

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAIS GERAIS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

Luana Luiza Bastos

**TRIAGEM VIRTUAL DE PROTEÍNAS COM INTERAÇÃO COM TNF- α NA
SALIVA DE *Ixodes scapularis***

Belo Horizonte

2021

Luana Luiza Bastos

**TRIAGEM VIRTUAL DE PROTEÍNAS COM INTERAÇÃO COM TNF- α NA
SALIVA DE *Ixodes scapularis***

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Bioinformática.

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Melo Minardi

Coorientador: Prof. Dr. Carlo Oliveira

Belo Horizonte

2021

043 Bastos, Luana Luiza.
Triagem virtual de proteínas com interação com TNF- α na saliva de *Ixodes scapularis* [manuscrito] / Luana Luiza Bastos. – 2021.
69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Melo Minardi. Coorientador: Prof. Dr. Carlo Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Citocinas. 3. Fator de Necrose Tumoral alfa. 4. Ixodes. 5. Proteínas e Peptídeos Salivares. I. Minardi, Raquel Cardoso de Melo. II. Oliveira, Carlo José Freire de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

LUANA LUIZA BASTOS

Às quatorze horas do dia **07 de dezembro de 2021**, reuniu-se, através do aplicativo Zoom, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Triagem Virtual de proteínas com interação com TNF-a na saliva de Ixodes scapularis**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Bioinformática**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Raquel Cardoso de Melo Minardi**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Professor(a)/Pesquisador(a)	Instituição	Indicação
Dra. Raquel Cardoso de Melo Minardi - Orientadora	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada
Dr. Carlo José Freire de Oliveira - Coorientador	Universidade Federal do Triângulo Mineiro	Aprovada
Dr. Lucas Bleicher	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada
Dr. Anderson de Sá Nunes	Universidade Federal de Minas Gerais	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Anderson de Sá Nunes, Usuário Externo**, em 09/12/2021, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Bleicher, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2021, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlo José Freire de Oliveira, Usuário Externo**, em 17/12/2021, às 06:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Tostes Gazzinelli, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2021, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Raquel Cardoso de Melo Minardi, Subcoordenador(a)**, em 02/05/2022, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por possibilitar a realização desse projeto, apesar de todas as dificuldades encontradas pelo caminho. Agradeço imensamente a minha família por todo apoio e compreensão durante todo esse período. Em especial a minha mãe Maria Luiza pelo apoio de sempre, por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não era capaz. Ao meu pai Amilton por sempre confiar em mim e no caminho que eu escolhi. Aos meus irmãos por me apoiarem nesse caminho, principalmente a Kênia Luiza, por todo suporte. Aos meus amigos pelo apoio e compreensão desde o início. Aos meus companheiros de jornada em especial a Letícia por ser minha dupla nessa caminhada e por todo apoio e ao Leandro por toda amizade. Agradeço a Dra. Raquel Melo Minardi, minha orientadora, por toda a confiança, ensinamentos e oportunidades, tem sido uma experiência incrível, e à Sra toda a minha admiração. Ao meu Coorientador Dr. Carlo Oliveira por toda sua contribuição ao trabalho.

Gostaria de agradecer às agências de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); ao Programa de Pós-graduação em Bioinformática da UFMG em especial aos membros da secretaria Sheila e Tiago por todo apoio e disponibilidade; e à equipe do Laboratório de Bioinformática e Sistemas pelo apoio e contribuição.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Edital Biologia Computacional. Número de processo 23038.004007/2014-82.

Resumo

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por linfócitos e macrófagos em resposta a diferentes estímulos. Embora a inflamação seja um mecanismo para proteger o organismo, uma reação inflamatória inadequada ou exacerbada pode resultar em danos aos tecidos e em casos graves pode causar falência de órgãos e morte. Atualmente drogas anti-TNF- α como Infliximabe e Adalimumabe são usadas no tratamento de doenças inflamatórias, incluindo espondilite anquilosante e doença de Crohn, no entanto, além dos importantes efeitos colaterais esses imunobiológicos são extremamente caros e de difícil acesso a população. Artrópodes hematófagos, especialmente os carrapatos, produzem substâncias bioativas com capacidade de modular a atividade de moléculas imunes incluindo citocinas. Konik e colaboradores, por exemplo, descreveram a atividade anti-TNF- α na saliva e extrato de glândula salivar de carrapatos *Ixodes ricinus*. Posteriormente, Rezková e Kopecký compararam a presença de atividade anti-TNF- α em 11 espécies de carrapatos da família *Ixodidae*, encontrando atividade em *Haemaphysalis concinna*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes scapularis*. Assim, a identificação e o isolamento de uma proteína com atividade anti-TNF- α na saliva de carrapato, abre possibilidades para utilização no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. No entanto um dos desafios da identificação e isolamento de proteínas e outras moléculas imunomoduladoras na saliva de carrapato por metodologias habituais como por exemplo por separação por reações imunes, microHPLC e identificação por espectrometria de massa é o grande número de compostos em quantidades muito pequenas, fazendo-se necessária a prospecção *in silico*. O objetivo do presente trabalho foi realizar a triagem virtual de proteínas de interação com o TNF- α na saliva de *Ixodes scapularis* utilizando modelagem molecular e docking. Foi realizada a modelagem molecular de 548 proteínas das quais 150 são proteínas de manutenção e 398 proteínas classificadas secretadas utilizando a ferramenta Robetta e verificadas utilizando o VERIFY 3D. As estruturas foram ancoradas a TNF- α inicialmente com docking rígido sem passagem de sítio pelas ferramentas ClusPro, Hdock e Zdock. As proteínas mais bem avaliadas para as três ferramentas foram submetidas a ferramenta de docking flexível SwarmDock, em seguida avaliadas as energias de ligação, número de resíduos de interação em comum com o receptor TNF-R2 e área de superfície enterrada. Foi identificada a proteína AAM93640.1, uma possível lipocalina de ligação à histamina que se liga às cadeias A e C de TNF- α . Esta proteína Realiza 137 contatos atômicos dos quais 4 são repulsivos, 10 contatos atrativos e 30 pontes de hidrogênio atômicas, além de 90 contatos atômicos hidrofóbicos obtendo uma energia de ligação de 144Å . Além disso, a lipocalina interage com 8 dos 13 resíduos que fazem parte do sítio de ligação do receptor TNF-R2. Levando em consideração as características favoráveis a utilização de lipocalinas como biofármacos sugere-se que a proteína AAM93640.1 é uma boa candidata a proteína com atividade inibidora de TNF- α .

Palavras-chave: TNF- α ; *Ixodes scapularis*; *cytokine by protein*; saliva; bioinformática; triagem virtual

Abstract

*Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine produced mainly by lymphocytes and macrophages in response to different stimuli. Although inflammation is a mechanism to protect the body, an inappropriate or exacerbated inflammatory reaction can result in tissue damage and in severe cases can cause organ failure and death. Currently anti-TNF- α drugs such as Infliximab and Adalimumab are used in the treatment of inflammatory diseases, including ankylosing spondylitis and Crohn's disease, however, in addition to the important side effects, these immunobiologicals are extremely expensive and difficult for the population to access. Hematophagous arthropods, especially ticks, produce bioactive substances capable of modulating the activity of immune molecules, including cytokines. Konik et al., for example, described anti-TNF- α activity in the saliva and salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks. Subsequently, Rezková and Kopecký compared the presence of anti-TNF- α activity in 11 tick species of the Ixodidae family, finding activity in *Haemaphysalis concinna*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes scapularis*. Thus, the identification and isolation of a protein with anti-TNF- α activity in tick saliva opens possibilities for use in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. However, one of the challenges of identifying and isolating proteins and other immunomodulatory molecules in tick saliva by common methodologies, such as separation by immune reactions, microHPLC and identification by mass spectrometry, is a large number of compounds in very small amounts, making the *in silico* prospecting is required. The aim of the present work was to perform a virtual screening of proteins that interact with TNF- α in the saliva of *Ixodes scapularis* using molecular modeling and docking. Molecular modeling of 548 proteins was performed, of which 150 are housekeeping proteins and 398 secreted proteins classified using the Robetta tool and verified using VERIFY 3D. The structures were anchored to TNF- α initially with rigid docking without site crossing using ClusPro, Hdock and Zdock tools. The best evaluated proteins for the three tools were submitted to the flexible SwarmDock docking tool, then binding energies, number of interaction residues in common with the TNF-R2 receptor and buried surface area were evaluated. Protein AAM93640.1 was identified, a possible histamine-binding lipocalin that binds to TNF- α A and C chains. This protein makes 137 atomic contacts of which 4 are repulsive, 10 attractive contacts and 30 atomic hydrogen bonds, in addition to 90 hydrophobic atomic contacts obtaining a binding energy of 144 Å. Furthermore, lipocalin interacts with 8 of the 13 residues that are part of the TNF-R2 receptor binding site. Taking into account the characteristics, considering the use of lipocalins as biopharmaceuticals, it is suggested that the AAM93640.1 protein is a good candidate for a protein with TNF- α inhibitory activity.*

Keywords: *TNF- α ; Ixodes scapularis; cytokine by protein; spittle ; bioinformatics; virtual screening*

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura em cristal de TNF- α em sua forma solúvel.	14
Figura 2. Diagrama da topologia TNF- α	15
Figura 3. Estrutura de TNF- α cadeia A.	16
Figura 4. Estruturas de TNF- α demonstram regiões hidrofóbicas e hidrofílicas.	16
Figura 5. Representação das estruturas de TNF-R1 e TNF-R2	17
Figura 6. Esquema da via de sinalização mediada por TNF-R1 e STNF-R2	20
Figura 7 . Estrutura de TNF- α complexada com TNF-R2.	21
Figura 8. Esquema ciclo de vida do carrapato.	23
Figura 9. Esquema metodológico	32
Figura 10. Valor de confiança Robetta proteínas secretadas	38
Figura 11. Valor de confiança Robetta proteínas de manutenção	39
Figura 12. Correlação de afinidade de ligação das proteínas secretadas	40
Figura 13. Correlação de afinidade de ligação das proteínas de manutenção	40
Figura 14. Estrutura modelada proteína AAM 93640.1	47
Figura 15. Avaliação estrutura AAM93640.1 no VERIFY 3D	47
Figura 16. Avaliação estrutura AAM93640.1 no Ramachandran Plot	48
Figura 17. Estrutura de AAM93640.1 demonstra regiões hidrofóbicas e hidrofílicas	49
Figura 18. Complexo TNF- AAM93640.1 cadeia A-D	49
Figura 19. Complexo TNF- AAM93640.1 cadeia C-D	50
Figura 20. Contato atrativo entre os resíduos E146-R273	50
Figura 21. Empilhamento atrativo entre os resíduos E146-R273	51
Figura 22. Interface de interação AAM93640.1	51
Figura 23. Interface de interação TNF- α	52

Lista de Tabelas

Tabela 1. Preço dos medicamentos para artrite reumatoide, gasto anual	28
Tabela 2. Tabela de referência de energia de contatos	37
Tabela 3. Proteínas selecionadas após o docking rígido	41
Tabela 4. Avaliação de contatos e cálculo de energia dos complexos selecionados	42
Tabela 5. Resíduos de ligação em comum com o sítio do receptor TNF-R2	43
Tabela 6. Resíduos participantes da interação a menos de 5 Å	44
Tabela 7. Área de superfície enterrada (BSA)Å ²	44
Tabela 8. Média final das métricas de avaliação	45
Tabela 9. Blast proteína AAM93640.1	53
Tabela 10. Principais contatos atômicos AAM93640.1-TNF- α cadeia A-D	60
Tabela 11. Principais contatos atômicos AAM93640.1-TNF- α cadeia C-D	67

Lista de Abreviações

PDB: *Protein Data Bank*

TNF- α : *Tumor necrosis factor*

TACE: *TNF α Converting Enzyme*

TNFR1: *Receptor de TNF- α 1*

TNFR2: *Receptor de TNF- α 2*

CRDS: *Cysteine-Rich Domains*

TNFR: *Tumor necrosis factor receptors*

DD: *Death Domain*

NK: *Natural Killers*

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa B*

TRADD: *TNFR-Associated-Death-Domain*

PLADs: *Pre-ligand Assembly Domains*

SOOD: *Silencer of Death Domain*

RIP-1: *Receptor Interacting Protein 1*

TRAF-2: *TNFR-Associated Factor 2*

MEKK-3: *Mitogen Activated protein kinase kinase kinases*

TAK: *Factor-beta (TGF β) -activated kinase*

IKK: *activate the β -subunit of the inhibitor of κ B (I κ B) kinase*

cIAP: *Inhibitor of cellular apoptosis proteins*

ASK-1: *Apoptosis-Signaling Kinase-1*

JNKs: *c-Jun N-terminal kinases*

p38 MAPKs: *p38 mitogen-activated protein kinase*

AP-1: *Activator protein 1*

CBP: *cAMP-response-element-binding-protein-binding protein*

FADD: *Fas-Associated DD protein*

ETK: Endothelial/epithelial Tyrosine Kinase

PI3K: *TNF-induced phosphatidylinositol 3-kinase*

VEGFR2: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

COX-2: ciclooxigenase 2

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

FDA: *Food and Drug Administration*

EMA: *European Medicines Agency*

PSO: *Partide Swarm Optimization*

BLAS: *Basic Linear Algebra Subprograms*

BSA: *Buried Surface Area*

FFT: *Fast Fourier Transform*

Sumário

1. Introdução	13
1.1 TNF-α	13
1.1.1 Estrutura	14
1.1.2 Função e sinalização	17
1.2 Carrapatos	22
1.2.1 <i>Ixodes scapularis</i>	24
1.2.2 Saliva	25
1.2.3 Atividade Anti-TNF- α	26
1.3 Justificativa	28
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 Coleta de dados	31
3.2 Modelagem Molecular	31
3.3 Docking Rígido	33
3.4 Docking Flexível	35
4. Resultados e discussões	38
5. Conclusões	53
6. Perspectivas	54
7. Referências bibliográficas	55
8. Apêndices	60

1. Introdução

1.1 TNF- α

A presença de moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas, é de extrema importância para a ativação de células efetoras da imunidade inata e da imunidade adquirida. Dentre as diferentes moléculas com essa capacidade, podemos destacar a citocina fator de necrose tumoral α (TNF- α do inglês, Tumour necrosis factor α) visto que é um dos principais mediadores dessas respostas inflamatórias e imunes em mamíferos (BRADLEY, 2008; CARSWELL et al., 1975; D et al., 1985; ECK; SPRANG, 1989).

A citocina foi identificada em 1975 por Carswell e colaboradores, durante o estudo da necrose hemorrágica de tumores produzidos por endotoxinas. Em 1985, o TNF- α foi clonado pela primeira vez por D. Pennica e colaboradores e demonstrou induzir necrose hemorrágica em camundongos (BRADLEY, 2008; CARSWELL et al., 1975; D et al., 1985; ECK; SPRANG, 1989). Sua produção é realizada predominantemente por macrófagos ativados e linfócitos, no entanto em condições inflamatórias pode ser produzido por uma grande gama de células, dentre elas mastócitos, linfócitos T e B, células endoteliais, neutrófilos, células musculares, cardíacas, fibroblastos, osteoblastos, e células exterminadoras naturais ou células NK (do inglês Natural Killer Cell) (BRADLEY, 2008; HORIUCHI et al., 2010).

O TNF- α é gerado como uma forma precursora chamada TNF- α transmembrana, que é expressa como um polipeptídeo de superfície celular do tipo II, de 233 resíduos de aminoácidos (26 kDa). Depois de ser processado por metaloproteinases como a enzima conversora de TNF (TACE do inglês TNF Converting Enzyme) que cliva a estrutura de TNF- α entre os resíduos alanina 76 e valina 77, a forma solúvel de TNF- α de 157 resíduos de aminoácidos (17 kDa) é liberada. E medeia suas atividades biológicas através da ligação com os receptores de TNF- α 1 (TNF-R1) e receptor de TNF- α 2 (TNF-R2). Tanto o TNF- α em sua forma solúvel, quanto sua forma transmembrana são biologicamente ativas. O TNF- α transmembrana exerce sua função biológica no contato célula a célula, enquanto o TNF- α solúvel, atua em locais remotos das células produtoras da citocina. O TNF- α transmembrana também se liga a ambos os receptores, mas suas atividades biológicas são mediadas principalmente por TNF-R2 (BRADLEY, 2008; HORIUCHI et al., 2010).

1.1.1 Estrutura

A estrutura de TNF- α humana solúvel, foi resolvida em 1989 por Eck e Sprang e publicada no ano seguinte, identificada no *Protein Data Bank* (PDB) como 1TNF. Sua estrutura (**Figura 1**) foi resolvida por difração de raio x, em uma resolução de 2,600 Å e R-value de 0,23, e seu refinamento foi realizado utilizando X-PLOR (ECK; SPRANG, 1989).

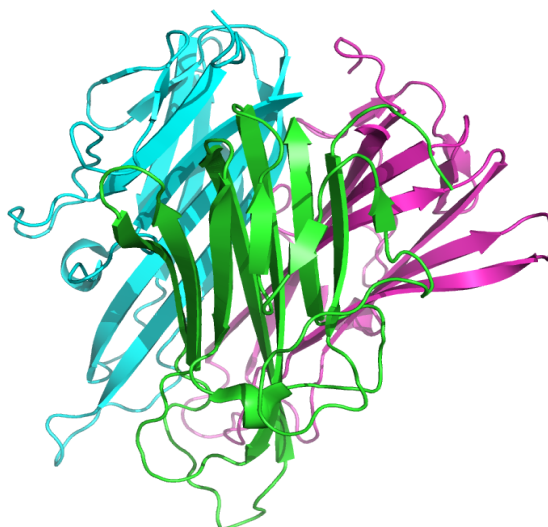


Figura 1. Estrutura em cristal de TNF- α em sua forma solúvel. Em verde cadeia A, em azul cadeia B e em roxo cadeia C.
Fonte: O próprio autor

A proteína é um homotrímero o que corresponde a uma estrutura formada por três monômeros. Apresenta um total de 52,106 kDa, 3.552 átomos, 471 resíduos, distribuídos em três cadeias idênticas de 157 aminoácidos. (ECK; SPRANG, 1989).

Cada monômero, forma um alongado e antiparalelo β sanduíche do inglês *β sandwich*, o que corresponde a uma estrutura composta por duas folhas β antiparalelas. Nesse caso trata-se de folhas β pregueadas, nas quais os grupos aminos (NH) de uma folha beta totalmente estendida, interagem formando ligações de hidrogênio com os grupos carbonila (C=O) da fita adjacente. Os monômeros possuem topologia rolo suíço do inglês *Jelly roll*, a qual é definida como uma dobra proteica super secundária composta por oito fitas β compostas em duas folhas de quatro fios. A topologia do monômero é representada na (**Figura 2**) (ECK; SPRANG, 1989).

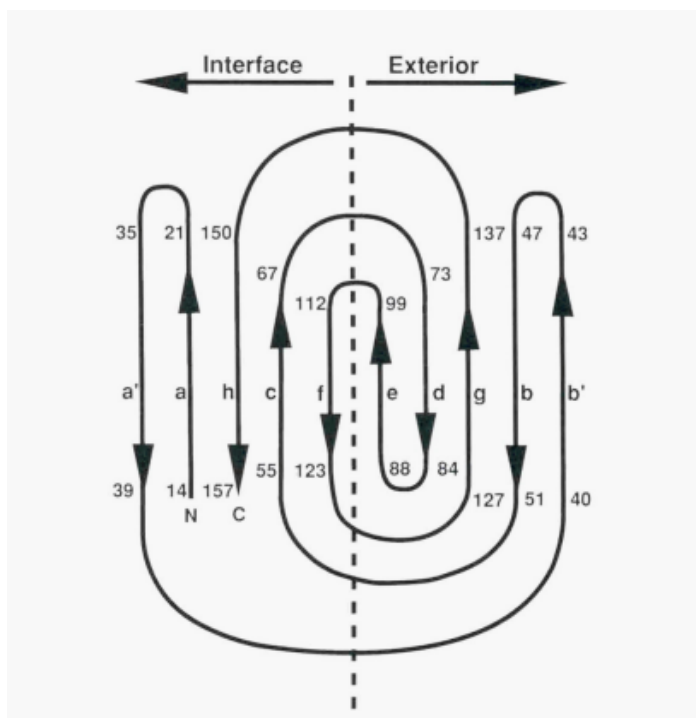


Figura 2. Diagrama da topologia

O monômero TNF é composto por dez fios; os cinco fios à esquerda da linha tracejada formam a folha interna do β -sheet sandwich. O layout dos fios é aquele que seria obtido se as folhas do β -sandwich fossem abertas como um livro. As cadeias são marcadas na ordem em que se seguem na sequência polipeptídica seguindo a ordem de a-h. a' e b' apresentam excursões da fita b que formam fios curtos adicionais que se comprimem contra os fios a e b, respectivamente.

Fonte: (ECK; SPRANG, 1989).

A folha interna é composta pelas fitas (a, c, f e h), elas estão envolvidas nos contatos internos que formam o trímero enquanto as folhas (b, g, d e e) formam a superfície externa. Tanto as folhas internas quanto as externas são formadas por 5 folhas β . As folhas internas voltadas para o eixo do trímero são essencialmente planas, enquanto as folhas externas são altamente curvadas. Observa-se que as folhas são torcidas em cerca de 60° em sentido horário (ECK; SPRANG, 1989).

Há três segmentos helicoidais em TNF- α , nenhum deles se estende por mais de uma volta. Os segmentos são formados pelos resíduos 106-110, 138-142, 145-150 (**Figura 3**). Existe uma ponte dissulfeto entre os resíduos 69-101 que conecta os fios e e f com os fios c e d. Também são encontrados na estrutura loops que conectam os fios, sendo formados pelos resíduos de 37-42 conectando o fio a ao b, e o loop formado pelos resíduos 49-57 conectando o fio b ao c (ECK; SPRANG, 1989).

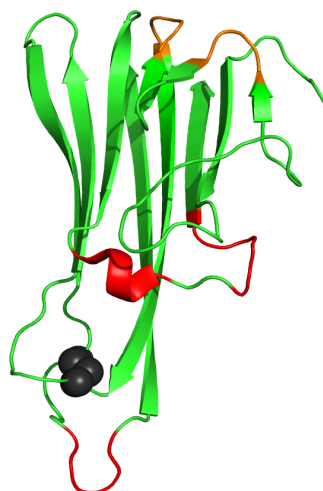


Figura 3. Estrutura de TNF- α cadeia A.

Em preto é destacada a ligação dissulfeto presente no monômero, em vermelho são destacados os segmentos helicoidais e em laranja é destacado os loops.

Fonte: O próprio autor.

A distribuição espacial das cadeias laterais dos resíduos em TNF- α é típico de proteínas β sanduíche, o interior da subunidade é compactado, em grande parte, com as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Existem sequências curtas de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos que se alternam nas folhas externas (**Figura 4**) (ECK; SPRANG, 1989).

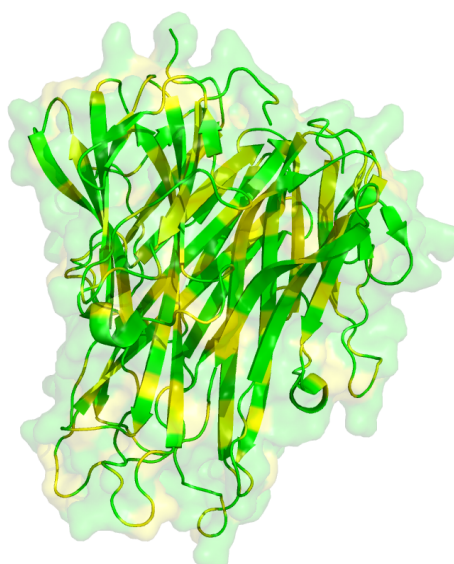


Figura 4. Estrutura de TNF- α demonstra regiões hidrofóbicas e hidrofílicas.

Marcados em amarelo estão os resíduos hidrofóbicos e em verde os resíduos hidrofílicos.

Fonte: O próprio autor.

1.1.2 Função e sinalização

A sinalização mediada por TNF- α é dependente da ligação com os receptores TNF-R1 e TNF-R2. Os receptores interagem com moléculas iguais e diferentes, o que os torna capazes de ativar vias em comum e distintas. O TNF-R1 é mais associado à ativação das vias pró-inflamatórias e de morte celular, enquanto que TNF-R2 é mais associado a vias de reparo tecidual e angiogênese (BRADLEY, 2008; ECK; SPRANG, 1989; HORIUCHI *et al.*, 2010).

Ambos os receptores são transmembranares e membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR do inglês *Tumor necrosis factor receptors*) e como os demais membros eles possuem domínios ricos em cisteína (CRDS do inglês *Cysteine-Rich Domains*) sendo caracterizados por possuírem de 2 a 4 CRDS, que formam 3 ligações dissulfeto cada um. Os receptores possuem 4 CRDs, (**Figura 5**) nos quais CRD1 e CRD2 apresentam homologia cerca de 30%, enquanto os demais domínios não possuem homologia (MUKAI *et al.*, 2009, 2010; TARTAGLIA *et al.*, 1993).

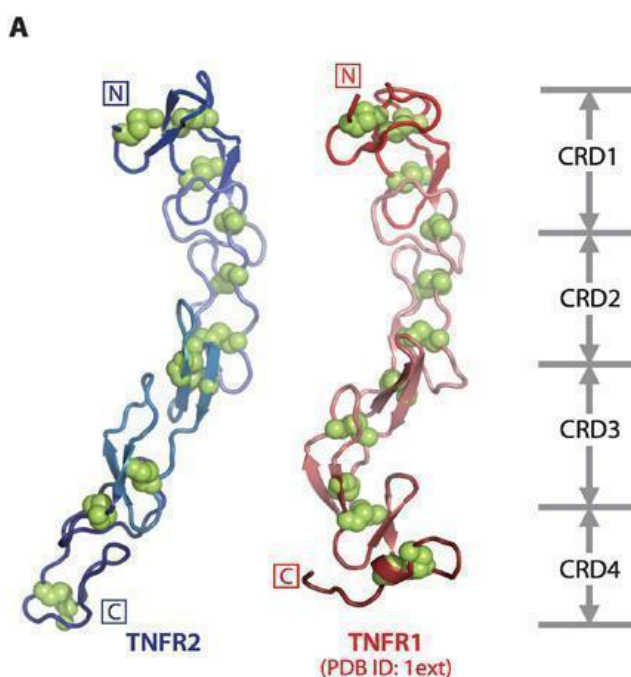


Figura 5. Representação das estruturas de TNF-R1 e TNF-R2. Em verde estão destacadas as cisteínas presentes nas CRDs

Fonte: Imagem modificada de (MUKAI *et al.*, 2010)

O TNF-R1 possui um domínio de morte (DD do inglês *Death Domains*), uma região de cerca de 80 resíduos localizada na parte intracelular do receptor, próximo ao C-terminal, que é responsável por sua citotoxicidade. Sua via de sinalização se inicia a partir da ligação com TNF- α , o que faz com que o silenciador do domínio de morte (SOOD do inglês *silencer*

of death domain) se dissocie da ligação com a região DD do receptor. A região DD liga-se à proteína do domínio de morte associada ao TNFR1 (TRADD do inglês *TNFR1-Associated DD Protein*) (**Figura 6**) (BRADLEY, 2008; POBEZINSKAYA; LIU, 2012).

A TRADD é uma proteína, que possui em sua estrutura um DD e interage com TNFR1 mediando a sinalização da morte celular programada e a ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB *do inglês Nuclear Factor kappa B*), um complexo proteico que controla a transcrição, produção de citocinas e sobrevivência celular. A sinalização prossegue com o recrutamento realizado por TRADD de duas proteínas. A proteína de interação com o receptor 1 (RIP-1 do inglês *Receptor Interacting Protein 1*) uma serina-treonina quinase que se liga à TRADD através de sua região DD, e o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF-2 do inglês *TNFR-Associated Factor 2*), uma ubiquitina ligase E3 que se trata de uma proteína que recruta enzimas conjugadoras de ubiquitina. Essa conjugação de proteínas TRADD-RIP-1-TRAF-2 é liberada de TNF-R1 após sua junção (POBEZINSKAYA; LIU, 2012).

Em seguida, a sinalização envolve o recrutamento e ativação de diferentes proteínas quinase quinase quinase ativada por mitógeno (MP3K do inglês *Mitogen-activated Protein kinase kinase kinase 3*). RIP-1 medeia o recrutamento da quinase 1 ativada pelo fator de crescimento β (TAK do inglês *TGF- β -activated kinase 1*), que por sua vez promove a ativação do complexo de quinases I κ B (Inibidor do fator nuclear kappa B) denominada IKK. IKK gera a fosforilação de proteínas I κ B, sinalizando sua ubiquitinação e a degradação mediada por proteossomo, permitindo que o fator NF-kB entre no núcleo e inicie a transcrição dos genes (BRADLEY, 2008; KARIN, 1999; KIM; CHOI, 2012).

TRAF-2 pode contribuir para a ativação de NF-kB, se ligando ao complexo IKK, e por meio do recrutamento de inibidores de proteínas de apoptose celular (cIAP do inglês *Inhibitor of cellular apoptosis proteins*). O complexo TRADD-RIP-1-TRAF-2 também pode recrutar a quinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK-1 do inglês *Apoptosis-Signalling Kinase-1*). O fator ativa MAP3K fosforila e ativa as c-Jun N-terminal quinases (JNKs) proteína quinases ativadas por mitógeno (*p38 MAPKs*) uma classe de MAPKs que respondem o estresse com a citocinas. JNKs ativadas fosforilam a região C-jun, uma subunidade da proteína ativadora do fator de transcrição (AP-1), o que permite a reação de proteína de ligação a elemento de resposta cAMP(CBP/p300) (BRADLEY, 2008).

Além de mediar a sobrevivência celular e os sinais pró-inflamatórios, por meio NF-kB

e AP-1, TNF-R1 pode iniciar as vias de sinalização da morte celular. Essa sinalização envolve a ligação da proteína DD associada a Fas (FADD do inglês *Fas-Associated DD protein*) que se associa à proteína TRADD, formando o complexo TRADD-FADD, recrutando as pró-caspases 8, que libera a caspase 8 ativada, e inicia a apoptose através da clivagem e ativação da pró-caspase 3 (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009, 2010)

As vias de sinalização de TNF-R2 ainda não são claramente definidas. O TNF-R2 não possui o DD, no entanto ainda sim pode interagir com o TRAF-2 que se liga diretamente ao receptor (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009).

O TNF-R2 também pode ativar a tirosina quinase endotelial / epitelial (ETK do inglês *Endothelial/epithelia Tyrosine Kinase*) que implica na adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular independente de TRAF-2. ETK é um regulador das junções de células epiteliais e participa da mediação da angiogênese através da Fosfatidilinositol 3-quinase induzida por TNF (PI3K do inglês *TNF-induced phosphatidylinositol 3-kinase*) que é mediada por ETK que se liga ao receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2 do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009).

O receptor se associa a uma forma inativa de ETK de forma independente, por meio da sequência de 16 aminoácidos no terminal de TNF-R2. Acredita-se que o TNF- α induz uma mudança conformacional em TNF-R2 que desencadeia no desdobramento da forma fechada e inativa de ETK. Nas células endoteliais, o TNF- α induz a montagem de um complexo trimolecular contendo TNFR2-ETK-VEGFR2, que resulta na ativação de PI3K (**Figura 6**) (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009).

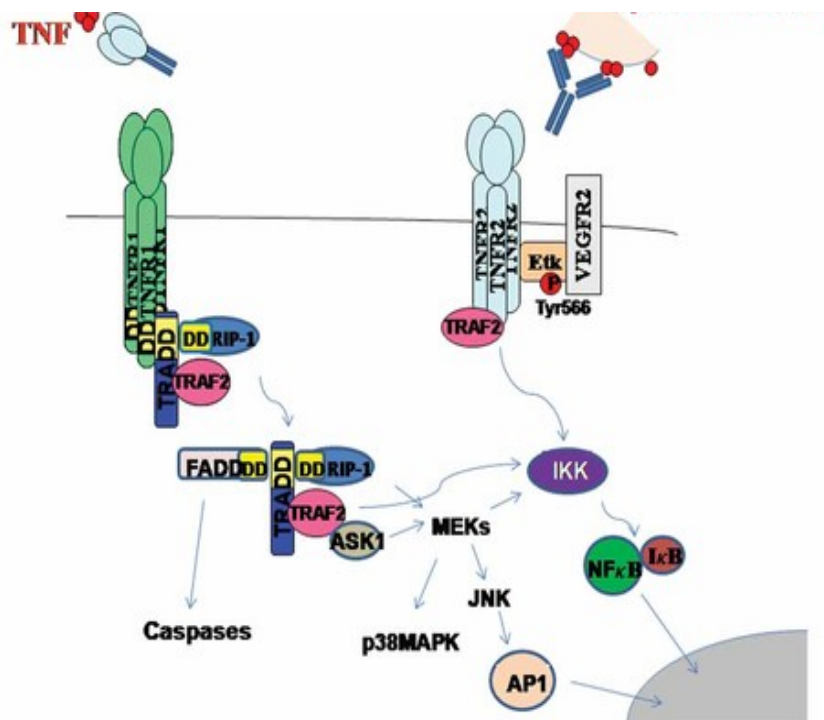


Figura 6. Esquema da via de sinalização mediada por TNF-R1 e TNF-R2.

Fonte: Imagem modificada de (BRADLEY, 2008)

Tanto TNF-R1 quanto TNF-R2, são expressos na maioria das linhagens celulares e tecidos primários. A expressão dos receptores é regulada pela presença de citocinas pró-inflamatórias como o próprio TNF- α , interleucina 1 (IL-1) e interleucina 2 (IL-2) (BRADLEY, 2008).

Muitos dos efeitos pró-inflamatórias de TNF- α , podem ser explicados com base nos efeitos da citocina no endotélio vascular e nas interações com leucócitos endoteliais. Em resposta a TNF- α durante a inflamação, as células endoteliais exibem um modelo temporal, espacial e anatômico distinto, essa resposta gera o recrutamento de diferentes populações de leucócitos. Além disso, a expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) induzida por TNF- α pode aumentar a produção de prostaciclina, resultando em vasodilatação, causando rubor e calor por meio do aumento do fluxo sanguíneo local, que são sinais clássicos de inflamação (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI et al., 2009).

Os receptores se conectam a citocina se ligando entre duas cadeias de TNF- α , logo um trímero que é a forma ativa de TNF- α , poderia interagir com três moléculas do receptor (**Figura 7**). Os receptores interagem com os seguintes resíduos da interface de TNF- α : Gln-21, Glu-23, Arg-31, Arg-32, Ala-33, Asp-143, Phe-144, Ala-145, Glu-146, Gln-149, Ser-86, His-73, Tyr-87. Destaca-se o resíduo Arg-31, que quando mutado conferiu menos

afinidade de ligação da citocina com os receptores (IDRISS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2010).

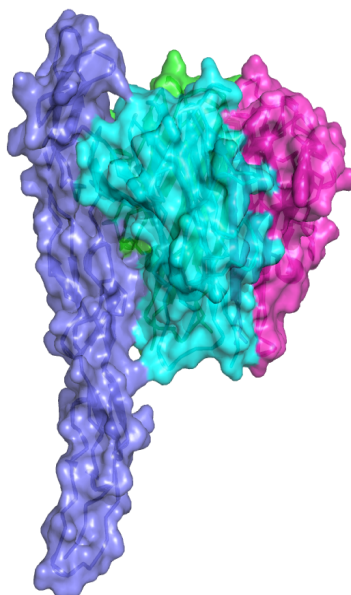


Figura 7. Estrutura de TNF- α complexada com TNF-R2.

Em verde está representada a cadeia A da citocina, em azul cadeia B, em roxo cadeia C. Em azul escuro é representado o receptor TNF-R2. Nota-se que o receptor está ligado entre a cadeia A e B

Fonte: O próprio autor.

Como visto anteriormente, o TNF- α tem um papel fundamental no processo inflamatório do organismo, bem como na defesa do hospedeiro quanto à invasão de vírus, bactérias e parasitas, dentre outros agentes agressores. No entanto uma produção exacerbada, pode ser prejudicial ao organismo, bem como ter um papel central em diversas patologias imunomediadas (BRADLEY, 2008; IDRISS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009).

Dentre tantas doenças imunomediadas é possível citar a artrite reumatoide, uma doença autoimune que se caracteriza pela inflamação do tecido sinovial que leva a danos progressivos e a erosão da cartilagem e ossos adjacentes. Neste caso uma das principais características da doença é o acúmulo de células T e B, macrófagos, células dendríticas na região, gerando uma hiperplasia sinovial e angiogênese. Na articulação inflamada são produzidas citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , o que faz com que a sinalização inflamatória seja constantemente ativada. Outro exemplo é a psoríase, uma doença inflamatória da pele, na qual um infiltrado de células inflamatórias está associado a lesões hiperkeratóticas, dando origem a placas psoriáticas típicas, nas quais o TNF- α se encontra em níveis elevados (BRADLEY, 2008; IDRISS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009).

Nessas doenças e em outras que se relacionam a altos níveis de TNF- α , uma das ferramentas utilizadas para o tratamento de tais doenças é a inibição da citocina. Esse bloqueio é realizado utilizando anticorpos inibidores de TNF- α , atualmente 5 moléculas são aprovadas para uso medicamentoso, sendo elas: certolizumabe, golimumabe, adalimumabe, infliximabe e etanercept. Sabe-se que sua utilização apresentou bons resultados (BAUGHMAN *et al.*, 2006; ELLIOTT *et al.*, 1993; HU *et al.*, 2013), no entanto deve levar-se em consideração o risco benefício apresentado pela abordagem de tratamento, uma vez que a inativação de TNF- α por esses anticorpos apresenta alguns efeitos colaterais e diminui em certos níveis a capacidade do organismo de gerar resposta inflamatória em um processo infeccioso (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009).

1.2 Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos, que se alimentam exclusivamente de sangue. São classificados na classe *Arachnida*, subclasse *Acarina*, ordem *Ixodida*. Existem 899 espécies de carrapatos conhecidas, divididas em duas famílias principais, o carrapato mole (*Argasidae*) e o carrapato duro (*Ixodidae*). Uma terceira família, *Nuttalliellidae*, existe, mas com uma única espécie. Os carrapatos moles se alimentam de forma relativamente rápida, enquanto os duros se alimentam por vários dias ou semanas (HORAK; CAMICAS; KEIRANS, 2002).

A estrutura do carrapato é formada por duas partes principais, capítulo (gnathostoma) ou aparelho bucal e o corpo (idiossoma) onde ficam aderidas as patas. Em geral, carrapatos moles são caracterizados por apresentarem aparelho bucal posicionado sub terminalmente, apresentando tegumento coriáceo altamente esculpido, e ausência de escudo dorsal. Enquanto carrapatos duros apresentam aparelho bucal posicionado anteriormente, tegumento estriado e escudo dorsal (LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

Seu ciclo de vida inclui as fases (**Figura 8**): ovo, larva, ninfas e adultos machos e fêmeas. Na fase de larva o carrapato apresenta 6 patas enquanto ninfas e adultos apresentam 8 patas. Carrapatos podem ter um período de vida relativamente longo, pertencentes a *Ixodidae* vivem entre 2 a 6 anos, enquanto que *Argasidae* vivem até 20 anos (LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

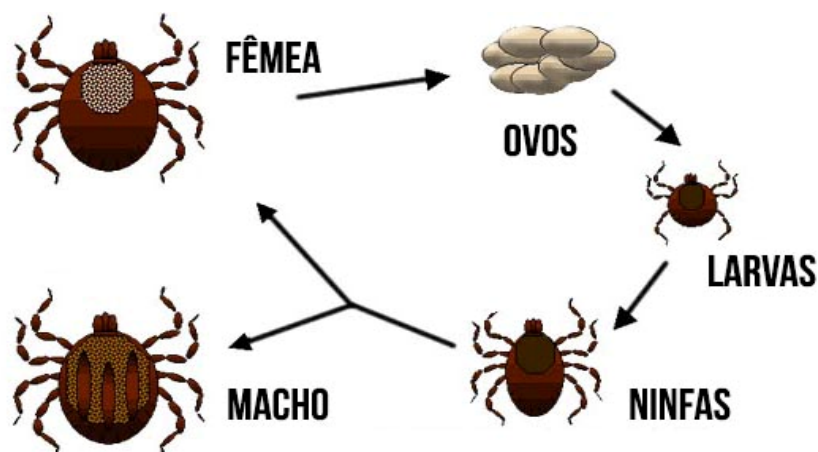


Figura 8. Esquema ciclo de vida do carrapato.

Fonte: Imagem retirada de (extinset.com.br)

As refeições de sangue são essenciais para a sobrevivência, crescimento e reprodução dos artrópodes. O processo de alimentação é iniciado na fase de apetência onde o artrópode procura um hospedeiro para a alimentação, os estímulos que induzem tal processo incluem odor, vibração e sombreamento, além do toque e temperatura. Os fatores anteriormente citados levam ao engajamento. Nesse processo o carrapato se adere à pele do hospedeiro (LÜTHY et al., 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020)..

Após a penetração, as quelíceras (apêndices localizados no aparelho bucal que possuem articulação e estão associados ao movimento predatório), são utilizadas para “provar” os hospedeiros. Em seguida o carrapato se agarra à superfície da pele e as quelíceras realizam o corte. Os dentes presentes no hipostômio (uma parte participante do aparelho bucal, que participa do processo de fixação no hospedeiro) se projetam e são inseridos na região. Em carrapatos da família Ixodidae nesse processo uma substância proteica semelhante ao cimento é secretada ao redor da região onde foi realizada a adesão mantendo a fixação no processo de adesão (LÜTHY et al., 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

Na fase de ingestão, o canal de alimentação é utilizado tanto para a realização da ingestão de fluidos do hospedeiro quanto para injetar saliva. Em seguida é feito o processo de ingurgitação onde o carrapato completa sua refeição, e desprende o aparelho bucal. Por último é feito o desligamento do hospedeiro (LÜTHY et al., 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

1.2.1 *Ixodes scapularis*

Os carrapatos da espécie *Ixodes scapularis*, também conhecido como carrapato de patas pretas, é pertencente à família *Ixodidae* e ao gênero *Ixodes*. Possui um ciclo de vida de 2 anos e três estágios: larva, ninfa e adultos. O *Ixodes scapularis* é considerado um carrapato de três hospedeiros, no qual a alimentação ocorre uma vez em cada estágio da vida (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; CAO *et al.*, 2020; LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

A fêmea adulta depende de uma refeição completa de sangue para obter as proteínas necessárias para a produção de ovos. As larvas eclodem de ovos fertilizados e se alimentam uma vez por dois ou mais dias de camundongos e pequenos mamíferos e após isso se transformam em ninfas. As ninfas não são meticulosas quanto aos hospedeiros de que se alimentam, os quais se incluem humanos. Após essa refeição, as ninfas transformam-se em adultos. Carrapatos adultos podem se alimentar de humanos e transmitir agentes infecciosos, mas geralmente buscam sua refeição de sangue de animais de grande porte (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; CAO *et al.*, 2020; LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

O *Ixodes scapularis* é um dos principais vetores da doença de Lyme na América do Norte. A doença é provocada pelas espiroquetas da espécie *Borrelia burgdorferi* e é transmitida principalmente por *I. scapularis* na fase de ninfas. Os sintomas em humanos podem incluir eritema migrans em aproximadamente 50% dos pacientes, e os sinais em humanos e em outros mamíferos podem incluir febre, claudicação, apatia, anorexia, linfadenopatia e edema articular (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; CAO *et al.*, 2020; LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

Entre os aproximadamente 50.000 casos de doenças transmitidas por vetores adquiridos localmente relatados anualmente nos Estados Unidos, aproximadamente 95% são causados por patógenos transmitidos por carrapatos e > 70% desses casos correspondem à doença de Lyme. Novos patógenos humanos transmitidos por *I. scapularis* continuam a ser descobertos. Em 2017, sete microrganismos transmitidos, incluindo bactérias (*Anaplasma phagocytophilum*, *Bo. Burgdorferi*, *Bo. Mayonii*, *Bo. Miyamotoi*), um protozoário parasita (*Babesia microti*) e um vírus (vírus de Powassan), foram reconhecidos como transmitidos por *Ixodes scapularis*. O reconhecimento dessa associação diversa de patógenos transmitidos por *I. scapularis* nas últimas cinco décadas marca uma mudança significativa na percepção da

importância médica do carrapato, uma vez que antes de 1970, *Ixodes scapularis* não era considerado um vetor importante de patógenos humanos (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; CAO *et al.*, 2020; LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

1.2.2 Saliva

Como sabemos, carrapatos necessitam de realizar a alimentação de sangue, para completar seu desenvolvimento e manter o ciclo de vida. O organismo do hospedeiro, no entanto durante um processo de invasão e uma picada de animal, como é o caso do carrapato, tende a ativar o sistema de defesa, com vias pró-inflamatórias e imunomoduladoras, formação de um tampão hemostático gerando vasoconstrição, e remodelação de tecidos. Se bem-sucedidos, esses processos levariam a rejeição do carrapato impedindo a fixação e que a alimentação fosse completada. Para driblar o sistema de defesa do hospedeiro, um mecanismo fundamental é a injeção de saliva, que contém moléculas anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras que facilitam a realização de uma alimentação satisfatória (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; ŠIMO *et al.*, 2017)

A glândula salivar desempenha diversas funções tanto durante o processo de ligação ao hospedeiro como fora dele. Dentre as quais estão absorção de umidade da atmosfera insaturada, concentração da porção nutritiva da refeição de sangue pela eliminação do excesso de fluidos, produção de fluido proteico que ancora o hipostômio na pele do hospedeiro em carrapatos duros, além da secreção de moléculas biologicamente ativas que participam da imunomodulação do hospedeiro (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; ŠIMO *et al.*, 2017)

Em fêmeas tanto *ixodidae* e *argasidae* a glândula salivar consiste em um grande número de ácinos (ou alvéolos) de três tipos diferentes (tipo I, II e III) em *ixodídeos* e dois tipos diferentes (tipos I e II) em carrapatos *argasídeos*. Os machos *ixodídeos* possuem um quarto tipo (tipo IV) de ácinos em sua glândula salivar. Os ácinos do tipo I agranulares conectam-se quase exclusivamente à parte anterior do ducto salivar principal, enquanto os ácinos do tipo II e III granulares estão associados a dutos secundários e terciários localizados mais distalmente, respectivamente (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; ŠIMO *et al.*, 2017).

Os ácinos agranulares são morfológicamente semelhantes em carrapatos duros e moles e compreendem quatro tipos de células distintas: uma única célula lamelada central, várias células lameladas periféricas, células peritubulares e uma célula circunluminal. Nos ácinos

tipo II e III, além de vários tipos de células agranulares (como células epiteliais, adluminais, intersticiais abluminal) várias células glandulares (divididas em tipos dependendo da espécie de carrapato) foram relatadas. Durante a alimentação de fêmeas *ixodídeos*, a maioria das células acinares de ambos os ácinos tipo II e III sofrem hipertrofia acentuada, resultando no aumento geral da massa da glândula salivar (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; ŠIMO *et al.*, 2017).

Em sua composição, a saliva contém muitas substâncias proteicas e não proteicas. Tais moléculas são produzidas diferencialmente durante o processo de alimentação, com o objetivo de manter o carrapato aderido a seu hospedeiro por mais tempo, uma vez que quando passa por um processo de agressão o organismo do hospedeiro ativa sua cascata imunológica com vias de coagulação, inflamação, agregação plaquetária, bem como o recrutamento de células de defesa, o que resultaria numa interrupção na alimentação do carrapato. No entanto, durante o processo de alimentação é injetada a saliva no hospedeiro, que contém moléculas imunomoduladoras que impedem que esse processo ocorra, as quais compreendem vasodilatadores, anti-inflamatórios, inibidores de agregação plaquetária e inibidores de coagulação (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; ŠIMO *et al.*, 2017).

Com o objetivo de compreender as substâncias presentes na saliva, bem como identificar moléculas com atividade farmacológica, diversos estudos foram e estão sendo realizados sobre tais substâncias. Os primeiros estudos de que se tem registro datam da primeira década do século XXI (FRANCISCHETTI *et al.*, 2008; FRANCISCHETTI; MATHER; RIBEIRO, 2005; MADDEN; SAUER; DILLWITH, 2004; NARASIMHAN *et al.*, 2007) Diversas moléculas já foram identificadas em várias espécies, dentre elas prostaciclina e prostaglandinas que atuam no processo de vasodilatação e vasoconstrição, metaloproteases que atuam na angiogênese, evasinas que modulam as atividades de quimiocinas, dentre outras (KAZIMÍROVÁ; ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; ŠIMO *et al.*, 2017, LÜTHY *et al.*, 1992; NARASIMHAN *et al.*, 2020; WOLF *et al.*, 2020).

1.2.3 Atividade Anti-TNF- α

Em 2006, Konik e colaboradores identificaram uma atividade inibidora de TNF- α na saliva e no extrato da glândula salivar de *Ixodes ricinus*. O experimento utilizou ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) ou ensaio de imunoabsorção enzimática, que consiste em um teste enzimático que permite a identificação de anticorpos específicos. Foram utilizados

anticorpos específicos para TNF- α humano e de camundongos (KONÍK *et al.*, 2006).

No estudo foi demonstrado que a saliva, bem como o extrato da glândula salivar de *Ixodes ricinus*, reduziram significativamente o nível da citocina. Realizando um experimento de digestão por tripsina (uma proteína que participa do processo de digestão, promovendo a quebra de proteínas em peptídeos menores), processo no qual ocorreu a perda da atividade inibitória do TNF- α , demonstrando que o fator que gera tal atividade é uma proteína. Em seguida foi realizado um experimento de fracionamento rápido por cromatina líquida nas proteínas da saliva e extrato da glândula salivar, onde foi identificado um pico de inibição de TNF- α , correspondente a uma proteína de massa molar de 23 kDa. Sugeriu-se que o mecanismo envolvido na inibição da citocina, seja a ligação direta com a proteína (KONÍK *et al.*, 2006).

A identificação de uma atividade inibidora de TNF- α , despertou o interesse da identificação de tal proteína, bem como a identificação da existência da mesma atividade em outras espécies. Anos mais tarde, em 2017, Kezková e Kopecky, compararam a presença de inibição de TNF- α em 11 espécies de carrapatos da família Ixodidae, sendo elas *Amblyomma americanum*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *I. hexagonus*, *I. scapularis*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. pulchellus* e *R. sanguineus*. Sendo utilizadas no experimento fêmeas parcialmente alimentadas em um período de 6-7 dias (REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

O teste foi realizado utilizando ELISA para estimar o efeito de inibição da TNF- α na saliva de carrapato e sua glândula salivar. Como resultado foi encontrada inibição para a citocina nos carrapatos do gênero *Ixodes* e *Haemaphysalis*, enquanto os carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, *Dermacentor* e *Amblyomma* não apresentam atividade inibidora de TNF- α (REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

Levando em consideração que a forma ativa de TNF- α é em trímero e que a clivagem da estrutura por uma protease inibiria sua função, testou-se se a presença de atividade inibidora diminuiria após o tratamento da saliva e extrato da glândula salivar com inibidores de protease e metaloprotease. Os resultados demonstraram que atividade inibidora não apresentou diminuição, o que sugere que o mecanismo de inibição seja a ligação direta com a citocina (REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

1.3 Justificativa

Embora a inflamação seja um mecanismo para proteger o organismo contra invasores e lesões, uma reação inflamatória inadequada ou exacerbada pode resultar em danos no tecido e em casos graves pode causar falência de órgãos e morte. Em doenças autoimunes como artrite reumatoide, que são caracterizadas pelo funcionamento incorreto do sistema imunológico, gerando resposta imune a moléculas endógenas, a inativação de TNF- α é uma importante ferramenta para o controle da inflamação. Atualmente drogas anti-TNF- α são usadas no tratamento de doenças inflamatórias, incluindo espondilite anquilosante e doença de Crohn (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009, 2010).

No entanto sabe-se que a utilização de anticorpos anti-TNF- α apresenta algumas dificuldades, em alguns casos os pacientes apresentaram perda da função após um certo período de uso, além disso alguns pacientes desenvolvem anticorpos anti-anticorpos anti-TNF- α (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2009). Outro aspecto importante é o alto custo associado à sua produção e utilização. No Brasil, os medicamentos são oferecidos pelo Sistema Único de Saúde. Um estudo realizado por Vieira e colaboradores em 2020 (VIEIRA *et al.*, 2020) demonstrou que em média o custo anual do uso de infliximab para um paciente com artrite reumatoide é cerca de R\$ 37.833,60 (**Tabela 1**), Adalimumabe R\$ 75.609,60, Certolizumabe pegol R\$ 57.456,48 e Golimumabe R\$ 36.476,52 (VIEIRA *et al.*, 2020).

Tabela 1. Preço dos medicamentos para artrite reumatoide, gasto anual.

Princípio Ativo e apresentação	Posologia	Preço do fabricante	Gasto anual por paciente
Adalimumabe	40mg a cada 2 semanas	R\$ 6.300,80	R\$ 75.609,60
Certolizumabe pegol	200mg a cada 2 semanas	R\$ 4.788,04	R\$ 57.456,48
Etanercepte	50mg/semana	R\$ 1.954,62	R\$ 23.455,44
	50mg/mês (< 100 kg); 100mg/mês (> 100 Kg)		
Golimumabe	Kg)	R\$ 3.039,71	R\$ 36.476,52
Infliximabe	3mg/Kg a cada 8 semanas	R\$ 3.152,80	R\$ 37.833,60

Fonte: (VIEIRA *et al.*, 2020)

A identificação de uma proteína com atividade anti-TNF- α na saliva de carrapato abre possibilidades para utilização no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes. No entanto um dos desafios da identificação de proteínas e moléculas imunomoduladoras na saliva de carrapato por metodologias habituais como por exemplo por separação por reações

imunes, microHPLC e identificação por espectrometria de massa é o grande número de compostos em quantidades muito pequenas, o que gera perda e torna necessária a prospecção *in silico*, a fim de filtrar moléculas promissoras para o teste em bancada.

Nesse contexto o *Ixodes scapularis*, foi selecionado como organismo alvo para o desenvolvimento do presente estudo, uma vez que a espécie apresentou atividade inibidora a TNF- α no estudo realizado por Rezková e Kopecký, bem como o estudo sugeriu que a proteína relacionada a atividade inibidora está relacionada a transmissão de patógenos como *Borrelia burgdorferi*. *Ixodes scapularis* é um importante vetor para transmissão de diversos patógenos incluindo aqueles que causam a doença de Lyme, anaplasmoze, babesiose, doença de *Borrelia miyamotoi*, o que o torna um dos principais alvos de pesquisa e geração de dados públicos que são necessários para as análises (KONÍK *et al.*, 2006; REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é realizar a triagem virtual de proteínas de interação com o fator de necrose tumoral alfa na saliva de *Ixodes scapularis*, utilizando modelagem molecular e docking.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar dados públicos de proteínas do transcriptoma da saliva de *Ixodes scapularis*
2. Verificar estruturas existentes das proteínas selecionadas, e realizar modelagem molecular das sequências para as quais não houver estruturas disponíveis.
3. Realizar ancoragem molecular rígida sem passagem de sítio de ligação, utilizando TNF- α como receptor e as proteínas obtidas da saliva como ligantes, em três diferentes ferramentas.
4. Realizar ancoragem molecular flexível no sítio de ligação.
5. Avaliar contatos formados nos complexos de ligação e selecionar proteínas promissoras.
6. Verificar a existência das proteínas selecionadas em outros carrapatos do gênero *Ixodes*

3. Materiais e métodos

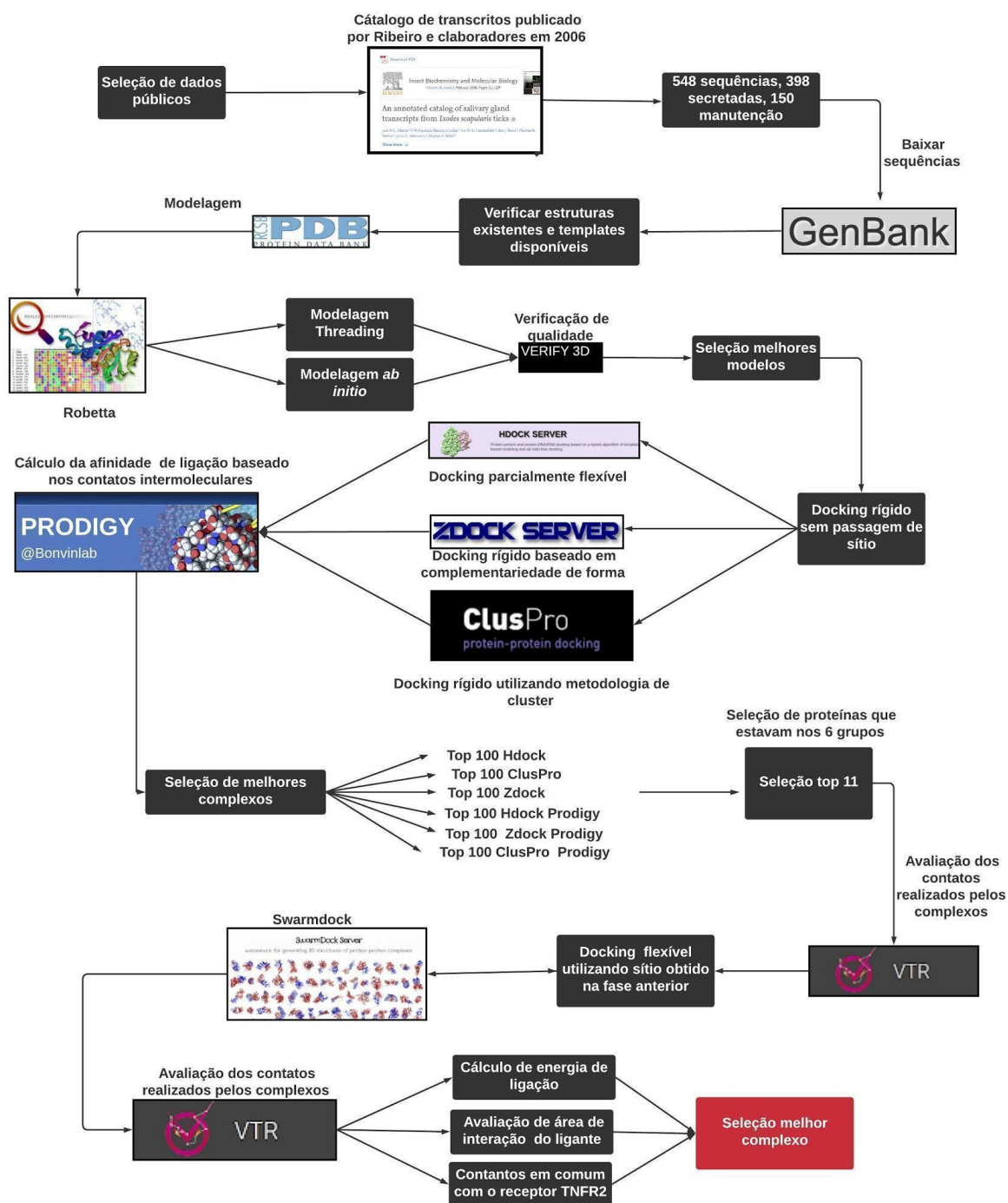


Figura 10. Esquema metodológico

Fonte: O próprio autor

3.1 Coleta de dados

As proteínas utilizadas foram obtidas do catálogo anotado de transcritos da glândula salivar de *Ixodes scapularis*, publicado por Ribeiro e colaboradores (2006). O catálogo foi construído a partir dos transcritos obtidos do extrato da glândula salivar de ninfas alimentadas por 2 dias não infectadas, ninfas alimentadas por 2 dias, previamente alimentadas com camundongos infectados com *Borrelia burgdorferi*, fêmeas adultas não alimentadas, fêmeas adultas alimentadas, 6 a 12 horas, 18–24 horas e 3-4 dias após a fixação do hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 2006).

O catálogo possui 654 proteínas transcritas divididas em dois grupos principais, elementos secretados sendo essas 487 sequências 167 sequências associadas pelos autores a funções de manutenção. Para identificar proteínas secretadas, os autores submeteram todas as sequências traduzidas, começando com o resíduo de metionina foram submetidas ao servidor Signal P (NIELSEN *et al.*, 1997) para identificar peptídeos sinalizadores indicadores de secreção (RIBEIRO *et al.*, 2006).

As sequências foram baixadas do Genbank (BENSON *et al.*, 2013) a partir do link de acesso disponibilizado na tabela suplementar do artigo (RIBEIRO *et al.*, 2006). Foram selecionadas 548 proteínas das quais 150 se encontram classificadas no grupo de proteínas de manutenção e 398 proteínas classificadas no grupo de secretadas. O critério de seleção utilizado foram sequências completas e com link de acesso disponível.

Foi elaborado um script em python para realizar um BLAST (ALTSCHUL, STEPHEN *et al.*, 1990), e verificar a existência de proteínas do catálogo experimentalmente resolvida no PDB, bem como identificar templates com no mínimo 25% de identidade (ESWAR *et al.*, 2007) para realizar a modelagem comparativa das proteínas sem estrutura. Foi encontrada uma estrutura de ixolaris (6NAN id Protein PDB), a sequência correspondente precisou ser modelada, visto que a estrutura 6NAN não correspondia a sequência completa.

3.2 Modelagem Molecular

Visto que não foram encontrados templates para a modelagem comparativa utilizando um único template, optou-se por utilizar o Robetta (CHIVIAN *et al.*, 2003). Um servidor automatizado para análise e predição de estrutura de proteína que realiza modelagem

comparativa, *threading*, *ab initio*. A ferramenta é uma implementação automatizada do protocolo do software Rosetta para a previsão de estrutura de proteína (CHIVIAN *et al.*, 2003 ; KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; LYSKOV; GRAY, 2008; PARK *et al.*, 2018).

Na modelagem por *threading*, o Robetta analisa as sequências de entrada em domínios, para isso utiliza o método de predição de domínios denominado GINZA (CHIVIAN *et al.*, 2003) que corresponde a um procedimento de triagem hierárquico e utiliza o Blast, PSI-Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997), FFASO3 (JAROSZEWSKI; RYCHLEWSKI; GODZIK, 2000) e 3D Jury (GINALSKI; RYCHLEWSKI, 2003) para detectar regiões na sequência de consulta que são homólogas a estruturas determinadas experimentalmente. Em seguida, prossegue com métodos baseados em alinhamentos múltiplos de sequência para prever domínios putativos.

Quando encontradas correspondências, a parte sem correspondência da sequência é utilizada como entrada para a próxima etapa. As regiões homólogas a estruturas conhecidas, são modeladas utilizando protocolo de modelagem comparativa. As regiões não atribuídas a template que tiverem menos de 50 resíduos são tratados como regiões de ligação de domínio ou pesquisados no PFAM (BATEMAN *et al.*, 2002). Em casos de regiões maiores que provavelmente correspondem a domínios quando não encontradas correspondências, as regiões sem identificação são modeladas por *ab initio* (CHIVIAN *et al.*, 2003; KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; LYSKOV; GRAY, 2008; PARK *et al.*, 2018).

As regiões modeladas pela metodologia comparativa são modeladas pela elaboração de um alinhamento aprimorado e, que utiliza a comparação perfil-perfil de resíduos sendo a previsão da estrutura secundária elaborada por programação dinâmica. A previsão *ab initio* é realizado gerando bibliotecas de três a 9 fragmentos de resíduos de aminoácidos e eles são pesquisados no PDB e em seguida montados modelos por inserção de fragmentos usando uma junção de pontuações (CHIVIAN *et al.*, 2003; KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; LYSKOV; GRAY, 2008; PARK *et al.*, 2018).

O Robetta fornece um *score* de confiança que corresponde para modelagem comparativa/*threading* corresponde à média de um alinhamento da estrutura modelada com os templates utilizados enquanto na modelagem *ab initio* a confiança se baseia na métrica TM_Score uma pontuação que corresponde a uma medida de similaridade entre duas proteínas, nesse caso é calculado a média dos 10 melhores modelos gerados. O *score* varia de 0 a 1 quanto mais próximo de 1 mais confiável é a estrutura (CHIVIAN *et al.*, 2003; KIM;

CHIVIAN; BAKER, 2004; LYSKOV; GRAY, 2008; PARK *et al.*, 2018).

As sequências foram submetidas ao servidor Robetta sem especificar a metodologia de modelagem a ser utilizada. Após a avaliação inicial da ferramenta o servidor retornou o valor de confiança de ambas as metodologias e optou-se pela técnica que apresentou maior confiança.

Após a modelagem as estruturas foram submetidas ao VERIFY 3D (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), a ferramenta determina a compatibilidade de um modelo atômico (3D) com sua própria sequência de aminoácidos (1D) atribuindo uma classe estrutural com base em sua localização e ambiente (alfa, beta, loop, polar, apolar etc.) e comparando os resultados com boas estruturas, para seleção da melhor estrutura e verificação da qualidade dela. Para aprovação da estrutura no mínimo 80% dos aminoácidos precisam pontuar $\geq 0,2$ no perfil 3D / 1D.

A ferramenta foi utilizada para verificar a qualidade das estruturas, bem como selecionar o melhor modelo gerado por Robetta. Foram selecionadas as estruturas com maior pontuação no perfil 3D/1D. Também foi avaliado o gráfico de Ramachandran no programa PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1996). As ferramentas anteriormente citadas foram utilizadas no servidor SAVES (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

3.3 Docking Rígido

Em seguida as estruturas modeladas foram submetidas aos experimentos de docking utilizando a estrutura de identificador PDB 1TNF, como receptor e as proteínas modeladas como ligante. O docking foi realizado sem fornecer o de sítio de ligação. Os experimentos foram realizados utilizando três diferentes ferramentas a fim de validar os resultados obtidos, sendo eles: Hdock (YAN *et al.*, 2017, 2020), Zdock (PIERCE; HOURAI, 2011; PIERCE; TONG; WENG, 2005) e ClusPro (KOZAKOV *et al.*, 2017; VAJDA *et al.*, 2017). As três ferramentas foram selecionadas uma vez que possuem metodologias de docking proteína-proteína diferentes entre si, com o objetivo de encontrar os complexos melhores avaliados em comum com as três metodologias.

O servidor ClusPro executa o acoplamento direto de duas proteínas em interação em três etapas computacionais, inicialmente é realizado o encaixe do corpo rígido gerando bilhões de conformações, em seguida é realizado um agrupamento com base no RMSD das 1000 estruturas de mais baixa energia geradas, e por fim o refinamento das estruturas

utilizando minimização de energia.

O encaixe rígido é realizado usando o Piper, um algoritmo baseado na abordagem de correlação de Fast Fourier Transform (FFT). Método o qual uma das proteínas (receptor) é colocado na origem do sistema de coordenadas em uma grade fixa e a segunda proteína (ligante) é colocado numa grade móvel. A energia de interação é descrita como uma função de correlação, além disso são incluídas interações eletrostáticas e energia de dessolvatação (KOZAKOV *et al.*, 2017; VAJDA *et al.*, 2017).

O ClusPro considera que em um processo de geração de estruturas à exaustão, os complexos mais próximos ao nativo são representados muitas vezes. Levando em consideração esse aspecto, na segunda etapa é realizado o agrupamento dos 1000 complexos com menor energia. São identificadas as estruturas que têm o maior número de vizinhos em um raio de 9 angstroms.

A estrutura selecionada é então definida como centro do cluster, e o procedimento é repetido gerando cerca de 30 clusters. Após o agrupamento é realizada a minimização de energia, na fase de minimização são removidas as sobreposições históricas. A ferramenta produz as 10 estruturas dos centros dos 10 primeiros clusters mais populosos (KOZAKOV *et al.*, 2017; VAJDA *et al.*, 2017).

O Zdock também consiste em uma ferramenta de ancoragem de corpo rígido que utiliza o algoritmo de FFT que permite uma busca de encaixe global eficiente em uma grade 3D, que utiliza uma combinação de complementaridade de forma, eletrostática e termos do potencial estático. O receptor e o ligante são coordenados na grade com base no centro de massa, o receptor permanece fixo enquanto o ligante se encontra em uma grade móvel (PIERCE. *et al.*, 2014; PIERCE, HOURAI, 2011; PIERCE.; TONG, 2005).

Hdock realiza docking hierárquico baseado em Fast Fourier Transform (FFT), o modelo é utilizado para mostrar globalmente todos os modos de ligação putativos nas quais as proteínas são representadas por um modelo reduzido onde a cadeia lateral na superfície da proteína por seu centro de massa. As poses iniciais são filtradas utilizando a complementaridade de forma. Em seguida os modos de ligação filtrados são refinados com base em uma pontuação baseada em conhecimento que leva em consideração os resíduos acessíveis ao solvente. E são consideradas a flexibilidade do backbone e loops utilizando um algoritmo de encaixe conjunto (YAN *et al.*, 2017, 2020).

Após a realização do docking nas três ferramentas para cada proteína, foram selecionados os melhores modelos considerando a função de pontuação de Zdock PSCDEELEC, em ClusPro menor energia livre de Gibbs e maior cluster, e em Hdock menor energia livre de Gibbs...

Após a realização do docking os modelos selecionados foram submetidos a ferramenta Prodigy (XUE *et al.*, 2016) que calcula a afinidade de ligação de complexos proteína-proteína baseado nos contatos intermoleculares, uma vez que considera que o número e característica dos contatos na interface do complexo se correlacionam com sua afinidade de ligação experimental. A ferramenta foi utilizada para tornar equiparáveis os complexos, para verificação a ser realizada no passo seguinte, se existia correlação entre os resultados das três ferramentas, o cálculo foi realizado utilizando o Microsoft Excel.

Em seguida as proteínas foram ranqueadas considerando inicialmente os *scores* das ferramentas, e em seguida o valor de delta G obtido utilizando o Prodigy (XUE *et al.*, 2016) para os três complexos gerados para cada proteína. Foram selecionadas as 100 melhores estruturas para cada um dos rankings, e em seguida selecionados os complexos que se mantinham presentes em todos os rankings. Ou seja, as proteínas que foram melhor posicionadas (100) para as três ferramentas considerando seus scores e a afinidade de ligação calculada pelo Prodigy, foram obtidas 11 proteínas.

Os complexos selecionados foram submetidos ao VTR (PIMENTEL *et al.*, 2020), uma ferramenta web para calcular e combinar contatos em duas. O VTR compara os contatos com base no AVD (*Average Vector Distance*) uma métrica obtida pelo cálculo da média mínima das distâncias entre os centróides dos vetores de contato. Com o objetivo de identificar todos os contatos do complexo, as estruturas são submetidas contra elas mesmas, utilizando-se *cutoff* de 2 Å, para calcular as interações realizadas pelas proteínas ancoradas com TNF- α . Foi obtida então a lista de resíduos de interação para cada complexo e ela foi utilizada para passar o sítio de ligação na etapa de docking flexível.

3.4 Docking Flexível

O SwarmDock (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010) é um algoritmo baseado em população iterativa em que os graus de liberdade translacional são simultaneamente otimizados usando a metaheurística *Partide Swarm Optimization* (PSO) que combina um algoritmo de busca local. No algoritmo o PSO funciona como otimizador robusto de funções

multimodais não lineares, ele é utilizado para otimizar coeficientes de uma combinação linear de autovetores de Hessian (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010; TORCHALA *et al.*, 2013).

Na análise de modos normais, a bacia de energia potencial é aproximada como um poço harmônico, permitindo a solução analítica das equações de movimentos utilizando o modelo de rede elástica. O modelo de rede elástica de todos os átomos é robusto e o valor de corte é grande o suficiente para amortecer os movimentos excessivos dos átomos periféricos. A matriz Hessiana contém segundas derivadas do potencial com respeito às coordenadas de massa ponderada. Qualquer mudança estrutural pode ser construída como uma combinação linear de coordenadas normais cujo conjunto completo forma uma base ortogonal. Na ferramenta é utilizado o pacote EINEMo (SUHRE; SANEJOUAND, 2004) para construir a matriz Hessiana e a diagonalização é realizada utilizando a biblioteca BLAS (Basic Linear Algebra Subprograms) (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010; TORCHALA *et al.*, 2013).

O espaço de busca é composto pelo centro de massa do ligante (3 dimensões translacionais) e uma representação no quaternário da orientação do ligante (4 dimensões orientacionais). O receptor é mantido fixo na grade de origem. Os coeficientes do modo normal e dimensões conformacionais são incluídos para o receptor e o ligante (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010; TORCHALA *et al.*, 2013).

O SwarmDock é executado em posições uniformemente espaçadas ao redor do receptor usando um algoritmo de distribuição. O componente translacional de cada posição das partículas é movido aleatoriamente para longe dessa posição e cada partícula recebe uma orientação aleatória. Os coeficientes dos modos normais para o enxame inicial são extraídos de uma gaussiana (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010; TORCHALA *et al.*, 2013).

Na função de energia para todos os membros da população inicial as velocidades e posições são atualizadas usando funções de transição na equação de PSO. Para evitar explosões e controlar o *trade off*, a fixação de velocidade é usada para impor um limite de distância. A cada iteração a partícula de menor energia passa por uma etapa de busca local. Após um determinado número de iterações, o complexo de menor energia é retornado, os resultados de todas as execuções são agrupados. A estrutura de energia mais baixa forma o primeiro cluster (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010; TORCHALA *et al.*,

2013).

O fluxo de trabalho do algoritmo se inicia com o pré-processamento que corresponde à verificação, correção estrutural e modelagem de resíduos faltantes, bem como os não padronizados e minimização da estrutura, em seguida é realizado o docking onde são gerados os pontos de ligação e execução de PSO e por fim é realizado o pós-processamento que consiste em minimização da estrutura reordenamento e agrupamento (LU; DOUSIS; MA, 2008; MOAL; BATES, 2010; TORCHALA *et al.*, 2013).

As 11 proteínas selecionadas nas fases anteriores foram submetidas à ferramenta, utilizando o padrão de 5 modos normais tanto para o receptor (TNFR), quanto para os ligantes. Foi passado para a ferramenta a lista de resíduos que faziam parte da interface de contato proteína-proteína, obtida do melhor complexo gerado pelas ferramentas de docking anteriormente usadas. Após a realização do docking, os melhores complexos foram selecionados com base na menor energia.

Os complexos selecionados foram submetidos ao VTR para o cálculo de contatos atômicos. Em seguida foram utilizadas como referência a tabela do programa The Star Sting Server (NESHICH *et al.*, 2006) para calcular a energia de ligação dos complexos, penalizando os contatos repulsivos, a tabela utilizada está representada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Tabela de referência de energia de contatos

Tipo de Contato	Energia de contato [Kcal / mol]
Van der waals	0,08
Interação hidrofóbica	0,6
Empilhamento aromático	1,5
Ligações de Hidrogênio	2,6
Pontes de Salina	10
Ligações Dissulfeto	85

Fonte: Tabela baseada na utilizada no programa The Star Sting Server (NESHICH *et al.*, 2006)

Em seguida foram considerados o número de resíduos de TNF- α ligados a proteína testada em relação aos resíduos ligados a TNF-R2, é importante ressaltar que no pré-processamento das estruturas o SwarmDock reenumerou os resíduos da estrutura de TNF- α , sendo assim o resíduo inicial numerado como 6 passou a ser o resíduo número 1, para essa etapa consideramos a numeração original da estrutura. Foram calculados os número de resíduos nas proteínas testadas em uma distância de até 5 angstroms que possuem interação

com TNF- α no complexo docado, para os dois últimos cálculos foram elaborados scripts em python para análise dos arquivos de saída do VTR.

Por último, foi calculada a BSA(*Buried Surface Area*) ou área de superfície enterrada que consiste na área de superfície que se torna inacessível ao solvente com a formação do complexo, a BSA é medida em angstroms quadrados. Foi utilizado o programa PISA (CHA *et al.*, 1998; CHAKRAVARTY *et al.*, 2013). Foi calculada a média dos 4 valores, e as proteínas foram ranqueadas, selecionando assim a melhor proteína candidata.

Por fim, as melhores candidatas foram submetidas ao BLAST, a fim de identificar a existência delas em outras espécies do gênero Ixodes.

4. Resultados e discussões

Após o processo de modelagem molecular das 398 estruturas caracterizadas como secretadas, 233 estruturas foram modeladas por modelagem comparativa (*threading*) e 169 estruturas por metodologia *ab initio*. Das proteínas agrupadas como proteínas de manutenção (150) todas foram modeladas por modelagem comparativa (*threading*). No grupo de proteínas secretadas (**Figura 10**) cerca de 50% das proteínas modeladas apresentam valor de confiança Robetta menor que 0,5. No grupo de proteínas de manutenção menos de 25% das proteínas moduladas apresentam valor de confiança menor do que 0,5 (**Figura 11**).

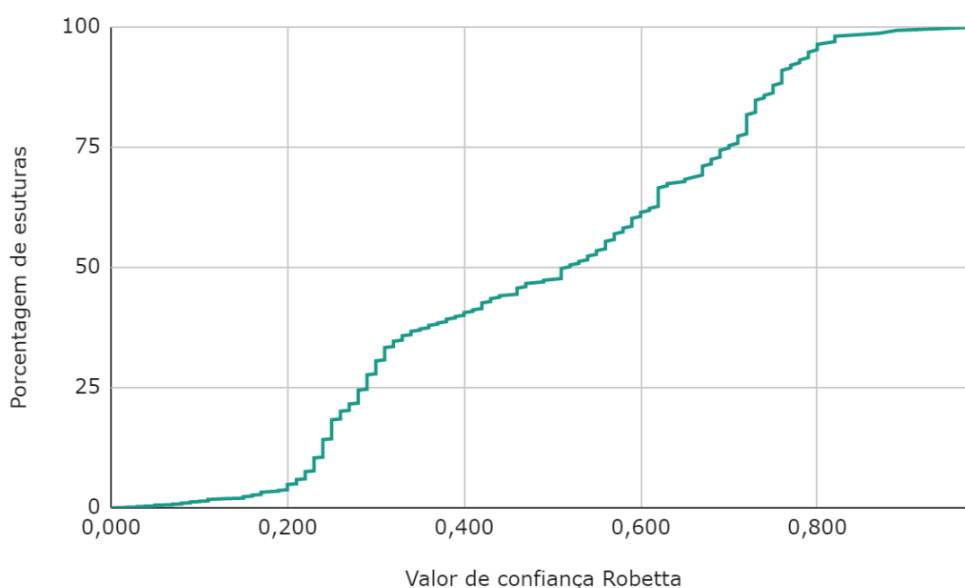


Figura 10. Valor de confiança Robetta proteínas secretadas

Fonte: O próprio autor

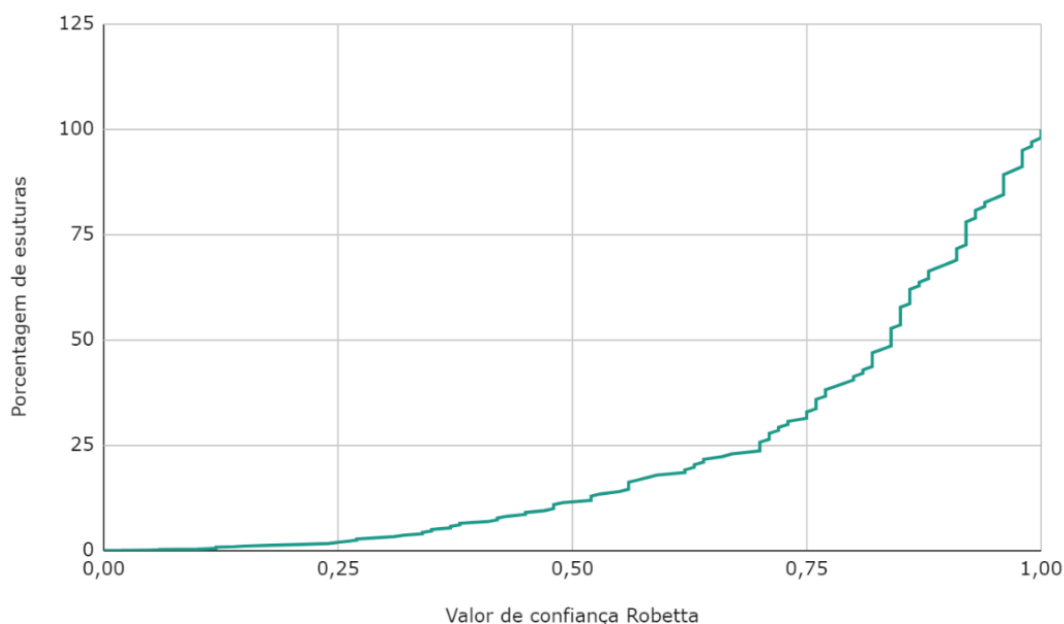


Figura 11. Valor de confiança Robetta proteínas de manutenção

Fonte: O próprio autor

Optou-se por manter as proteínas modeladas por Robetta que apresentaram valor de confiança abaixo de 0,5 levando em consideração que foram aprovadas VERIFY 3D e considerando as possíveis inconsistências relacionadas à modelagem.

Após a modelagem, as estruturas foram submetidas às três ferramentas de docking e os valores de score obtidos foram armazenados. Os melhores complexos obtidos para cada ferramenta foram submetidos ao prodigy. Os valores de delta G fornecidos para cada complexo foram utilizados para calcular a correlação entre as estruturas obtidas.

É possível observar na **figura 12**, referente a correlação das estruturas do grupo de proteínas secretadas, que os dados se mostram dispersos apresentando valor de R2 igual a 0,135 para Hdock vs Zdock, Zdock v ClusPro 0,272, Cluspro vs Hdock 0,263. Isso também foi observado no grupo de proteínas *housekeeping*, que pode ser avaliado na **figura 13**, apresentando R2 igual a 0,225 para Hdock vs Zdock, Zdock vs ClusPro 0,4 e 0,263 para ClusPro vs Hdock.

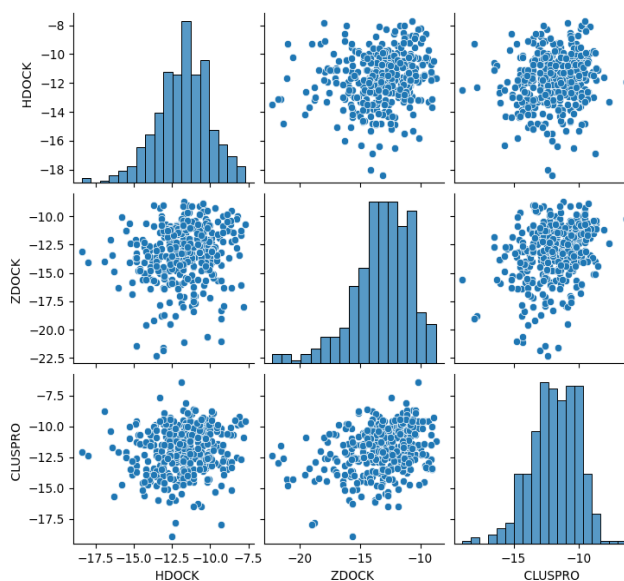


Figura 12. Correlação de afinidade de ligação das proteínas secretadas

Fonte: O Próprio autor

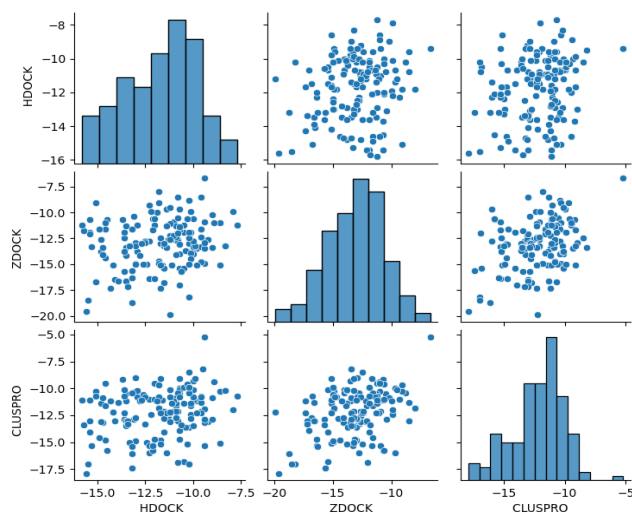


Figura 13. Correlação de afinidade de ligação das proteínas de manutenção

Fonte: O Próprio autor

Após a realização da metodologia de votação exemplificada na figura 10, foram selecionadas 11 proteínas das quais 6 pertencem ao grupo proteínas de manutenção e 5 proteínas pertencentes ao grupo de proteínas secretadas. Destaca-se a presença de três proteínas de manutenção classificadas como pertencentes ao mecanismo de tradução, e 2 proteínas do grupo de secretadas classificadas como lipocalinas. As proteínas selecionadas

podem ser observadas na **tabela 3**.

Tabela 3. Proteínas selecionadas após o docking rígido

ID DA PROTEÍNA	NOME	NÚMERO DE RESÍDUOS	TIPO	VALOR DE CONFIANÇA ROBETTA
AAT75325.1	proteína de matriz associada à queratina	320	Manutenção	0,2
AAY66893.1	complexo de ubiquitina ligase SCF	162	Manutenção	0,86
AAY66973.1	proteína dissulfeto-isomerase	242	Manutenção	0,63
AAY66956.1	proteína ribossomal L26	116	Manutenção	0,82
AAY66840.1	proteína ribossomal L12	165	Manutenção	0,94
AAY66934.1	Proteína ribossomal 40S S3a	270	Manutenção	0,8
AAM93640.1	proteína de ligação à histamina	311	Secretadas	0,54
AAV80787.1	proteína putativa	171	Secretadas	0,2
AAV80791.1	proteína putativa	161	Secretadas	0,16
AAY66701.1	Proteína Tipo de fator de von Willebrand	101	Secretadas	0,76
AAM93643.1	proteína de ligação à histamina	222	Secretadas	0,72

Fonte. O próprio autor

Notou-se que embora algumas estruturas apresentem valor de confiança inferior a 0,5, com avaliação do gráfico Ramachandran e a avaliação realizada pelo VERIFY 3D as modelagens se apresentam de boa qualidade. Como é o caso da estrutura AA75325.1, que na verificação feita pelo VERIFY 3D apresentou 86,56 % dos resíduos pontuados acima de 0,2, e em seu gráfico de Ramachandran notou-se que 88,4% resíduos se encontram em regiões favoráveis e 11,6 % dos resíduos encontram-se em regiões permitidas, não sendo encontrados resíduos em regiões desfavoráveis. Considera-se que embora a estrutura apresente uma baixa confiança Robetta, a modelagem se demonstra boa. O mesmo ocorre com com a proteína AAY80787.1 na avaliação realizada pelo VERIFY 3D, 100% dos resíduos apresentam pontuação acima de 0,2, e em seu gráfico Ramachandran, verificou-se que 87,7% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis, cerca de 12,4% em regiões se encontram em regiões permitidas. Não foram identificados resíduos em regiões desfavoráveis.

Vale ressaltar que a estrutura AAY80791.1 embora bem pontuada pelo VERIFY 3D (89,44 % dos resíduos possuem uma pontuação acima de 0,2) e na análise do gráfico de Ramachandran (94,2% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis e 5,8% em regiões permitidas) apresenta um valor de confiança 0,1 e uma estrutura pouco definida com uma vasta região de loops o que sugere a necessidade de revisar o processo de modelagem da mesma.

Destaca-se que as estruturas AAM93643.1 e AAM93640.1 que se trata de lipocalinas apresentaram em sua estrutura modelada o barril de folhas beta que é característica desse grupo de proteínas.

Após a etapa de docking flexível foi realizada a análise de contatos e cálculo de energia do mesmo (**Tabela 4**). No cálculo de energia destaca-se o complexo AAY66934.1-TNF- α com energia 217,80. É possível observar que alguns complexos apresentaram um número grande de contatos atômicos repulsivos, o que é pouco interessante para a ligação. Neste contexto destaca-se o complexo AAY66973.1-TNF- α com 20 contatos repulsivos, e complexo o AAY66840.1-TNF- α com 16 contatos. A estrutura com menor pontuação de ligação obtida foi a AAV80791.1 com energia de ligação de 52,2.

Tabela 4. Avaliação de contatos e cálculo de energia dos complexos selecionados

Estrutura	Energia
AAY66934.1	217,8
AAM93643.1	192,2
AAY66956.1	180,9
AAM93640.1	144,0
AAV80787.1	144,0
AAT75325.1	130,4
AAY66701.1	110,2
AAY66840.1	93,8
AAY66893.1	87,6
AAY66973.1	70,0
AAV80791.1	52,2

Fonte. O próprio autor

Na etapa seguinte foram avaliados os resíduos do receptor que fazem parte da interação com o ligante nos complexos em comum ao sítio do receptor TNF-R2 (**Tabela 5**). Destaca-se que AAM93640.1 se liga em 8 dos 13 resíduos do sítio do receptor, interagindo por meio de contatos atrativos com os resíduos 23 e 146, interações hidrofóbicas com os resíduos 21 e 32, pontes de hidrogênio com os resíduos 33 e 145 e empilhamentos aromáticos 73 e 87. A proteína AAT75325.1, AAY66934.1 e AAY66973.1 interagem com 6 dos 13 resíduos do sítio do receptor incluindo o resíduo 31 considerado importante para a interação da citocina com seus receptores (IDRISS; NAISMITH, 2000 e MUKAI *et al.*, 2010). Nota-se

que a proteína AY66840.1 não interage com nenhum dos resíduos pertencentes ao sítio do receptor.

Os resultados obtidos são favoráveis uma vez que o estudo de Koník e colaboradores, bem como Rezková Kopecky mantêm a hipótese de que a atividade da proteína inibidora de TNF- α é pela ligação dela no sítio de ligação, impedindo que a mesma interaja com seus receptores (KONÍK *et al.*, 2006 e REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

Tabela 5. Resíduos de ligação em comum com o sítio do receptor TNF-R2 Em vermelho estão marcados os resíduos que fazem contatos atrativos, consecutivamente em verde empilhamentos aromáticos, em azuis ligações de hidrogênio e em amarelo hidrofóbicos.

TNFR2	GLN 21	GLU 23	ARG 31	ARG 32	ALA 33	HIS 73	SER 86	TRY 87	LEU 143	PHE 144	ALA 145	GLU 146	GLN 149	<-Resíduos da TNF
AAM93640.1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	8
AAM93643.1	X	X								X	X			4
AAT75325.1	X		X						X	X	X	X		6
AAV80787.1								X						1
AAV80791.1								X						1
AAV66701.1		X						X						2
AAY66840.1														0
AAY66893.1			X					X						2
AAY66934.1	X		X		X				X		X	X		6
AAY66956.1						X			X		X	X		4
AAY66973.1	X	X	X		X					X		X		6

Fonte: O próprio autor

Em seguida foram avaliados o número de resíduos na superfície do ligante interagindo com TNF- α a uma distância de 5 Å, uma vez que proteínas com maior região de interação são mais interessantes para a proteína a ligação. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 6**, destaca-se AAY66701.1 na qual 30 resíduos participam da ligação, seguido de AAY66934.1 28, AAV80787.1 e AAY66893.1 nas quais 26 resíduos participam da interação.

Tabela 6. Resíduos participantes da interação a menos de 5 Å.

Estrutura	Número de resíduos a menos de 5 Å.	Média
AAY66701.1	30	100,00
AAY66934.1	28	93,33
AAV80787.1	26	86,67
AAY66893.1	26	86,67
AAY66973.1	23	76,67
AAT75325.1	23	76,67
AAM93643.1	22	73,33
AAM93640.1	22	73,33
AAY66956.1	21	70,00
AAY66840.1	21	70,00
AAV80791.1	20	66,67

Fonte: O próprio autor

Na avaliação de BSA (**Tabela 7**), destaca-se o complexo AAM93640.1-TNF- α , que possui uma área de superfície enterrada de 1704,4 Å², seguido do complexo AAY6693.1-TNF- α que apresenta BSA correspondente a 1634 Å², o que corresponde a uma área compatível com as interfaces típicas de proteína-proteína que varia entre (1560-1700 Å²) (HU *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2013). BSA igual a 1334,8 Å², sendo assim as proteínas destacadas possuem área enterrada de superfície superior a da interação da citocina com TNF-R2 (HU *et al.*, 2013b; LIANG *et al.*, 2013)

Tabela 7. Área de superfície enterrada (BSA)Å²

Estrutura	Área de superfície enterrada (BSA)Å²	Média
AAY66934.1	1634	95,87
AAY66956.1	1425,6	83,64
AAT75325.1	1556	91,29
AAY66893.1	1418,1	83,20
AAM93640.1	1704,4	100,00
AAY66973.1	1343,7	78,84
AAV80787.1	1487,7	87,29
AAY66840.1	1191,5	69,91
AAV80791.1	1322,3	77,58
AAY66701.1	1577,5	92,55
AAM93643.1	1536	90,12

Fonte: O próprio autor

Por fim foram avaliadas as 4 métricas anteriormente citadas e a média das mesmas foi calculada a fim de selecionar o complexo que tivesse boa energia de ligação, interagisse com um bom número de resíduos do sítio do receptor, bem como uma região grande de sua estrutura interagisse com TNF- α os resultados obtidos são apresentados na (**Tabela 8**). Destaca-se que as primeiras 4 proteínas melhores ranqueadas são proteínas associadas à manutenção o que é esperado. Levando em consideração que os estudos de Koník e colaboradores, bem como Rezková Kopecky sugerem que a proteína inibidora de TNF- α participa do mecanismo de transmissão de patógenos, bem como é injetada no hospedeiro durante o processo de alimentação, sugere-se que a melhor candidata seja a proteína AAM93640.1 uma vez que a lipocalina é uma proteína secretada no processo de alimentação e apresenta média de 69,50 sendo a proteína secretada melhor avaliada (KONÍK *et al.*, 2006 e REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017)

Tabela 8. Média final das métricas de avaliação

Estrutura	Total
AAY66934.1	78,58
AAY66956.1	74,95
AAT75325.1	73,94
AAY66893.1	70,89
AAM93640.1	69,50
AAY66973.1	67,74
AAV80787.1	67,25
AAY66840.1	66,69
AAV80791.1	64,71
AAY66701.1	64,54
AAM93643.1	58,77

Fonte: O próprio autor

As lipocalinas constituem uma família de pequenas proteínas extracelulares com massa molecular próxima a 20 kDa, possuem forte divergência em sua sequência de aminoácidos, mas mantêm sua estrutura tridimensional conservada. Sua capacidade de reconhecimento celular bem como a diversidade funcional contribui para sua utilização como biofármacos. As lipocalinas são transportadoras de moléculas e estão associadas a muitos processos biológicos dentre elas resposta imune, transporte de ferormônios, síntese biológica de prostaglandinas bem como ligação de retinóides (DAI *et al.*, 2010; PAESEN *et al.*, 2000).

Embora variável, a estrutura é caracterizada pela presença de uma dobra em barril de folhas betas simétricas formadas por 8 fios antiparalelos em forma de cilindro. A região de dentro do barril de folhas betas é considerada um importante sítio de ligação para pequenas moléculas (DAI *et al.*, 2010; PAESEN *et al.*, 2000).

Como sabemos a histamina é um produto da descarboxilação da histidina, e possui um papel fundamental na inflamação e processo alérgico. É produzido principalmente por mastócitos e basófilos, onde é secretado em resposta a mecanismos mediados por IgE. A histamina atua ligando-se a receptores específicos acoplados à proteína G ligados à membrana nas células-alvo (DAI *et al.*, 2010; PAESEN *et al.*, 2000).

A inflamação mediada por histamina é uma das reações de defesa que os animais hospedeiros desenvolvem contra os carrapatos que se alimentam de sangue. Está estabelecido que a histamina não só afeta adversamente a fixação de carrapatos à pele de seu hospedeiro, mas também diminui direta ou indiretamente sua alimentação e sucesso reprodutivo. Por sua vez, os carrapatos desenvolveram estratégias para suprimir as respostas do hospedeiro. Os carrapatos suprimem a inflamação, secretando proteínas de ligação à histamina no local da ferida.

Essas proteínas sequestram moléculas de histamina secretadas localmente, evitando que alcancem suas células-alvo. As lipocalinas da saliva de carrapato possuem capacidade de interagir tanto com regiões hidrofílicas como regiões hidrofóbicas o que as torna uma ótima proteína candidata para a interação. Contudo levando em consideração sua capacidade de reconhecimento celular bem como seu precedente favorável a utilização como biofármaco sugere-se que a proteína AAM93640.1 é uma boa proteína candidata (DAI *et al.*, 2010; PAESEN *et al.*, 2000).

AAM93640.1 possui 311 foi modelada por *threading*, apresentando um valor de confiança de 0,54 (**Figura 14**).



Figura 14. Estrutura modelada proteína AAM93640.1

Fonte: O próprio autor

Na avaliação realizada pelo VERIFY 3D 81,67 % dos resíduos possuem pontuação acima de 0,2 (**Figura 15**).

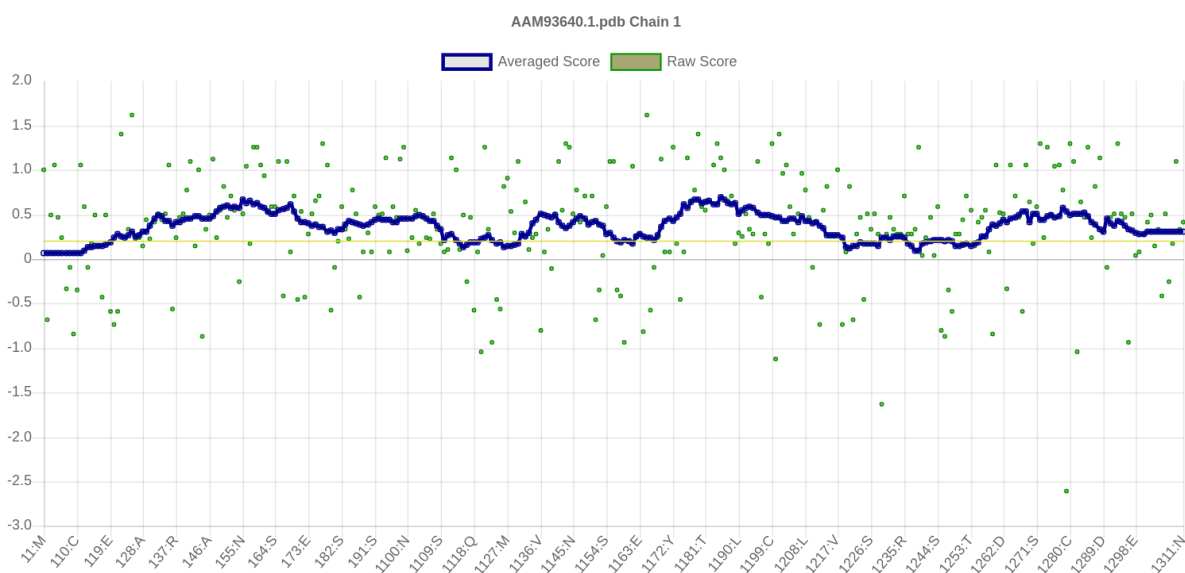


Figura 15. Avaliação estrutura AAM93640.1 no VERIFY 3D

Fonte: Próprio autor

Na avaliação realizada pela observação no gráfico de Ramachandran cerca de 90,7% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis, cerca de 9,3% estão em regiões permitidas. Não

foram encontrados resíduos em regiões desfavoráveis (**Figura 16**). Contudo nota-se que a proteína apresenta resultados positivos em sua modelagem, o que sugere que a estrutura proposta esteja próxima a estrutura nativa.

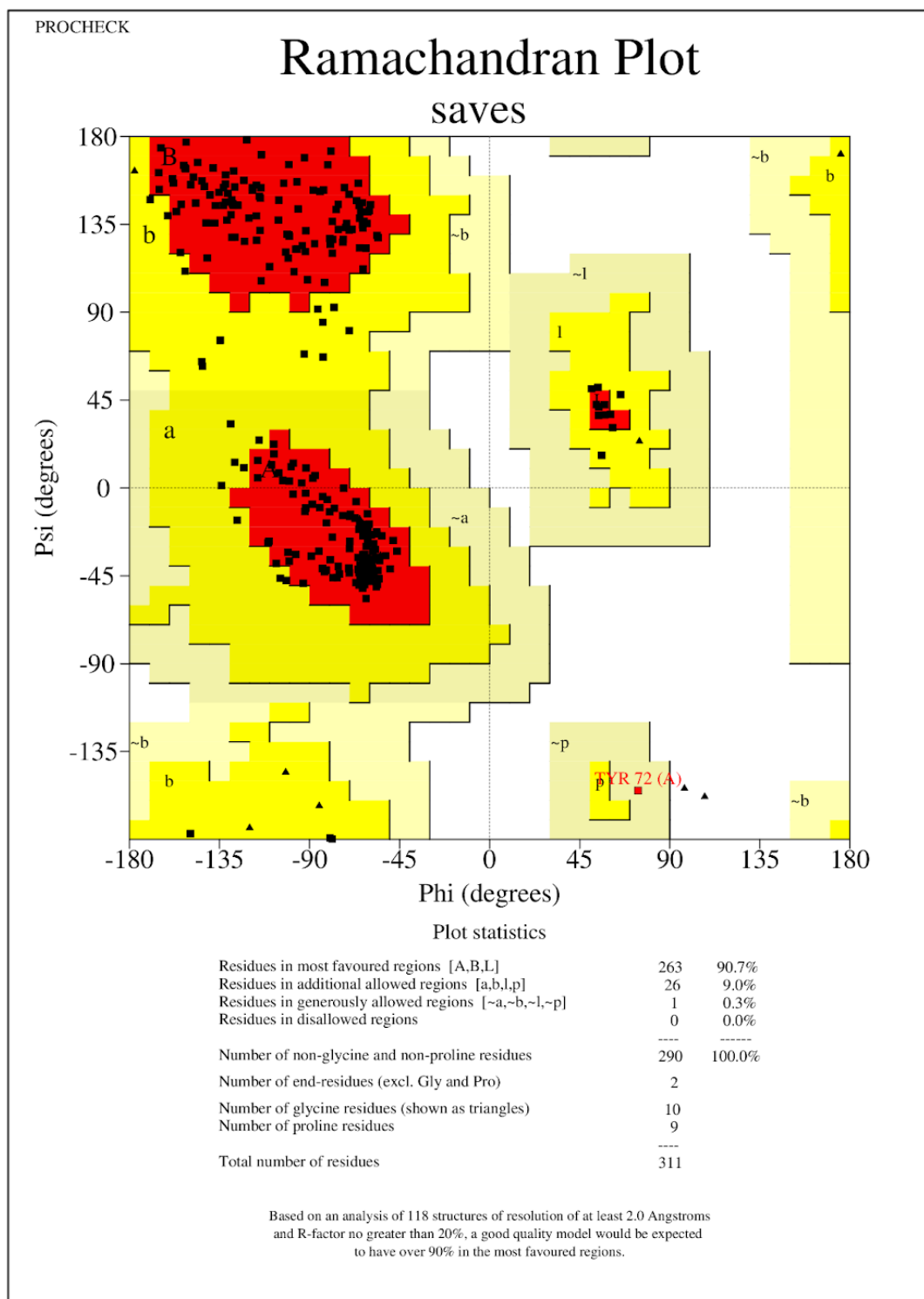


Figura 16. Avaliação estrutura AAM93640.1 no gráfico Ramachandran

Fonte: O próprio autor

A proteína possui em sua interface regiões hidrofílicas e hidrofóbicas que se alternam (**Figura 17**), colaborando com a o sugerido por (DAI *et al.*, 2010; PAESEN *et al.*, 2000).

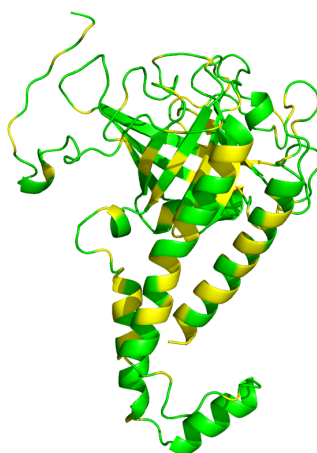


Figura 17. Estrutura de AAM93640.1 demonstra regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Marcados em amarelo estão os resíduos hidrofóbicos e em verde os resíduos hidrofílicos.

Fonte: O próprio autor.

A estrutura AAM93640.1 se liga às cadeias A e C de TNF- α (**Figura 18 e 19**). A estrutura faz 137 contatos dos quais 4 são repulsivos (**Tabela 10 e 11 em apêndice**).

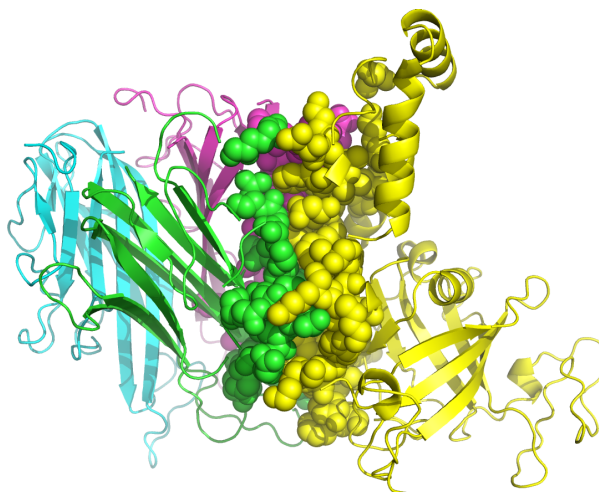


Figura 18. Complexo TNF- α - AAM93640.1 cadeia A-D. Em verde cadeia A de TNF- α , respectivamente, cadeia B e C de TNF- α em azul e roxo. Em amarelo a estrutura AAM93640.1

Fonte: O próprio autor

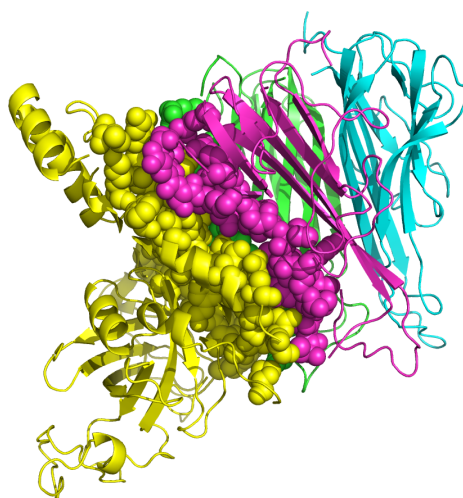


Figura 19. Complexo TNF- α -AAM93640.1 cadeia C-D. Em verde, a cadeia A de TNF- α , respectivamente, cadeia B e C de TNF- α em azul e roxo. Em amarelo a estrutura AAM93640.1

Fonte: O próprio autor

Destacam-se os contatos atrativos realizados entre a cadeia A de TNF- α e AAM93640.1 GLU23-LYS290, ASP140-LYS284, GLU146-ARG273 (**Figura 20**). Os resíduos GLU146 e GLU23 fazem parte do sítio de ligação de TNF- α interagindo por meio de contatos atrativos com a interface de TNF-R2.

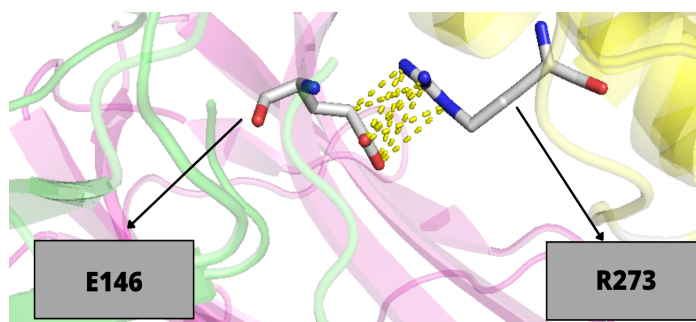


Figura 20. Contato atrativo entre os resíduos E146-R273 no complexo AAM93640.1-TNF- α

Fonte: O próprio autor

Existem empilhamentos aromáticos entre a cadeia D AAM93640.1 com a cadeia C de TNF- α TYR82-PHE259, HIS73-TYR282 (**Figura 21**). Destaca-se que a HIS73 faz parte do sítio de ligação dos receptores de TNF- α , interagindo com TNF-R2 por meio de ligações de hidrogênio. A cadeia A em interação com AAM93640.1 possui um empilhamento aromático

entre os resíduos TYR115-TRY282. contatos atômicos hidrofóbicos.



Figura 21 . Empilhamento aromático entre os resíduos Y87-F259 e H73-Y282 no complexo AAM93640.1-TNF- α

Fonte: O próprio autor

Dentre as ligações de hidrogênio destaca-se GLN21-LYS210, GLU23-ARG286, ALA33-ASP262, ALA33-ASP262, ALA145-ARG273 ocorrem entre a cadeia A de TNF- α e a proteína. É importante ressaltar que os resíduos anteriormente citados pertencentes a interface de TNF- α fazem parte do sítio de ligação de TNF-R2. Destacam-se também ligações de hidrogênio entre os resíduos VAL74-ARG282. No que se refere a contatos hidrofóbicos destaca-se TRY115-LEU277, LYS65-LYS284 entre a cadeia A TNF- α e a cadeia D de AAM93640.1, além disso destaca-se THR80-VAL8, ILE97-THY282 entre a cadeia C de TNF- α e AAM93640.1.

Como visto anteriormente na **tabela 6**, a proteína AAM93640.1 possui 22 resíduos participantes da interação com TNF- α a menos de 5 Å, que se concentram nas regiões de α -hélice (**Figura 22**).

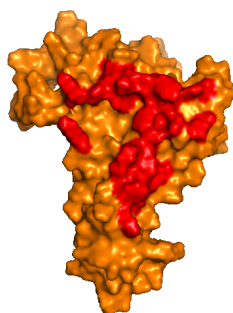


Figura 22 .Interface de interação AAM93640.1. Em laranja a cadeia D de AAM93640.1, em vermelho os resíduos de interação com TNF- α

Fonte: O próprio autor

A lipocalina se liga em 8 dos 13 resíduos (**Figura 23**) da interface de interação com os receptores, a proteína não interage com os resíduos LEU143, PHE144, GLN149. Destaca-se que o resíduo ARG 31, considerado fundamental para a interação de TNF- α com seus (IDRISS; NAISMITH, 2000; MUKAI *et al.*, 2010).

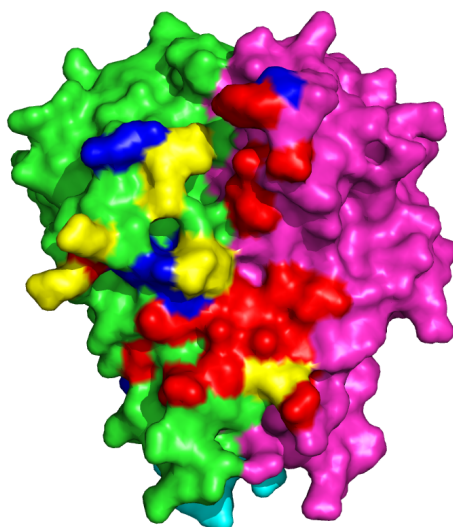


Figura 25. Ligações hidrofóbicas no complexo TNF- α - AAM93640.1 Em verde a cadeia A de TNF- α , respectivamente, cadeia B e C de TNF- α em azul e roxo. Em vermelho encontram-se destacados os resíduos que AAM93640.1 se liga que não fazem parte do sítio de ligação do receptor. Em amarelo destacam-se os resíduos em comum no sítio TNF-R2 e AAM93640.1, em azul resíduos do sítio de TNF-R2 que a lipocalina não interage. Fonte: O próprio autor

Levando em consideração a hipótese Rezková Kopecky de que a atividade TNF- α também se encontra em outros carrapatos do gênero, foi realizado um BLAST da proteína AAM93640.1 (**Tabela 9**). Foram encontradas proteínas semelhantes em *I. ricinus* com 82.64 de identidade e cobertura de 100% em *I. pacificus* com cobertura de 85% e identidade de 88.35 (REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

Tabela 9. Blast proteína AAM93640.1

Descrição	Nome científico	Score		Query Cover	E- Value	Per. ident	Tamanho alinhamento	Acesso
		Máximo	Score Total					
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	506	506	100%	5,00E-179	82.64	311	CAJ20743.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	486	486	99%	1,00E-170	78.25	329	CAJ20741.1
Lipocalina	<i>I.pacificus</i>	472	472	85%	5,00E-166	88.35	266	AAT92120.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	405	405	100%	4,00E-139	67.63	293	CAJ20735.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	402	402	100%	5,00E-138	66.35	293	CAJ20736.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	201	316	82%	4,00E-60	75.38	224	CAJ20739.1
Lipocalina	<i>I.persulcatus</i>	117	117	92%	1,00E-26	28.76	306	BAJ22599.1
Lipocalina	<i>I.pacificus</i>	110	110	92%	3,00E-24	27.60	313	AAT92121.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	109	109	95%	8,00E-24	27.30	306	CAJ20742.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	87.0	87.0	86%	2,00E-15	25.08	336	QOJ01963.1
Lipocalina	<i>I. ricinus</i>	83.6	83.6	94%	3,00E-14	23.53	337	CAJ20728.1

Fonte: O próprio autor

5. Conclusões

Konik e colaboradores (2006) descreveram a atividade anti-TNF- α na saliva e extrato de glândula salivar (SGE) de carrapatos *Ixodes ricinus*. O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por monócitos e macrófagos em resposta a estímulos invasivos e toxinas, que atua na supressão da carcinogênese e exclui patógenos infecciosos para manter a homeostase, sua atividade em combinação com a liberação de quimiocinas, leva o recrutamento de diferentes populações de leucócitos. Os autores demonstraram que a saliva de carrapato e SGE reduziram acentuadamente o nível da citocina. Além disso, a atividade inibidora de anti-TNF- α por digestão com tripsina demonstrou que o fator anti-TNF- α é uma proteína. Rezková e Kopecký (2017) compararam a presença de atividade anti-TNF- α em 11 espécies de carrapato da família *Ixodidae*, encontrando atividade em *Haemaphysalis concinna*, *Ixodes hexagonus*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes scapularis*. Em doenças autoimunes que são caracterizadas pelo funcionamento incorreto do sistema imunológico, gerando resposta imune a moléculas endógenas, a inativação de TNF- α é uma importante ferramenta para o controle da inflamação. Atualmente drogas anti-TNF como Infliximabe e Adalimumabe são usadas no

tratamento da artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias, incluindo espondilite anquilosante e doença de Crohn (BAUGHMAN *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2013b; KONÍK *et al.*, 2006; REZKOVÁ; KOPECKÝ, 2017).

Diversos grupos de pesquisa, dentre eles o grupo coordenado pelo professor Carlo Oliveira na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), propuseram a prospecção de tal proteína via separação por reações imunes, microHPLC e identificação por espectrometria de massa. No entanto um do grande desafio encontrado são quantidades extremamente pequenas dos compostos presentes na saliva, fazendo-se necessária a prospecção *in silico*.

No presente trabalho foi realizada a triagem virtual de proteínas presentes no transcriptoma da saliva e glândula salivar de *Ixodes scapularis*, após a realização de modelagem molecular das sequências bem como realização de docking rígido e flexível e análise de contatos. Foi identificada a proteína AAM93640.1, uma lipocalina de ligação à histamina que se liga às cadeias A e C de TNF- α . Realiza 137 contatos atômicos dos quais 4 são repulsivos, 10 contatos atrativos e 30 ligações de hidrogênio atômicas além de 90 contatos atômicos hidrofóbicos obtendo uma energia de ligação de 144 Å. A estrutura possui em sua interface 22 resíduos que interagem com TNF- α a uma distância de 5 Å. Além disso, a lipocalina interage com 8 dos 13 resíduos que fazem parte do sítio de ligação do receptor TNF-R2, bem como o complexo possui que possui uma área de superfície enterrada de 1704,4 Å² o que embora menor do que a área obtida de TNF- α complexada a seus anticorpos, corresponde a uma área compatível com as interfaces típicas de proteína-proteína que varia entre (1560-1700 Å²), mas superior ao valor de BSA apresentado por TNF-R2 (HU *et al.*, 2013b; LIANG *et al.*, 2013). Bem como a identificação de proteínas em *I. ricinus* e *I. pacificus* e levando em consideração as características favoráveis a utilização de lipocalinas como biofármacos sugere-se que a proteína AAM93640.1 é uma boa candidata a proteína com atividade inibidora de TNF- α .

6. Perspectivas

As próximas etapas do trabalho consistem em realizar o teste em bancada para verificar a interação de TNF- α com a proteína AAM93640.1, os testes serão realizados pelo grupo coordenado pelo professor Carlo Oliveira na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Além disso, pretende-se elaborar um artigo científico apresentando os resultados obtidos, bem como aplicar a metodologia de triagem virtual de proteínas da saliva de

carrapatos para outras proteínas alvo.

Espera-se que os resultados obtidos no presente trabalho colaborem para identificação da proteína com atividade anti-TNF- α na saliva de carrapato, visto que ela abre uma possibilidade para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças inflamatórias crônicas.

7. Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S F *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.

ALTSCHUL, STEPHEN F. *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, Tick-borne Diseases, Part I: Lyme Disease. v. 22, n. 2, p. 195–215, 1 jun. 2008.

BATEMAN, A. *et al.* The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 1, p. 276–280, 1 jan. 2002.

BAUGHMAN, R. P. *et al.* Infliximab therapy in patients with chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 174, n. 7, p. 795–802, 1 out. 2006.

BENSON, D. A. *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. Database issue, p. D36–D42, jan. 2013.

BOWIE, J.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v. 253, n. 5016, p. 164, 12 jul. 1991.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008.

CAO, Y. *et al.* An Ixodes scapularis Protein Disulfide Isomerase Contributes to Borrelia burgdorferi Colonization of the Vector. *Infection and Immunity*, v. 88, n. 12, 16 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7671890/>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

CARSWELL, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, set. 1975.

CHAKRAVARTY, Devlina *et al.* Reassessing buried surface areas in protein–protein complexes. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, v. 22, n. 10, p. 1453–1457, out. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3795504/>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CHIVIAN, D. *et al.* Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server.

- Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 53, n. S6, p. 524–533, 2003.
- D, P. *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n. 18, set. 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3898078/>>. Acesso em: 22 abr. 2021.
- DAI, J. *et al.* Tick Histamine Release Factor Is Critical for *Ixodes scapularis* Engorgement and Transmission of the Lyme Disease Agent. *PLOS Pathogens*, v. 6, n. 11, p. e1001205, 24 nov. 2010.
- ECK, M. J.; SPRANG, S. R. The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 29, p. 17595–17605, 15 out. 1989.
- ESWAR, N. *et al.* Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science*, v. 50, n. 1, p. 2.9.1–2.9.31, 2007.
- FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.* An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *Journal of Proteomics*, v. 71, n. 5, p. 493–512, 2 dez. 2008.
- FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*, v. 94, n. 1, p. 167–174, jul. 2005.
- GINALSKI, K.; RYCHLEWSKI, L. Detection of reliable and unexpected protein fold predictions using 3D-Jury. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 13, p. 3291–3292, 1 jul. 2003.
- HU, S. *et al.* Comparison of the Inhibition Mechanisms of Adalimumab and Infliximab in Treating Tumor Necrosis Factor α -Associated Diseases from a Molecular View. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 38, p. 27059–27067, 20 set. 2013a.
- HU, S. *et al.* Comparison of the Inhibition Mechanisms of Adalimumab and Infliximab in Treating Tumor Necrosis Factor α -Associated Diseases from a Molecular View. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 38, p. 27059–27067, 20 set. 2013b.
- IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, v. 50, n. 3, p. 184–195, 2000.
- JAROSZEWSKI, L.; RYCHLEWSKI, L.; GODZIK, A. Improving the quality of twilight-zone alignments. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, v. 9, n. 8, p. 1487–1496, ago. 2000.
- KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, 20 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747359/>>. Acesso em: 13 jan. 2021.
- KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic acids research*, v. 32, n. Web Server issue, p. W526–W531, 1 jul.

2004.

KONÍK, P. *et al.* Anti-tumour necrosis factor- α activity in Ixodes ricinus saliva. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 12, p. 649–656, 2006.

KRISSINEL, Evgeny; HENRICK, Kim. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *Journal of Molecular Biology*, v. 372, n. 3, p. 774–797, 21 set. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283607006420>>. Acesso em: 20 jul. 2021

KOZAKOV, D. *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, v. 12, n. 2, p. 255–278, fev. 2017.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 8, n. 4, p. 477–486, 1 dez. 1996.

LEE, J. U. *et al.* Molecular Basis for the Neutralization of Tumor Necrosis Factor α by Certolizumab Pegol in the Treatment of Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, jan. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297857/>>. Acesso em: 6 maio 2021.

LIANG, S. *et al.* Structural Basis for Treating Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-associated Diseases with the Therapeutic Antibody Infliximab. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 19, p. 13799–13807, 10 maio 2013.

LU, M.; DOUSIS, A. D.; MA, J. OPUS-PSP: An Orientation-dependent Statistical All-atom Potential Derived from Side-chain Packing. *Journal of Molecular Biology*, v. 376, n. 1, p. 288–301, 8 fev. 2008.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, v. 356, n. 6364, p. 83–85, mar. 1992.

LYSKOV, S.; GRAY, J. J. *Nucleic Acids Research*, v. 36, n. suppl_2, p. W233–W238, 1 jul. 2008.

MADDEN, R. D.; SAUER, J. R.; DILLWITH, J. W. A proteomics approach to characterizing tick salivary secretions. *Experimental & Applied Acarology*, v. 32, n. 1–2, p. 77–87, 2004.

MOAL, I. H.; BATES, P. A. SwarmDock and the Use of Normal Modes in Protein-Protein Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 10, p. 3623–3648, out. 2010.

MUKAI, Y. *et al.* Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. *Science Signaling*, v. 3, n. 148, p. ra83–ra83, 16 nov. 2010.

MUKAI, Y. *et al.* Structure–Function Relationship of Tumor Necrosis Factor (TNF) and Its Receptor Interaction Based on 3D Structural Analysis of a Fully Active TNFR1-Selective TNF Mutant. *Journal of Molecular Biology*, v. 385, n. 4, p. 1221–1229, 30 jan. 2009.

NARASIMHAN, S. *et al.* Immunity against Ixodes scapularis salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs Borrelia transmission. *PLoS*

One, v. 2, n. 5, p. e451, 16 maio 2007.

NARASIMHAN, S. *et al.* Ixodes scapularis saliva components that elicit responses associated with acquired tick-resistance. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 11, n. 3, p. 101369, 1 maio 2020.

NESHICH, G. *et al.* The Star STING server: A multiplatform environment for protein structure analysis. *Genetics and molecular research : GMR*, v. 5, p. 717–22, 1 fev. 2006.

NIELSEN, H. *et al.* Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 10, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 1997.

PAESEN, G. C. *et al.* Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1482, n. 1, p. 92–101, 18 out. 2000.

PAN, A.; GERRIETS, V. *Etanercept*. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545252/>>. Acesso em: 5 maio 2021.

PARK, H. *et al.* Automatic structure prediction of oligomeric assemblies using Robetta in CASP12. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 86, n. S1, p. 283–291, 2018.

PIERCE, B. G. *et al.* ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, v. 30, n. 12, p. 1771–1773, 15 jun. 2014.

PIERCE, B. G.; HOURAI, Y.; WENG, Z. Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, 19 set. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176283/>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

PIERCE, B.; TONG, W.; WENG, Z. M-ZDOCK: a grid-based approach for Cn symmetric multimer docking. *Bioinformatics*, v. 21, n. 8, p. 1472–1478, 15 abr. 2005.

POBEZINSKAYA, Y. L.; LIU, Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*, v. 11, n. 5, p. 871–876, 1 mar. 2012.

REZKOVÁ, M.; KOPECKÝ, J. Anti-tumour necrosis factor activity in saliva of various tick species and its appearance during the feeding period. *Folia Parasitologica*, 20 out. 2017. Disponível em: <<http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2017.032.html>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

RIBEIRO, J. M. C. *et al.* An annotated catalog of salivary gland transcripts from Ixodes scapularis ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 2, p. 111–129, 1 fev. 2006.

RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N. Ixodes scapularis: Salivary Kininase Activity Is a Metallo Dipeptidyl Carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, v. 89, n. 2, p. 213–221, 1 jun. 1998.

ŠIMO, L. *et al.* The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, 22 jun. 2017.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479950/>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

SUHRE, K.; SANEJOUAND, Y.-H. ElNémo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. Web Server issue, p. W610–W614, 1 jul. 2004.

TARTAGLIA, L. A. *et al.* A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, v. 74, n. 5, p. 845–853, 10 set. 1993.

TORCHALA, M. *et al.* SwarmDock: a server for flexible protein–protein docking. *Bioinformatics*, v. 29, n. 6, p. 807–809, 15 mar. 2013.

PIMENTEL, V. *et al.* VTR: an algorithm for identifying analogous contacts on protein structures and their complexes. 23 set. 2020. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/ppr/ppr218283>>. Acesso em: 13 jan. 2021.

VAJDA, S. *et al.* New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 85, n. 3, p. 435–444, 2017.

VIEIRA, E. R. *et al.* MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS PARA ARTRITE REUMATOIDE DISPONIBILIZADOS PELO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. *Revista Saúde em Foco*, v. 12, n. 1, p. 75–81, 2020.

WOLF, M. J.; WATKINS, H. R.; SCHWAN, W. R. Ixodes scapularis: Vector to an Increasing Diversity of Human Pathogens in the Upper Midwest. *WMJ: official publication of the State Medical Society of Wisconsin*, v. 119, n. 1, p. 16–21, mar. 2020.

XUE, L. C. *et al.* PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, v. 32, n. 23, p. 3676–3678, 1 dez. 2016.

YAN, Y. *et al.* HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic acids research*, v. 45, n. W1, p. W365–W373, 3 jul. 2017.

YAN, Y. *et al.* The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*, v. 15, n. 5, p. 1829–1852, maio 2020.

8. Apêndices

Tabela 10. Principais contatos atômicos AAM93640.1-TNF- α cadeia A-D

TNF-A	AAM93640.1-D	Tipos de ligação	Distância (Å)
GLU 23 OE2	LYS 290 NZ	Atrativo	5,76
ASP 140 OD2	LYS 284 NZ	Atrativo	5,78
GLU 146 OE1	ARG 273 NE	Atrativo	3,75
GLU 146 OE2	ARG 273 NH1	Atrativo	3,47
TYR 115 CG	TYR 282 CG	Empilhamento Aromático	4,97
GLU 23 CG	LYS 290 CD	Hidrofóbico	3,99
ARG 32 CG	PHE 265 CE2	Hidrofóbico	4,31
ALA 33 CB	LYS 266 CD	Hidrofóbico	3,98
PRO 113 CB	TYR 282 CB	Hidrofóbico	3,66
TYR 115 CE1	PRO 283 CG	Hidrofóbico	3,84
ALA 145 CB	PRO 269 CB	Hidrofóbico	4,49
GLN 21 CB	LYS 210 CG	Hidrofóbico	3,97
LYS 65 CG	PRO 283 CG	Hidrofóbico	3,88
TYR 115 CE1	LEU 277 CD2	Hidrofóbico	4,45
TYR 115 CB	TYR 282 CE2	Hidrofóbico	3,66
LYS 65 CD	LYS 284 CD	Hidrofóbico	4,22
GLN 21 OE1	LYS 210 N	Ligação de hidrogênio	2,87
GLU 23 O	ARG 286 NH1	Ligação de hidrogênio	2,71
GLN 67 N	LYS 284 O	Ligação de hidrogênio	3,16
ALA 33 N	ASP 262 OD1	Ligação de hidrogênio	2,94
LYS 65 NZ	TYR 62 OH	Ligação de hidrogênio	2,71
LYS 65 O	LYS 284 NZ	Ligação de hidrogênio	3,122
GLY 66 N	PRO 283 O	Ligação de hidrogênio	3,59
GLN 67 NE2	TYR 282 O	Ligação de hidrogênio	2,83
GLN 67 OE1	LYS 284 N	Ligação de hidrogênio	3,25
TYR 141 O	LYS 284 NZ	Ligação de hidrogênio	3,52
ALA 145 O	ARG 273 NH2	Ligação de hidrogênio	2,7
ALA 22 O	ARG 286 NH2	Ligação de hidrogênio	3,65

Fonte: O próprio autor

Tabela 11. Principais contatos atômicos AAM93640.1-TNF- α cadeia A-C

TNF-C	AAM 93640.1-D	Tipos de ligação	Distância (Å)
TYR 87 CG	PHE 259 CG	Empilhamento Aromático	4,36
HIS 73 CG	TYR 282 CG	Empilhamento Aromático	4,69
LEU 75 CD1	LEU 277 CD1	Hidrofóbico	3,74
ILE 97 CD1	LEU 277 CD	Hidrofóbico	4,26
ASN 137 CB	TYR 274 CE2	Hidrofóbico	3,96
ASN 92 CB	LYS 266 CB	Hidrofóbico	3,78
THR 72 CG2	ARG 27 CG	Hidrofóbico	3,9
TYR 87 CE2	LYS 256 CB	Hidrofóbico	3,7
VAL 91 CG2	PHE 259 CE2	Hidrofóbico	4,12
VAL 91 CB	LEU 263 CD2	Hidrofóbico	3,53
LEU 75 CD1	TYR 282 CE1	Hidrofóbico	3,45
THR 77 CG2	TYR 274 CE1	Hidrofóbico	4,49
TYR 87 CD2	LEU 260 CD2	Hidrofóbico	4,26
TYR 87 CB	LEU 263 CD2	Hidrofóbico	3,81
THR 89 CG2	VAL 8 CG1	Hidrofóbico	3,78
THR 89 CG2	LEU 263 CD1	Hidrofóbico	3,64
ILE 97 CG2	TYR 282 CE1	Hidrofóbico	3,92
ASN 137 CB	GLN 23 CG	Hidrofóbico	4,39
VAL 74 O	ARG 27 NH2	Ligação de hidrogênio	2,9
LEU 75 N	TYR 282 OH	Ligação de hidrogênio	3,85
LEU 75 N	TYR 282 OH	Ligação de hidrogênio	3,29
THR 89 OG1	GLU 267 OE2	Ligação de hidrogênio	2,95
ASN 92 OD1	SER 270 OG	Ligação de hidrogênio	2,87
LYS 98 O	TYR 282 OH	Ligação de hidrogênio	2,77
HIS 73 O	ARG 27 NH2	Ligação de hidrogênio	2,6
HIS 73 NE2	TYR 282 OH	Ligação de hidrogênio	3,7
THR 89 OG1	SER 12 OG	Ligação de hidrogênio	3,51

Fonte: O próprio autor