

Alissa de Sarom Ferreira Freitas Anchiêta

**Identificação *in silico* de prováveis alvos
vacinais e de fármacos contra *Haemophilus
ducreyi*: uma abordagem em vacinologia
reversa e genômica subtrativa**

Uberaba, MG

2018

Alissa de Sarom Ferreira Freitas Anchiêta

Identificação *in silico* de prováveis alvos vacinais e de fármacos contra *Haemophilus ducreyi*: uma abordagem em vacinologia reversa e genômica subtrativa

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Siomar de Castro Soares

Uberaba, MG

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

A554i Anchieta, Alissa de Sarom Ferreira Freitas
Identificação *in silico* de prováveis alvos vacinais e de fármacos
contra *Haemophilus ducreyi*: uma abordagem em vacinologia reversa
e genômica subtrativa / Alissa de Sarom Ferreira Freitas Anchieta. --
2018.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientador: Prof. Dr. Siomar de Castro Soares

1. Cancroide. 2. *Haemophilus ducreyi*. 3. Terapia de alvo molecu-
lar. 4. Antibacterianos. 5. Vacinas. I. Soares, Siomar de Castro. II.
Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.971

Alissa de Sarom Ferreira Freitas Anchiêta

Identificação *in silico* de prováveis alvos vacinais e de fármacos contra *Haemophilus ducreyi*: uma abordagem em vacinologia reversa e genômica subtrativa

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Siomar de Castro Soares

Orientador

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Membro interno

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto

Membro externo

Universidade de Uberaba

Uberaba, MG

2018

*À minha mãe de coração, Carol Greensmith (in memoriam), que tanto amo e sinto
saudade.*

Agradecimentos

Agradeço ao Deus trino: ao Pai, rei soberano, pela dádiva da vida, conhecimento e sabedoria; ao Filho, Jesus Cristo, meu salvador, por seu infinito amor e misericórdia e ao Espírito Santo, meu consolador, por me conceder paciência, força e perseverança. Obrigada, Deus, pela graça de ter um orientador excelente, um marido amoroso, pais bondosos e honestos e amigos leais.

Agradeço ao meu marido e melhor amigo, Rafael, por todo seu cuidado, paciência e apoio por, não apenas insistir, mas também me ajudar do início à conclusão deste projeto.

Agradeço ao meus pais, James e Maria Madalena, cidadãos batalhadores, por sempre me apoiarem e se esforçarem para me verem feliz e realizada e por me darem amor sem medida. Ao meu irmão, Neto, por todos os ensinamentos e por seu companheirismo.

Agradeço ao meu orientador, Siomar, por acreditar no meu potencial quando nem eu mesma acreditei, por não desistir de mim, por todos seus ensinamentos e paciência. Aos colegas de laboratório, em especial, Lucila, Arun, Letícia, Ton e Guilherme, pela amizade e colaboração. À secretária da PPGCF, Elisabete, por sua presteza e paciência.

Agradeço aos amigos e familiares que me emprestaram seus ouvidos e seus ombros, que torceram por mim e acreditaram na minha vitória. Às igrejas que me acolheram e que, de constante, oram por mim.

Agradeço ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

(Bíblia Sagrada, 1 Coríntios 13.2)

Resumo

O cancro mole é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria Gram-negativa *Haemophilus ducreyi*. O controle do cancro mole é difícil porque uma infecção prévia por *H. ducreyi* não induz uma resposta imune adaptativa adequada e os métodos convencionais de triagem de antígeno não tiveram sucesso na obtenção de moléculas alvo apropriadas. O único tratamento disponível atualmente é com antibiótico; no entanto, a resistência tem sido relatada em áreas endêmicas. Devido aos surtos recentes de ISTs em todo o mundo, é importante continuar procurando por novas estratégias de tratamento e medidas preventivas. Neste trabalho, utilizamos abordagens de vacinologia reversa e genômica subtrativa para a predição *in silico* de potenciais alvos vacinais e de drogas contra *H. ducreyi*. Identificamos as proteínas não homólogas ao hospedeiro e predizemos sua localização subcelular, essencialidade, funcionalidade e virulência. Ao todo, predizemos 13 prováveis alvos vacinais e 3 alvos de fármacos, onde 2 alvos vacinais (A01_1275 e A01_0690) e 3 alvos de drogas (A01_0698, A01_0702 e A01_0677) são albergados por ilhas de patogenicidade. Por fim, aplicamos uma abordagem de docking molecular para analisar cada alvo de droga e selecionamos ZINC77257029, ZINC43552589 e ZINC67912117 como moléculas promissoras com interações favoráveis com os resíduos dos sítios ativos dos alvos. Os alvos identificados aqui podem ser usados em estratégias futuras para controlar o cancro mole em todo o mundo.

Palavras-chaves: *Haemophilus ducreyi*, cancro mole, candidatos vacinais, alvos de drogas, docking molecular

Abstract

Chancroid is a sexually transmitted infection (STI) caused by the Gram-negative bacterium *Haemophilus ducreyi*. The control of chancroid is difficult because an earlier infection by *H. ducreyi* does not induce an appropriate adaptative immune response and the conventional antigen screening methods have been unsuccessful in finding suitable target molecules. The only current available treatment is with antibiotic; however, resistance has been reported in endemic areas. Due to recent outbreaks of STIs worldwide, it is important to keep searching for new treatment strategies and preventive measures. Here, we applied reverse vaccinology and subtractive genomic approaches for the *in silico* prediction of potential vaccine and drug targets against *H. ducreyi*. We identified the non-host homologous proteins and predicted their subcellular localization, essentiality, functionality and virulence. Altogether, we predicted 13 candidate vaccine targets and 3 drug targets, where 2 vaccine (A01_1275 and A01_0690) and 3 drug targets (A01_0698, A01_0702, and A01_0677) are harbored by pathogenicity islands. Finally, we applied a molecular docking approach to analyze each drug target and selected ZINC77257029, ZINC43552589, and ZINC67912117 as promising molecules with favorable interactions with the targets active site residues. Altogether, the targets identified here may be used in future strategies to control chancroid worldwide.

Key-words: *Haemophilus ducreyi*, chancroid, reverse vaccinology, vaccine candidates, drug targets, molecular docking

Lista de ilustrações

Figura 1 – Úlceras produzidas pelo <i>H. ducreyi</i> em órgãos genitais	15
Figura 2 – Paciente com linfadenite inguinal unilateral com infecção por <i>H. ducreyi</i>	15
Figura 3 – Amostras de biópsia de úlceras causadas por <i>H. ducreyi</i>	16
Figura 4 – Micrografia eletrônica de transmissão de <i>H. ducreyi</i> em uma pústula. .	17
Figura 5 – Úlceras de bases rasas e bordas irregulares em paciente com infecção por <i>H. ducreyi</i>	18
Figura 6 – Desenvolvimento do pan-genoma de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .	25
Figura 7 – As Ilhas Genômicas (GEIs) das linhagens de <i>Treponema pallidum</i> Nichols.	27
Figura 8 – Comprovante de submissão do artigo para Journal of the Royal Society Interface	44

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

CDS	<i>CoDing Sequence</i>
COG	<i>Cluster of Orthologous Groups</i>
DEG	<i>Database of Essential Genes</i>
DsrA	<i>Ducreyi serum resistance A</i>
DGU	Doenças Genitais Ulcerativas
EUA	Estados Unidos da América
GC	Guanina-Citosina
GEI	<i>Genomic Islands</i>
HGT	<i>Horizontal Gene Transfer</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MI	<i>Metabolic Islands</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	<i>Pathogenicity Islands</i>
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i>
SI	<i>Symbiotic Islands</i>
STI	<i>Sexually Transmitted Infection</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de símbolos

β	Letra grega beta
γ	Letra grega gamma
κ	Letra grega kappa

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Distribuição global do cancro mole	13
1.2	Fisiopatologia da doença	14
1.3	Gênero <i>Haemophilus</i>	15
1.4	<i>Haemophilus ducreyi</i>	16
1.5	<i>H. ducreyi</i> e HIV	18
1.6	Fatores de virulência	19
1.7	Profilaxia	20
1.8	Vacinas	20
1.9	Tratamento	21
1.10	Genômica comparativa	22
1.11	Pan-genômica	23
1.12	Plasticidade genômica	24
1.13	Genômica subtrativa	26
1.14	Vacinologia reversa	28
1.15	Análise de <i>docking</i>	30
	REFERÊNCIAS	31
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO	42
	APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	44
	APÊNDICE C – CONTRIBUIÇÃO DOS COAUTORES NO ARTIGO	45

1 Introdução

1.1 Distribuição global do cancro mole

O cancro mole é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria *Haemophilus ducreyi*. É endêmico em países pobres da Ásia, África e América Latina (Piot; Plummer, 1990; González-Beiras et al., 2016). Os casos de infecções por *H. ducreyi* permanecem relativamente incomuns nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa Ocidental (Trees; Morse, 1995; González-Beiras et al., 2016). Esse fato indica que há uma relação direta entre a situação socioeconômica e a incidência do cancro mole em uma população.

As regiões endêmicas da África, Ásia e América Latina possuem recursos limitados para cuidados em saúde, principalmente em ISTs. Dessa forma, a epidemiologia do cancro mole permanece pouco compreendida por não ser notificada aos responsáveis de saúde e pela falta de disponibilidade de testes diagnósticos para *H. ducreyi*. Com isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não inclui o cancro mole em suas estimativas sobre ISTs devido à inadequação das informações fornecidas (Bong; Bauer; Spinola, 2002).

Em países industrializados, infecções por *H. ducreyi* estão restritas a casos esporádicos (Mertz et al., 1998a; Bruisten et al., 2001; González-Beiras et al., 2016). Esses surtos ocorrem, comumente, entre profissionais do sexo e seus clientes. Brunham e Ronald (1991) mostraram uma elevada proporção de homens infectados que relataram ter tido relações com profissionais do sexo. Além disso, outros fatores de risco associados ao cancro mole são a utilização de drogas ilícitas, em particular o crack e a cocaína, e a troca de droga por sexo (DiCarlo; Armentor; Martin, 1995; Mertz et al., 1998b; González-Beiras et al., 2016).

Embora a OMS tenha estimado a prevalência global do cancro mole em torno de 7 milhões, na década de 90, a epidemiologia dessa infecção permanece indefinida (Steen, 2001). Em 1991, a OMS recomendou a implantação da gestão sindrômica (baseada nos sinais e sintomas comuns entre ISTs) para casos de infecções por *H. ducreyi*, sendo adotadas a partir de 2000 (Lewis, 2003; Organization, 2003). Desde então, a incidência global de doenças genitais ulcerativas (DGUs), tem caído ou diminuído substancialmente, e as herpes

genitais tem se tornado a principal causa de úlceras genitais (Lewis et al., 2012).

No Brasil, a doença nem sempre é levada para os responsáveis de saúde, e quando é, nem sempre é notificada, pois não é considerada uma doença de notificação compulsória. Assim, existem poucos dados epidemiológicos sobre o cancro mole.

Além da epidemiologia da doença ser pouco compreendida, inúmeros fatores influenciam na persistência de infecções por *H. ducreyi*. Esses fatores podem ser expressos matematicamente pela equação $R_0 = \beta Dc$, na qual R_0 é a taxa reprodutiva, definida como a média de casos secundários gerados por um caso primário em uma população suscetível de densidade definida, β é a probabilidade média de transmissão da infecção por contato sexual por unidade de tempo, D é a duração média de infecciosidade de um indivíduo infectado, e c é a média de parceiros sexuais por unidade de tempo (Anderson, 1991 apud Trees; Morse, 1995).

1.2 Fisiopatologia da doença

O período de incubação do *H. ducreyi* varia entre 4 e 7 dias e, raramente, menos de 3 ou mais de 10 dias. A porta de entrada do *H. ducreyi* é uma descontinuidade na pele. É através dessa falha no epitélio que ocorrem as primeiras mudanças patológicas na forma de células epiteliais escamosas com infiltração de leucócitos polimorfonucleares (Sullivan, 1940).

O *H. ducreyi* infecta, preferencialmente, o epitélio da mucosa, mas pode infectar também o epitélio escamoso estratificado queratinizado. Dentro de horas ou dias, são formadas pápulas eritematosas nos locais de entrada da bactéria. Em 2 ou 3 dias, as pápulas se desenvolvem formando pústulas. Após algumas semanas, as pústulas se tornam úlceras (Figuras 1a e 1b), o paciente sente dor no local e pode ter linfadenopatia supurativa. Os pacientes geralmente não procuram por cuidados médicos até que tenham úlceras por 1 ou 3 semanas, provavelmente cerca de 3 a 6 semanas após o contato com o microrganismo (Chen et al., 1997; Hammond et al., 1980; Morse, 1989).

Aproximadamente 40% dos pacientes infectados com *H. ducreyi* desenvolvem linfadenopatia inguinal unilateral ou bilateral (Figura 2). Se não tratados, após uma ou duas semanas, esses pacientes podem desenvolver supuração e íngua (Ronald; Plummer, 1985).



(a) Órgão genital masculino



(b) Órgão genital feminino

Figura 1 – Úlceras produzidas pelo *H. ducreyi* em órgãos genitaisFonte: <https://www.herpes-coldsores.com/std/chancroid_pictures.htm>Figura 2 – Paciente com linfadenite inguinal unilateral com infecção por *H. ducreyi*. Adaptada de Lewis (2000a)

Sobre a infecção, a bactéria permanece no meio extracelular junto de leucócitos polimorfonucleares (Figura 3), macrófagos, colágeno e fibrina. O *H. ducreyi* é capaz de escapar da ação de fagócitos, o que aparenta ser um mecanismo de evasão do sistema imune, importante fator na patogênese da infecção. As lesões ulcerativas são associadas a infiltrado de células mononucleares na derme, consistindo de número significativo de linfócitos TCD4⁺. Esse infiltrado celular, por sua vez, facilita o mecanismo de coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Beigi, 2012).

1.3 Gênero *Haemophilus*

Todos os membros do gênero *Haemophilus* são pequenos, pleomórficos, cocobacilos Gram-negativos. O gênero consiste de diversas espécies, incluindo algumas que são