



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**MAPEAMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO RECEPTOR DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL ALFA**

Aluno: Jéssica Regina da Costa Silva

Orientador: Carlos Ueira-Vieira

Co-orientadora: Fernanda de Assis Araújo

**UBERLÂNDIA - MG
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**MAPEAMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO RECEPTOR DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL ALFA**

Aluno: Jéssica Regina da Costa Silva

Orientador: Carlos Ueira-Vieira

Co-orientadora: Fernanda de Assis Araújo

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética).**

**UBERLÂNDIA - MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586m Silva, Jéssica Regina da Costa, 1992
2015 Mapeamento de peptídeos ligantes ao receptor do fator de necrose tumoral alfa / Jéssica Regina da Costa Silva. - 2015.
62 f. : il.

Orientador: Carlos Ueira-Vieira.
Coorientadora: Fernanda de Assis Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Citocinas - Teses. 3. Peptídeos - Teses. 4. Inflamação - Teses. I. Ueira, Carlos, 1981-. II. Araújo, Fernanda de Assis. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**MAPEAMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES AO RECEPTOR DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL ALFA**

Aluno: Jéssica Regina da Costa Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (Orientador)

Examinadores: Carla Lima da Silva
Wânia Rezende Lima
Patrícia Tieme (suplente)
Simone Deconte (suplente)

Data da Defesa: 30/07/2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Dedicatória

Ao tempo,

pois com ele percebi a transformação das lágrimas em experiência, da dor em sabedoria, das alegrias em memórias e principalmente da ideia em movimento, pesquisa, aprendizado e realização que se concretizam.

Ao amor,

que em forma de família e amigos me guia, me permiti recomeçar e continuar. É com ele, por ele que chego aqui.

A música,

por ser minha válvula de escape, a contradição, o limiar entre o possível e o impossível, por me permitir musicar tudo que o tempo e o amor me ensinaram, musicar está dissertação.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente, a Deus, Ele que se fez presente no tempo, no amor, na música, mas principalmente na fé. Alcançamos muito mais do que imaginamos quando acreditamos.

Agradeço imensamente ao meu pai, minha mãe e minha irmã, vocês são meu alicerce, obrigado por aceitar exatamente como sou, cada um de vocês é essencial pelo que alcanço hoje, que vocês tenham a certeza que auxiliaram da melhor forma e com muito amor. Sou completa ao lado de vocês.

Agradeço ao meu orientador, Carlos Ueira-Vieira por acreditar no meu potencial e pela oportunidade de crescer como profissional por meio deste trabalho. Obrigado pela confiança, por me instigar questionamentos e principalmente, por partilhar seus conhecimentos com paciência e entusiasmo.

A minha co-orientadora Fernanda de Assis e a técnica Simone Deconte pela contribuição e aprendizado obtidos através da parceria com seu grupo de pesquisa que me acolheu e auxiliou no enriquecimento deste trabalho e da minha formação profissional. Vocês são um exemplo profissional a se seguir.

Agradeço a Banda 7 Sons, a Thais e Lobão por podermos ser o Rock Mensagem, pelas histórias, por aturar o estresse e principalmente por entender quando estou ausente. Em especial, ao meu companheiro, namorado e baixista, Zé Luiz pela compreensão, puxões de orelha e por sua calma e amor dedicado.

Agradeço a amizade e companheirismo dos que caminham ao meu lado desde a graduação: Bianca Uliana, Mariana Zóia e Victor Alexandre. Em especial a Aline Gomes, uma amiga que me inspira com a força, dedicação e altruísmo que possuí. Obrigado por sempre ouvir minhas reclamações e me mostrar o lado positivo de tudo.

Aos colegas de laboratório, da Pós-Graduação e da vida pessoal. Em especial: a Leane Cunha pela sintonia, pela amizade e principalmente pelo apoio no meio das turbulências da vida acadêmica e pessoal. Agradeço à Emília Rezende, Izabella Cristina, Cláudia Mendonça, Mayara Ingrid e Roberta Rezende pela compreensão, por terem me acolhido e transmitido tantos conhecimentos, pela confiança profissional firmada em uma parceria que me trouxe uma evolução não só profissional, mas pessoal.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação Genética e Bioquímica pela disponibilização de equipamentos e estrutura, a CAPES pelo investimento realizado para produção científica e aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir para melhoria deste trabalho.

Meu obrigado a cada um que percorreu esta caminhada ao meu lado, seja integralmente ou em alguns trechos. Hoje finalizamos uma etapa a fim de crescer muito mais.

E vai caminhando além de tudo, vem encontrar, transformar
também o seu mundo! Começou...

Viajante sem bússola - Banda 7 Sons

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.	CONCEITOS BÁSICOS DA RESPOSTA IMUNE	16
1.1.	Características gerais da imunidade	16
1.1.1.	Inflamação e autoimunidade	19
2.	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α)	20
2.1.	Bloqueadores de TNF- α	22
2.2.	Aplicações do TNF- α no câncer	23
3.	<i>PHAGE DISPLAY</i>	26
4.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	28

CAPÍTULO II - ARTIGO

1.	INTRODUÇÃO	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1.	Voluntários	40
2.2.	Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	40
2.3.	<i>Biopanning</i>	40
2.4.	Síntese do peptídeo	42
2.5.	Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular	42
2.6.	Estímulo em PBMC e detecção de IL-1 β e IL-10 <i>in vitro</i>	42
2.7.	<i>Western Blot</i>	43
2.8.	Animais	43
2.9.	Implante das esponjas para validação <i>in vivo</i> da atividade dos peptídeos	44
2.10.	Dosagem de hemoglobina	44
2.11.	Dosagem de colágeno solúvel	44
2.12.	Determinação de neutrófilos e macrófagos no infiltrado tecidual do implante	45
2.13.	Análise <i>in silico</i>	46
2.14.	Análise Estatística	46
3.	RESULTADOS	47
3.1.	Seleção de fagos ligantes ao receptor TNF- α por <i>Phage Display</i>	47
3.2.	Os peptídeos selecionados não apresentam citotoxicidade em PBMC	48
3.3.	Dosagem das citocinas IL-1 β e IL-10	49
3.3.1.	Estímulo com peptídeos	49
3.3.2.	Estímulo com TNF- α e peptídeos	50
3.4.	O fator de transcrição NF- κ B é ativado sob estímulo dos peptídeos	51
3.5.	O peptídeo 3 apresenta resposta inflamatória <i>in vivo</i>	51

3.6.	Interação do peptídeo 3 e complexo TNF-TNFR2	52
4.	DISCUSSÃO	54
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	Anexo I - Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa	61
	Anexo II - Termo de consentimento para coleta de material biológico.	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo I - Fundamentação Teórica	
Figura 1 - Linhas de defesa do sistema imunológico	17
Figura 2 - Interação entre as imunidades inata e adaptativa	18
Figura 3 - Biossíntese e ação do TNF- α	20
Figura 4 - Interação TNF- α e TNFR1	21
Figura 5 - Principais bloqueadores do TNF- α	23
Figura 6 - Paradoxo do TNF- α no câncer	24
Figura 7 - Tecnologia <i>Phage Display</i> : fagos e seleção	26
Capítulo II - Artigo	
Resumo Gráfico	38
Figura 1 - Imunoreatividade dos fagos isolados por <i>Phage Display</i>	48
Figura 2 - Ensaio de citotoxicidade das três doses de cada peptídeo	48
Figura 3 - Dosagem de IL-1 β e IL-10 (peptídeo)	49
Figura 4 - Dosagem de IL-1 β e IL-10 (peptídeo e TNF- α recombinante)	50
Figura 5 - Avaliação da fosforilação do NF- κ B	51
Figura 6 - Dosagem de hemoglobina, colágeno, MPO e NAG	52
Figura 7 - Alinhamento tridimensional entre peptídeo 3 e PDB 3ALQ	53
Figura 8 - <i>Docking</i> da estrutura do peptídeo 3 predita com o PDB 3ALQ	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo II - Artigo	
Tabela 1 - Títulos de enriquecimento dos ciclos de seleção	47

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância
CEP	Comitê de Ética e pesquisa em humanos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECL	Eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
FDA	Administração de alimentos e drogas
g	Gramas
H ₂ O ₂	Água oxigenada
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosise
Kd	Constante de dissociação
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
N	Normal
NAG	N-acetil-beta-D-glucosaminidase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
Ng	Nanogramas
NK	Natural <i>killer</i>
nm	Nanômetros
OD	Densidade ótica
OPD	1,2 ortofenilenodiamino
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PDB	Banco de dados de proteínas
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage Display</i> New England Biolabs
pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
pV	Proteína V capsídica de bacteriófagos filamentosos
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil de sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média

SPPL	Proteínas SPP like
sTNF- α	Fator de necrose tumoral alfa solúvel
TACE	Enzima conversora de fator de necrose tumoral alfa
TAM	Macrófagos associados a tumores
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
tmTNF- α	Fator de necrose tumoral alfa transmembranar
TNFR I	Receptor tipo I de TNF- α
TNFR II	Receptor tipo II de TNF- α
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa humano
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
x g	Força centrífuga
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosideo
μ L	Microlitros

APRESENTAÇÃO

A resposta imunológica é mediada por uma série de células e componentes solúveis, como os macrófagos que ao serem ativados são as principais células secretoras do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esta citocina interage com os receptores TNFR1 e TNFR2 na efetivação da resposta inflamatória aguda. Sua ação é alterada de acordo com o tipo de TNF- α , os níveis liberados e tipo do receptor ativado.

No câncer, a secreção do TNF- α em pequenas quantidades por células tumorais, auxilia na angiogênese e na liberação de fatores de crescimento que culminam na metástase. Porém, quando há o aumento de TNF- α por células sadias do organismo é observado a destruição da neoplasia, dada a presença de sensibilidade a citocina. Desta forma, mesmo com o paradoxo da sua ação, o TNF- α apresenta potencial como agente antitumoral e pode ser combinado a outros antineoplásicos. Contudo, é importante estudar as variáveis de cada patologia e identificar em que ponto o TNF- α age para garantir a eficiência do tratamento, bem como a redução dos efeitos colaterais.

Essa dissertação está dividida em dois capítulos: o **Capítulo I** cujo objetivo é expor e introduzir informações relevantes para a compreensão deste trabalho, com breve revisão sobre o tema desenvolvido; e o **Capítulo II** que aborda o trabalho experimental na busca de ligantes aos receptores TNF- α com papel imunomodulador, expondo os resultados obtidos. Este capítulo está apresentado em formato de artigo científico, seguindo as normas do periódico.

CAPÍTULO I
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. CONCEITOS BÁSICOS DA RESPOSTA IMUNE

1.1. Características gerais da imunidade

O sistema imunológico é definido como o conjunto de células e moléculas solúveis responsáveis pela resposta contra antígenos exógenos, de forma coordenada, garantindo a proteção ao organismo e a restauração da homeostase (Beutler, Bruce, 2004; Abbas *et al.*, 2012; Castelo-Branco e Soveral, 2014). Este sistema conta com dois tipos de imunidades responsáveis pela resposta imunológica, são elas: a imunidade inata e a imunidade adaptativa (Parkin e Cohen, 2001; Turvey e Broide, 2010; Tomar e De, 2014).

A imunidade inata ou natural é a ativada pelo sistema imunológico assim que o organismo é exposto ao patógeno. Essa linha de defesa é inespecífica e está presente em todos vertebrados desde o nascimento. Por ser um sistema de defesa desenvolvido por milhares de anos, ele é bastante rápido e conservado, considerado tão importante quanto a imunidade adaptativa (Medzhitov e Janeway Jr, 1997; Hoffmann *et al.*, 1999; Beutler, Bruce, 2004).

As células *natural killer* (NK), o sistema complemento, as células fagocitárias e uma diversidade de proteínas sinalizadoras compõem a imunidade inata (Beutler, B., 2004; Bruce Alberts, 2010; Chaplin, 2010; Cruvinel *et al.*, 2010). Esses componentes estão inativados na homeostase, porém a pele intacta, o muco e o revestimento gastrointestinal protegem o organismo a todo momento e compõem a primeira linha de defesa encontrada pelo patógeno, denominada barreiras físicas (Turvey e Broide, 2010). Em suma, todo esse conjunto auxilia na proteção do organismo, de maneira ampla e rápida, levando a destruição do patógeno ou das células infectadas (Figura 1) (Silva, 2001).

As células NK apresentam funções complexas e por isso são consideradas um componente presente no limiar de ambas as imunidades. Elas agem principalmente na destruição de células infectadas com o patógeno e na ativação de células fagocitárias (Vivier *et al.*, 2011). As células fagocitárias são representadas pelos macrófagos e neutrófilos e têm funções neutralizadoras sobre o patógeno por meio da internalização do corpo estranho, além de serem

as principais células secretoras de citocinas (Chaplin, 2010; Murphy *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

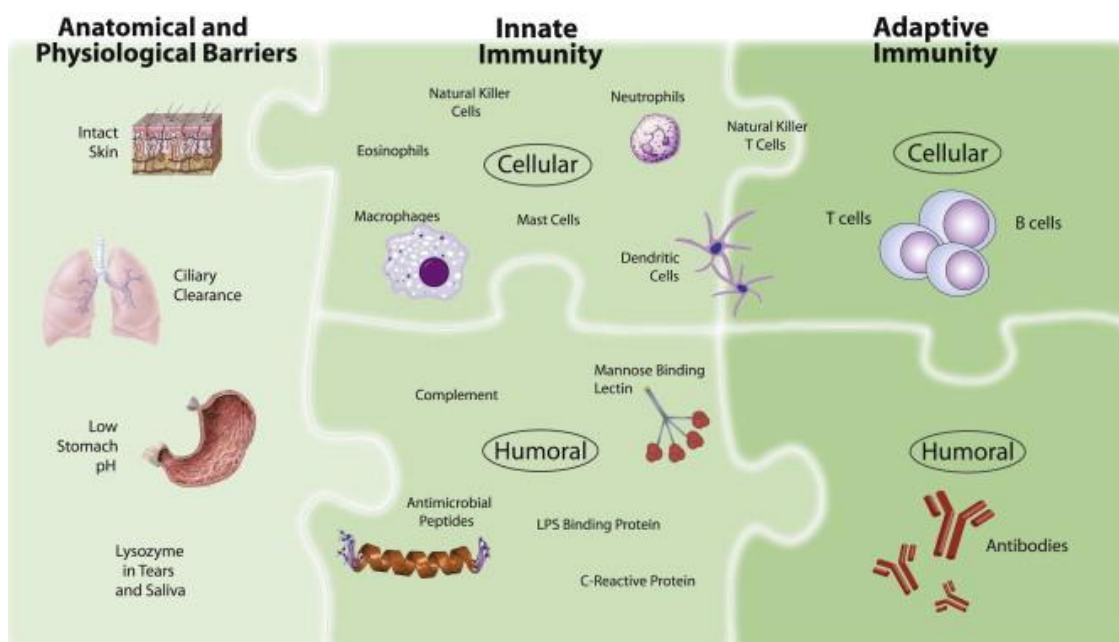


Figura 1 - Divisão dos níveis de defesa do sistema imunológico. Os elementos do sistema imune podem ser divididos em níveis. Cada uma das linhas de defesa tem elementos espalhados pelo organismo e a interação entre as imunidades é essencial para o bom funcionamento da resposta contra o patógeno e manutenção da homeostasia. Retirada de Turvey e Broide (2010)

As citocinas, por sua vez, são proteínas mediadoras da comunicação entre célula-célula e fundamentais na sinalização em ambas imunidades (Bruce Alberts, 2010). As principais citocinas envolvidas na regulação da imunidade inata são as quimiocinas (citocinas estruturalmente homólogas, que estimulam a migração e ativação de leucócitos), interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-10, IL-12, interferon alfa (IFN- α), IFN- β e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Murphy *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

A imunidade adaptativa é geralmente acionada pelo sistema imunológico após a imunidade inata, apesar da ação em conjunto também ser possível. É específica, apresenta alta variabilidade e memória imunológica (Beutler, B., 2004). A magnitude da defesa mediada pela imunidade adaptativa é desenvolvida de acordo com o número de exposições ao antígeno, intensificando a resposta e ativando-a rapidamente quando o organismo é exposto novamente ao antígeno (Chaplin, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

Esta imunidade é dividida em outros dois tipos: resposta humoral e resposta celular. A primeira é mediada por imunoglobulinas secretadas pelos

linfócitos B que interagem com alta afinidade e especificidade aos antígenos. Já a segunda resposta é mediada pelos linfócitos T que interagem diretamente com outras células efetoras por meio da apresentação do antígeno promovendo a destruição das células infectadas e eliminação do patógeno (Flajnik e Du Pasquier, 2004; Bruce Alberts, 2010).

A ativação de linfócitos B e T é o gatilho para a formação das células da memória que conseguem sobreviver por longos períodos, mesmo depois da contenção da infecção (Beutler, Bruce, 2004; Bonilla e Oettgen, 2010; Murphy *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012). A imunidade adquirida conta com citocinas que medeiam e regulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos, bem como a ativação de células efetoras, tais como: IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TGF- β , IL-13 e IL-17 (Abbas *et al.*, 2012).

Sendo assim, as imunidades inata e adaptativa formam uma rede interligada, defendendo o organismo dos diversos patógenos reconhecendo-os e ativando os mecanismos necessários para sua eliminação e redução dos danos colaterais causados aos tecidos do hospedeiro (Figura 2) (Murphy *et al.*, 2010; Shanker, 2010).

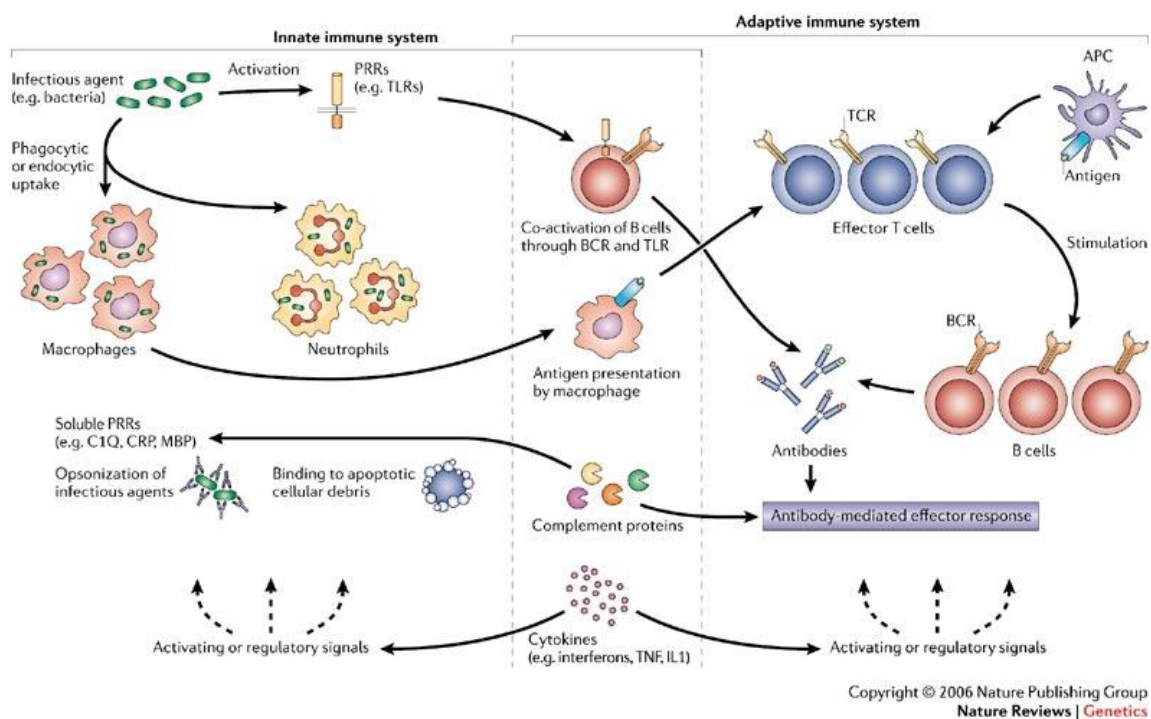


Figura 2 - Representação gráfica da interação e mecanismos de ação de cada componente das imunidades inata e adaptativa. Retirada de Gregersen e Behrens (2006) *Nature Reviews Genetics* 7, 917-928.

Para garantir que os mecanismos de defesa não ataquem as células saudáveis e próprias, o organismo ainda desenvolveu um mecanismo de tolerância conceituado como a falta de responsividade do sistema imune a antígenos derivados de tecidos próprios, conhecido também como autotolerância (Murphy *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

1.1.1. Inflamação e autoimunidade

O processo inflamatório é efetivado com a ativação da resposta imune após a exposição ao antígeno, porém quando o sistema imune apresenta falhas na ativação e regulação da inflamação, a resposta imune pode causar danos nos tecidos e patologias (Chan e Carter, 2010; Abbas *et al.*, 2012).

A autoimunidade é a falha dos mecanismos normais de autotolerância, que provocam a ativação do sistema imune adaptativo por meio do reconhecimento defeituoso de antígenos próprios desencadeando o processo inflamatório crônico (Yu *et al.*, 2005; Gregersen e Behrens, 2006; Chan e Carter, 2010). Graças aos avanços alcançados nas áreas de Genética e Imunologia foi possível elucidar a base molecular e compreender o papel da diferenciação de células T autoimunes em células efetoras bem como a influência da tolerância imunológica (Sakaguchi *et al.*, 2012).

As doenças autoimunes são desenvolvidas pela autoimunidade e apresentam ação órgão-específica ou sistêmica (Wynn *et al.*, 2013), as principais são: artrite reumatoide (Araujo *et al.*, 2015), uveíte (Caspi, 2010) e lúpus eritematoso sistêmico (Yu *et al.*, 2005). As citocinas também apresentam importante papel no agravamento das inflamações e no próprio diagnóstico da patologia, dentre elas: a interleucina 1 (IL-1), interleucina 8 (IL-8), interferon γ (INF- γ) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), comumente encontradas nos locais de inflamação (Murphy *et al.*, 2010).

2. FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α)

O TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que apresenta 17kDa, em sua forma solúvel. Ao ser descoberta recebeu tal nomenclatura por ser uma substância sérica que promove a necrose de tumores; somente posteriormente os mecanismos de ação via inflamação e apoptose foram identificados (Abbas *et al.*, 2012; Tse *et al.*, 2012). Juntamente com a IL-1, o TNF- α é considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda, auxiliando as células da imunidade inata (Fischer *et al.*, 2015).

Esta citocina é secretada principalmente por macrófagos e monócitos ativados e tem ação sob neutrófilos e células endoteliais. O TNF- α apresenta duas formas descritas e ativas biologicamente, são elas: a forma transmembrana (tmTNF) e a forma solúvel (sTNF) (Horiuchi *et al.*, 2010).

A forma transmembrana é precursora da forma solúvel do TNF- α , apresenta ação bidirecional, seja como ligante ou como receptor (Horiuchi *et al.*, 2010). A biossíntese do TNF- α é dada pela formação do monômero da proteína precursora ancorada a membrana (tmTNF- α) e posteriormente a junção com os monômeros para obter o homotrîmero (Watts *et al.*, 1999; Palladino *et al.*, 2003).

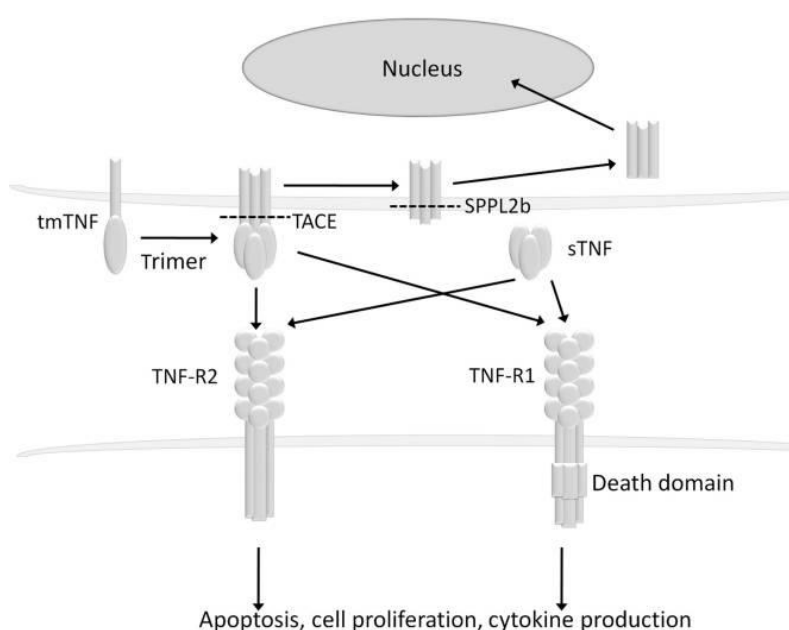


Figura 3 - Representação da síntese de TNF- α e ação de ambas formas da citocina. Retirado de Tracey *et al.* (2008).

O processamento é realizado pela metaloproteínase TACE (Enzima Conversora de TNF-A), que cliva a forma tmTNF- α obtendo a forma solúvel do TNF- α (Dhanjal *et al.*, 2014). Após a clivagem entre Ala76 e Val77 com a TACE, o restante do trímero presente na membrana é novamente clivado, porém com proteínas SPP-*like*, ao final o produto remanescente é translocado para o interior do núcleo para sinalização (Figura 3) (Mohan *et al.*, 2002; Fluhner *et al.*, 2006; Friedmann *et al.*, 2006; Horiuchi *et al.*, 2010).

Os receptores do TNF- α são conhecidos como TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75), apresentam domínios extracelulares ricos em cisteína e estrutura homotrimérica. O TNFR1 apresenta um domínio de morte (DD) e ao ser ativado por meio da interação com TNF- α recruta proteínas adaptadoras (TRADD, FADD) responsáveis pela ativação das MAP quinase (proteínas quinase ativadas por mitógeno), do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e ativação da via das caspases desencadeando por sua vez, a apoptose (Figura 4) (Watts *et al.*, 1999; Maney *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2015).

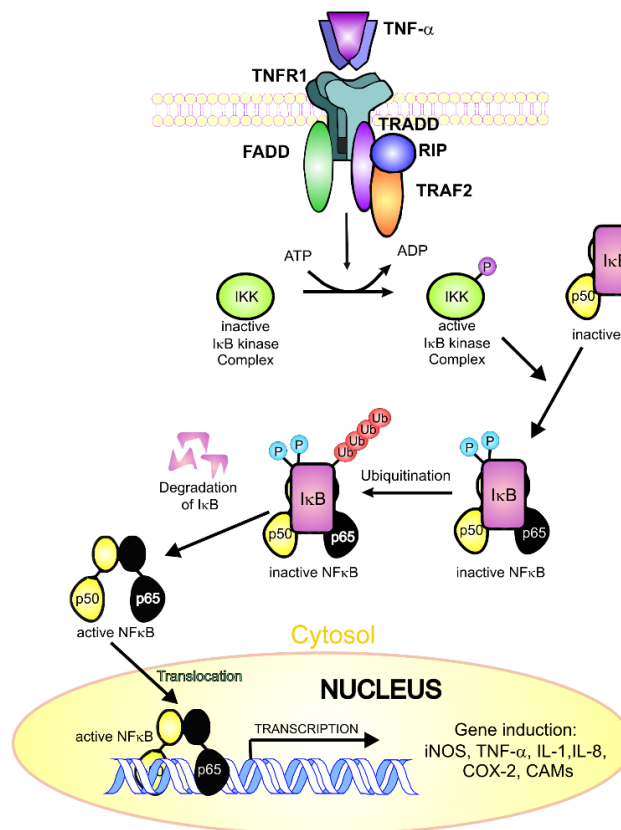


Figura 4 - Cascata de ativação após interação do TNF- α e seu receptor TNFR1. Retirado de Ingaramo *et al.* (2013).

Desta forma, a ligação do TNF- α no TNFR1 induz indiretamente a expressão de genes como a interleucina 1 beta (IL-1 β), por meio da ativação do NF-kB (Ingaramo *et al.*, 2013). Já o TNFR2 regula a ativação de células T, interação entre células dendríticas e NK, além de ser totalmente ativado apenas pelo tmTNF- α . Apesar de não apresentar domínio de morte pode induzir a apoptose indiretamente por meio da ativação do TNFR1.

O TNF- α se liga principalmente ao TNFR1 e geralmente as interações com TNFR2 apresentam menor afinidade e culminam na ação no TNFR1 (Watts *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2015). Ambos receptores são encontrados na maioria das células, principalmente o TNFR1. A afinidade da ligação do TNF- α aos seus receptores, comparado a outras citocinas, é considerada baixa com constante de dissociação (Kd) de 0,5 e 1,0x10⁹ M para o TNFR2 e TNFR1, respectivamente (Palladino *et al.*, 2003; Tracey *et al.*, 2008).

2.1. Bloqueadores de TNF- α

Nas doenças inflamatórias e autoimunes, os altos níveis de TNF- α prejudicam o quadro clínico do paciente. Este aspecto foi o alicerce para o desenvolvimento de fármacos que se acoplam aos membros da família do TNF- α bloqueando ou minimizando sua ação (Croft *et al.*, 2012; Vinay e Kwon, 2012).

Estudos importantes demonstraram a eficácia dos fármacos bloqueadores de TNF- α , cuja maioria ocupa os TNFR que interferem amenizando os processos inflamatórios promovendo assim, uma melhoria no quadro dos pacientes com doenças autoimunes (Feldmann, 2002; Van Hauwermeiren, Filip *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2012).

Os inibidores do TNF- α podem ser antagonistas de TNFR1 ou bloqueadores do sTNF- α e apesar de ambos agirem na redução da resposta inflamatória o modo de ação é diferente. Ao bloquear o sTNF- α , há uma redução da inflamação crônica e aguda, além disso, a forma tmTNF- α ainda fica disponível mantendo um nível reduzido da resposta imune frente aos patógenos, porém ativo. Já ao bloquear o TNFR1, o sTNF- α permanece livre e pode interagir com o TNFR2 em células com alta expressão do mesmo, promovendo propriedades regenerativas de tecidos e regulando o sistema imunológico.

O aumento do risco de infecções é um dos efeitos colaterais relacionados ao bloqueio do TNF, para evitar esse efeito colateral, os fármacos agem bloqueando parcialmente as vias TNF- α , direcionando o tratamento para solucionar as falhas na resposta imune. Os efeitos adversos gerados por meio do uso dos antagonistas e bloqueadores do TNF- α à longo prazo ainda é pouco compreendido. Em casos raros, o paciente pode apresentar neoplasia devido a insuficiência de TNF- α ativo no organismo (Martin *et al.*, 2006).

Dentre os principais fármacos utilizados no bloqueio do TNF- α temos: *infliximab*, *etanercept*, *adalimumab*, *certolizumab pegol* e *golimumab* (Figura 5) (Fischer *et al.*, 2015).

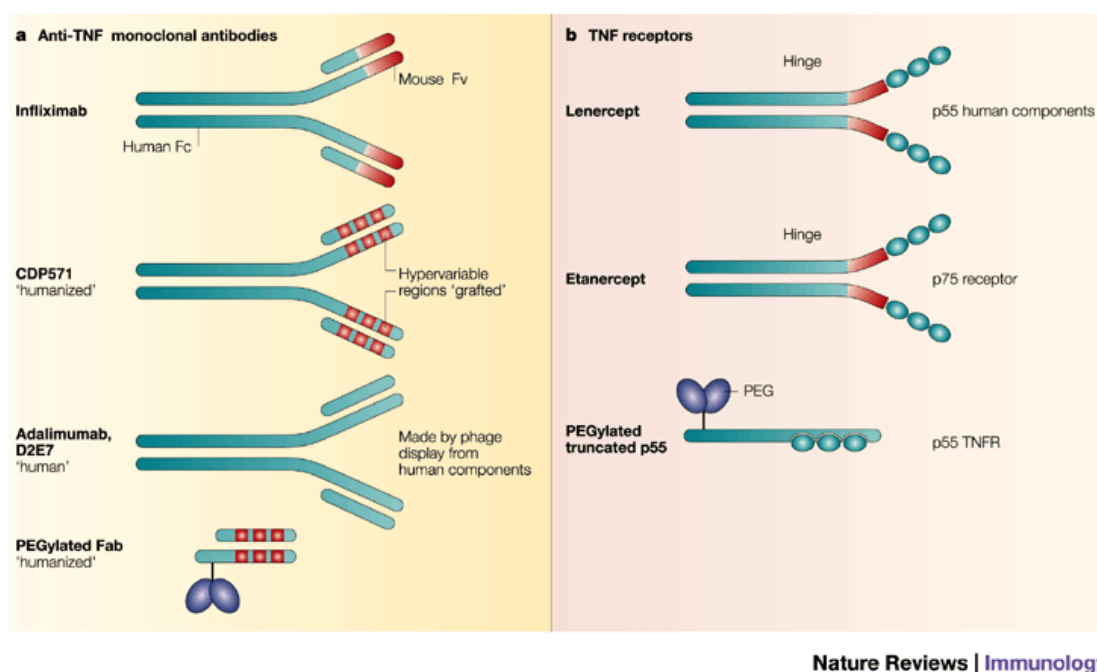


Figura 5 - Principais antagonistas e anti-TNF- α utilizados no tratamento de doenças autoimunes. *Infliximab*, *Adalimumab* são anticorpos monoclonais anti-TNF- α , do qual o último é composto por IgG1 totalmente humana. *Etanercept* é uma proteína de fusão recombinante do TNFR2 (p75). *Certolizumab* é um anti-TNF- α PEGuilado. Retirado de Feldmann (2002)

2.2. Aplicações do TNF- α no câncer

Os macrófagos são monócitos diferenciados, presentes em tecidos do organismo que garantem a defesa específica daquele local. A sua polarização pode ser como M1 (clássico) e M2 (via alternativa), de forma sucinta, o primeiro perfil está ligado à resposta pró-inflamatória, com atividade e liberação de citocinas que auxiliam na sinalização da inflamação, enquanto o outro garante

um perfil anti-inflamatório e imunossupressor (Italiani e Boraschi, 2014). Esta plasticidade dos macrófagos é importante na regulação da resposta imune e patologias (Biswas e Mantovani, 2010).

Segundo Bruce Alberts (2010), o câncer é uma patologia com controle anormal e impróprio da divisão celular, gerando tumores que possuem o crescimento invasivo. No câncer, os macrófagos seguem duas vias opostas, a primeira é desencadear ativação do sistema imunológico e destruir as células tumorais; na segunda via estas células se diferenciam em macrófagos associados a tumores (TAM) e agem a favor do câncer secretando metaloproteinases que degradam a matriz extracelular facilitando a migração de células tumorais, a metástase e promovendo a angiogênese (Wynn *et al.*, 2013).

O TNF- α é secretado principalmente por macrófagos e também atua no câncer como uma molécula paradigma (Baay *et al.*, 2011). Alguns tumores apresentam alta sensibilidade ao TNF- α e o emprego desta citocina desencadeia na morte tumoral (Croft *et al.*, 2013).

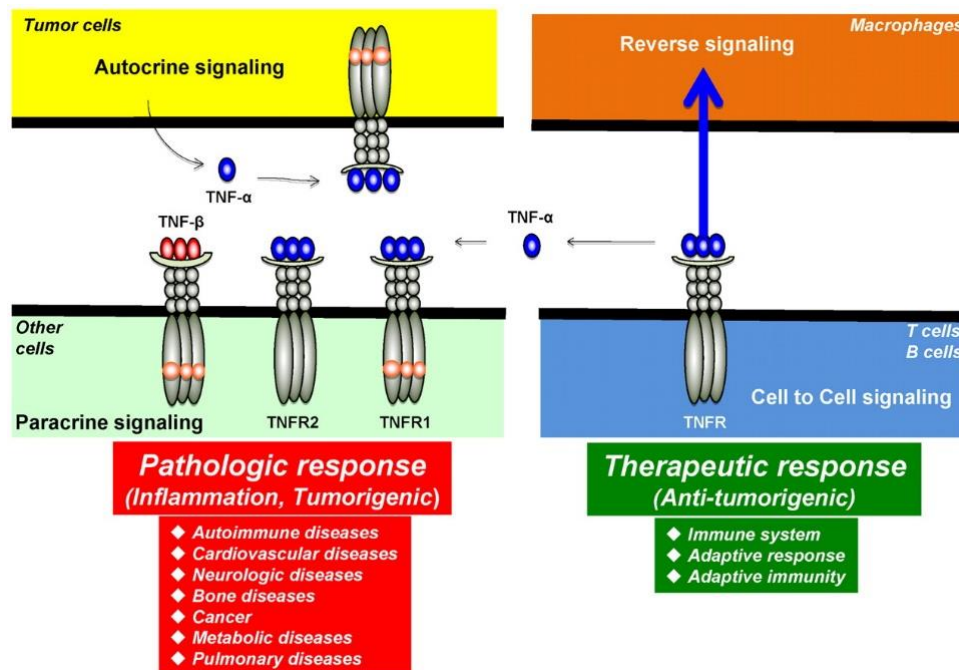


Figura 6 - Paradoxo do TNF- α no câncer. A ação do TNF- α pode ser por meio da sinalização autócrina, parácrina e ainda mediante interação célula-célula e por efeito reverso (Aggarwal *et al.*, 2012).

No início das neoplasias, o papel do TNF- α é crucial, devido a ativação dos fatores de transcrição do NF- κ B, que por sua vez, agem suprimindo o

crescimento tumoral (Perkins, 2004; Waters *et al.*, 2013). Desta forma, o uso de antagonista ao TNF- α elevam as chances da ocorrência de neoplasias (Setoguchi *et al.*, 2006; Park e Ranganathan, 2012; Ben Musa *et al.*, 2014).

Por outro lado, na fase de metástase os altos níveis de TNF- α intensificam e protegem a neoplasia, sendo assim o uso de inibidores da TACE como tratamento, pode ser utilizado para minimizar a quantidade de TNF- α solúvel (Balkwill, 2006; Landry e Gies, 2008; Aggarwal *et al.*, 2012; Dhanjal *et al.*, 2014).

A expressão dos receptores do TNF- α também já foi associada ao câncer, demonstrando que ambos receptores determinam características biológicas do tumor, com destaque ao TNFR1 (Ma *et al.*, 2015).

O emprego do TNF- α no tratamento de neoplasias apresenta diversas variáveis que afetam na sua resposta, são elas: a dose utilizada, célula alvo, sensibilidade hormonal do tipo celular e complexidade do sistema (Balkwill, 2009). Assim, um grupo avaliou o tratamento de câncer de próstata com a neutralização do TNF- α em pacientes em metástase visto que organismo não é sensível ao mesmo; outro grupo propôs o *drug delivery* do TNF- α , direcionando os efeitos da citocina diretamente ao tumor maligno (Tse *et al.*, 2012; Petrenko e Jayanna, 2014).

Atualmente alguns agonistas de TNF- α encontram em estágios de desenvolvimento voltado ao tratamento de neoplasias, dentre eles: TNFerade, Oxelumab, TriMix-DC, Mapatumumab dentre outros ligantes da família do TNF. O Tasonermin é um fármaco agonista do TNF- α , ligante em ambos receptores e aprovado para uso como terapia antitumoral, principalmente em tumores sólidos (Perkins, 2004; Croft *et al.*, 2013).

3. PHAGE DISPLAY

A tecnologia de *Phage Display* consiste na seleção de sequências de peptídeos recombinantes expressos na superfície dos fagos filamentosos f1, fd ou M13 (Smith, 1985). Estes peptídeos apresentam interação proteína-proteína, possibilitando a identificação de ligantes específicos à molécula de interesse (Petrenko e Jayanna, 2014)

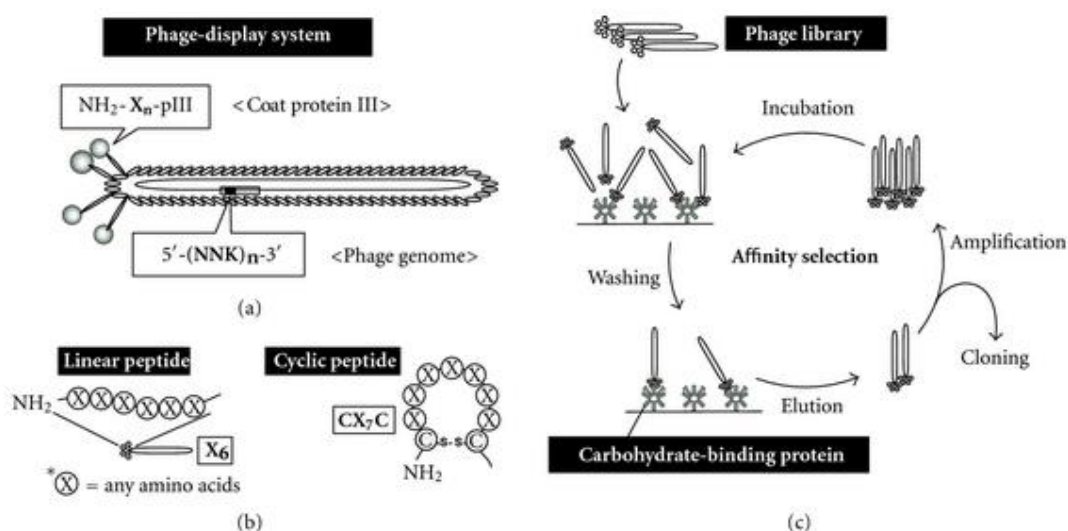


Figura 7 - Tecnologia *Phage Display*. (a) Expressão de peptídeos na pIII (b) Tipos de bibliotecas de peptídeos (c) Representação esquemática do ciclo de seleção, neste exemplo a plataforma são carboidratos e o alvo clones com interação ao alvo. X_n representa o número de resíduos de aminoácidos incluídos na biblioteca. Retirada de Matsubara (2012)

O fago M13 (Figura 7) apresenta diversas proteínas que compõem seu capsídeo, as mais utilizadas comumente na montagem da biblioteca de fagos são as pIII ou pVIII, com 5 cópias e 2700 cópias, respectivamente, em cada fago, expressando peptídeos lineares ou conformacionais. A biblioteca em fagos é incubada com a plataforma de interesse, os fagos inespecíficos e com interações fracas são removidos através de lavagem. Os fagos remanescentes das lavagens são eluídos e amplificados em *E. coli*, e submetido ao próximo ciclo para enriquecimento (Barbas *et al.*, 2004; Matsubara, 2012).

Segundo Arap (2005), o *Phage Display* é uma ferramenta que auxilia áreas como: imunologia, genética e medicina. Devido à identificação e seleção de ligantes específicos aos receptores e a possibilidade de estudos *in vivo*.

Os peptídeos bioativos são formados por sequências de até 20 resíduos de aminoácidos apresentam funcionalidade biológica, capacidade de regular e modificar as funções do organismo, devido à interação que fazem com receptores de determinado sítio alvo (Fujiwara e Fujii, 2009; Perez Espitia *et al.*, 2012).

Os peptídeos por muito tempo não foram atrativos para a indústria farmacêutica devido sua suscetibilidade de degradação e curta duração no organismo, fatores que limitam encontrar os alvos (Mason, 2010).

No entanto, com o avanço tecnológico e obtenção de moléculas específicas, esta barreira começa a ser rompida, visto que o aumento da meia-vida e disponibilidade oral podem ser alcançados para peptídeos e miméticos. Além do mais, existe uma gama de modificações para que estas pequenas moléculas permaneçam por mais tempo no corpo (Moore, 1994; Mason, 2010; Baxter *et al.*, 2014).

A obtenção de sequências de aminoácidos com atividade biológica, por meio da tecnologia de *Phage Display* apresenta diversas aplicações, dentre elas podemos citar: a produção de fármaco ou plataformas de diagnóstico, desenvolvimento de vacinas e biossensores (Zhao *et al.*, 2012; Omidfar e Daneshpour, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar o mapeamento de peptídeos ligantes ao receptor de TNF- α por meio da tecnologia de Phage Display na busca de bioativos, empregando-os na modulação do sistema imune e no tratamento de patologias.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012. ISBN 9788535259728. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=TqbISHVxAKAC> >.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. **Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey**. 2012. 651-665 Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/bloodjournal/119/3/651.full.pdf> >.

ARAP, M. A. Phage display technology: applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 1-9, 2005. ISSN 1415-4757. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572005000100001&nrm=iso >.

ARAUJO, G. R. et al. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: a highly antigenic mimotope of Carbonic Anhydrase III selected in a murine model by phage display. **Arthritis Res Ther**, v. 17, n. 1, p. 168, Jun 23 2015. ISSN 1478-6354 (Linking).

BAAY, M. et al. Tumor Cells and Tumor-Associated Macrophages: Secreted Proteins as Potential Targets for Therapy. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 565187, 09/20 2011. ISSN 1740-2522 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3227419/> >.

BALKWILL, F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 3, p. 409-16, Sep 2006. ISSN 0167-7659 (Print) 0167-7659 (Linking).

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-371, 05//print 2009. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2628> >.

BARBAS, C. F. et al. **Phage Display**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. ISBN 9780879697402. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=uCNAay6pVAgC> >.

BAXTER, D.; ULLMAN, C. G.; MASON, J. M. Library construction, selection and modification strategies to generate therapeutic peptide-based modulators of protein-protein interactions. **Future Med Chem**, v. 6, n. 18, p. 2073-92, 2014. ISSN 1756-8927 (Electronic) 1756-8919 (Linking).

BEN MUSA, R. et al. TNF inhibitors to treat ulcerative colitis in a metastatic breast cancer patient: a case report and literature review. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 19, p. 5912-7, May 21 2014. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327 (Linking).

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2// 2004. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016158900300316X> >.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v. 40, n. 12, p. 845-59, Feb 2004. ISSN 0161-5890 (Print) 0161-5890 (Linking).

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-896, 10//print 2010. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1937> >.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S33-S40, 2// 2010. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674909014055> >.

BRUCE ALBERTS, A. J., JULIAN LEWIS. MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, PETER WALTER. **Biologia Molecular da Celula**. Artmed Editora, 2010. ISBN 9788536321707. Disponível em: < https://books.google.com.br/books?id=bGzbgGZ_A9UC >.

CASPI, R. R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 9, p. 3073-3083, 09/01 2010. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2929721/> >.

CASTELO-BRANCO, C.; SOVERAL, I. The immune system and aging: a review. **Gynecol Endocrinol**, v. 30, n. 1, p. 16-22, Jan 2014. ISSN 1473-0766 (Electronic) 0951-3590 (Linking).

CHAN, A. C.; CARTER, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 5, p. 301-316, 05//print 2010. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri2761> >.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, Feb 2010. ISSN 0091-6749 (Linking).

CROFT, M.; BENEDICT, C. A.; WARE, C. F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 2, p. 147-168, 02//print 2013. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3930> >.

CROFT, M. et al. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 3, p. 144-152, 3// 2012. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490611001839> >.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010. ISSN 0482-5004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&nrm=iso >.

DHANJAL, J. K. et al. Embelin inhibits TNF- α converting enzyme and cancer cell metastasis: molecular dynamics and experimental evidence. **BMC Cancer**, London, v. 14, p. 775, 10/07 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4210574/> >.

FELDMANN, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 5, p. 364-71, May 2002. ISSN 1474-1733 (Print).

FISCHER, R.; KONTERMANN, R. E.; MAIER, O. Targeting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. **Antibodies**, v. 4, n. 1, p. 48-70, 2015.

FLAJNIK, M. F.; DU PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 640-644, 12// 2004. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490604002972> >.

FLUHRER, R. et al. A [gamma]-secretase-like intramembrane cleavage of TNF[alpha] by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 8, p. 894-896, 08//print 2006. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1450> >.

FRIEDMANN, E. et al. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF[alpha] in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 8, p. 843-848, 08//print 2006. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1440> >.

FUJIWARA, D.; FUJII, I. Phage Selection of Peptide "Microantibodies". In: (Ed.). **Current Protocols in Chemical Biology**: John Wiley & Sons, Inc., 2009. ISBN 9780470559277.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases disorders of immune homeostasis. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 12, p. 917-928, 12//print 2006. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1944> >.

HOFFMANN, J. A. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313-8, May 21 1999. ISSN 0036-8075 (Print).

HORIUCHI, T. et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 7, p. 1215-28, Jul 2010. ISSN 1462-0324 (Linking).

INGARAMO, P. I. et al. **Diabetes and Its Hepatic Complication**. 2013. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/export/citation/EndNote/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related-diseases/diabetes-and-its-hepatic-complication> >.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 514, 10/02 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4201108/> >.

LANDRY, Y.; GIES, J.-P. Drugs and their molecular targets: an updated overview. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 1-18, 2008. ISSN 1472-8206. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00548.x> >.

MA, X. et al. Interaction between TNFR1 and TNFR2 dominates the clinicopathologic features of human hypopharyngeal carcinoma. **Tumor Biology**, p. 1-9, 2015/06/27 2015. ISSN 1010-4283. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3684-8> >.

MANEY, N. J. et al. Dendritic cell maturation and survival are differentially regulated by TNFR1 and TNFR2. **J Immunol**, v. 193, n. 10, p. 4914-23, Nov 15 2014. ISSN 0022-1767 (Linking).

MARTIN, P.; MEDEIROS, A. C. D.; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. O papel dos inibidores do fator de necrose tumoral no tratamento da artrite idiopática juvenil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 126-133, 2006. ISSN 0482-5004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042006000200007&nrm=iso >.

MASON, J. M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. **Future Med Chem**, v. 2, n. 12, p. 1813-22, Dec 2010. ISSN 1756-8919 (Linking).

MATSUBARA, T. Potential of Peptides as Inhibitors and Mimotopes: Selection of Carbohydrate-Mimetic Peptides from Phage Display Libraries. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2012, p. 15, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/740982> >.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. A. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295-298, 10/31/ 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400804122> >.

MOHAN, M. J. et al. The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. **Biochemistry**, v. 41, n. 30, p. 9462-9, Jul 30 2002. ISSN 0006-2960 (Print).

MOORE, G. J. Designing peptide mimetics. **Trends Pharmacol Sci**, v. 15, n. 4, p. 124-9, Apr 1994. ISSN 0165-6147 (Print).

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Artmed Editora, 2010. ISBN 9788536321752. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=KOoxFR99i48C> >.

OMIDFAR, K.; DANESHPOUR, M. Advances in phage display technology for drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 10, n. 6, p. 651-69, Jun 2015. ISSN 1746-0441 (Linking).

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 9, p. 736-46, Sep 2003. ISSN 1474-1776 (Print).

PARK, H. J.; RANGANATHAN, P. TNF-alpha antagonism and cancer risk in rheumatoid arthritis: is continued vigilance warranted? **Discov Med**, v. 13, n. 70, p. 229-34, Mar 2012. ISSN 1944-7930 (Electronic) 1539-6509 (Linking).

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-89, Jun 2 2001. ISSN 0140-6736 (Print).

PEREZ ESPITIA, P. J. et al. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 187-204, 2012. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x> >.

PERKINS, N. D. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 2, p. 64-9, Feb 2004. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924 (Linking).

PETRENKO, V. A.; JAYANNA, P. K. Phage protein-targeted cancer nanomedicines. **FEBS Lett**, v. 588, n. 2, p. 341-9, Jan 21 2014. ISSN 1873-3468 (Electronic).

SAKAGUCHI, S.; POWRIE, F.; RANSOHOFF, R. M. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. **Nat Med**, v. 18, n. 1, p. 54-8, Jan 2012. ISSN 1546-170X (Electronic).

SETOGUCHI, S. et al. Tumor necrosis factor alpha antagonist use and cancer in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 9, p. 2757-64, Sep 2006. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking).

SHANKER, A. Adaptive control of innate immunity. **Immunology Letters**, v. 131, n. 2, p. 107-112, 7/8/ 2010. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247810001197> >.

SILVA, L. N. D. C. **Engenharia Imunológica: Desenvolvimento e Aplicação de Ferramentas Computacionais Inspiradas em Sistemas Imunológicos**. 2001. 302 (Doutorado). Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação., Universidade Estadual de Campinas

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 14 1985. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

TOMAR, N.; DE, R. K. A brief outline of the immune system. **Methods Mol Biol**, v. 1184, p. 3-12, 2014. ISSN 1940-6029 (Electronic).

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacol Ther**, v. 117, n. 2, p. 244-79, Feb 2008. ISSN 0163-7258 (Print).

TSE, B. W. C.; SCOTT, K. F.; RUSSELL, P. J. Paradoxical Roles of Tumour Necrosis Factor-Alpha in Prostate Cancer Biology. **Prostate Cancer**, v. 2012, p. 8, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/128965> >.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S24-S32, 2// 2010. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674909010835> >.

VAN HAUWERMEIREN, F.; VANDENBROUCKE, R. E.; LIBERT, C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 5-6, p. 311-319, 10// 2011. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610111000463> >. Acesso em: 2011/12//.

VERMA, P. K. et al. Therapeutic potential of natural products from terrestrial plants as TNF-alpha antagonist. **Curr Top Med Chem**, v. 12, n. 13, p. 1422-35, 2012. ISSN 1568-0266 (Linking).

VINAY, D. S.; KWON, B. S. Targeting TNF superfamily members for therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. **Cytokine**, v. 57, n. 3, p. 305-312, 3// 2012. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466611008398> >.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 7 2011. ISSN 0036-8075 (Linking).

WATERS, J. P.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Tumour necrosis factor and cancer. **J Pathol**, v. 230, n. 3, p. 241-8, Jul 2013. ISSN 1096-9896 (Electronic) 0022-3417 (Linking).

WATTS, A. D. et al. Soluble TNF-alpha receptors bind and neutralize over-expressed transmembrane TNF-alpha on macrophages, but do not inhibit its processing. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 6, p. 1005-13, Dec 1999. ISSN 0741-5400 (Print).

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445-55, Apr 25 2013. ISSN 0028-0836 (Linking).

YU, P. et al. Autoimmunity and Inflammation Due to a Gain-of-Function Mutation in Phospholipase C γ 2 that Specifically Increases External Ca²⁺ Entry. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 451-465, 4// 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761305000993>>.

ZHAO, G. et al. Phage display against corneal epithelial cells produced bioactive peptides that inhibit Aspergillus adhesion to the corneas. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33578, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic).

CAPÍTULO II
ARTIGO

Mapeamento de peptídeos ligantes ao receptor do Fator de Necrose Tumoral alfa

Jéssica Regina da Costa Silva^b, Emília Rezende Vaz^b, Carlos Antônio Trindade da Silva^b, Bruno Antônio Ferreira^c, Simone Ramos Deconte^c, Luiz Ricardo Goulart^c, Fernanda de Assis Araújo^c, Carlos Ueira-Vieira^a.

^a Laboratório de Genética, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil

^b Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil

^c Laboratório de Angiogênese, Área de Ciências Fisiológicas-ARFIS, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 38405-320 Uberlândia, MG, Brasil

O artigo após considerações da banca examinadora será submetido na revista *Peptides* do qual segue a formatação.

ISSN: 0196-9781

Resumo

O fator de necrose tumoral alfa é uma citocina pró-inflamatória importante na resposta imune contra antígenos exógenos. Sua ativação desencadeia a inflamação e sinalização para outros componentes imunológicos que colaboram nos processos inflamatórios, porém falhas na sua resposta podem determinar a concretização de patologias como: o câncer e a artrite reumatoide. O objetivo deste trabalho foi mapear e caracterizar peptídeos ligantes ao receptor do TNF- α a fim de obter uma molécula imunomoduladora. A seleção destes peptídeos com sete resíduos de aminoácidos foi realizada utilizando células mononucleares do sangue periférico e a tecnologia de *Phage display*. Ao final, três peptídeos foram sintetizados e testados através de estímulos em cultura, quantificação da ativação do NF- κ B e ensaio *in vivo* da resposta inflamatória induzida por implantes sintéticos em camundongos com dosagens bioquímicas de componentes da resposta inflamatória como: atividade enzimática de Mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), hemoglobina e colágeno. Dentre os três peptídeos selecionados, um foi descrito como mimético de TNF- α , visto que tanto sua ação *in vitro* quanto *in vivo* é bastante similar ao que encontramos descrito na literatura sobre a ação desta citocina. A obtenção do mimético de TNF- α possibilita o direcionamento de novos ensaios, na busca de novos fármacos imunomoduladores.

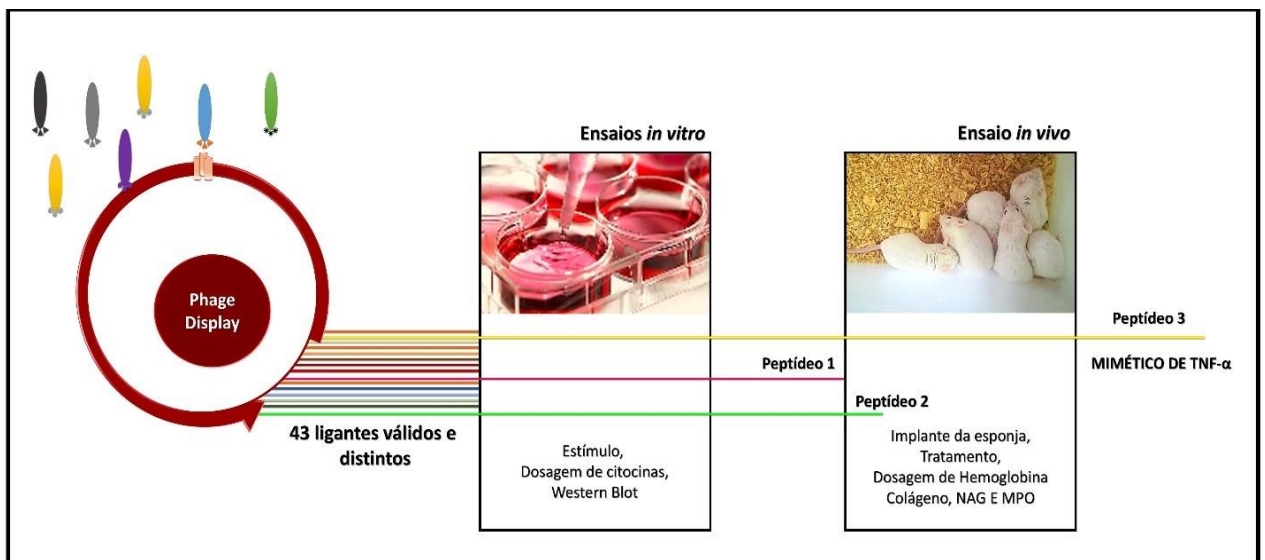
Palavra-chave: mimético, peptídeo, inflamatório, TNF- α , paradoxo.

Abstract

Tumor necrosis factor α (TNF- α) is an important proinflammatory in immune responses against antigens. Its activation triggers inflammation and signaling to other immune components to promote inflammatory processes. However, failure in the TNF- α regulation may determine the pathological development, such cancer and rheumatoid arthritis. The objective of this study was to map and characterize peptides binding to TNF- α receptor (TNFR) by Phage Display in order to select some immunomodulatory peptides. The selection of these peptides was performed using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donor as source TNFR. After selection and pre-screening three peptides were synthesized. After in vitro PBMC stimulation two of them (PhDTNF-7 and PhDTNF-9) were able to significantly increase interleukin 1 β (IL-1 β , $p < 0.05$), a pro-inflammatory cytokine. Also in vitro, those peptides are efficient to increase the serine 536 phosphorylation of the nuclear factor kappa B (NF- κ B), a biomarker for TNF- α pathway activation. Synthetic implants in mice were injected with peptide and same biochemical biomarker to test the effect in immune neutrophil biomarker) and N-acetyl-D- β -glucosaminidase (NAG, macrophage biomarker). Among the three selected peptides, only the PhDTNF-9 could be validated as TNF- α mimetic.

Keywords: mimetic, peptide, inflammatory, TNF- α , Phage Display.

Resumo Gráfico



1. INTRODUÇÃO

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina responsável pelo controle de proliferação celular, apoptose, resposta inflamatória aguda e orientação das células da imunidade inata por meio de moléculas de adesão (Abbas *et al.*, 2012). Sua produção é dada principalmente por macrófagos e monócitos ativos sendo que, sua produção ocorre tanto na forma transmembranar (mTNF), como na forma solúvel (sTNF) (Idriss e Naismith, 2000; Caminero *et al.*, 2011; Van Hauwermeiren, F. *et al.*, 2011). Ambos interagem com seus respectivos receptores: TNFR1 e TNFR2; no entanto, cada interação pode ocasionar numa resposta distinta (Rossol *et al.*, 2007; Puimege *et al.*, 2014; Al-Lamki e Mayadas, 2015).

O TNFR1 é expresso em todas as células, com exceção das hemácias, e apresenta domínio de morte intracelular. Já o TNFR2 é expresso em células do sistema imune, endotélias e algumas populações de neurônios e apresenta funções imunorreguladoras, além de liberar sinais para sobrevivência celular (Grell *et al.*, 1995; Caminero *et al.*, 2011; Al-Lamki e Mayadas, 2015).

Em neoplasias iniciais, o TNF- α age como supressor de tumor, porém seu uso foi reduzido devido a toxicidade sistêmica. Os avanços na Biologia Molecular e Imunologia auxiliam cada vez mais na elucidação dos mecanismos de ação do TNF- α , portanto o interesse em utiliza-lo no tratamento de câncer foi intensificado, visto que o enfoque no direcionamento e aplicação correta podem minimizar os efeitos colaterais (Croft *et al.*, 2013; Waters *et al.*, 2013; Ben Musa *et al.*, 2014).

A tecnologia *Phage Display* desenvolvida por Smith (1985), já foi empregada com sucesso em diversos trabalhos relacionados ao tratamento e diagnóstico de diversas doenças (Liu *et al.*, 2015) como: Alzheimer (De Oliveira-Júnior *et al.*; Droste *et al.*, 2015), artrite reumatoide (Araujo *et al.*, 2015), patologias relacionadas à corticotropina (ACTH) (Liu *et al.*, 2015), doença da mão-pé-boca (Zhang *et al.*, 2015), dentre outros. Essa tecnologia se configura pela construção de bibliotecas randômicas de fagos, por meio da inserção de fragmentos aleatórios de DNA no gene da proteína PIII, expressos na superfície do mesmo. Esses peptídeos apresentam interação proteína-proteína, possibilitando a identificação e seleção de ligantes específicos (Scott e Smith, 1990; Pande *et al.*, 2010; Zhao e Lu, 2014; Mccafferty e Schofield, 2015).

Assim, este trabalho busca por meio da tecnologia de *Phage Display* mapear ligantes aos receptores do TNF- α , que possam atuar como biomoléculas imunomoduladoras no sistema imune.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Voluntários

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo CEP 449/10. Todos voluntários convidados foram esclarecidos a respeito das intenções do estudo e em seguida assinaram o termo de consentimento.

2.2. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para obtenção de PBMC, amostras de sangue foram coletadas em tubo contendo anticoagulante heparina (10ml) e diluídas por inversão em solução tampão fosfato salino - PBS 1X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM Na₂HPO₄, 1,2mM KH₂PO₄) com diluição de 1:1. Em um tubo cônico de 15 ml contendo *Ficoll Histo Paque* 1.077 g/ml (GE Healthcare, Freiburg, Germany), a amostra de sangue diluída foi transferida para realizar a separação, conforme as especificações do fabricante. Para contagem de células viáveis utilizou câmara de Neubauer, com azul de tripan 1% (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brazil). Todas as soluções utilizadas foram autoclavadas ou filtradas e em todos os ensaios *in vitro* utilizamos PBMC.

2.3. Biopanning

A seleção foi realizada sob $2,0 \times 10^6$ de células, ressuspendidas em 200 μ l de solução PBS 1X, no total de três ciclos. No primeiro ciclo, a biblioteca comercial de fagos de 7 aminoácidos conformacionais constrictos - Ph.D.TM - C7C *Phage Display Peptide Library* (New England Biolabs, Cambridge, MA) foi incubada com $1,0 \times 10^{11}$ de fagos diluídos em PBS 1X, por 1 hora a 4°C. O *pellet* de células foi lavado por 5 vezes no primeiro round e 10 vezes nos *rounds* posteriores para remoção de fagos não ligantes. As lavagens foram realizadas com PBS 1X e submetidos a centrifugação de 400 \times g por 10 minutos, ao final o sobrenadante foi descartado. Para obter clones ligantes específicos do receptor

de TNF- α foi realizada a eluição competitiva com 10ng de TNF- α recombinante (*HumanKine™ Tumor Necrosis Factor alpha, human recombinant, expressed in HEK 293 cells* - Sigma-Aldrich, St Louis), incubando por 1 hora a 4°C. Após a eluição foi realizada outra centrifugação para coleta do sobrenadante (eluato).

Para verificar a eficiência da seleção de fagos foi realizada a titulação de uma alíquota do eluato do *round* não amplificado e do *round* amplificado em *Escherichia coli* ER2738 na OD 0,5. As placas com meio LB sólido contendo tetraciclina, IPTG e X-Gal foram semeadas com bactérias infectadas para seleção das bactérias com presença dos fagos. Desta forma, o número de partículas virais presente em cada *round* foi estimado pela contagem de colônias. Para iniciar os *rounds* seguintes foi realizada a amplificação dos fagos presentes no eluato em meio com OD 0,3, incubando por 5 horas à 37°C sob agitação (150 a 200 rpm). Após a incubação, a purificação dos fagos foi realizada com PEG NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl). Ao final do terceiro *round*, as colônias obtidas através da titulação do eluato não amplificado foram coletadas e submetidas à amplificação para posterior extração do material genético. Na reação de sequenciamento foi utilizando o primer 96 M13 - 5' ^{OH}CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3', Premix - DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit *System* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) juntamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA) molde. Foram seguidas as recomendações do MegaBACE 1000 *Sequencing System* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) para o sequenciamento.

O Pré-*screening* foi realizado para avaliar a reatividade dos fagos em contato com PBMC e verificou quais clones apresentavam maior interação com o alvo. Os ensaios foram realizados tanto com sobrenadante, quanto com os clones purificados por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA). A sensibilização da placa foi feita com PBMC e tampão de bicarbonato carbonato (0,1M NaHCO₃, 0,1M Na₂CO₃, pH 9,4), *overnight*. O anticorpo primário utilizado foi o Anti M13 marcado com peroxidase, diluído 1:5000 em PBS 1X. A reação foi revelada com 2,0mg orto-fenilenodiamina (OPD), 5,0ml de tampão citrato fosfato (0,2M fosfato de sódio dibásico, 0,1M ácido cítrico, pH 5,0), acrescida de 2 μ l de água oxigenada (H₂O₂). Após cada etapa eram realizadas lavagens. A reação foi interrompida pelo acréscimo de 20 μ l ácido sulfúrico 4N. A placa foi mensurada na absorvância de 492nm.

2.4. Síntese do peptídeo

Três dos peptídeos obtidos foram encaminhados para síntese química pela *GenScript* (Piscataway, NJ, USA), são eles: pep1: ACLWPYDARCGSSS; pep2: ACVFPSLLRCGSSS e pep3: ACLYPFLLDGSSS. Todos apresentam 14 resíduos de aminoácidos e pureza >85%. As sequências primárias foram modificadas com amidação na região C-terminal com intuito de aumentar a estabilidade da molécula e os peptídeos apresentam conformação constricta, devido a ligação dissulfeto entre os resíduos 2 e 10 (Barbas *et al.*, 2004). Após a síntese, os peptídeos foram ressuspensos em água ultrapura e utilizados para validação *in vitro* e *in vivo*.

2.5. Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade de cada peptídeo em PBMC foram plaqueadas $1,0 \times 10^4$ células em placa de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark), juntamente com as doses a serem testadas: 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M. A placa foi incubada por 24 horas na incubadora com 5% CO₂ à 37 °C (ThermoForma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, HEPA Filter, Fischer Scientific, Dublin, Ireland) e adicionou-se 10 μ l de solução MTT (Sigma-Aldrich, Wicklow, Ireland) em cada poço na concentração de 5mg/ml diluído em PBS1X e incubado novamente em estufa umidificadora por 4 horas. Para solubilização dos cristais de formazano foi inserido 50 μ l de SDS 20% diluído em solução dimetilformamida 50%. A leitura da placa foi mensurada na absorbância de 590nm.

2.6. Estímulo em PBMC e detecção de IL-1 β e IL-10 *in vitro*

Em placa de 24 poços, foram adicionadas $1,0 \times 10^6$ de PBMC por poço, em meio RPMI suplementado com 0,1% de gentamicina. O estímulo foi feito com as doses de 1, 10 e 100 μ M de cada peptídeo, num período de 24 horas, à 37°C e 5% CO₂. Os controles positivos utilizados foram: 50 μ g/ml de Fator de necrose tumoral alfa humano *HumanKine* (Sigma-Aldrich, Wicklow, Ireland) e 10 μ g/ml de lipopolissacarídeo LPS (Sigma-Aldrich, Wicklow, Ireland). As células foram suplementadas com meio RPMI com gentamicina 0,1% e incubadas em estufa contendo atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Além disso, foi realizado um estímulo com os peptídeos e após meia hora adicionou o TNF- α recombinante para identificar se os peptídeos realizavam algum bloqueio na ligação da

citocina e conseqüentemente em sua resposta. Após 24 horas, foi feita a dosagem de interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 10 (IL-10) a partir do sobrenadante resultante utilizando *kits* de ELISA *BD OptEIA - Human IL-1b e Human IL-10* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), conforme as especificações.

2.7. Western Blot

Para avaliar a ativação do NF- κ B, pela fosforilação da Serina 536, estimulou-se $1,0 \times 10^7$ PBMC com a concentração de 100uM de cada peptídeo, incubadas por 15 minutos em estufa CO₂ à 37 °C (ThermoForma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, HEPA Filter, Fischer Scientific, Dublin, Ireland). A lise celular foi realizada com o *Lysis-M Reagent containing complete*, EDTA-free (Roche Molecular Branchburg, NJ), acrescido de inibidores de fosfatase (20mM de NaF e 1mM de Na₃VO₃). As amostras foram quantificadas por Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Walldorf, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de SDS-Page de 12% Tris-glicina, 50ug de amostra foram inseridos nos respectivos poços do gel. Após a corrida transferiu-se as proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi feito com leite desnatado a 5% e a marcação com o anticorpo primário *Rb pAb to NF- κ B p65 (Phospho S536) Abcam overnight* com diluição de 1:1000. Após as lavagens, a membrana foi incubada com anticorpo secundário por 1 hora e lavado para revelação com ECL. A marcação com actina foi realizada com o anticorpo *β -Actin (N-21)* (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) para normalização da quantidade de proteína total carregada no gel de SDS-Page.

2.8. Animais

O projeto foi submetido a avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e apresentou o protocolo de pesquisa aprovado sobre o número 070/14. Todos os camundongos utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFU. Para validação experimental dos ensaios com os peptídeos foram utilizados 40 animais Balb/c machos com idade entre 7 a 8 semanas pesando em torno de 25 a 30 gramas.

2.9. Implante das esponjas para validação *in vivo* da atividade dos peptídeos

Para a mimetização de um processo inflamatório e avaliação da atividade *in vivo* dos peptídeos foram utilizados implantes de esponjas de poliéster-poliuretano (Vitafoam Ltda., Manchester, UK), em formato de disco medindo 5 mm de espessura × 8 mm de diâmetro. Para esterilização dos implantes, os mesmos foram mantidos em álcool 70%, por no mínimo 24 horas, antes da implantação foram fervidos por 30 minutos em água destilada. Para realizar o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com cetamina (6,5mg/kg) e xilazina (90mg/kg). Após anestesia foi realizada a tricomia do dorso do animal e desinfecção local com álcool 70%. O implante foi inserido no subcutâneo na região interescapular. Durante todo tratamento os animais foram monitorados e acondicionados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*.

Os animais receberam tratamento diário intrainplante com os peptídeos, por 9 dias a partir do dia de implantação, nas doses de 0, 10, 100 e 1000ug/kg animal diluídas em 10µl de solução salina. No nono dia pós implantação, os animais foram eutanasiados, os implantes retirados, dissecados, pesados e processados para análises bioquímicas

2.10. Dosagem de hemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi detectada pelo método de *Drabkin* (Teixeira *et al.*, 2006). Metade do implante foi previamente pesada e transferido para tubo de ensaio contendo 2 ml de reagente de cor de hemoglobina *Drabkin* (1% de reagente de cor diluído em água destilada) (Labtest, São Paulo, Brazil). Os implantes foram homogeneizados em Ultra-Turrax por 10 segundos, transferidos para microtubo de 2,0ml e centrifugados a 4°C por 40 minutos a 10,000×g. O sobrenadante foi filtrado com filtro de 0,22 µm (Millipore, MA, USA) transferido para a placa de 96 poços e foi realizada a leitura utilizando espectrofotômetro de microplacas na absorbância de 540nm.

2.11. Dosagem de colágeno solúvel

A outra metade do implante foi pesada e utilizada para análise de colágeno solúvel. O implante foi transferido para microtubos de 1,5ml juntamente com 1.0ml de Salina Triton X (NaCl 0,9% com 0,1% de Triton X-100) e homogeneizados por 10 segundos.

Em seguida, foram centrifugados a 5000×g por 10 minutos a 4°C e transferido para outro microtubo, sendo 10µl do sobrenadante acrescido de 50 µl de *Picrosirius Red*. As amostras foram submetidas a nova centrifugação a 10000×g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500µl de etanol puro livre de metanol. Foi adicionado 1,0ml de NaOH 0,5M e as amostras foram transferidas para placa de 96 poços, juntamente com a curva padrão e realizada a quantificação de colágeno solúvel na leitora de microplacas na absorvância de 540nm (Campos *et al.*, 2008).

2.12. Determinação de neutrófilos e macrófagos no infiltrado tecidual do implante

A fração da esponja utilizada nas dosagens de hemoglobina foi dividida em duas partes, sendo uma delas utilizada na dosagem de mieloperoxidase (MPO) e a outra na dosagem de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) (Teixeira *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2011).

Para a determinação do infiltrado de neutrófilos no implante, foi feita a dosagem da atividade enzimática de MPO. Após pesagem dos implantes, estes foram transferidos para microtubos e ressuspensos em 2,0ml de tampão fosfato de sódio, pH 4.7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA). Uma parcela do sobrenadante foi transferida e acrescida com 0,5% de Brometo de hexadeciltrimetilamônio HTAB, diluído em tampão fosfato de sódio. As amostras foram sonicadas por 10 segundos, seguido do resfriamento em nitrogênio, aquecimento a 100°C em banho maria e posteriormente centrifugadas por 10,000×g por 10 minutos. Para reação utilizou cerca de 100µl de amostra, 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St Louis) a 1,6mM dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e 100µl de H₂O₂ a 0,3mM, diluída em tampão fosfato. A reação foi parada com 50µl de ácido sulfúrico 4M (Sigma-Aldrich, St Louis). A atividade da enzima mieloperoxidase foi obtida pela leitura em leitora de microplacas na absorvância de 450nm.

O infiltrado de macrófagos foi avaliado através da atividade enzimática de NAG. Os fragmentos do implante foram ressuspensos em solução NaCl (0.9% w/v) contendo 0.1% v/v Triton X-100 (Promega) e centrifugado por 3000×g por 10 minutos a 4°C. Foi coletado 100µl de sobrenadante e adicionado 100µl de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidase (Sigma-Aldrich, St Louis) a 2,43mM, diluído em tampão citrato fosfato (0,1 M ácido cítrico, 0,1 M Na₂HPO₄, pH 4,5). As amostras foram incubadas por 30

minutos a 37°C e depois transferidas para placa de 96 poços e acrescido 100µl de tampão glicina 0,2 M, pH 10,6. A leitura foi realizada em leitora de microplacas na absorvância de 400nm

2.13. Análise *in silico*

Dada a importância das ferramentas de bioinformática na predição de interações proteína-proteína, o alinhamento tridimensional no *PepSurf* foi realizado com o peptídeo 3 e a cadeia A do complexo TNF-TNFR2 – PDB 3ALQ. Além disso, a região dos resíduos de aminoácido do peptídeo 3, expressos na PIII dos fagos selecionados foi submetida ao *RaptorX Structure Prediction* para predição da estrutura tridimensional do peptídeo com sua cadeia duplicada (ACLYPFLLDGSSS ACLYPFLLDGSSS). A sequência foi inserida à análise em formato FASTA, com duplicação uma vez que a ferramenta apenas recebe sequências de peptídicas com mais de 26 resíduos de aminoácidos (Källberg *et al.*, 2012). Após o resultado da predição foi realizado o *docking* molecular que apresenta algoritmo baseado nos princípios da complementaridade utilizando o programa *PachtDock* (Duhovny *et al.*, 2002; Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005). Neste caso, submetemos a predição do peptídeo 3 juntamente (ligante molecular) com o PDB 3ALQ (receptor molecular). Todos parâmetros foram utilizados conforme o padrão. Os resultados gerados foram analisados com o *Edu PyMOL Molecular Graphics System*, Versão 1.7.4 Schrödinger, LLC (Lill e Danielson, 2011).

2.14. Análise Estatística

Para análise dos dados, inicialmente fez o teste de normalidade de *D'Agostino and Pearson omnibus normality test*, caso os dados apresentassem normalidade era utilizada a análise de variância (ANOVA) com repetição (amostra em triplicata) e pós teste *Tukey*. Para os dados não paramétricos utilizamos o teste de *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunns* comparando todas colunas. Foi considerado significativo para valores com $p < 0,05$. Nas análises dos dados obtidos pelas dosagens bioquímicas foi feito análise de variância (ANOVA), seguido de pós teste *Newman Keuls*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *GraphPad Prism*, versão 5.0.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção de fagos ligantes ao receptor TNF- α por *Phage Display*

Com o objetivo de encontrar fagos ligantes aos receptores do TNF- α foi obtido a estimativa dos títulos de fagos de entrada por meio da titulação do eluato amplificado, enquanto a estimativa dos títulos de saída foi referente à titulação do eluato não amplificado do *biopanning*. Na Tabela 1, temos os títulos de entrada e saída de partículas virais, tais valores são importantes para considerar quão eficiente foi a seleção de peptídeos ligantes ao receptor do TNF- α .

Ciclo de Seleção	Número de partículas de fagos	
	Entrada	Saída
1°	1.0x10 ¹¹	1.8x10 ⁵
2°	1.2x10 ¹¹	2.0x10 ⁴
3°	1.5x10 ¹¹	4.0x10 ⁴

Tabela 1 - Títulos de enriquecimento das partículas virais nos ciclos de seleção, em unidades formadoras de colônias.

No primeiro ciclo houve uma redução entre o título de entrada e o título de saída, devido às lavagens realizadas no *biopanning* que removem os fagos ligantes de forma inespecífica ou com baixa afinidade, mantendo aqueles clones que apresentavam maior afinidade ligado ao alvo.

Após a seleção 92 clones foram sequenciados, sendo que 47 apresentaram sequências com boa qualidade, denominadas de sequências válidas. Destas 47 sequências válidas, das quais 43 foram distintas quanto a sequência de 7 resíduos de aminoácidos obtida. Todos os clones foram testados quanto a reatividade utilizando *Phage ELISA*, somente sete clones tiveram reatividade significativa maior que o controle (fago selvagem). Os clones B5, F7 e F9 apresentaram maior média de reatividade entre os demais, além de bons resultados na validação *in silico* (resultados não mostrados), assim eles foram escolhidos para síntese química e melhor caracterização (Figura 1).

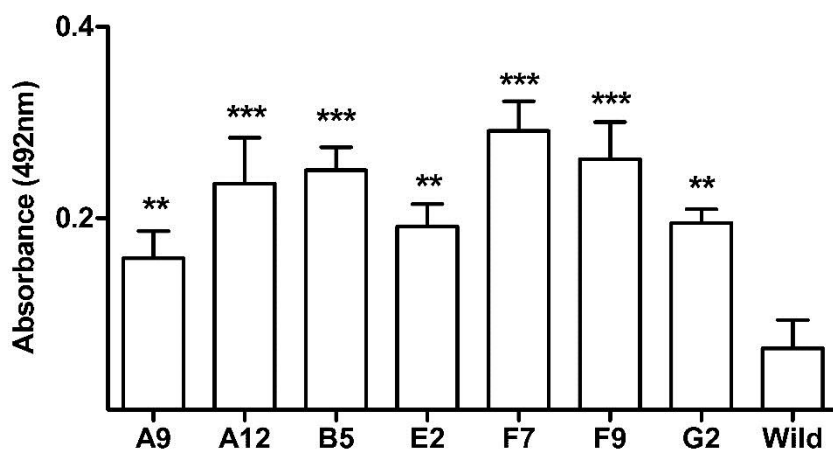


Figura 1 - Imunoreatividade dos fagos isolados por *Phage Display* em PBMC, cada coluna refere a um clone purificados. Controle negativo é o fago selvagem sem peptídeo (*wild*). Os peptídeos sintetizados 1, 2 e 3 correspondem neste ensaio aos clones B5, F7 e F9, respectivamente. Valores significativos foram analisados utilizando *One Way ANOVA* e pós teste *Tukey* e representam a média \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparado com o controle negativo.

3.2. Os peptídeos selecionados não apresentam citotoxicidade em PBMC

O teste de citotoxicidade mostrou que os peptídeos em nenhuma das doses testadas apresentaram diferença estatística significativa comparado ao controle. Assim, as concentrações utilizadas não são citotóxicas para células mononucleares do sangue periférico no período de 24 horas. (Figura 2).

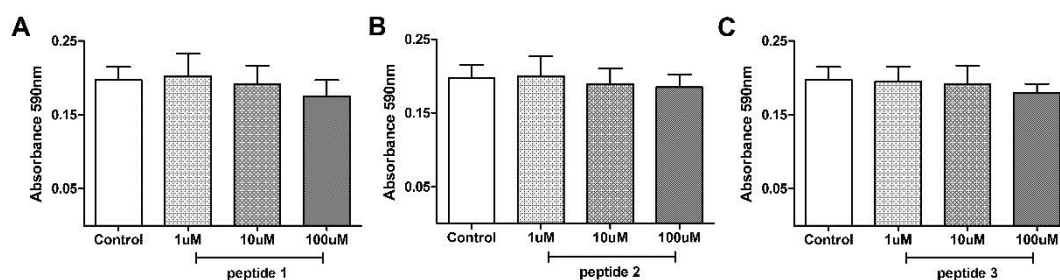


Figura 2 - Ensaio de citotoxicidade das três doses de cada peptídeo por 24 horas utilizando MTT. A - Peptídeo 1, B - Peptídeo 2, C - Peptídeo 3. Os valores são representados com a média \pm desvio padrão SD (n = 3). Valores significativos foram analisados utilizando *One Way ANOVA* e pós teste *Tukey* e representam a média \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparado com o controle negativo.

3.3. Dosagem das citocinas IL-1 β e IL-10

3.3.1. Estímulo com peptídeos

As células mononucleares isoladas ao serem estimulada com LPS produzem citocinas. Aqui nós investigamos se os peptídeos selecionados eram capazes de induzir a produção de citocinas em PBMC. Como controle positivo das reações utilizou-se o estímulo com LPS e como controle negativo apenas a PBMC em meio de cultura. Frente ao estímulo com LPS há aumento da produção das citocinas IL-1 β e IL-10 de modo significativo, demonstrando a viabilidade das células em cultura (Figura 3). Os resultados da dosagem de citocinas revelam que as células mononucleares (PBMC) produziram IL-1 β e IL-10 estatisticamente diferente do controle negativo, após o estímulo com 100uM de peptídeo 2 e 3. Os dados mostram que o peptídeo 1 não apresentou diferença significativa com relação ao controle negativo, em nenhuma das concentrações utilizadas neste estudo.

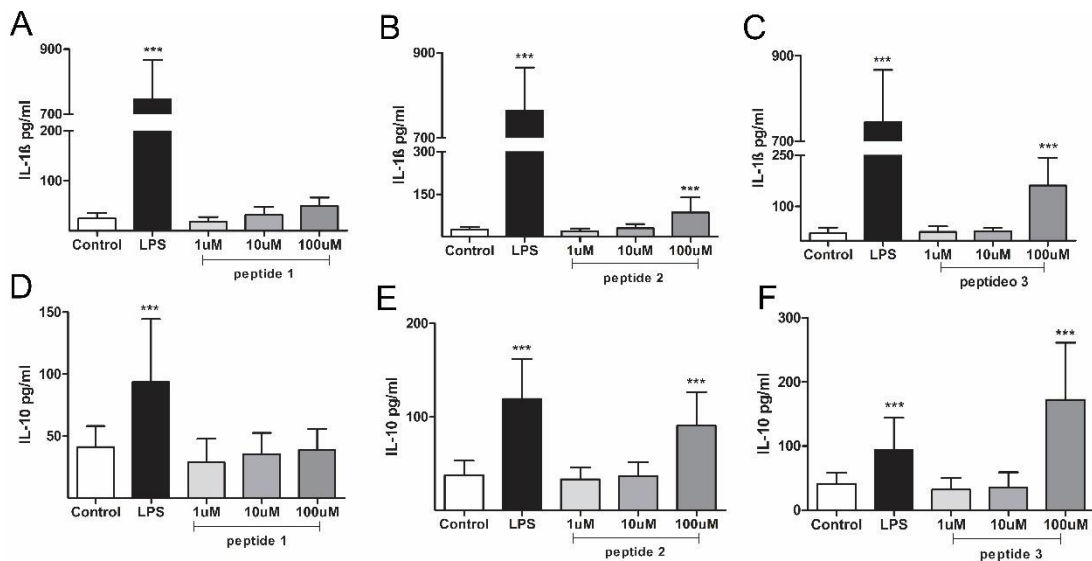


Figura 3 - Gráficos representativos das dosagens para IL-1 β e IL-10 após estímulos com os peptídeos. **A, B e C** - Dosagem de IL-1 β referente aos peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente. **D, E e F** - Dosagem de IL-10 referente aos peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores significativos foram analisados utilizando *One Way ANOVA* e pós teste *Tukey* e representam a média \pm S.E.M. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparado com o controle negativo.

3.3.2. Estímulo com TNF- α e peptídeos

A quantificação de citocinas neste ensaio foi realizada após o estímulo por 30min com as três concentrações de peptídeo seguido do acréscimo de TNF- α recombinante incubados por 24 horas.

Pela dosagem de IL-1 β observa-se o aumento significativo desta citocina comparado ao controle após o estímulo dos três peptídeos avaliados. Contrário ao resultado anterior, o peptídeo 1 só apresentou diferença significativa com a inserção do TNF- α ao estímulo. A indução da produção de citocina pró-inflamatória serve como primeiro indício de que os peptídeos selecionados, com exceção do peptídeo 1, são miméticos de TNF- α (Figura 4).

Os níveis da citocina IL-10 produzidos após os estímulos foram menores se comparados aos níveis encontrados de IL-1 β . Apenas o peptídeo 2 foi observada a diferença estatisticamente significativa comparado ao controle negativo. Enquanto com o peptídeo 1 foi análogo ao comportamento do PBMC sem estímulo. Os peptídeos 2 e 3 quando tratados com o TNF- α recombinante apresentaram uma diminuição na produção de IL-10, ficando praticamente similar ao controle.

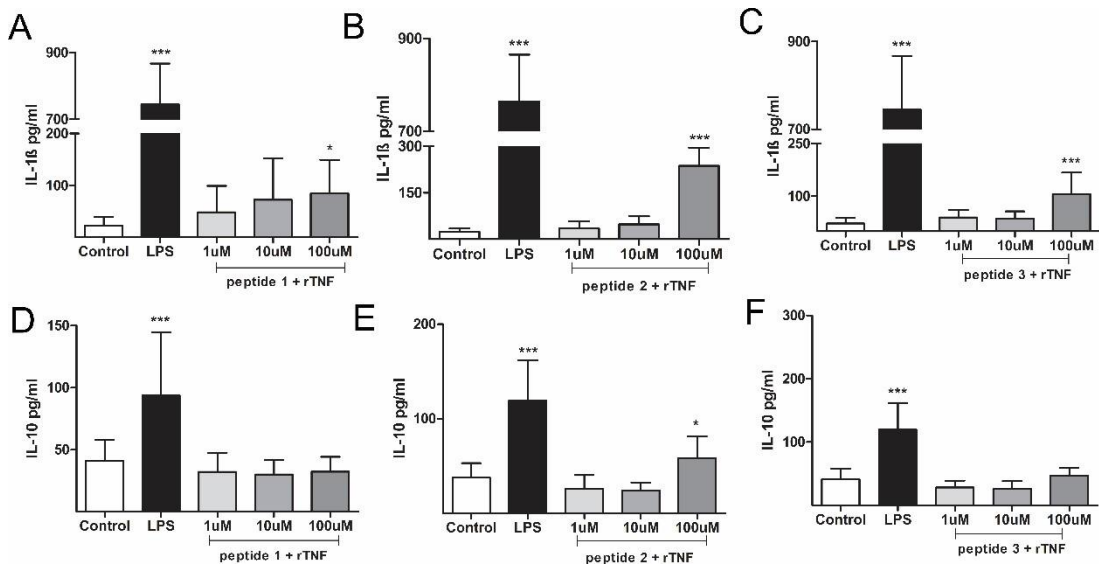


Figura 4 - Gráficos representativos das dosagens para IL-1 β e IL-10 após estímulos com os peptídeos por 30 min, e posterior inserção de TNF- α recombinante. **A, B e C** - Dosagem de IL-1 β referente aos peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente. **D, E e F** - Dosagem de IL-10 referente aos peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente. Os valores significativos foram analisados utilizando *One Way ANOVA* e pós teste *Tukey* e representam a média \pm S.E.M. *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 comparado com o controle negativo.

3.4. O fator de transcrição NF- κ B é ativado sob estímulo dos peptídeos

Visto que os peptídeos podem mimetizar o TNF- α e induzir a produção de citocinas, nós investigamos se os peptídeos 1, 2 e 3 podem ativar a via do NF- κ B. Neste ensaio, as células MDA foram utilizadas como controle positivo por se tratar de uma célula tumoral com alta sinalização do fator de transcrição fator nuclear NF- κ B (Bruce Alberts). A actina foi utilizada como controle e normalizador da reação.

Os resultados mostraram que os três peptídeos foram capazes de induzir a fosforilação do NF- κ B. Desta forma, sugerimos que os peptídeos avaliados foram eficientes ao ligar nos receptores do TNF- α e ativar a cascata de sinalização intracelular culminando na fosforilação do NF- κ B (Figura 5).

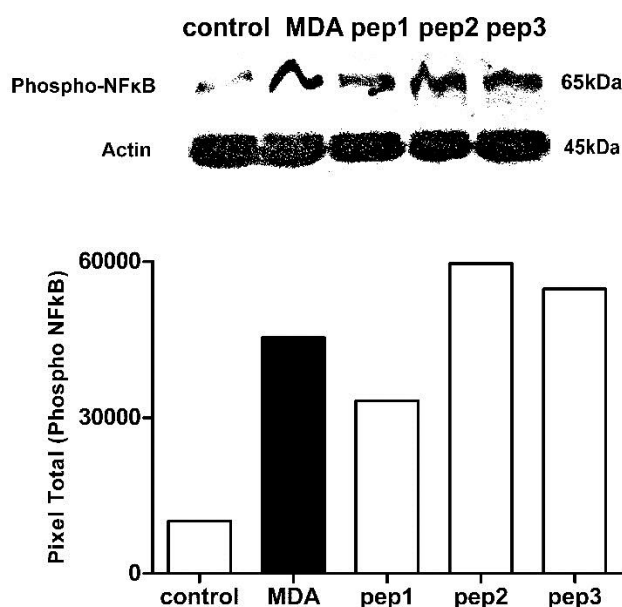


Figura 5 - Avaliação da fosforilação do NF- κ B após estímulo com peptídeos, utilizando a dose de 100uM, para todos peptídeos.

3.5. O peptídeo 3 apresenta resposta inflamatória *in vivo*

Após confirmação de que esses mimetopos são capazes de ativar receptor de membrana e induzir uma resposta pró-inflamatória, foi realizado teste *in vivo* para verificar o comportamento dos peptídeos.

Dentre os peptídeos avaliados no ensaio *in vivo* apenas o peptídeo 3 obteve alteração significativa nas dosagens obtidas após o tratamento em camundongos. Esse peptídeo foi capaz de alterar significativamente tanto o componente inflamatório como

angiogênico da inflamação induzida por implantes sintéticos de esponja. Os parâmetros inflamatórios apresentaram efeito bifásico com redução da atividade enzimática de neutrófilos (MPO) e macrófagos (NAG) na menor dose (10ug/kg) e aumento da atividade dessas enzimas na dose de 1000ug/kg. A angiogênese também foi aumentada na dose de 1000ug/kg enquanto que a quantificação de colágeno solúvel não sofreu alterações significativas (Figura 6).

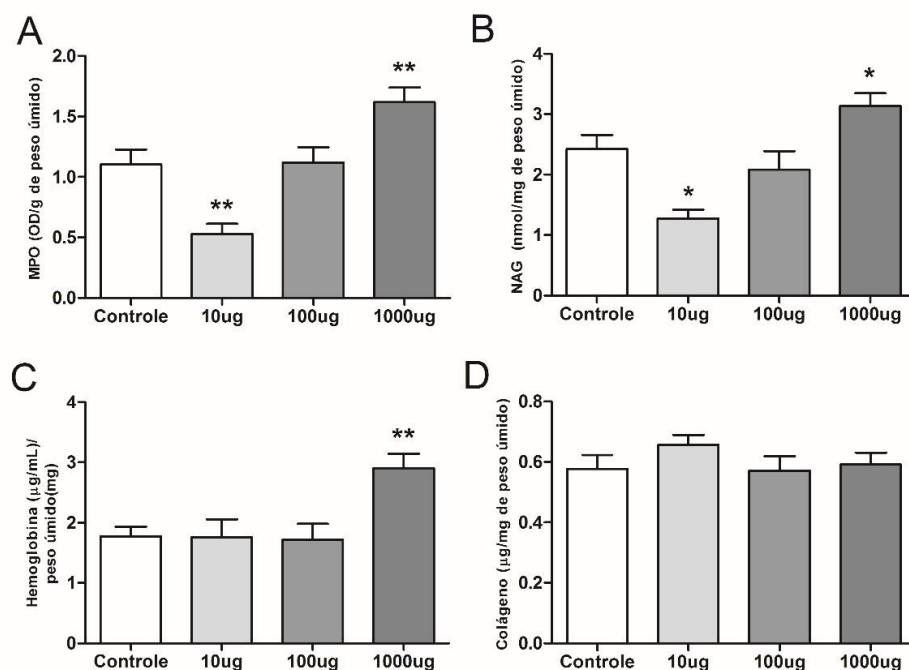


Figura 6 – Análise dos efeitos do peptídeo 3 *in vivo*. (A) infiltrado de neutrófilos (MPO), (B) infiltrado de macrófagos (NAG), (C) conteúdo de hemoglobina e (D) colágeno solúvel. Os valores representam a média \pm S.E.M. Foram considerados significativos para * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado ao controle.

3.6. Interação do peptídeo 3 e complexo TNF-TNFR2

A estrutura tridimensional do complexo *TNF-TNFR2* (PDB - 3ALQ) foi utilizada nas avaliações tridimensionais por apresentar cadeias com o TNF- α (A ao F) e cadeias referente ao receptor do TNF- α (TNFR2) nas cadeias R ao V e a cadeia W. Não foi encontrado nenhum arquivo PDB referente ao receptor tipo I do TNF- α para complementar a análise *in silico*.

O alinhamento tridimensional foi feito utilizando o programa *PepSurf*. O peptídeo 3 mapeou a cadeia A da molécula do TNF- α (Figura 7).

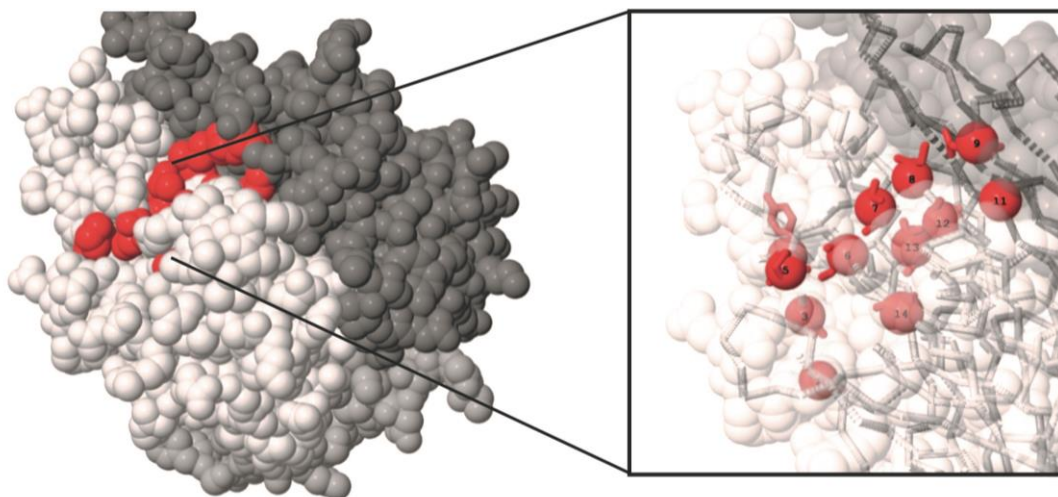


Figura 7 - Alinhamento tridimensional entre o peptídeo 3 com a cadeia A do TNF- α e (PDB) 3ALQ utilizando a ferramenta *PepSurf*.

A predição da estrutura tridimensional do peptídeo 3 foi obtida com o Raptor X *Structure Prediction* em formato PDB e a partir dela, submetemos ao *docking*. Diversas interações com o TNFR2 foram previstas pelo modelo sugerido pelo *PatchDock*. O *docking* é destinado a encontrar transformações de encaixe que produzem boa forma complementaridade molecular. Dentre as quais são mostradas na Figura 8 interações dos resíduos Cys-78, Ser-79, Ser-80 e Asp-81 da cadeia U com os resíduos do peptídeo mimético e a interação entre Arg-122, Pro-123, Gly-124 e Phe-125 com os resíduos. Além de interagir com o receptor, o peptídeo 3 apresenta regiões de alinhamento com o TNF- α .

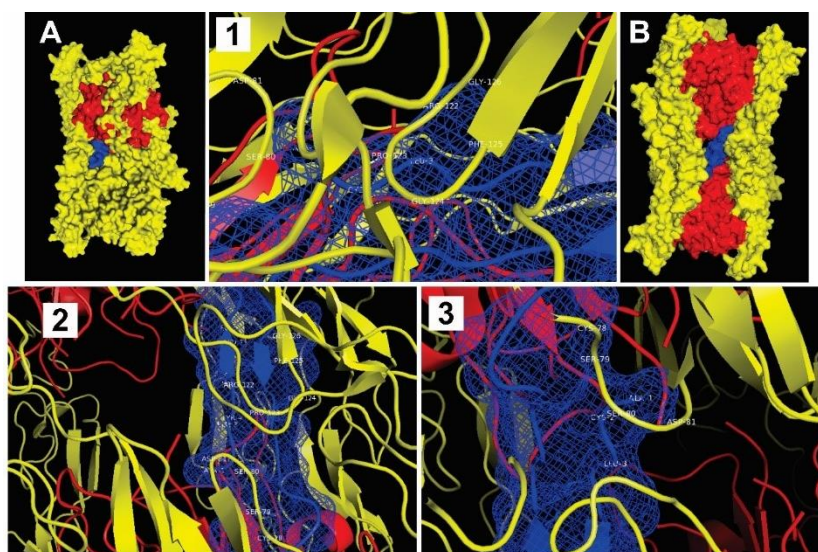


Figura 8 - *Docking* da estrutura em 3D predita do peptídeo 3, juntamente com o PDB 3ALQ. Representado em amarelo TNFR2, vermelho TNF- α e em azul o peptídeo mimético 3 selecionado pela tecnologia *Phage Display*. A e B - Interações entre: TNF- α o peptídeo e TNFR2 em *surface*. As figuras 1, 2 e 3 representam os resíduos de aminoácidos que interagem com o peptídeo 3.

4. DISCUSSÃO

O mapeamento do domínio de ligação do TNF- α ao seu receptor é de grande interesse para a farmacologia. Essa molécula juntamente com o seu receptor é alvo de diferentes medicamentos como *infliximab*, *etanercept*, *adalimumab*, *certolizumab*, *golimumab* como antagonistas do receptor e *Tasonermin* como agonista, todos já aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Croft *et al.*, 2013).

No entanto esses medicamentos são moléculas grandes o que facilita a indução no paciente de anticorpos neutralizantes anti-medicação resultando em perda de atividade. O desenvolvimento de moléculas imunobiológicas, tais como peptídeos moduladores da resposta imune, poderá contribuir para redução dessa resistência ao medicamento principalmente devido ao tamanho reduzida dessa molécula (Keystone, 2006; Soares *et al.*, 2012).

Este estudo foi desenhado para selecionar peptídeos ligantes ao receptor de TNF- α na busca por novos imunomoduladores. A tecnologia de *Phage Display* é excelente para seleção de peptídeos ligantes a diferentes receptores (Koivunen *et al.*, 1999; Odermatt *et al.*, 2001).

O uso da biblioteca conformacional de 7 aminoácidos favorece a seleção de novas moléculas, visto que os peptídeos quando sintetizados terão uma conformação mais próxima do alvo, que possibilita a estabilidade, bem como manter sua resposta semelhante de quando analisado em fusão com as proteínas do fago (Zhao, An *et al.*, 2004). A seleção de fagos ligantes foi eficiente visto que o aumento da quantidade de lavagens intensifica a remoção das interações fracas ou inespecíficas, selecionando clones seletivos e alta afinidade ao sítio de seleção. A quantidade de fagos na saída do terceiro ciclo de seleção foi estabilizada, indicando o enriquecimento de clones específicos neste ciclo (Barbas *et al.*, 2004).

O alinhamento tridimensional apresenta para este estudo grande importância, visto que uma das características da biblioteca utilizada é apresentar 7 aminoácidos conformacionais constrictos por dois resíduos de cisteína, os quais, por ligações tipo ponte dissulfeto formam uma estrutura em *loop* (Zhao, A. *et al.*, 2004). Essa ferramenta é capaz de mapear os resíduos peptídicos e identificar regiões com elevada similaridade, alinhando uma ou mais sequências peptídicas quaisquer, com uma estrutura tridimensional base, que pode ser obtida no *Protein Data Bank*. Desta forma, o

alinhamento linear entre os resíduos de aminoácidos do peptídeo selecionado com a sequência primária da molécula alvo não é uma técnica adequada.

A compreensão das interações entre proteína e ligante foi facilitada com a modelagem molecular e uso da informática que possibilitam a visualização de interações preditas de ambas às moléculas (Lill e Danielson, 2011; Pan e Aller, 2015). O *docking* molecular é uma predição da interação de um ligante e uma proteína com estrutura tridimensional conhecida (Morris e Lim-Wilby, 2008). Juntamente com as análises é possível localizar possíveis regiões de interações do peptídeo ao alvo.

A dosagem de citocinas presentes no sobrenadante obtido pelo estímulo realizado em PBMC, permitiu entender o papel de cada peptídeo testado e sua ação. A interleucina 1 beta é uma citocina pró inflamatória que juntamente com outras citocinas, como o TNF- α leva a ativação da resposta imune (Jammal *et al.*, 2015). As altas concentrações de IL-1 β encontradas no sobrenadante após o estímulo com os peptídeos caracteriza a indução de inflamação na cultura primária de PBMC. Já a IL-10 é um inibidor de macrófagos ativados e atua principalmente na regulação da resposta imune e homeostase (Jammal *et al.*, 2015). O peptídeo 3 induz uma resposta inflamatória, mas juntamente estimula a produção desta citocina anti-inflamatória, desta forma sugere-se que a resposta deste mimético seja branda e culmina no balanço obtido entre a citocina pró inflamatória e a citocina anti-inflamatória.

Em doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, este balanço é perdido e as quantidades de citocinas inflamatórias no líquido sinovial é exacerbada, enquanto moléculas anti-inflamatórias como IL-10 são reduzidas (Hata *et al.*, 2004). A indução de IL-1 β obtida pelo peptídeo 3, permite direcionar aplicações para esta molécula, dentre as quais uso como adjuvante (Gellin e Salisbury, 2015).

O papel inflamatório e caracterização do peptídeo 3 como mimético são confirmados pela ativação do NF- κ B, do qual o principal indutor é o TNF- α (Hayden e Ghosh, 2014). A via de sinalização da NF- κ B resulta na ativação de quinases. A via clássica é ativada por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α o qual recruta vários adaptadores incluindo proteínas com domínio de morte (TRADD) associado ao receptor TNF, proteína de interação com receptor (RIP) e fator 2 associado ao receptor TNF na membrana citoplasmática (Hsu *et al.*, 1995). O tempo de incubação deste experimento foi de 15 minutos, devido a característica de ativação do NF- κ B. A ativação do NF- κ B ocorre rapidamente e posterior sofre oscilações até chegar aos níveis basais. Quando o estímulo com TNF- α apresenta curta duração, sua ativação ocorre até uma hora após o estímulo

(Bruce Alberts; Hoffmann *et al.*, 2002). Desta forma, o estímulo apresentou curta exposição ao peptídeo.

Análises *in vivo* com uso de implantes, neste trabalho, foi o ponto chave na compreensão da resposta imunológica induzida pelo peptídeo. Os implantes de esponja funcionam como um corpo estranho no organismo do animal induzindo uma resposta inflamatória crônica do tipo corpo estranho (Staton *et al.*, 2007). Os níveis de MPO e frente ao tratamento com o peptídeo 3 concordam com o paradoxo do TNF- α , do qual o aumento de TNF- α no tumor resulta na destruição do mesmo, porém quando o TNF- α é produzido pelo tumor em quantidades inferiores, esta citocina auxilia a angiogênese e liberação de fatores de crescimento, por fim as células imunes que deveriam defender o organismo acabam por auxiliar na sua ampliação e metástase (Anderson *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2014; Knutson *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2015). Desta forma, o peptídeo 3 assim como o TNF- α , apresenta alterações na resposta imune, de acordo com as quantidades injetadas no tratamento. Além disso, nas maiores doses do tratamento com o peptídeo 3, houve a indução de formação de vasos sanguíneos, dado pelo aumento dos níveis de hemoglobina de forma significativa.

Visto que a modulação da resposta varia, um estudo mais refinado da resposta do TNF- α deve ser feito, uma vez que em algumas neoplasias já foi confirmada a influência do TNF- α neste balanço (Wang e Lin, 2008; Stanilov *et al.*, 2014). Roberts *et al.* (2011) mostraram que diversos trabalhos encontram-se em fase de testes com pacientes, na busca de avaliar o tratamento do câncer com TNF- α . Esta citocina tem sua resposta efetiva quando administrado juntamente com outros neoplásicos já conhecidos. Outras combinações foram testadas como uso de TNF- α juntamente com outras citocinas, dentre elas o interferon alfa (IFN- α).

Além disso, o peptídeo selecionado pode ser fusionado a nanocápsulas para tratamento do câncer; sendo um tratamento alternativo que resulta no direcionamento ao alvo e na redução dos efeitos colaterais (Petrenko e Jayanna, 2014). Desta forma, sugere-se que o peptídeo aqui selecionado é um mimético de TNF- α com potencial de aplicação como antineoplásico ou mesmo adjuvante. O nosso trabalho relata pela primeira vez a descoberta de um peptídeo mimético ao TNF- α , todavia, para melhor compreender o seu papel e utilizá-lo como antineoplásico ou adjuvante, estudos mais detalhados necessitam ser realizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*: Elsevier Health Sciences Brazil; 2012.
- [2] Al-Lamki RS, Mayadas TN. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int.* 2015;87:281-96.
- [3] Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current Opinion in Pharmacology.* 2004;4:314-20.
- [4] Araujo GR, Vaz ER, Fujimura PT, Fonseca JE, de Lima LM, Canhao H, et al. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: a highly antigenic mimotope of Carbonic Anhydrase III selected in a murine model by phage display. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:168.
- [5] Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. *Phage Display*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004.
- [6] Ben Musa R, Usha L, Hibbeln J, Mutlu EA. TNF inhibitors to treat ulcerative colitis in a metastatic breast cancer patient: a case report and literature review. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2014;20:5912-7.
- [7] Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Biologia Molecular da Celula*: Artmed Editora.
- [8] Caminero A, Comabella M, Montalban X. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol.* 2011;234:1-6.
- [9] Campos PP, Bakhle YS, Andrade SP. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair Regen.* 2008;16:416-24.
- [10] Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nature reviews Drug discovery.* 2013;12:147-68.
- [11] de Oliveira-Júnior LC, Araújo Santos FdA, Goulart LR, Ueira-Vieira C. Epitope Fingerprinting for Recognition of the Polyclonal Serum Autoantibodies of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International.*
- [12] Droste P, Frenzel A, Steinwand M, Pelat T, Thullier P, Hust M, et al. Structural differences of amyloid-beta fibrils revealed by antibodies from phage display. *BMC Biotechnol.* 2015;15:57.
- [13] Duhovny D, Nussinov R, Wolfson H. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In: Guigó R, Gusfield D, editors. *Algorithms in Bioinformatics*: Springer Berlin Heidelberg; 2002. p. 185-200.
- [14] Gellin BG, Salisbury DM. Communicating the role and value of vaccine adjuvants. *Vaccine.* 2015;33 Suppl 2:B44-B6.

- [15] Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83:793-802.
- [16] Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, et al. Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest*. 2004;114:582-8.
- [17] Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol*. 2014;26:253-66.
- [18] Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. 2002;298:1241-5.
- [19] Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;81:495-504.
- [20] Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50:184-95.
- [21] Jammal MP, Da Silva AA, Filho AM, De Castro CÔBo E, Adad SJ, Murta EFC, et al. Immunohistochemical staining of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 in benign and malignant ovarian neoplasms. *Oncology Letters*. 2015;9:979-83.
- [22] Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protocols*. 2012;7:1511-22.
- [23] Keystone EC. Switching tumor necrosis factor inhibitors: an opinion. *Nat Clin Pract Rheum*. 2006;2:576-7.
- [24] Knutson K, Karyampudi L, Lamichhane P, Preston C. Targeted immune therapy of ovarian cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2015;34:53-74.
- [25] Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1999;40:883-8.
- [26] Lill MA, Danielson ML. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *J Comput Aided Mol Des*. 2011;25:13-9.
- [27] Liu Z, Liu J, Wang K, Li W, Shelver WL, Li QX, et al. Selection of Phage-displayed Peptides for the Detection of Imidacloprid in Water and Soil. *Anal Biochem*. 2015.
- [28] Luo M, Shao B, Nie W, Wei XW, Li YL, Wang BL, et al. Antitumor and Adjuvant Activity of lambda-carrageenan by Stimulating Immune Response in Cancer Immunotherapy. *Sci Rep*. 2015;5:11062.
- [29] Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira MAND, Andrade SP. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research*. 2011;82:246-52.

- [30] McCafferty J, Schofield D. Identification of optimal protein binders through the use of large genetically encoded display libraries. *Curr Opin Chem Biol.* 2015;26:16-24.
- [31] Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Mol Biol.* 2008;443:365-82.
- [32] Odermatt A, Audige A, Frick C, Vogt B, Frey BM, Frey FJ, et al. Identification of receptor ligands by screening phage-display peptide libraries ex vivo on microdissected kidney tubules. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2001;12:308-16.
- [33] Pan L, Aller SG. Tools and procedures for visualization of proteins and other biomolecules. *Curr Protoc Mol Biol.* 2015;110:19 2 1- 2 47.
- [34] Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv.* 2010;28:849-58.
- [35] Petrenko VA, Jayanna PK. Phage protein-targeted cancer nanomedicines. *FEBS letters.* 2014;588:341-9.
- [36] Puimege L, Libert C, Van Hauwermeiren F. Regulation and dysregulation of tumor necrosis factor receptor-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25:285-300.
- [37] Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA, Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget.* 2011;2:739-51.
- [38] Rossol M, Meusch U, Pierer M, Kaltenhauser S, Hantzschel H, Hauschildt S, et al. Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J Immunol.* 2007;179:4239-48.
- [39] Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W363-7.
- [40] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* 1990;249:386-90.
- [41] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228:1315-7.
- [42] Soares MRMP, Reis Neto ETd, Luz KR, Ciconelli RM, Pinheiro MM. Estratégia de troca entre agentes anti-TNF-alfa não melhora a capacidade funcional em pacientes com artrite reumatoide de longa evolução. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2012;52:9-15.
- [43] Stanilov N, Miteva L, Dobрева Z, Stanilova S. Colorectal cancer severity and survival in correlation with tumour necrosis factor-alpha. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014;28:911-7.
- [44] Staton CA, Lewis C, Bicknell R. *Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques*; Wiley; 2007.

- [45] Teixeira AS, Araujo FA, Ferreira MA, Barcelos LS, Teixeira MM, Andrade SP. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sci.* 2006;78:1637-45.
- [46] Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22:311-9.
- [47] Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta pharmacologica Sinica.* 2008;29:1275-88.
- [48] Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor and cancer. *The Journal of pathology.* 2013;230:241-8.
- [49] Zhang X, Sun C, Xiao X, Pang L, Shen S, Zhang J, et al. Phage display-derived cross-reactive neutralizing antibody against enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *Jpn J Infect Dis.* 2015.
- [50] Zhao A, Xue Y, Zhang J, Gao B, Feng J, Mao C, et al. A conformation-constrained peptide library based on insect defensin A. *Peptides.* 2004;25:629-35.
- [51] Zhao A, Xue Y, Zhang J, Gao B, Feng J, Mao C, et al. A conformation-constrained peptide library based on insect defensin A. *Peptides.* 2004;25:629-35.
- [52] Zhao L, Lu W. Mirror image proteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2014;22:56-61.
- [53] Zhou XL, Fan W, Yang G, Yu MX. The clinical significance of PR, ER, NF- kappa B, and TNF- alpha in breast cancer. *Dis Markers.* 2014;2014:494581.

Anexo I - Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 – Bloco A – Sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 092/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CER/UFU
449/10

Projeto Pesquisa: Desenvolvimento de peptídeos bioativos moduladores da resposta imune.

Pesquisador Responsável: Carlos Ueira Vieira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do relatório final: Junho de 2011.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 04 de março de 2011.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Anexo II - Termo de consentimento para coleta de material biológico.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada **Desenvolvimento de peptídeos bioativos moduladores da resposta imune**, sob a responsabilidade do pesquisador Prof^o. Dr Carlos Ueira Vieira.

Nesta pesquisa nós iremos investigar os papéis moduladores do sistema imunológico por uma substância semelhante a proteínas que atuam no sistema imunológico de doadores voluntários saudáveis que não participam desse projeto de pesquisa, nem possui vínculo ao Laboratório de Nanobiotecnologia.

Na sua participação, você será submetido à coleta de sangue periférico (10 mililitros, 1 tubo de heparina), cuja amostra será levada ao Laboratório de Nanobiotecnologia. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Comunicamos que você não será exposto a nenhum risco biológico ou de qualquer outra natureza durante o andamento do trabalho. Esclarecemos também, que os resultados obtidos com esse estudo, podem, futuramente, trazer muitos benefícios para a qualidade de vida de pacientes portadoras de doenças autoimunes. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você, qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Prof Dr. Carlos Ueira Vieira – Telefone: (34) 3218-2203, Av Amazonas, s/n bloco 2E Campus Umuarama, Uberlândia – MG.

Poderá também entrar em contato com o comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av João Naves de Ávila, n° 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38408-100, Telefone: (34) 32394131.

Uberlândia, ____ de _____ de 201__.

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa