



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

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MIMETOPOS DE AUTO-ANTÍGENOS  
PARA UTILIZAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO DA ARTRITE IDIOPÁTICA  
JUVENIL**

**Aluno:** Galber Rodrigues Araujo

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

**UBERLÂNDIA - MG  
2011**



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

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MIMETOPOS DE AUTO-ANTÍGENOS  
PARA UTILIZAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO DA ARTRITE IDIOPÁTICA  
JUVENIL**

**Aluno:** Galber Rodrigues Araujo

**Orientador:** Carlos Ueira Vieira

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

UBERLÂNDIA - MG  
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- A663i Araujo, Galber Rodrigues, 1984-  
Isolamento e identificação de mimetopos de auto-antígenos para  
utilização em imunodiagnóstico da artrite idiopática juvenil [manus-  
crito] / Galber Rodrigues Araujo. – 2011.  
72 f. : il.
- Orientador: Carlos Ueira Vieira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.
1. Artrite idiopática juvenil - Teses. I. Vieira, Carlos Ueira. II.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 616.72-002.77-053.2

---



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

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MIMETOPOS DE AUTO-ANTÍGENOS  
PARA UTILIZAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICO DA ARTRITE IDIOPÁTICA  
JUVENIL**

**Aluno:** Galber Rodrigues Araujo

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (orientador)

**Examinadores:**

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza

**Data da Defesa:** 30/06/2011

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

---

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

## DEDICATÓRIA

**Ao meu pai**, meu grande amigo, pelo exemplo de honestidade e profissionalismo  
ao qual eu me espelho sempre

**À minha mãe**, meu porto seguro, pelo exemplo de fé, amor incondicional e  
maturidade

**À minha querida irmã**, que esteve sempre ao meu lado, pelo exemplo de força e  
capacidade

**À toda a minha família**, por confiarem sempre em mim e me incluírem em suas  
orações

**Aos meus amigos** do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal  
de Uberlândia, por terem me proporcionado momentos memoráveis e crescimento  
profissional e pessoal

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Dr. Carlos Ueira, pela grande oportunidade, por ter me recepcionado tão bem e ter se tornado, além de um exemplo profissional para mim, um grande amigo.

À Patricia Tieme, pela generosidade inacreditável, pela paciência em me fazer entender várias etapas deste trabalho e por ter sempre a palavra certa para me acalmar, à você Paty sou extramente grato nessa etapa da minha vida.

Ao Fausto Capparelli, pela amizade e pela força em vários momentos difíceis.

Aos amigos Carol Reis, Ana Paula Carneiro, Fabiana, Thaíse, Carol Siquieroli, Rone, Rafael, Washington, Karina, Paula Cristina e Paula Souza, pelo aprendizado, pela boa convivência e por terem me acolhido tão bem no Laboratório de Nanobiotecnologia.

À Yara Cristina P. Maia, pelo carinho que sempre teve comigo e pela experiência que obtivemos trabalhando juntos.

À Juliana, Tamiris (sisters) e Ângela, pela amizade, pela cumplicidade, pelos papos angustiados, pelos papos descontraídos e pela atenção que sempre tiveram comigo em momentos de desequilíbrio emocional (vários).

À Emilia por ter se mostrado uma grande amiga e por ter cotribuído muito para o término deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart, que me aceitou no Laboratório de Nanobiotecnologia.

À Dra. Karla Pereira Fernandes e Dr. Carlos Henrique Martins da Silva pela valiosa ajuda na obtenção das amostras biológicas para a realização desse trabalho.

À minha grande amiga Sarah, sempre presente na minha vida, apesar da distância.

À todas as crianças que doaram parte de si para realização dessa pesquisa.

Ao CNPq, financiador deste trabalho.

# LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Capítulo I: Fundamentação Teórica:</b>	
<b>Figura 1</b> – Processo inflamatório das Artrites Reumatóides.....	08
<b>Figura 2</b> – Paciente com oligoartrite .....	11
<b>Figura 3</b> – Escaneamento ósseo com tecnécio-99m .....	17
<b>Figura 4</b> – Esquema de um fago filamentosos.....	20
<b>Capítulo II: Isolamento e identificação de mimetopos de autoantígenos para utilização em imunodiagnóstico da Artrite Idiopática Juvenil:</b>	
<b>Figura 1</b> – Esquema da estratégia utilizada no primeiro ciclo do <i>Biopanning</i> .....	43
<b>Figura 2</b> – Esquema da estratégia utilizada no segundo de terceiro ciclo do <i>Biopanning</i> .....	44
<b>Figura 3</b> – Ensaio de <i>Bead-ELISA</i> para verificação da eficiência do acomplamento de IgG's nas microesferas magnéticas.....	49
<b>Figura 4</b> – Titulação dos fagos obtidos na seleção .....	50
<b>Figura 5</b> – Gel de agarose contendo DNA dos clones selecionados nos quatro subtipos da AIJ .....	52
<b>Figura 6</b> – Gráfico representativo mostrando reatividade dos 40 clones obtidos no <i>biopanning</i> .....	60
<b>Figura 7</b> – <i>Phage-ELISA</i> com os peptídeos selecionados na pré-validação.....	61
<b>Figura 8</b> – <i>Phage-ELISA</i> com os dois peptídeos mais reativos.....	62

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo I: Fundamentação Teórica:</b>	
<b>Tabela 1</b> – Classificação da Artrite Idiopática Juvenil.....	14
<b>Capítulo II: Isolamento e identificação de mimetopos de autoantígenos para utilização em imunodiagnóstico da Artrite Idiopática Juvenil:</b>	
<b>Tabela 1</b> – Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade .....	51
<b>Tabela 2</b> – Frequência de aminoácidos de todos os peptídeos sequenciados nos diferentes subtipos .....	53
<b>Tabela 3</b> - Sequências consenso encontradas através do alinhamento de todos os peptídeos selecionados no <i>biopanning</i> , utilizando o programa CLUSTAL W .....	54
<b>Tabela 4</b> - Similaridade entre os peptídeos selecionados no <i>biopanning</i> e a proteína HC gp-39 utilizando o programa <i>Pepitope Server</i> .....	56
<b>Tabela 5</b> - Similaridade entre os peptídeos selecionados no <i>biopanning</i> e o colágeno tipo II citrulinado utilizando o programa <i>Pepitope Server</i> ...	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

aa	Aminoácido
AIJ	Artrite Idiopática Juvenil
AR	Artrite Reumatóide
ARJ	Artrite Reumatóide Juvenil
BSA	Soro Albumina Bovina
°C	Grau Celsius
CCP	Peptídeos Cíclicos Citrulinados
CEP/UFU	Cômite de Ética e Pesquisa da UFU
DMARDs	Drogas anti-Reumáticas Modificadoras da Doença
DMI	Diabetes Mellitus Tipo I
DNA	Ácido Desoribonucléico
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
FAN	Anticorpos antinucleares
Fc	Região constante
FR	Fator Reumatóide
FR <sup>-</sup>	Fator Reumatóide negativo
FR <sup>+</sup>	Fator Reumatóide positivo
g	Gramas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HC	Hospital das Clínicas
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IPTG	<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>
L	Litros

LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases da matriz
N	Normal
Nm	Nanômetros
OD	Densidade ótica
pIII	Proteína três do capsídeo do fago
pVI	Proteína seis do capsídeo do fago
pVII	Proteína sete do capsídeo do fago
pVIII	Proteína oito do capsídeo do fago
pIX	Proteína nove do capsídeo do fago
PCR	Proteína C reativa
rpm	Rotações por minuto
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietileno Glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D.- C7C	Biblioteca comercial de <i>Phage Display</i> de 7 aminoácidos conformacionais
RNA	Ácido ribonucléico
SEL	Selvagem
T.A	Temperatura ambiente
TBS	Tampão Tris-salino
TBST	Tampão Tris-salino com tween 20
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- $\alpha$ -D-galactosídeo
$\mu$ L	Microlitros

## 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

---

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>Apresentação</b> .....	01
<b>Capítulo I: Fundamentação Teórica</b> .....	04
Resumo .....	05
1. Artrite Idiopática Juvenil .....	06
1.1 Fatores genéticos .....	06
1.2 Patogênese das Artrites Reumatóides .....	08
1.3 Subtipos da Artrite Idiopática Juvenil .....	10
1.3.1 AIJ sistêmica .....	10
1.3.2 AIJ oligoarticular .....	11
1.3.3 AIJ poliarticular .....	12
1.3.3.1 AIJ poliarticular Fator Reumatóide Negativo ....	12
1.3.3.2 AIJ poliarticular Fator Reumatóide Positivo .....	13
1.4 Diagnóstico e tratamento da Artrite Idiopática Juvenil .....	15
1.4.1 Diagnóstico .....	15
1.4.2 Tratamento .....	17
2. <i>Phage Display</i> .....	19
Referências Bibliográficas .....	22
<b>Capítulo II: Isolamento e identificação de mimetopos de autoantígenos para utilização em imunodiagnóstico da Artrite Idiopática Juvenil</b> .....	33
Resumo .....	34
Abstract .....	35
Introdução .....	36

Objetivos .....	38
Casuística e Métodos .....	39
1. Obtenção das amostras .....	39
2. Acoplamento das IgG's nas microesferas de proteína G .....	40
3. Seleção dos peptídeos miméticos a auto-antígenos – <i>Biopanning</i> .....	41
4. Titulações .....	45
5. Extração e sequenciamento do DNA dos fagos selecionados .....	45
6. Análises dos dados por bioinformática .....	47
7. Testes de ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados .....	47
8. Análises estatísticas.....	48
Resultados .....	49
1. Acoplamento das IgG's nas microesferas de proteína G .....	49
2. Seleção dos peptídeos miméticos a auto-antígenos .....	50
2.1 <i>Biopanning</i> e titulações .....	50
3. Extração do DNA dos fagos selecionados .....	52
4. Sequenciamento de DNA e Bioinformática.....	52
5. Validação por <i>Phage-ELISA</i> dos mimetopos selecionados no <i>biopanning</i> .....	59
Discussão .....	63
Conclusões .....	68
Referências Bibliográficas .....	69
Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética .....	72

# APRESENTAÇÃO

A Artrite Idiopática Juvenil (AIJ) é uma doença articular crônica, que acomete uma ou mais articulações em crianças menores de 16 anos, por pelo menos seis semanas, com exclusão de outras causas de artrites juvenis. É a doença reumatológica mais comum na infância, com uma prevalência estimada de 1 em cada 1.000 crianças. A incidência é quase o dobro no sexo feminino, com exceção do tipo sistêmico, onde não há diferença entre os sexos. Existem três tipos mais comuns: AIJ sistêmica que corresponde a 10% dos casos e é precedida de febre com duração de pelo menos duas semanas e artrite em  $\geq 1$  articulação. É a que mais compromete o desenvolvimento. A AIJ oligoarticular que corresponde a 50% dos casos e são acometidas  $\leq 4$  articulações durante os primeiros 6 meses da doença, sendo os joelhos, tornozelos e cotovelos os mais afetados, é classificada em duas subcategorias: persistente, que afeta  $\leq 4$  articulações, e extendida, afetando  $> 4$  articulações após 6 meses do diagnóstico da doença. A AIJ poliarticular corresponde a 40% dos casos e são acometidas  $\geq 5$  articulações durante os primeiros 6 meses da doença. Esse subtipo também é classificado em duas subcategorias: pacientes que apresentam Fator Reumatóide positivo detectado pelo menos duas vezes em três meses de intervalo e pacientes que apresentam Fator Reumatóide negativo.

A causa exata da doença ainda é desconhecida. Acredita-se haver uma influência multifatorial, ligada a fatores imunológicos, infecciosos e genéticos. Acredita-se que alguns fatores externos, como alguns tipos de infecções, estresse emocional e traumatismos articulares podem atuar como desencadeantes da doença. A multiplicidade das características clínicas, evolutivas, imunológicas e imunogenéticas desta doença heterogênea sugere que as diferentes formas clínicas representem, na realidade, entidades clínicas distintas com mecanismos etiopatogênicos próprios.

A criança com AIJ pode apresentar, além da artrite crônica, manifestações extra-articulares variáveis, dependendo do tipo de início da doença. Em qualquer tipo de início, os joelhos são as articulações mais frequentemente acometidas. O componente doloroso da artrite às vezes é pouco intenso, o que pode dificultar o reconhecimento do problema articular. A ocorrência de artrite indolor em algumas crianças pode retardar a percepção da família e a procura pelo médico. Além disso, crianças menores têm dificuldade de identificar o local da dor e muitas vezes o problema articular é notado por causa da diminuição das atividades habituais, alterações da marcha, dificuldade ou choro à movimentação de determinados segmentos dos membros e rigidez matinal.

A AIJ constitui um desafio diagnóstico e sua identificação depende de uma avaliação clínica minuciosa e, na maioria das vezes, do seguimento prospectivo do

paciente, para que se possa caracterizar o tipo de comprometimento articular e o tempo de duração da artrite, essencial ao diagnóstico, e afastar causas específicas de artrite nesta faixa etária. A inexistência de marcadores laboratoriais e a grande variabilidade de seu quadro clínico contribuem adicionalmente para a dificuldade de identificação precoce destas crianças e adolescentes. Trata-se de um diagnóstico de exclusão, uma vez que não existem sinais, sintomas ou exames laboratoriais exclusivos desta doença.

A aplicabilidade da metodologia de *Phage Display* na apresentação de peptídeos ou bibliotecas protéicas na superfície de fagos filamentosos permite uma seleção altamente específica a determinados alvos. Uma vantagem crucial dessa tecnologia é a conexão direta entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, a qual possibilita uma evolução clonal de ligantes selecionados. Nesse sentido, essa metodologia tem se mostrado significativa à prática clínica, ao permitir a seleção de peptídeos expressos na superfície viral.

No trabalho aqui apresentado foram isolados peptídeos reconhecidos por anticorpos purificados a partir do soro de pacientes com os quatro subtipos de AIJ por meio da metodologia de *Phage Display*. Para a seleção dos peptídeos foi realizado um *biopanning* subtrativo, utilizando anticorpos purificados a partir do soro de pacientes aparentemente saudáveis e pacientes com outras doenças auto-imunes não portadores de AIJ, seguida de uma seleção positiva utilizando uma biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C expressa na superfície do fago filamentoso M13. O DNA dos clones selecionados foi seqüenciado, traduzido, e os diversos clones foram submetidos aos ensaios de ELISA e bioinformática.

**CAPÍTULO I:**  
**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## **Resumo**

A Artrite Idiopática Juvenil (AIJ) é uma doença auto-imune caracterizada por artrite persistente, de causa desconhecida, que se inicia antes dos 16 anos de idade e está presente há pelo menos 6 semanas após exclusão de outras doenças. Longos períodos de AIJ ativa podem prejudicar o desenvolvimento do músculo, resultando em um retardo do crescimento generalizado, uso limitado de alguns membros, erosões nas articulações e menor capacidade aeróbica. É uma das mais prevalentes entre as doenças reumáticas crônicas da infância, podendo acarretar incapacidade motora permanente, afetando a qualidade de vida das crianças afetadas. O exame mais importante para o diagnóstico da doença hoje é o exame físico que o pediatra ou especialista faz na hora da consulta. O diagnóstico para AIJ é clínico, não depende de exames laboratoriais porque ainda não existe nenhum teste que confirme a presença da doença, não há exames laboratoriais considerados específicos para a sua definição diagnóstica. Testes laboratoriais bioquímicos e marcadores sorológicos são úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial, classificar o subgrupo da doença, avaliar a extensão da inflamação, determinar o prognóstico e resposta à terapia. Nesse sentido, a busca por novos biomarcadores podem levar a novos métodos para o diagnóstico e tratamento da AIJ. Essa revisão visa descrever alguns aspectos da Artrite Idiopática Juvenil e como a tecnologia de *Phage Display* tem sido utilizada no mapeamento de epitopos de diversos antígenos, constituintes de vários agentes causadores de doenças.

**Palavras chave:** Artrite Idiopática Juvenil, Marcadores sorológicos, *Phage Display*

# 1 ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL

## 1.1 Fatores genéticos

A Artrite Idiopática Juvenil (AIJ) é definida como uma doença de ocorrência antes dos 16 anos de idade, caracterizada primariamente pela presença de artrite persistente em uma ou mais articulações, por no mínimo 6 semanas, após exclusão de outras causas. É uma doença inflamatória crônica que, se não tratada precocemente, pode acarretar prejuízos permanentes (RAVELLI e MARTINI, 2007).

A AIJ compreende um grupo heterogêneo de artropatias crônicas que afeta aproximadamente 1–3/1000 crianças (MURRAY e GLASS, 1997). No primeiro mundo, é classificada como uma doença reumática mais comum na infância e uma das doenças crônicas mais frequentes nesta faixa juvenil. A prevalência é de 0.07 - 4.01 /1000 crianças e incidência geral de 0,83 - 86,0 /100.000 crianças por ano, com acentuada diferença de incidência entre os diversos países, justificada também pela dificuldade de diagnóstico e pelas diferentes classificações existentes (OEN, 2000; MANNERS e BOWER, 2002). No Brasil não existe qualquer estudo epidemiológico, mas a AIJ não é uma enfermidade rara, é a segunda doença reumática com maior incidência na infância, suplantada somente pela febre reumática (ALVES et al., 1995; TERRERI et al., 2001).

O diagnóstico precoce é de exclusão e inclui sete diferentes formas. No entanto, pode ser facilitado pelo reconhecimento das três formas de apresentação maiores: oligoarticular (50%-60% dos casos), poliarticular (30%-35% dos casos) e sistêmica (10%-20% dos casos). Logo após seu início, o curso da AIJ é incerto, mas esta evolução torna-se razoavelmente previsível após a definição do padrão clínico definitivo do paciente (CASSIDY, 2001; CASSIDY, 2005).

Há uma concordância de que a AIJ é uma doença de patogênese complexa e multifatorial, resultante da interação de fatores ambientais e genéticos. Dentre os inúmeros fatores de risco para o aparecimento da doença sugeridos, destaca-se a história familiar positiva (CLEMENS et al., 1985; PRAHALAD, 2006). A AIJ tem sido por muitas vezes descrita como uma peculiaridade genética complexa, onde vários genes interagem para resultar um fenótipo específico (GLASS e GIANNINI, 1999). Em gêmeos monozigóticos a taxa de concordância da AIJ é em torno de 25 a 40% quando um dos gêmeos é acometido pela doença, e a prevalência de AIJ entre irmãos portadores é de 15 a 30 vezes maior do que da população geral (PRAHALAD e

GLASS, 2008). Os subtipos da AIJ compartilham características genéticas e fenotípicas com outras doenças auto-imunes, que acredita-se ser resultado da interação de fatores genéticos e ambientais. A identificação de fatores genéticos associados com a susceptibilidade ou proteção às doenças auto-imunes é importante por várias razões, como a identificação de variantes que tenham potencial para melhorar significativamente nossa compreensão sobre a patogênese da doença, que por sua vez, levará a um melhor diagnóstico e classificação dos fenótipos. Além disso, a descoberta de novos caminhos envolvidos na patogênese da doença pode levar a novas modalidades de tratamento (ANGELES-HAN & PRAHALAD, 2010).

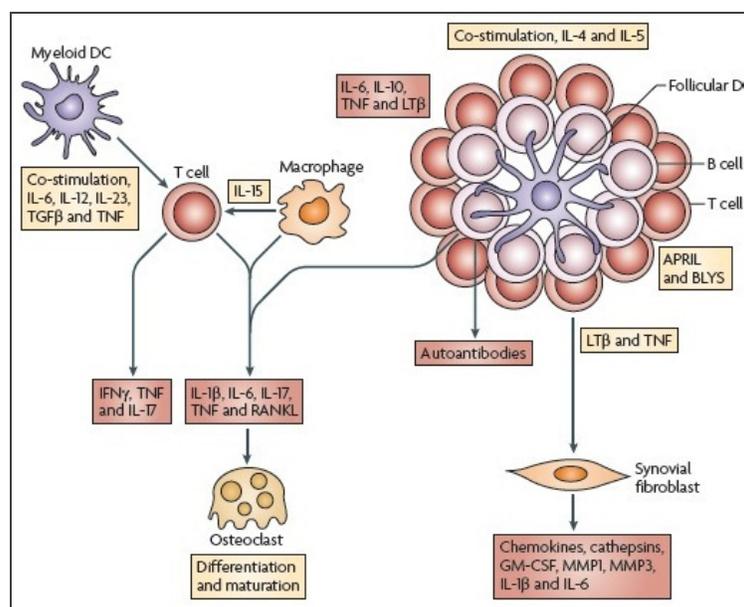
Recentemente, vários estudos têm demonstrado que doenças auto-imunes clinicamente distintas possuem ação ordinária de fatores genéticos de susceptibilidade. Por exemplo, polimorfismos dos genes que codificam as moléculas HLA estão associados a várias doenças auto-imunes. Associações com variantes HLA têm sido validados e confirmados em diferentes populações de doenças auto-imunes, tais como Diabetes Mellitus Tipo I (DMI), Artrite Reumatóide (AR), bem como a AIJ. No entanto, as variantes HLA explicam apenas parte da susceptibilidade genética para muitas doenças auto-imunes, sugerindo que as variações fora da região do HLA também devem contribuir para a susceptibilidade à doença. Por exemplo, foi relatado que as variantes conhecidas no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) explicam apenas cerca de 30% da carga genética da AR (PLENGE, 2009). Os genes HLA-DR do complexo de histocompatibilidade maior estão associados com a AR e participam da apresentação do antígeno às células T. A associação destes genes com as células HLA-DR com a AR é no momento a evidência mais forte do papel da genética na patogênese e frequência da doença (ANGELES-HAN & PRAHALAD, 2010). Da mesma forma na AIJ, estimou-se que o HLA-DR representa apenas cerca de 17% da carga genética da doença, o que sugere que outras variantes dentro e fora do complexo MHC podem apresentar uma função na susceptibilidade (PRAHALAD et al., 2000).

Até o momento, as variantes do complexo HLA e o loco PTPN22 foram confirmados como sendo indiscutivelmente associados à AIJ por vários trabalhos. Recentemente, vários outros candidatos foram adicionados à lista de locos associados à AIJ, incluindo o STAT4, TNFAIP3, IL2RA, TRAF1/C5 e VTCN1 (ANGELES-HAN & PRAHALAD, 2010). Convém ressaltar que, subtipos diferentes de AIJ tem fenótipos diferentes, e é extremamente importante que tais subgrupos sejam estratificados em estudos genéticos (MACAUBAS et al., 2009). No entanto, a falta de amostras adequadas e consequente poder estatístico, impede a detecção de importantes

associações genéticas com os subtipos da AIJ. Estes desafios destacam a necessidade de estudos multicêntricos internacionais para obtenção de amostras bem fenotipadas (PRAHALAD et al., 2000).

## Patogênese das artrites reumatóides

Nas artrites reumatóides, a membrana sinovial torna-se infiltrada por vários tipos de células inflamatórias, que sinergizam para causar destruição das articulações (Fig. 1). Células importantes que foram omitidas nesta figura incluem os mastócitos sinoviais e células plasmáticas.



**Fig. 1.** Processo inflamatório das artrites reumatóides. APRIL: ligante indutor de proliferação; BLYS: estimulador de linfócitos B; DC: células dendríticas; GM-CSF: fator de estimulação para granulócitos e macrófagos; IFNγ: interferon-γ; IL: interleucina; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear κB; TGFβ: fator de transformação do crescimento β. Fonte: ISAACS, 2010.

Fibroblastos adotam um fenótipo de “up-regulation” de oncogenes, inibição da apoptose e secreção de citocinas, quimiocinas e enzimas que reforçam a inflamação e catalisam a destruição da articulação, resultando na formação do pannus e habilidade de invadir e destruir a cartilagem articular adjacente (CHANG et. al., 2010). A ativação dos osteoclastos no osso peri-articular leva a reabsorção e erosões, o que auxilia na detecção da doença (WALSH & GRAVALLESE, 2010).

Processos similares afetam a membrana sinovial que reveste as bainhas dos tendões, resultando em fraqueza e ruptura dos mesmos, que são responsáveis pelas deformidades características das artrites. As artrites reumatóides também podem envolver órgãos como os pulmões, levando à inflamação e fibrose. Os efeitos sistêmicos incluem a osteoporose, anemia e fadiga profunda. A aterosclerose precoce causa graves danos colaterais, que respondem por grande parte da redução do tempo de vida de pacientes com artrites graves, ataques cardíacos e derrames podem ocorrer (GABRIEL, 2008).

Está bem claro que as células T são importantes, como evidenciado pelos genes associados com artrite reumatóide (BARTON & WORTHINGTON, 2009). Em particular, células T auxiliares ( $T_H17$ ), podem orquestrar sinovite e lesões através de interações com as células dendríticas, macrófagos e células B (MIOSSEC et. al., 2009). Em contrapartida, a função das células T regulatórias parece estar comprometida nas artrites reumatóides (EHRENSTEIN et. al., 2004). Os macrófagos também desempenham papel importante na patogênese da doença, sua presença correlaciona-se com os sintomas, talvez causados pela secreção de mediadores pró-inflamatórios (HAMILTON & TAK, 2009). O sucesso da terapia de anticorpos específicos para células B atesta a importância dessas células na patogênese da artrite reumatóide. Além da secreção de auto-anticorpos, células B apresentam antígeno para células T e estimulam os fibroblastos sinoviais através da secreção de citocinas como linfotóxina- $\beta$  ( $LT\beta$ ) e fator de necrose tumoral (TNF). Em alguns pacientes, folículos linfóides bem formados estão presentes na membrana sinovial, sugerindo que ocorre uma apresentação local do antígeno, enquanto em outros pacientes, as células B estão presentes de forma aglomerada ou dispersas (MANZO et. al., 2010). Fibroblastos sinoviais são elementos fundamentais de lesões articulares através da secreção de metaloproteinases da matriz (MMPs) e catepsinas. Inicialmente, elas são ativadas pelo microambiente inflamatório, mas posteriormente assumem um fenótipo semi-autônomo (AUPPERLE et. al., 1998). A lesão óssea é causada pela convergência de vários sinais de precursores dos osteoclastos no osso subcondral, induzindo sua diferenciação e maturação (TAKAYANAGI, 2009).

## **1.2 Subtipos da Artrite Idiopática Juvenil**

### 1.3.1 AIJ sistêmica

A manifestação clínica da AIJ é dependente do subtipo. É provável que alguns dos diferentes subtipos representam diferentes doenças com causas diferentes, no entanto, tudo isso resulta em inflamação articular. Mais recentemente, há especulações de que a AIJ sistêmica pertença às síndromes autoinflamatórias ao invés de pertencer ao grupo de doenças auto-imunes. No processo inflamatório, duas citocinas, em particular, a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), desempenham papéis importantes (BENEDETTI & MARTINI, 2005; PASCUAL et al., 2005). A hipótese de que a IL-6 tem papel importante na patogênese da AIJ sistêmica foi confirmada pela eficácia do tocilizumab, um anticorpo anti-IL-6. Vários estudos mostram que o bloqueio da IL-6 trás benefícios terapêuticos para os pacientes portadores de AIJ sistêmica (BENEDETTI & MARTINI, 1998; YOKOTA et al., 2008). O tratamento com anti-IL-1 também se mostrou eficaz, e análises da expressão gênica na doença ativa mostrou um perfil IL-1 (PASCUAL, 2005). A AIJ sistêmica é uma doença claramente distinta das outras formas e muito semelhante a AR dos adultos. Há uma acentuada ativação do sistema inato, acompanhado também pela ocorrência frequente (em torno de 5-8% dos pacientes) de uma complicação com risco de vida conhecida como síndrome de ativação macrofágica uma forma de linfocitose hemofagocítica (FROSCH & ROTH, 2008). A razão para o alto índice de ocorrência da síndrome de ativação macrofágica nos paciente acometidos com AIJ sistêmica ainda é desconhecida (GROM, 1998). Para um diagnóstico claro, é necessário presença de artrite, acompanhada ou precedida por febre cotidiana de pelo menos duas semanas com um ou mais dos sinais listados na Tabela 1. Os episódios febris muitas vezes são acompanhados por um característico rash (erupção cutânea macular fina e rósea). As lesões temporárias são distribuídas mais comumente no tronco, têm menos de 10 milímetros em tamanho e geralmente não causam prurido (BEHRENS et al., 2007).

### 1.3.2 AIJ oligoarticular

A AIJ oligoarticular é uma doença muito bem definida, é típica de crianças e não é vista em adultos. É caracterizada por uma artrite assimétrica afetando principalmente as grandes articulações, de início precoce (antes dos 6 anos de idade), com prevalência no sexo feminino, alta frequência de anticorpos antinucleares positivos e alto risco para o desenvolvimento de iridociclite crônica e consistentes associações com o complexo HLA (RAVELLI, 2005). A AIJ oligoarticular, também conhecida como oligoartrite, afeta quatro ou menos articulações nos primeiros 6 meses da doença e é classificada em dois subtipos: oligoartrite persistente, que não se estende a mais de quatro articulações, e oligoartrite extendida, no qual se estende a artrite a mais de quatro articulações após 6 meses (PETTY et. al., 2004). Até 50% dos pacientes podem desenvolver AIJ oligoarticular estendida, e 30% irão desenvolver nos primeiros 2 anos após o diagnóstico (AL-MATAR et. al., 2002). As articulações mais afetadas são os joelhos, tornozelos, cotovelos e punhos. Em aproximadamente um terço dos pacientes, apenas uma única articulação é afetada no início da doença. O diagnóstico pode ser difícil, pois os sinais de dor e inchaço nas articulações nem sempre são reconhecidos, e crianças nem sempre conseguem verbalizar suas queixas. Sequelas incluem rigidez matinal com movimento, calor, dor ou resististência à gama completa de movimentos. O crescimento acelerado pode causar atrofia muscular das extremidades afetadas. Uma criança com gonartrite unilateral normalmente se apresenta com discrepância no comprimento da perna, resultando em uma flexão e rotação externa do joelho afetado (Fig. 2) (DANNECKER & QUARTIER, 2009).



**Fig. 2.** Oligoartrite afetando joelho esquerdo e tornozelo direito. Nota-se a flexão do joelho esquerdo devido à diferença de comprimento dos membros inferiores. Fonte: DANNECKER & QUARTIER, 2009.

Reagentes de fase aguda são normais ou moderadamente elevados, mas VHS (velocidade de hemossedimentação) elevada também pode ocorrer. Os anticorpos

antinucleares (FAN) são detectados em cerca de 60% dos pacientes. A presença de FAN transmite um risco de iridociclite, uma inflamação da íris, corpo ciliar do olho. A Iridociclite geralmente se manifesta dentro dos primeiros anos após o início da artrite e afeta aproximadamente 30% dos pacientes com oligoartrite, mas em alguns casos pode preceder a artrite (RAVELLI et. al., 2007).

### 1.3.3 AIJ poliarticular

Pacientes com artrite em cinco ou mais articulações nos primeiros seis meses da doença são diagnosticados como portadores de AIJ poliarticular. Este subtipo inclui crianças com poliartrite fator reumatóide negativo em 20% a 30% dos pacientes. Afeta mais frequentemente crianças do sexo feminino (LANG & SHORE, 1990). As associações com HLA nestes pacientes são os mesmos que em adultos com artrite reumatóide e, provavelmente, representam a expressão inicial de a artrite reumatóide de adultos. A AIJ poliarticular envolve geralmente grandes e pequenas articulações das mãos e dos pés, embora o esqueleto axial, inclusive da coluna cervical e articulações temporomandibulares, podem ser afetados. Deformidade de Boutonnière (flexão da interfalângica proximal e hiperextensão da interfalângica distal) e deformidade em pescoço de cisne (hiperextensão da articulação interfalângica proximal e da flexão, com incapacidade de extensão, da interfalângica distal) são comuns. Crianças portadoras desse subtipo de AIJ desenvolvem uveíte crônica com menos frequência do que na doença oligoarticular (WEISS & ILOWITE, 2005).

#### 1.3.3.1 AIJ poliarticular fator reumatoide negativo

A AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> é definida como artrite que afeta 5 ou mais articulações durante os primeiros seis meses da doença (PETTY et. al., 2004). Pacientes FR<sup>-</sup> frequentemente desenvolvem poliartrite mais cedo na infância, em contraste com os pacientes FR<sup>+</sup>, que desenvolvem artrite geralmente chegando na puberdade. Os pacientes soronegativos têm um prognóstico variável. Este subtipo não tem nenhuma associação HLA forte e pode representar um grupo de distúrbios que podem ser subtipados (WEISS & ILOWITE, 2005). O fator Reumatóide é um grupo de auto-anticorpos, geralmente uma imunoglobulina da classe IgM, que se liga ao fragmento Fc da IgG formando complexos imunes. O início da doença pode ser agudo ou insidioso. A dor, os movimentos limitados e rigidez matinal são os sintomas mais proeminentes.

Alguns pacientes com poliartrite – especialmente aqueles que são FAN positivos - poderiam ser classificados como tendo oligoartrite, exceto quando há mais articulações envolvidas. Os pacientes que apresentam apenas pequeno inchaço nas articulações, mas tenham pronunciado contrações e rigidez de flexão e um VHS normal, são especialmente difíceis de diagnosticar (DANNECKER & QUARTIER, 2009). A poliartrite FR<sup>-</sup> é uma categoria heterogênea da AIJ. Pelo menos dois subconjuntos distintos podem ser identificados: (a) uma forma que é semelhante à artrite reumatóide nos adultos e é caracterizada por sinovite simétrica de grandes e pequenas articulações e FAN-negativo, (b) uma forma que se assemelha a oligoartrite, exceto pelo número de articulações acometidas nos primeiros seis meses da doença. Estas semelhanças levaram à hipótese de que este segundo subconjunto da AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> é AIJ oligoarticular em seus sintomas iniciais (MARTINI 2003). Estas observações foram confirmadas pela demonstração de que os pacientes portadores de AIJ oligoarticular com FAN-positivo, nas formas persistente ou estendida, apresentam as mesmas características (artrite assimétrica, primeiros sinais da doença aparecem cedo, com preferência pelo sexo feminino, FAN-positivo, elevada incidência de iridociclite crônica) que os pacientes portadores de AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> com FAN-positivo, portanto, estas características não são compartilhadas entre os paciente portadores de AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> com FAN-negativo e AIJ oligoarticular FAN-negativo (RAVELLI 2005). Este conceito também é apoiado pela observação de que, nos países em que pacientes portadores de AIJ oligoarticular com FAN-positivo são raros, pacientes AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> com FAN-positivo, raramente são vistos (MARTINI 2003). A heterogeneidade da AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> foi confirmada recentemente também por estudos de expressão gênica (GRIFFIN, 2009).

#### 1.3.3.2 AIJ poliarticular fator reumatóide positivo

Este subtipo é provavelmente idêntico a Artrite Reumatóide nos adultos. A AIJ poliarticular FR<sup>+</sup> ocorre principalmente em adolescentes do sexo feminino como uma poliartrite simétrica, afetando as pequenas articulações das mãos e dos pés, incluindo a articulação metacarpofalangeana, a interfalangeana proximal e articulações metatarsofalângicas. Nódulos reumatóides às vezes aparecem nas superfícies extensoras dos cotovelos (DANNECKER & QUARTIER, 2009). Por definição, a presença de IgM-FR é obrigatória, entretanto, é o único subtipo de AIJ que com prevalência de anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados, o que pode ser de

grande interesse, uma vez que esses achados já foram observados em doentes adultos com Artrite Reumatóide (VAN ROSSUM, 2003).

**Tabela 1.** Classificação da Artrite Idiopática Juvenil, segundo os critérios propostos pela ILAR (International League of Associations for Rheumatism) e EULAR (European League Against Rheumatism).

Subtipo	Definição
AIJ Sistêmica	Febre com duração de pelo menos duas semanas, artrite em $\geq 1$ articulações, além de um ou mais dos seguintes comprometimentos: * Rash eritematoso * Linfonomegalia generalizada * Hepatomegalia e/ou esplenomegalia * Serosite
AIJ Oligoarticular	Afeta $\leq 4$ articulações durante os primeiros 6 meses da doença. Classificada em duas subcategorias: * Persistente: afetando $\leq 4$ articulações * Extendida: afetando $> 4$ articulações após 6 meses
AIJ Poliarticular FR <sup>-</sup>	Afeta $\geq 5$ articulações durante os primeiros 6 meses da doença * Apresenta Fator Reumatóide negativo
AIJ Poliarticular FR <sup>+</sup>	Afeta $\geq 5$ articulações durante os primeiros 6 meses da doença * Apresenta Fator Reumatóide positivo detectado pelo menos 2 vezes em 3 meses de intervalo

Fonte: Adaptado de DANNECKER & QUARTIER, 2009

## 1.2 Diagnóstico e tratamento da Artrite Idiopática Juvenil

### 1.4.1 Diagnóstico

O diagnóstico da AIJ é, até o momento, baseado na história clínica e exame físico, sendo a utilização de métodos complementares principalmente direcionada para a exclusão de outros diagnósticos e comorbidades. Não há exames laboratoriais considerados específicos para a sua definição diagnóstica. Os testes laboratoriais bioquímicos e marcadores sorológicos são úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial, classificar o subtipo, avaliar a extensão da inflamação, determinar o prognóstico e a resposta à terapia (CASSIDY & PETTY, 2001). O diagnóstico de positividade sorológica da AIJ é restrito a pacientes com poliartrite de início mais tardio e que apresentam IgM-FR<sup>+</sup> detectado por nefelometria em 7 a 10% dos casos. Os fatores antinucleares (FAN), ou anticorpos antinucleares, podem ser encontrados em 2 a 70% das populações com AIJ, sendo essa variabilidade provavelmente em razão dos diferentes substratos utilizados na sua mensuração e os distintos subtipos de AIJ. Foi detectada uma prevalência aumentada de FAN (entre 65 a 85%) no subtipo de AIJ relacionado à oligoartrite e uveíte (NAKAMURA, 2000).

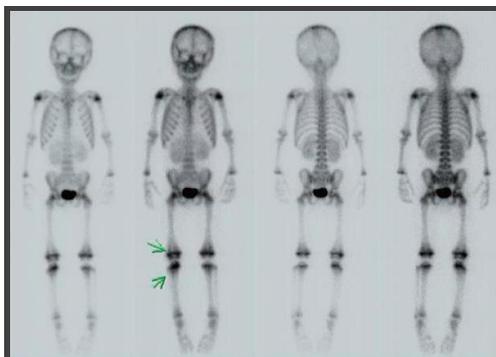
Os sintomas clínicos da AIJ podem ser variáveis. Vários sintomas que indicam a artrite não são necessariamente um diagnóstico de AIJ e podem ter múltiplas etiologias que só podem ser diferenciadas com um criterioso estudo do histórico do paciente (BOROS & WHITEHEAD, 2010). A AIJ poliarticular tem uma etiologia multifatorial, e pode se apresentar como uma doença viral ou pode ser o início de uma doença crônica, e pode evoluir ao longo do dia ou às vezes semanas, tornando o diagnóstico difícil, no momento da consulta. Assim, para diagnosticar com precisão a AIJ, o primeiro passo é excluir artrite com etiologias conhecidas (SINGH & MEHRA, 2010).

Como brevemente mencionado acima, o diagnóstico de AIJ é essencialmente clínico, e nenhum teste de laboratório pode confirmar seu diagnóstico. No entanto, os estudos de laboratório podem ser usados para fornecer evidências de inflamação, o apoio ao diagnóstico clínico da AIJ, monitoramento da toxicidade do tratamento, e entender melhor a patogênese da doença (KIM & KIM, 2010). Anormalidades hematológicas geralmente refletem na extensão da doença inflamatória. Exames laboratoriais que podem auxiliar para um melhor diagnóstico da AIJ incluem marcadores inflamatórios como VHS e proteína C-reativa (PCR). No entanto, os níveis de VHS e PCR em pacientes com AIJ ativa são variáveis. Em geral, o VHS é ocasionalmente útil no monitoramento da eficácia terapêutica (CASSIDY & PETTY 2001).

Um novo auto-anticorpo, o anti-CCP (anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados), tem sido estudado nos últimos anos. A citrulina é um aminoácido

modificado pós-tradução a partir de resíduos de arginina e está presente em alta frequência na cadeia peptídica da filagrina. As regiões ricas em citrulina parecem ser alvo dos anticorpos antifilagrina, identificados na artrite reumatóide, daí o desenvolvimento de um peptídeo sintético rico em citrulina para ensaio imunoenzimático mais estável e padronizável é de grande interesse (SERRA et. al., 1999; VAN VENROIJ & PRUIJN, 2000). SCHELLEKENS et al. (2000) observaram que o anti-CCP é específico (96-98%) para a artrite reumatóide no adulto, com sensibilidade de 60%. Alguns estudos têm mostrado a presença do anti-CCP em 60-75% dos pacientes com AR estabelecida (BIZZARO et. al., 2001; GAALLEN et. al., 2004; SARAUX et. al., 2004). Recentes estudos que tratam da identificação de anti-CCP na AIJ têm verificado sua presença na forma poliarticular FR<sup>+</sup> (LOW et. al., 2004; MACHADO, 2005). Embora os auto-anticorpos clássicos (fatores antinucleares e fatores reumatóides) tenham sido razoavelmente bem explorados em crianças e adolescentes com AIJ, houve pouco progresso na identificação de marcadores sorológicos desta doença.

As radiografias convencionais são os métodos mais acessíveis, rápidos e baratos para avaliação das articulações. A ultra-sonografia é, muitas vezes, a melhor maneira de identificar líquido intra-articular, em especial em articulações como o quadril e ombro onde o fluido pode ser difícil para ser detectado clinicamente (FEDRIZZI et. al., 1997). O aumento do uso da ressonância magnética e os avanços em técnicas de ressonância mais funcionais nos últimos dez anos têm melhorado a avaliação da doença articular em AIJ. Em comparação com a ultra-sonografia ou com radiografia, a ressonância magnética é que apresenta melhores resultados na detecção de inflamações e lesões nas articulações e cartilagem. A ressonância magnética também é capaz de avaliar com precisão as manifestações posteriores da AIJ, incluindo erosões, perda de espaço articular, danos à cartilagem e ligamentos (LAMER & SEBAG, 2000). Além disso, o escaneamento ósseo com tecnécio-99m tem se mostrado útil na detecção da fase inicial da inflamação em pacientes com artrite (Fig. 3) (QING et. al., 2008).



**Fig. 3.** Escaneamento ósseo com tecnécio-99m mostra o aumento da lesão óssea em um paciente portador de AIJ. Fonte: KIM & KIM, 2010.

Infelizmente, até o momento, ainda não há uma única modalidade que reúna todas as exigências de imagem, porém os métodos para detecção da AIJ estão se aperfeiçoando (MCKAY et. al., 2010).

#### 1.4.2 Tratamento

Estudos recentes mostraram que existe um grande benefício na resposta ao tratamento, quando se iniciam as drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) em sua fase inicial e de forma mais agressiva (EGSMOSE, 1995; VAN DER HEIDE, 1996; LARD, 2001; MOTTONEN, 2002; NELL et. al., 2004; BREEDVELD & KALDEN, 2004). No passado, a clássica pirâmide terapêutica que consistia em um tratamento conservador na fase inicial da doença deu chance para que muitos pacientes tivessem mais erosões e demormidades irreversíveis antes do uso de drogas mais efetivas. A ineficácia do esquema terapêutico proposto pela pirâmide terapêutica das artrites levou à mudança daquele paradigma de tratamento (PINCUS, 1990). O tratamento ideal da AIJ deve iniciar com a educação dos responsáveis pelo paciente sobre a doença, sobre os riscos e deformidades articulares e perda de capacidade funcional, assim como a orientação sobre os riscos e benefícios das opções terapêuticas disponíveis (KWOH, 2002). Portanto, o tratamento de crianças com AIJ deve centrar-se não só na realização da função ótima das articulações, mas também na preservação do desenvolvimento infantil normal, minimizando impactos negativos sobre a família do paciente. O tratamento de portadores de AIJ é desafiador e complexo, e os pacientes e suas famílias podem ter problemas psicológicos, dificuldades financeiras e levam um certo tempo para lidar com todos os diferentes aspectos da terapêutica (DANNECKER & QUARTIER, 2009)

As doenças reumáticas da infância nem sempre são benignas ou de curta duração (MINDEN et. al., 2002). Dada a complexidade da doença, a terapia pode ser necessária por muitos anos e uma equipe multidisciplinar de reumatologia pediátrica é crucial para o tratamento ideal dessas crianças. Além do reumatologista pediátrico, representantes de diferentes especialidades (por exemplo, um ortopedista, oftalmologista, cirurgião oral, fisioterapeutas e terapeutas ocupacionais, assistentes sociais e psicólogos) devem ser incluídos como membros de uma multifuncional equipe de tratamento (DANNECKER & QUARTIER, 2009).

O tratamento da AIJ visa tanto o controle do processo inflamatório subjacente como a prevenção de complicações. Até há poucos anos, a terapêutica baseava-se essencialmente na utilização de anti-inflamatórios não esteróides, corticoesteróides (sistêmicos e intra-articulares) e os fármacos anti-reumáticos modificadores da doença, como o metotrexato. No entanto, alguns doentes, principalmente aqueles com a apresentação sistêmica e poliarticular mostravam-se refratários a esta abordagem (PETTY, 1999).

O aumento dos conhecimentos do processo inflamatório subjacente à AIJ e dos seus principais intervenientes, permitiu estabelecer novos alvos terapêuticos. De fato, as opções para o tratamento têm melhorado com o desenvolvimento de fármacos dirigidos contra estes mediadores inflamatórios, nomeadamente os antagonistas do fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF). Diversos artigos têm demonstrado uma resposta favorável a estes agentes nos doentes com AIJ refratária ao tratamento convencional (HORNEFF et. al., 2004; QUARTIER et. al., 2003; LOVELL et. al., 2008). Após vários anos usando anti-fator de necrose tumoral (anti-TNFs) no tratamento das artrites, aproximadamente um terço dos pacientes deixam de usar a medicação por perda de eficácia ou efeitos adversos (SCHEINBERG et. al., 2008; GRINBLAT & SCHEINBERG, 2008). Outras citocinas, além do TNF, participam dos mecanismos etiopatogênicos das artrites: é o caso da interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6). Vários estudos mostram que o bloqueio da IL-1 e IL-6 possam ter benefícios terapêuticos nesses pacientes. O tocilizumab é um anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor solúvel e celular da interleucina-6, também alterando sensivelmente os níveis do fator de crescimento endotelial vascular. Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente esclarecido, vários trabalhos na literatura médica indicam que seus benefícios são evidentes e sugerem que será um novo tratamento anticitocina para artrites inflamatórias (NISHIMOTO et. al., 2003; TAKAGI et. al., 1998).

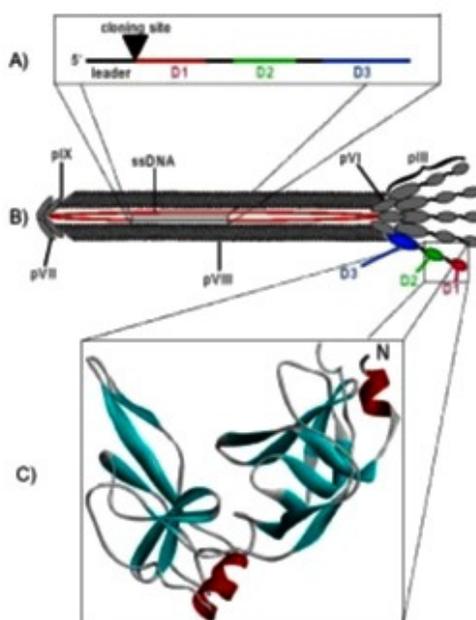
Apesar de nenhuma droga ter o poder de curar a AIJ, o tratamento tem melhorado drasticamente nos últimos anos. O controle da doença pode ser alcançado de forma mais eficaz e mais rápido com menos efeitos colaterais. Esta evolução encorajadora é devido a grandes avanços nas opções farmacológicas, especialmente os agentes biológicos (DANNECKER & QUARTIER, 2009).

## 2 Phage Display

A metodologia do *Phage Display*, exposição de biomoléculas em fagos, foi desenvolvida por Smith (1985), ao conseguir a expressão da enzima de restrição EcoRI através da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo do fago.

A biblioteca combinatória de peptídeos, *Phage display*, emergiu como um recurso de triagem para a identificação de peptídeos ligantes a molécula alvo. Essa tecnologia tem sido aplicada em vários estudos tais como interações entre proteínas, maturação de afinidade de peptídeos ligantes, mapeamento de epítomos e identificação de especificidade enzima-substrato. Além disso, apresenta grande impacto na imunologia, biologia celular, desenvolvimento de medicamentos e outros fármacos (AZZAZY & HIGHSMT, 2002; OHKUBO et al 2001; WILLATS, 2002).

Normalmente, utiliza-se o bacteriófago filamentosso M13 (Fig. 4) para construção de uma biblioteca de pequenos peptídeos fusionados à proteína pIII, que permite realizar “screening” de peptídeos ligantes a molécula alvo por seleção *in vitro*, essa seleção é conhecida como biopanning.



**Fig. 4.** Fago filamentosos: A) Composição do gene III, mostrando o sítio de ligação de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pXI; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III (HOLLIGER et al., 1999), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas  $\beta$  em cianico.

Uma biblioteca biológica consiste de um *pool* de microrganismos expressando diferentes polipeptídeos. Cada microrganismo carrega apenas uma sequência de DNA ou RNA codificante para certo peptídeo, representando um clone. Cada clone na biblioteca pode ser propagado expressando o mesmo peptídeo (MERSICH; JUNGBAUER, 2008). Bacteriófagos ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando pilus sexual como receptor. As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *Escherichia coli* via pilus F consiste de DNA de fita simples incluso em uma cápsula protéica (RUSSEL, 1991). A partícula viral esquematizada na Figura 4 é composta por cinco proteínas estruturais (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) presentes no capsídeo viral. Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que fagos filamentosos não geram infecção lítica em *E. Coli* mas preferencialmente induzem à um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Bibliotecas de peptídeos randômicos têm sido usadas com sucesso para identificar peptídeos bioativos contra receptores purificados e imobilizados ou contra células intactas (RODI & MAKOWSKI, 1999). Além disto, o método de *Phage display* é utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em alvos do tipo celular ou um órgão específico (PASQUALINI & RUOSLAHT, 1996).

Peptídios recombinantes dispersos em fagos podem se ligar a receptores hormonais (DOORBAR; WINTER, 1994; WRIGHTON, et al., 1996; CWIRLA et al., 1997), proteínas (BALASS et al., 1993; DENNIS et al., 2000) e componentes inorgânicos (WHALEY et al., 2000) e assim elucidar suas moléculas alvo.

A utilização de amostras de soros na seleção de peptídeos, através da técnica de *phage display*, é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada para o imunodiagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, na tentativa de se identificar sequências específicas que se ligam a anticorpos presentes em tais amostras. Tal procedimento pode gerar o desenvolvimento de novos compostos mais simples e sensíveis, além de permitir o entendimento da participação de antígenos conhecidos, ou não, nos mecanismos de resposta imune (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

A apresentação na superfície de fagos lambda pode ser eficaz para o isolamento de clones que codificam auto-antígenos identificados no fluido sinovial ou soro de pacientes com artrite reumatóide ou com outras doenças auto-imunes (NIWA et al., 2004). Diante do exposto, a identificação de peptídeos miméticos aos antígenos autoimunes da Artrite Idiopática Juvenil, bem como a sua caracterização como novos biomarcadores, poderá ser potencialmente utilizado para o desenvolvimento do diagnóstico precoce e terapêuticas apropriadas para as populações em risco.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AL-MATAR, M. J.; PETTY, R. E.; TUCKER, L. B.; MALLESON, P. N.; SCHROEDER, M. L.; CABRAL, D. A. The early pattern of joint involvement predicts juvenile idiopathic arthritis disease progression in children with oligoarticular (pauciarticular) juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.46, p.2708–2715, 2002.

ALVES MEIRA, Z.; DE CASTILHO, S. R.; LINS BARROS, M. V.; MARIA VITARELLI, A.; DINIZ CAPANEMA, F.; MOREIRA, N. S.; MOREIRA CAMARGOS, P. A.; COELHO MOTA, C. C. Prevalence of Rheumatic Fever in Children from a Public High School in Belo Horizonte. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.65, p.331-334, 1995.

ANGELES-HAN, S.; PRAHALAD, S. The Genetics of Juvenile Idiopathic Arthritis: What Is New in 2010? *Current Rheumatology Reports*, v.12, p.87-93, 2010.

AUPPERLE, K. R.; BOYLE, D. L.; HENDRIX, M.; SEFTOR, E. A.; ZVAIFLER, N. J.; BARBOSA, M.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *The American Journal of Pathology*, v.152, p.1091–1098 1998.

AZZAY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v.35, p.425-445, 2002.

BALASS, M.; HELDMAN, Y.; CABILLY, S.; GIVOL, D.; KATCHALSKI-KATZIR, E.; FUCHS, S., Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.90, p.10638-10642, 1993.

BARTON, A. & WORTHINGTON, J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. *Arthritis & Rheumatism*, v.61, p.1441-1446, 2009.

BEHRENS, E. M.; BEUKELMAN, T.; PAESSLER, M.; CRON, R. Q. Occult macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v.34, p.1133-1138, 2007.

BIZZARO, N.; MAZZANT, G.; TANUTTI, E.; VIOLATE, D.; TOZZOLI, R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline assay for rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry*, v.47, p.1089-93, 2001.

BOROS, C.; WHITEHEAD, B. Juvenile idiopathic arthritis. *Australian Family Physician*, v.39, p.630-6, 2010.

BREDA, L.; DEL TORTO, M.; SANCTIS, D. S.; CHIARELLI, F. Biologics in children's autoimmune disorders: efficacy and safety. *European Journal of Pediatrics*, v.170, p.157-167, 2011.

BREEDVEL, F. C.; KALDEN, J. R. Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.63, p.627-633, 2004.

CASSIDY, J. T. Juvenile Rheumatoid Arthritis, in Kelley's Textbook of Rheumatology, S.H.J. Ruddy, Edward;Sledge,C., Editor. W.B.Saunders Company: Philadelphia, Pennsylvania, p.1297-1313, 2001.

CASSIDY, J. T.; PETTY, R. E., Juvenile rheumatoid arthritis. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. Textbook of Pediatric Rheumatology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co. p.214-221, 2001.

CASSIDY, J. T.; PETTY, R. E. Textbook of Pediatric Rheumatology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B Saunders, p.258, 2001.

CASSIDY, J. T., Juvenile Rheumatoid Arthritis, in Kelley's Textbook of Rheumatology, E.D. Harris Jr, Editor. Elsevier Saunders: Philadelphia, Pennsylvania, p.1579-1596, 2005.

CHANG, S. K.; GU, Z. & BRENNER, M. B. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunological Reviews*, v.233, p.256-266, 2010.

CLEMENS, L. E.; ALBERT, E.; ANSELL, B. M. Sibling pairs affected by chronic arthritis of childhood: evidence for a genetic predisposition. *The Journal of Rheumatology*, v.12, p.108–113, 1985.

CWIRLA, S. E.; BALASUBRAMANIAN, P.; DUFFIN, D. J.; WAGSTROM, C. R.; GATES, C. M.; SINGER, S. C.; DAVIS, A. M.; TANSIK, R. L.; MATTHEAKIS, L. C.; BOYTOS, C. M.; SCHATZ P, J.; BACCANAR, I D. P.; WRIGHTON, N. C.; BARRETT, R. W.; DOWER, W. J. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science*, v.276, p.1696-1699, 1997.

DANNECKER, G. E.; QUARTIER, P. Juvenile Idiopathic Arthritis: Classification, Clinical Presentation and Current Treatments. *Hormone Research in Paediatrics*, v.72, p.4-12, 2009.

de BENEDETTI, F.; MARTINI, A. Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease? *The Journal of Rheumatology*, v.25, p.203–207, 1998.

de BENEDETTI, F.; MARTINI, A. Targeting the interleukin-6 receptor: a new treatment for systemic juvenile idiopathic arthritis? *Arthritis & Rheumatism*, v.52, p.687-693, 2005.

DENNIS, M. S.; EIGENBROT, C.; SKELTON, N. J.; ULTSCH, M. H.; SANTELL, L.; DWYER, M. A.; O'CONNELL, M. P.; LAZARUS, R. A., Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature*, v.404, p.465-470, 2000.

DOORBAR, J.; WINTER, G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using *phage display*. *Jornal of Molecular Biology*, v.244, p.361-369, 1994.

EGSMOSE, C.; LUND, B.; BORG, G.; PETTERSON, H.; BEREG, E.; BRODIN, U.; TRANG, L. Patients with rheumatoid arthritis benefit from early second line therapy: 5-year follow-up of a prospective double-blind placebo-controlled study. *The Journal of Rheumatology*, v.22, p.2208-2213, 1995.

EHRENSTEIN, M.; EVANS, J. G.; SINGH, A.; MOORE, S.; WARMES, G.; ISENBERG, D. A.; MAURI, C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and

reversal by anti-TNF  $\alpha$  therapy. *The Journal of Experimental Medicine*, v.200, p.277-285, 2004.

FEDRIZZI, M. S.; RONCHEZEL, M. V.; HILARIO, M. O.; LEDERMAN, H. M.; SAWAYA, S.; GOLDENBERG, J.; SOLE, D. Ultrasonography in the early diagnosis of hip joint involvement in juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v.24, p.1820-1825, 1997.

FROSCH, M.; ROTH, J. New insights in systemic juvenile idiopathic arthritis—from pathophysiology to treatment. *Rheumatology (Oxford)*, v.47, p.121-125, 2008.

GAALLEN, F. A.; LINN-RASKER, S. P.; VENROOIJ, W. J.; JONG, B. A. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. A prospective cohort study. *Arthritis & Rheumatism*, v.50, p.709-715, 2004.

GABRIEL, S. E. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *American Journal of Medicine*, v.121, p.9–14, 2008.

GLASS, D. N.; GIANNINI, E. H. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis & Rheumatism*, v.42, p.2261-2268, 1999.

GRIFFIN, T. A.; BARNES, M. G.; ILOWITE, N. T.; OLSON, J. C.; SHERRY, D. D.; GOTTLIEB, B. S.; ARONOW, B. J.; PAVLIDIS, P.; HINZE, C. H.; THORNTON, S.; THOMPSON, S. D.; GROM, A. A.; COLBERT, R. A.; GLASS, D. N. Gene expression signatures in polyarticular juvenile idiopathic arthritis demonstrate disease heterogeneity and offer a molecular classification of disease subsets. *Arthritis & Rheumatism*, v.60, p.2113–2123, 2009.

GRINBLAT, B.; SCHEINBERG, M. The enigmatic development of psoriasis and psoriasiform lesions during anti-TNF therapy: a review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.37, p.251-255, 2008.

GROM, A. A. Natural killer cell dysfunction: a common pathway in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis, macrophage activation syndrome, and hemophagocytic lymphohistiocytosis? *Arthritis & Rheumatism*, v.50, p.689-98, 2004.

HAMILTON, J. A. & TAK, P. P. The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis & Rheumatism*, v.60, p.1210–1221 2009.

HOLLIGER, P.; RIECHMANN, L. AND WILLIAMS, R. L. Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9Å: evidence for conformational lability. *Journal of Molecular Biology*, v.288, p.649-657, 1999.

HORNEFF, G.; SCHMELING, H.; BIEDERMANN, T.; FOELDVARI, I.; GANSER, G.; GIRSCHICK, H. J. The German etanercept registry for treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.63, p.1638-1644, 2004.

ISAACS, D. I. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nature Reviews*, v.10, p.605-611, 2010.

KIM, K. H.; KIM, D. S. Juvenile idiopathic arthritis: Diagnosis and differential Diagnosis. *Korean Journal of Pediatrics*, v.53, p.931-935, 2010.

KWOH, C. K, and the American College of Rheumatology Subcommittee on rheumatoid arthritis guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.46, p.328-346, 2002.

LAMER, S.; SEBAG, G. H. MRI and ultrasound in children with juvenile chronic arthritis. *European Journal of Radiology*, v.33, p.85-93, 2000.

LANG, B. A.; SHORE, A. A review of current concepts on the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v.17, p.1-15, 1990.

LARD, L. R.; VISSER, H.; SEPEYER, I., VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E.; ZWINDERMAN, A. H.; BREEDVELD, F. C. Early versus delayed treatment in patients

with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *American Journal of Medicine*, v.111, p.446-451, 2001.

LOVELL, D. J.; REIFF, A.; ILOWITE, N. T.; WALLACE, C. A.; CHON, Y. Safety and efficacy of up to eight years of continuous etanercept therapy in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.58, p.1496–1504, 2008.

LOW, J. M.; CHAUHAN, A. K.; KIETZ, D. A.; DAUD, U.; PEPMUELLER, P. H.; MOORE, T. L. Determination of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Rheumatology*, v.31, p.829-33, 2004.

MACAUBAS, C.; NGUYEN, K.; MILOJEVIC, D. Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. This review describes the epidemiology, genetics, and pathogenesis of JIA. *Nature Reviews Rheumatology*, v.5, p.616-626, 2009.

MACHADO, S. H.; VON MUHLEN, C. A.; BRENOL, J. C. T.; BISOTTO, L.; XAVIER, R. M. Juvenile idiopathic arthritis, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, diagnosis, immunology. *Jornal de Pediatria*, v.81, p.491-494, 2005.

MANNERS, P. J.; BOWER, C. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *The Journal of Rheumatology*, v.29, p.1520 -1530, 2002.

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of Cerebrospinal fluid Antibodies Specificities in Neurocysticercosis Using *Phage Display* Peptide Library. *Clinical Immunology*, v.91, p.117-121, 1999.

MANZO, A.; BOMBARDIERI, M.; HUMBY, F.; PITZALIS, C. Secondary and ectopic lymphoid tissue responses in rheumatoid arthritis: from inflammation to autoimmunity and tissue damage/remodeling. *Immunological Reviews*, v.233, p.267–285, 2010.

MARTINI, A. Are the number of joints involved or the presence of psoriasis still useful tools to identify homogeneous disease entities in juvenile idiopathic arthritis? *Journal of Rheumatology*, v.30, p.1900-1903, 2003.

MCKAY, G. M.; COX, L. A.; LONG, B. W. Imaging juvenile idiopathic arthritis: assessing the modalities. *Radiologic Technology*, v.81, p.318-27, 2010.

MERSICH, C; JUNGBAUER, A. Generation of bioactive peptides by biological libraries. *Journal of Chromatography B, Amsterdam*, v.861, p.160-170, 2008.

MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England Journal of Medicine*, v.361, p.888–898, 2009.

MINDEN, K.; NIEWERTH, M.; LISTING, J.; BIEDERMANN, T.; BOLLOU, M.; SCHONTUBE, M.; ZINK, A. Long-term outcome in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.46, p.2392-2401, 2002.

MOTTONEN, T.; HANNONEN, P.; KORPELA, M.; NISSILA, M.; KAUTIAINEN, H.; ILOINEN, J. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.46, p.894-898, 2002.

MURRAY, K. T. S. D.; GLASS, D. N. Pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors. *Archives of Disease in childhood*, v.77, p.530-534, 1997.

NAKAMURA, R. M. Progress in the use of biochemical and biological markers for evolution of rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v.14, p.305-313, 2000.

NELL, V. P. K.; MACHOLD, K. P.; EBERL, G.; UFFMANN, M.; STAMM, T.; SMOLEN, J. S. Benefit of very early referral and therapy with disease-modifying antirheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v.43, p.906-914, 2004.

NISHIMOTO, N.; YOSHIKAZI, K.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6. In: Smolen J, Lipsky P, editors. *Targeted Therapy in Rheumatology*. London: Martin Dunitz, p.231-241, 2003.

NIWA, M.; FUKUOKA, K.; FUJIMOTO, T.; MARUYAMA, I. N. Efficient isolation of cDNA clones encoding rheumatoid arthritis autoantigens by lambda phage surface display. *Journal of Biotechnology*, v.114, p. 55-58, 2004.

OEN, K. Comparative epidemiology of the rheumatic diseases in children. *Current Opinion in Rheumatology*, v.12, p.410-414, 2000.

OHKUBO, S.; MIYADERA, K.; SUGIMOTO, Y.; MATSUO, K.; WIERZBA, K.; YAMADA, Y. Substrate *phage* as a tool to identify Novel substrate sequences of proteases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screenin*, v.4, p.573-83, 2001.

PASCUAL, V.; ALLANTAZ, F.; ARCE, E.; PUNARO, M.; BANCHEREAU, J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *The Journal of Experimental Medicine*, v.201, p.1479-1486, 2005.

PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Tissue targeting with phage peptide libraries. *Molecular Psychiatry*, v.1, p.423, 1996.

PETTY, R. E. Prognosis in children with rheumatic diseases: justification for consideration of new therapies. *Rheumatology*, v.38, p.739-742, 1999.

PETTY, R. E.; SOUTHWOOD, T. R.; MANNERS, P.; BAUM, J.; GLASS, D. N.; GOLDENBERG, J.; HE, X.; MALDONADO-COCCO, J.; OROZCO-ALCALA, J.; PRIEUR, A. M.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E.; WOO, P. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *The Journal of Rheumatology*, v.31, p.390-392, 2004.

PINCUS, T.; CALLAHAN, L. F. Remodeling the pyramid or remodeling the paradigms concerning rheumatoid arthritis: lessons from Hodgkin's disease and coronary artery disease. *The Journal of Rheumatology*, v.17, p.1582-1585, 1990.

PLENGE, R. M. Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update. *Current Rheumatology Reports*, v.11, p.351-356, 2009.

PRAHALAD, S. Genetic analysis of juvenile rheumatoid arthritis: approaches to complex traits. *Currents Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, v.36, p.83-90, 2006.

PRAHALAD, S.; GLASS, D. N. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Rheumatology Online Journal*, v.6, p.11, 2008.

PRAHALAD, S.; RYAN, M. H.; SHEAR, E. S. Juvenile rheumatoid arthritis: linkage to HLA demonstrated by allele sharing in affected sibpairs. *Arthritis & Rheumatism*, v.43, p.2335-2338, 2000.

QING, C.; LEI, Y.; MA, L.; XIE, P.; DENG, H. [A clinical study on the diagnosis of early rheumatoid arthritis using bone imaging with 99mTc-MDP]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, v.25, p.1193-1196, 2008.

QUARTIER, P.; TAUPIN, P.; BOURDEAUT, F.; LEMELLE, I.; PILLET, P.; BOST, M.L. Efficacy of etanercept for the treatment of juvenile idiopathic arthritis according to the onset type. *Arthritis & Rheumatism*, v.48, p.1093-1101, 2003.

RAVELLI, A.; FELICI, E.; MAGNI-MANZONI, S.; PISTORIO, A.; NOVARINI, C.; BOZZOLA, E.; VIOLA, S.; MARTINI, A. Patients with antinuclear antibody- positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis & Rheumatism*, v.52, p.826-832, 2005.

RAVELLI, A.; MARTINI, A. Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet*, v.369, p.767-778, 2007.

RODI, D. J.; MAKOWSKI, L. *Phage-display* technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Current Opinion in Biotechnology*, v.10, p.87-93, 1999.

RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. *Molecular Microbiology*, v.5, p.1607-1613, 1991.

SARAUX, A.; BERTHELOT, J. M.; CHALES, G. L. E.; HENAFF, C.; MARY, J. Y.; THOREL, V. Value of laboratory tests in early prediction rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.47, p.1089-93, 2004.

SCHEINBERG, M.; GOLDENBERG, J.; FELDMAN, D. P.; NÓBREGA, J. L. Retrospective study evaluating dose standards for infliximab in patients with rheumatoid arthritis at Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil. *Clinical Rheumatology*, v.27, p.1049-1052, 2008.

SCHELLEKENS, G. A.; VISSER, H.; DE JONG, B. A.; VAN DEN HOOGEN, F. H.; HAZES, J. M.; BREEDVELD, F. C. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism*, v.43, p.155-163, 2000.

SERRA, C. R.; RODRIGUES, S. H.; STANJNBOK, F. R.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. Antiperinuclear factor and antibodies to the stratum corneum of rat esophagus in juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Pediatrics*, v.134, p.507-509, 1999.

SINGH, S.; MEHRA, S. Approach to Polyarthritis. *Indian Journal of Pediatrics*, v.77, p.1005-1010, 2010.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v.228, p.1315-1317, 1985.

TAKAGI, N.; MIHARA, M.; MORIYA, Y.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.41, p.2117-2121, 1998.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nature Reviews Rheumatology*, v.5, p.667-676, 2009.

TERRERI, M. T.; F., GOLDENBERG, F. M. B., LEN, J., HILARIO M. O, Resource utilization and cost of rheumatic fever. *Journal of Rheumatology*, v.28, p.1394-1397, 2001.

VAN DER HEIDE, A.; JACOBS, J. W.; BIJLSMA, J. W.; HEURKENS, A. H. The effectiveness of early treatment with "second-line" antirheumatic drugs. A randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, v.124, p.699-707, 1996.

VAN ROSSUM, M.; VAN SOESBERGEN, R.; DE KORT, S. Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies in children with juvenile idiopathic arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v.30, p.825-828, 2003.

VAN VENROIJ, W. J.; PRUIJN, G. J. Citrullination: a small change for protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*, v.2, p.249-251, 2000.

WALSH, N. C.; GRAVALLESE, E. M. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunological Reviews*, v.233, p.301-312, 2010.

WEISS, J. E.; ILOWITE, N. T. Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatrics Clinics of North America*, v.52, p.413-442, 2005.

WHALEY, S. R.; ENGLISH, D. S.; HU, E. L.; BARBARA, P. F.; BELCHER, A. M. Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature*, v.405, p.665-668, 2000.

WILLATS, W. G. *Phage display: practicalities and prospects*. *Plant Molecular Biology*, v. 50, p.837-54, 2002.

WRIGHTON, N. C.; FARRELL, F. X.; CHANG, R.; KASHYAP, A. K.; BARBONE, F. P.; MULCAHY, L. S.; JOHNSON, D. L.; BARRETT, R. W.; JOLLIFFE, L. K.; DOWER, W. J. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*, v.273, p.458-464, 1996.

YOKOTA, S.; IMAGAWA, T.; MORI, M. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebocontrolled, withdrawal phase III trial. *The Lancet*, v.371, p.998-1006, 2008.

## **CAPÍTULO II:**

**Isolamento e identificação de mimetopos de  
auto-antígenos para utilização em  
imunodiagnóstico da Artrite Idiopática Juvenil**

## Resumo

As Artrites Idiopáticas Juvenis (AIJ) são um conjunto de doenças crônicas caracterizadas por inflamação persistente das articulações, sendo os sinais típicos desta inflamação a dor, inchaço e limitação dos movimentos. “Idiopática” significa que não se sabe a causa da doença e “juvenil”, neste caso, significa que o início dos sintomas acontece antes dos 16 anos de idade. O diagnóstico da AIJ é clínico e baseia-se no achado de artrite em uma ou mais articulações, com duração igual ou superior a 6 semanas. É fundamental que várias doenças, como as infecções, sejam pesquisadas e afastadas, uma vez que a artrite é a manifestação comum de várias doenças reumáticas e não-reumáticas. Por isso, trabalhos que são direcionados a investigar novos biomarcadores tornam-se de grande importância para o diagnóstico da AIJ. O objetivo deste estudo foi selecionar e identificar através da metodologia de *Phage Display*, peptídeos reconhecidos por anticorpos purificados a partir do soro de pacientes com AIJ. Para seleção dos peptídeos foi realizado um *biopanning* utilizando uma biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C expressa na superfície do fago filamentoso M13. O DNA dos clones selecionados foi sequenciado, traduzido, e os diversos clones foram submetidos aos ensaios de ELISA e bioinformática. Dentre os 192 clones sequenciados, 100 apresentaram sequências válidas, onde foram identificadas 40 sequências diferentes. As análises de bioinformática demonstraram que há similaridades entre a maioria dos peptídeos selecionados e proteínas altamente expressas em pacientes portadores de AIJ. O ensaio ELISA permitiu a pré-validação de um clone com potencial biomarcador para o imunodiagnóstico sorológico da Artrite Idiopática Juvenil.

Palavras-chave: Artrite Idiopática Juvenil, *Phage display*, imunodiagnóstico

## **Abstract**

Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) is a set of chronic diseases characterized by persistent inflammation of joints. "Idiopathic" means that no one knows the cause of illness and "Juvenile" in this case means that the onset of symptoms occurs before 16 years of age. The diagnosis of JIA is clinical and is based on the finding of arthritis in one or more joints, lasting less than six weeks. It is essential that several diseases such as infections are investigated and removed, since arthritis is a common manifestation of various rheumatic and non-rheumatic diseases. Therefore, studies that are aimed at investigating new biomarkers become of great importance for the diagnosis of JIA. The aim of this study was to select and identify peptides recognized by antibodies purified from the serum of patients with JIA by Phage Display technology. For selection of peptides was performed a biopanning using a peptide library Ph.D.-C7C expressed on the surface of filamentous phage M13. The DNA from selected clones was sequenced, translated, and several clones were subjected to ELISA assays and bioinformatics. Among the 192 clones sequenced, 100 had valid sequences, which were identified 40 different sequences. The bioinformatics analysis showed that there are similarities between most of the selected peptides and proteins highly expressed in patients with JIA. ELISA allowed the pre-validation of a clone with a potential biomarker for the serological immunodiagnosis of JIA.

Key words: Juvenile Idiopathic Arthritis, Phage Display, Immunodiagnostic

# **INTRODUÇÃO**

A nova classificação adotada internacionalmente para artrites na infância define o termo Artrite Idiopática Juvenil (AIJ), em substituição à Artrite Reumatóide Juvenil (ARJ), como artrite crônica (persistente por mais de 6 semanas) em uma ou mais articulações, com início antes dos 16 anos de idade e de etiologia desconhecida. (PETTY et. al., 2004).

Nas últimas décadas houve grande progresso no tratamento das artrites juvenis. O reconhecimento precoce de suas complicações, como a síndrome de ativação macrofágica, principalmente na forma sistêmica, resultou em declínio na mortalidade. A intervenção mais precoce nas formas poliarticulares também tem levado à evolução com menor incapacidade física e psicossocial. Observou-se também melhora no prognóstico visual, com a vigilância oftalmológica regular mediante o risco de uveíte crônica. Isto se deve principalmente ao aprimoramento de técnicas diagnósticas, laboratoriais e por imagem e à introdução de novos agentes terapêuticos, como as drogas anti-reumáticas e os agentes biológicos. Contudo, a mortalidade ainda é um risco, especialmente para os pacientes com persistência da sinovite ativa na vida adulta (FRENCH et. al., 2000).

A avaliação do prognóstico a longo prazo da AIJ indica a persistência de atividade da doença durante a adolescência e vida adulta numa grande proporção de pacientes, com repercussões clínicas e funcionais significantes (WALLACE; LEVINSON, 1991; OEN et. al., 2002). Estima-se que 50% das crianças com AIJ terão doença recorrente ou persistente na vida adulta, resultando em destruição articular progressiva. As formas poliarticulares respondem por cerca de 40% de todos os casos e têm o pior prognóstico, com a probabilidade de remissão de apenas 15% em dez anos. Conseqüentemente, a sinovite persistente poderá resultar em lesão articular com diminuição do desempenho nas atividades cotidianas, retardo motor de grandes e pequenas articulações, o que irá interferir no desempenho escolar e na qualidade de vida (MACHADO; RUPERTO, 2005).

O diagnóstico da AIJ é, até o momento, baseado na história clínica e exame físico, sendo a utilização de métodos complementares principalmente

direcionada para a exclusão de outros diagnósticos e comorbidades. Não há exames laboratoriais considerados específicos para a sua definição diagnóstica. Os testes laboratoriais bioquímicos e marcadores sorológicos são úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial, classificar o subgrupo de AIJ, avaliar a extensão da inflamação, determinar o prognóstico e a resposta à terapia (CASSIDY; PETTY, 2001; OLIVIERA, 2001). Nesse sentido, a busca por novos biomarcadores podem levar a novos métodos para o diagnóstico e tratamento da AIJ.

A biblioteca combinatória de peptídeos, *Phage display*, emergiu como um recurso de triagem para a identificação de peptídeos ligantes em molécula alvo. Essa tecnologia tem sido aplicada em vários estudos tais como interações de proteína ligante; maturação de afinidade de peptídeos ligantes isolados previamente; mapeamento de epítomos ligantes em sítios e identificação de especificidade de enzima substrato. Além disso, apresenta grande impacto na imunologia, biologia celular, desenvolvimento de medicamentos e outros fármacos (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002; OHKUBO et al 2001; WILLATS, 2002).

Essa metodologia consiste no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que a proteína ou o peptídeo expresso fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena, pIII ou pVIII (BARBAS et al, 2001).

A técnica *Phage Display*, torna possível a seleção de biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento individualizado de pacientes acometidos por várias doenças. É muito provável que a análise do complexo conteúdo proteico de tecidos e diferentes fluidos biológicos tenha, no futuro, um impacto significativo na avaliação e no diagnóstico de muitas patologias.

# **OBJETIVOS**

- Seleção de peptídeos miméticos aos antígenos reconhecidos por anticorpos autoimunes das quatro diferentes formas clínicas de Artrite Idiopática Juvenil (sistêmica, oligoarticular, poliarticular FR<sup>+</sup>, poliarticular FR<sup>-</sup>) através da técnica de *Phage Display*.
- Caracterização *in silico* dos mimetopos de autoantígenos selecionados.
- Avaliação do potencial dos clones selecionados para padronização de novas plataformas diagnósticas da doença.

# **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **1 Obtenção das amostras**

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia entre os anos de 2010 e 2011, mediante aprovação do comitê de ética em Pesquisa, sob o número de parecer 685/2009 (Anexo 1) e todas as técnicas de manipulação dos materiais biológicos seguiram normas do Código de Ética em Pesquisa com Humanos (Resolução CNS N° 196/96). O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, sem causar desconforto adicional às crianças. As amostras de sangue periférico (5mL) foram coletadas em tubos tipo vacutainer™ contendo K<sub>2</sub>EDTA 7,2mg, e em tubos sem adição de anticoagulante (5mL). O soro foi transferido para outro tubo e estocado à -80°C.

Para a seleção dos peptídeos miméticos de autoantígenos dos subtipos de AIJ, foram coletadas amostras de 10 pacientes com AIJ sistêmica, 19 pacientes com AIJ oligoarticular, 5 pacientes com AIJ poliarticular FR<sup>+</sup> e 3 pacientes com AIJ poliarticular FR<sup>-</sup>. Soros de pacientes portadores de outras doenças autoimunes e que não são portadores de Artrite Reumatóide foram utilizados como uma forma de diminuir os fagos inespecíficos para os subtipos da AIJ. Foram coletadas amostras de 2 pacientes portadores de Febre Reumática, 2 pacientes portadores de Uveíte, 3 pacientes portadores de Lúpus e 5 pacientes portadores de Tireoidite de Hashimoto. O soro de 20 crianças saudáveis, sem nenhum processo alérgico ou inflamatório no momento da coleta, também foram utilizados como uma forma de diminuir os fagos inespecíficos para os subtipos da AIJ.

## 2 Acoplamento das IgG's nas microesferas de proteína G

A purificação das Imunoglobulinas G provenientes de pacientes com AIJ, pacientes com Febre Reumática, Uveíte, Lúpus, Tireoidite de Hashimoto e pacientes saudáveis, ocorreu por intermédio de esferas magnéticas (*beads* magnéticos) conjugadas com proteína G (*GE Healthcare*).

Um volume de  $2 \times 10^9$  partículas (100ul do estoque) foram lavadas três vezes com tampão MES (0,1 M pH=5,0) para ativar as microesferas, adicionou-se 100uL de pool de cada subtipo de AIJ (Sistêmica, oligoarticular, poliarticular FR<sup>+</sup> e poliarticular FR<sup>-</sup>), dos pacientes com as outras doenças autoimunes e dos pacientes controle saudáveis, seguida da incubação por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente (T.A). As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então, lavadas novamente três vezes com tampão MES (0,1 M pH=5,0) com a finalidade de retirar os anticorpos não ligantes.

Para realizar a ligação covalente entre a proteína G presente na microesfera e os anticorpos, o sistema *beads*-anticorpo foi lavado duas vezes com 1ml de tampão trietanolamina (0,2M pH=8,2) e, ressuspendido e 1mL de tampão de ligação covalente (20mM de dimetil pimelinidato x 2HCl em tampão trietanolamina) por 30 minutos sob agitação a T.A. A neutralização da reação da ligação covalente foi feita pela incubação do sistema *beads*-anticorpos com 1mL de tampão Tris (50mM pH=7,5) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as microesferas foram lavadas com TBS-T 0,1% de tween e bloqueadas por 1 hora a 37°C com a solução de bloqueio (5% de BSA em TBS-T 0,05% de tween) e ressuspendidas em 200ul de TBS.

Para certificar-se do acoplamento, 5ul de *beads* contendo IgG, dos diferentes grupos, foram incubados por 1 hora a 37°C com anti-IgG (VH+ VL da *Sigma*) humana diluído na proporção 1:5000 na solução de bloqueio e com anti-IgY na proporção 1:5000 para o controle da reação. Após a incubação, os *beads* foram lavados 3 vezes com TBS-Tween 0,1% e reveladas com substrato de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e efetuada a leitura a 450 nm em leitor de microplacas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*).

Estimou-se a quantidade de anticorpos obtida pelo método de detecção e

quantificação de proteínas descrito por JONHSTONE & THORPE (1987), onde a Concentração da amostra = Absorbância à 280 nm X Fator de diluição/ 1,36.

### **3 Seleção dos peptídeos miméticos a auto-antígenos – *Biopanning***

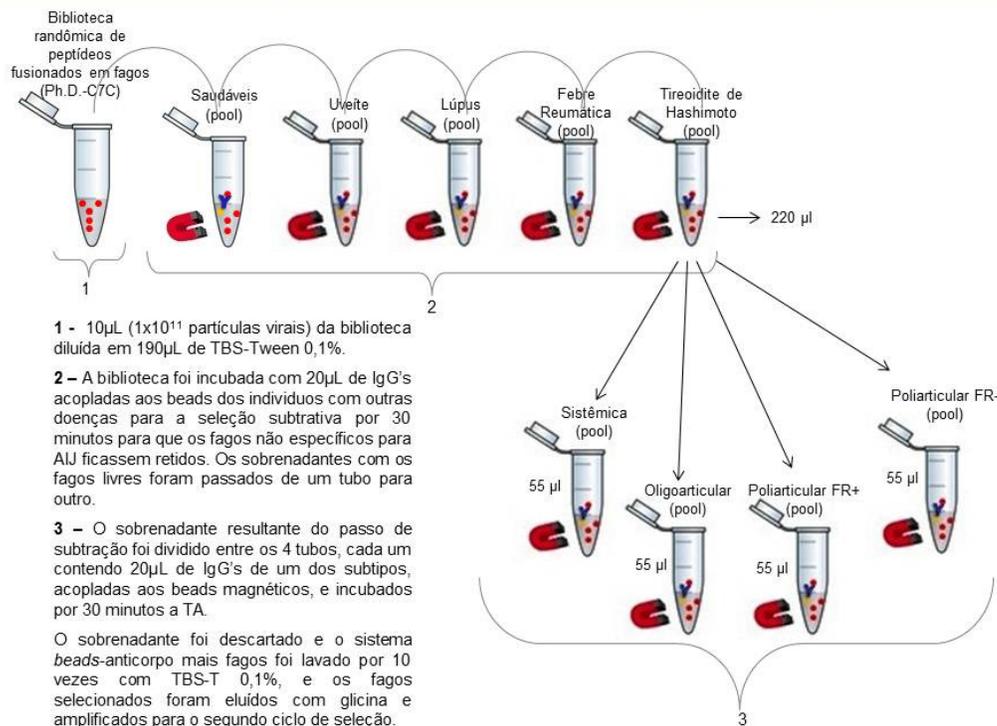
Foram utilizadas 10µL ( $1 \times 10^{11}$  partículas virais) de uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados na proteína pIII de fagos (Ph.D.-C7C da NEW ENGLAND BioLabs® Inc.), diluída em 190ul de TBS-Tween 0,1% para a seleção de ligantes de IgG de pacientes dos quatro subtipos de AIJ. A biblioteca é composta de 7 aminoácidos randômicos expressos na região da pIII dos bacteriófagos, os quais são flanqueados por um par de resíduos de cisteína, que quando oxidados durante a montagem do fago formam uma ligação dissulfeto. A estratégia utilizada para a seleção dos peptídeos miméticos dos quatro subtipos de AIJ é mostrada na Figura 1 e Figura 2.

Com o intuito de remover os peptídeos ligantes às IgG's do soro de pacientes saudáveis e pacientes com outras doenças autoimunes, foi feita primeiramente uma seleção subtrativa onde a biblioteca de fagos foi incubada sob agitação por 30 minutos a T.A com 20 µl das microesferas acopladas às IgG's de pacientes saudáveis. Em seguida, as microesferas foram precipitadas e o sobrenadante (contendo os fagos que não se ligaram) foi transferido a outro tubo contendo microesferas acopladas com IgG's de pacientes portadores de uveíte, os fagos que não se ligaram foram transferidos para um tubo contendo microesferas acopladas com IgG's de pacientes portadores de lúpus, o mesmo foi feito com microesferas acopladas com IgG's de pacientes portadores de febre reumática e tireoidite de Hashimoto.

Para a seleção positiva, o sobrenadante com os fagos não ligantes (220µl), após a incubação prévia com as IgGs dos grupos controle, foi dividido entre quatro tubos (55µl para cada tubo), cada um contendo 20µl das microesferas magnéticas acopladas às IgG's dos quatro subtipos da AIJ e incubado sob agitação por 30 minutos a T.A. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sistema *beads*-anticorpo mais fagos foi lavado por 10 vezes com TBS-T 0,1%, e os fagos selecionados foram eluídos com 500ul de glicina pH 2,0 e neutralizados com 75ul de Tris 1M pH 9,1.

Os fagos selecionados foram amplificados pela inoculação de uma cultura de *E. coli* da linhagem ER2738 em meio Luria Bertani (LB - Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L) suplementado com tetraciclina. Após atingir a fase early-log ( $OD_{600}$  0,3), a cultura bacteriana foi inoculada com 500ul dos eluatos dos fagos e incubados a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10000rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 16 horas a 4°C para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1mL de TBS e reprecipitado com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200uL de TBS com 0.02% de  $NaN_3$ , obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

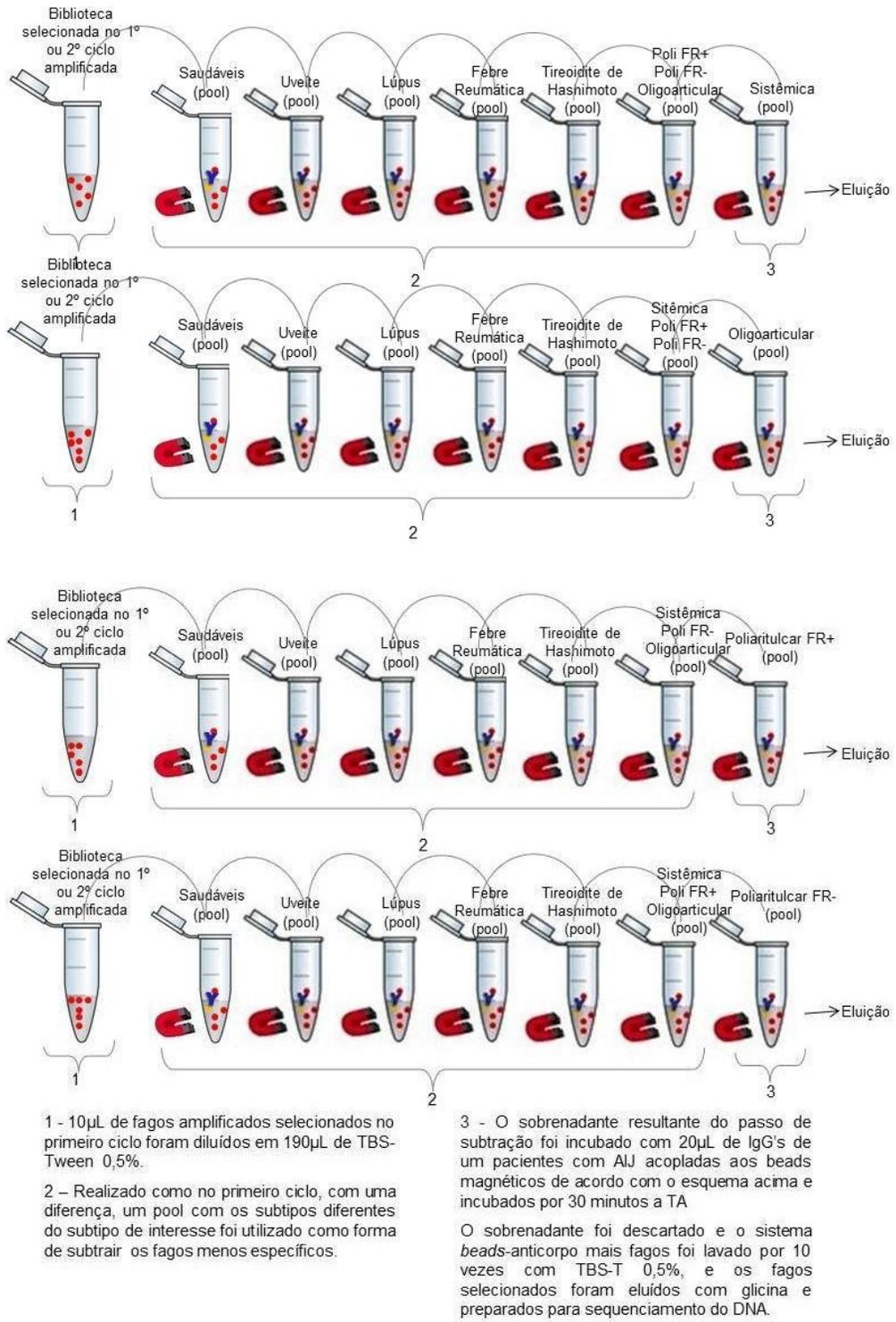
## Estratégia do primeiro ciclo do *Biopanning*



**Fig. 1.** Estratégia do primeiro ciclo do *Biopanning* para seleção de mimetopos de autoantígenos da Artrite Idiopática Juvenil.

Os fagos amplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo, sendo que houve um aumento da estringência do tampão de lavagem de 0.1% para 0.5% de Tween 20 em todas as lavagens. A estratégia da subtração de fagos inespecíficos utilizando outras doenças autoimunes foi a mesma, portanto, com uma etapa adicional, um pool contendo IgG's dos outros três subtipos de AIJ diferentes foi utilizado com o intuito de que aqueles que não fossem específicos ao subtipo de interesse, ficassem ligados às IgG's do pool. Os fagos do segundo ciclo de seleção foram amplificados como descrito anteriormente e utilizados em um terceiro ciclo, que ocorreu exatamente como descrito no segundo.

## Estratégia do segundo e terceiro ciclo do *Biopanning*



**Fig. 2.** Estratégia do segundo e terceiro ciclo do *Biopanning* para seleção de mimetopos de autoantígenos da Artrite Idiopática Juvenil.

## 4 Titulações

A titulação é um procedimento utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante a entrada e saída em cada ciclo do “*Biopanning*” para o acompanhamento e avaliação do grau de enriquecimento dos fagos reativos ao alvo desejado.

A solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes exponenciais sob log<sub>10</sub> em meio LB. Para eluatos não amplificados de cada subtipo foram utilizadas as diluições de 10<sup>1</sup> até 10<sup>4</sup> e no caso das soluções com eluatos amplificados a faixa de diluição utilizada foi entre 10<sup>8</sup> e 10<sup>11</sup>. Para cada diluição acrescentou-se 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* (OD<sub>600nm</sub> 0,5) e a solução foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células bacterianas, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Ágar-Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período, as colônias azuis formadas nas placas foram contadas e quantificadas, multiplicando-se cada valor obtido de colônias nas placas LB sólido pelo fator de diluição com intuito de obter o título dos fagos.

## 5 Extração e sequenciamento do DNA dos fagos selecionados

As colônias obtidas nas placas tituladas do 3º ciclo de seleção que demonstraram coloração azul, confirmando a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β-galactosidase pelo fago, foram re-amplificadas separadamente em poços de uma placa de cultura (do tipo *deep well*) contendo 1,2mL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* (OD<sub>600</sub> ~ 0,3) para a extração do DNA dos fagos. A placa foi, então, vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 24 horas, sob vigorosa agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Então, 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos para

precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 20°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500µL de etanol a 70% e recentrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído em 20µL de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do primer -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um Termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf) nas seguintes condições: Desnaturação a 95°C por 20 segundos; anelamento do primer a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por um minuto. A precipitação do DNA sequenciado foi feito com 1µL de Acetato de Amônio e 27,5µL Etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos a 3700 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 5 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

## 6 Análises dos dados por bioinformática

As sequências de DNA obtidas após o sequenciamento foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis *on-line*.

Para a obtenção das sequências reverso complementares de aminoácidos (aa) utilizou-se o programa *Sequence Manipulation Suite* ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)). As sequências obtidas foram traduzidas pelo programa *ExPASy* (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). O alinhamento dos peptídeos selecionados foi gerado utilizando o programa *CLUSTAL W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html/>). Para as análises de similaridades com auto-antígenos humanos foi utilizado o programa *Peptide Server* (<http://pepitope.tau.ac.il/index.html>).

## 7 Testes ELISA para estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados

Após a obtenção das sequências de DNA dos clones selecionados por sequenciamento e suas análises por bioinformática, foi realizado o teste ELISA com todos os clones obtidos para verificar a reatividade dos mesmos às IgG's dos pacientes com AIJ sistêmica, AIJ oligoarticular, AIJ poliarticular FR<sup>+</sup>, AIJ poliarticular FR<sup>-</sup> e os controles, tendo como controle negativo em todas as placas o fago selvagem (M13), sem o inserto do DNA exógeno.

Placas de microtitulação (NUNC Maxisorp) carregadas foram sensibilizadas com cada clone a uma concentração de  $1 \times 10^{11}$ /poço diluídos em 100µl de tampão carbonato bicarbonato de sódio (pH 9,6) por 16 horas sob agitação a 4°C. Decorrido o tempo de sensibilização, as placas foram bloqueadas com 300µl de tampão de bloqueio (PBS-BSA 5%) por poço por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas uma vez com PBS 1x e incubadas com 100µL/poço das amostras de soro, diluídas a 1:250 em PBS-BSA 5% com 0,5% de tween 20 por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T 0,5% e incubadas com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) diluído a 1:5000 em PBS-T 0,5% suplementado com 5% de BSA por 1 hora a 37°C. Após 6 lavagens com PBS-T 0,5%, a ligação antígeno/anticorpo foi

detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

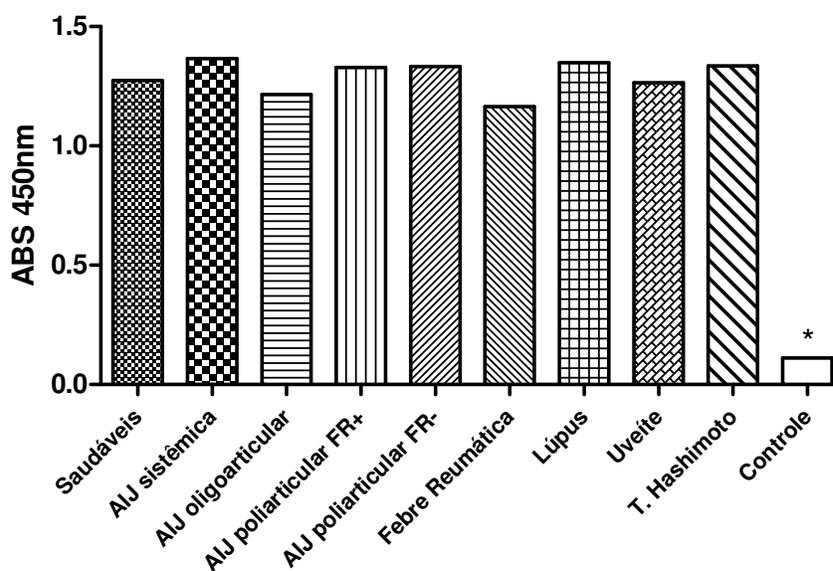
## **8 Análises estatísticas**

A análise estatística foi feita para avaliar a reatividade dos clones em relação aos soros de pacientes portadores de AIJ, outras doenças auto-imunes e indivíduos saudáveis. O teste utilizado foi ANOVA seguido da comparação múltipla de Tukey, com um intervalo de confiança de 95%. As análises e os gráficos foram realizados pelo software estatístico GraphPad Prism 5.0 assumindo significância quando  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

## 1 Acoplamento de imunoglobulinas nas microesferas para proteína G

A purificação dos anticorpos do *pool* de soros de pacientes positivos para os quatro subtipos de AIJ, com outras doenças autoimunes e aparentemente saudáveis pelos *beads* magnéticos se mostrou eficiente. Pelos resultados obtidos no bead-ELISA, verificou-se que a purificação ocorreu de maneira satisfatória e eficiente quando comparou-se os dados obtidos com o controle, como pode ser observado na Figura 3.



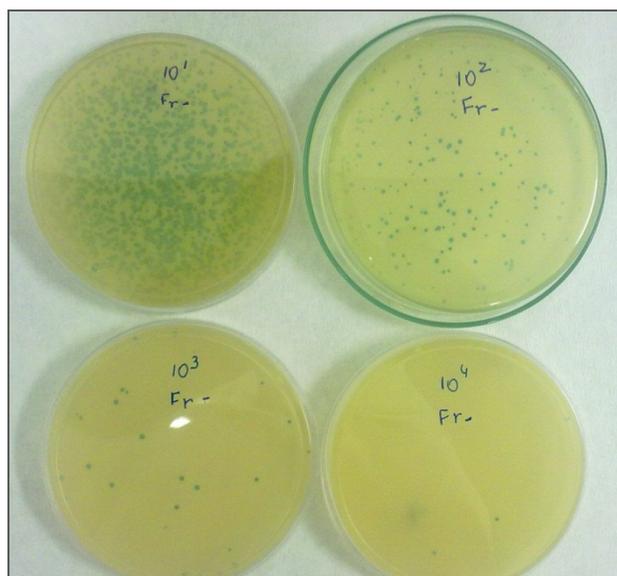
**Fig. 3.** Ensaio de *Bead*-ELISA para verificação da eficiência do acoplamento de IgG's nas microesferas magnéticas. O eixo Y representa a leitura média da absorbância a 450nm, o eixo X representa os diferentes grupos mais o controle, que foi incubado com um anticorpo irrelevante. A diferença entre os grupos e o controle foi evidenciada pelo teste estatístico ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## 2 Seleção dos peptídeos miméticos a auto-antígenos

### 2.1 *Biopanning* e titulações

A estratégia de seleção dos ligantes a imunoglobulinas de pacientes com Artrite Idiopática Juvenil utilizou-se de dois passos subtrativos realizados com as IgGs de indivíduos controles aparentemente saudáveis e portadores de outras doenças autoimunes, procedimento o qual assegurou uma maior especificidade dos mimetopos selecionados. A eficiência do *biopanning* pode ser observada com o enriquecimento das titulações dos ciclos.

As titulações foram eficientes nos três ciclos de seleção de peptídeos, visto que as colônias apresentaram coloração azulada (Figura 4) devido à quebra do substrato X-Gal e à expressão do gene da  $\beta$ -Galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738 como consequência do processo de infecção das bactérias pelos bacteriófagos e à incorporação do DNA destes ao genoma bacteriano. Outra demonstração de que as titulações foram eficazes foi o aumento do número de colônias de bactérias infectadas pelos fagos de um ciclo a outro, indicando o enriquecimento da seleção de peptídeos.



**Fig. 4.** Titulação dos fagos. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com os fagos M13 carregando o gene da  $\beta$ -Galactosidase. A figura mostra a titulação dos fagos obtidos no segundo ciclo de seleção de peptídeos do subtipo AIJ poliarticular FR<sup>-</sup>, o procedimento foi o mesmo para os quatro subtipos.

Os resultados obtidos nos títulos de entrada e saída (fagos amplificados e não amplificados) são mostrados na Tabela 1, que demonstra o enriquecimento dos clones a favor do alvo durante os ciclos de seleção. Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos contra os autoantígenos ficam ligados as IgG's dos pacientes com AIJ através da interação peptídeo/anticorpo. O restante dos fagos com baixa ou nenhuma afinidade foi removido durante as lavagens. Nas ampliações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

**Tabela 1.** Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a IgG's. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade.

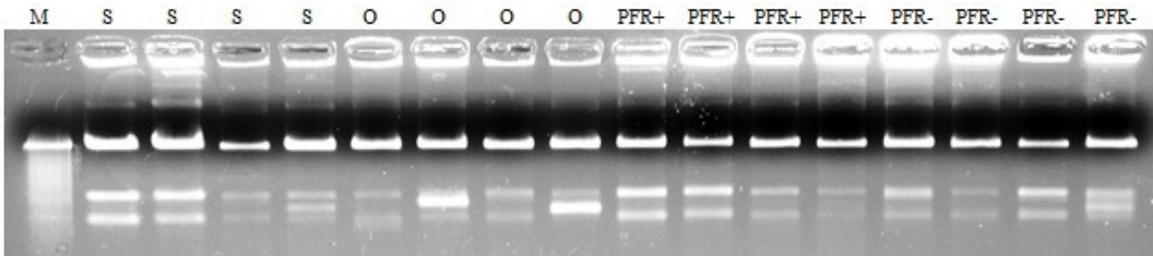
Ciclos/estringência	Número de Partículas de Fagos			
	Entrada		Saída	
1º Ciclo de Seleção 0,1% tween	Biblioteca original	1x10 <sup>11</sup>	AIJ Sistêmica	4x10 <sup>3</sup>
			AIJ Oligoarticular	2x10 <sup>4</sup>
			AIJ Poliarticular FR <sup>+</sup>	2x10 <sup>4</sup>
			AIJ Poliarticular FR <sup>-</sup>	1x10 <sup>3</sup>
2º Ciclo de Seleção 0,5% tween	Pool de Fagos obtidos no 1º Ciclo	1x10 <sup>11</sup>	AIJ Sistêmica	2x10 <sup>4</sup>
			AIJ Oligoarticular	2x10 <sup>4</sup>
			AIJ Poliarticular FR <sup>+</sup>	3x10 <sup>4</sup>
			AIJ Poliarticular FR <sup>-</sup>	3x10 <sup>4</sup>
3º Ciclo de Seleção 0,5% tween	Pool de Fagos obtidos no 2º Ciclo	1x10 <sup>11</sup>	AIJ Sistêmica	8x10 <sup>7</sup>
			AIJ Oligoarticular	6x10 <sup>5</sup>
			AIJ Poliarticular FR <sup>+</sup>	9x10 <sup>5</sup>
			AIJ Poliarticular FR <sup>-</sup>	7x10 <sup>7</sup>

Nota-se que no segundo ciclo de seleção houve um enriquecimento de fagos, levando-se em conta a estratégia de seleção com duas etapas a mais e o aumento do tween 20 de 0,1% no primeiro ciclo para 0,5% no segundo ciclo,

aumentando assim, a estringência. O enriquecimento claramente observado no terceiro ciclo comprova a eficiência da estratégia aplicada para a seleção.

### 3 Extração do DNA dos fagos selecionados

Após o crescimento individual de 48 colônias de cada subtipo de AIJ, totalizando 192 colônias, foi feita a extração do DNA de todos os clones para posterior sequenciamento. Para a análise da qualidade do DNA em gel de agarose 0,8%, foram escolhidos aleatoriamente DNA's de 4 clones de cada subtipo de AIJ. O gel foi corado com brometo de etídeo (Figura 5). Este procedimento demonstrou que a extração do DNA foi eficiente, e com quantidade suficiente para a realização da reação de sequenciamento.



**Fig. 5.** Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo: M; DNA do fago M13 padrão 400ng (GE) e amostras do DNA dos clones selecionados no *Biopanning*, correspondendo às iniciais dos quatro subtipos de AIJ. M = marcador; S = AIJ sistêmica; O = AIJ oligoarticular; PFR<sup>+</sup> = AIJ poliarticular fator reumatóide positivo; PFR<sup>-</sup> = AIJ poliarticular fator reumatóide negativo

### 4 Sequenciamento de DNA e Bioinformática

Dentre os 192 clones sequenciados, 100 apresentaram sequências válidas, onde foram identificadas 40 sequências diferentes e as demais ocorrendo repetidas vezes. A tabela 2 mostra a sequência de aa e a frequência de cada clone obtido nos diferentes subtipos.

**Tabela 2.** Frequência de aminoácidos de todos os peptídeos sequenciados nos diferentes subtipos.

Peptídeos	Frequência dos peptídeos	Frequência absoluta			
		AIJ Sist.	AIJ Oligo.	AIJ P. FR <sup>+</sup>	AIJ P. FR <sup>-</sup>
SPFWWSD	25/100	6	6	6	7
SPFWWTD	36/100	7	11	7	11
IDTFLYP	2/100	0	1	1	0
PNPFVLD	1/100	0	1	0	0
PGLATNF	1/100	0	1	0	0
LGSVQHT	1/100	0	1	0	0
SPFWWSL	1/100	0	1	0	0
FSPFFWN	1/100	0	1	0	0
WILFFLD	1/100	0	1	0	0
NSPFQLF	1/100	0	1	0	0
QFGPFHS	1/100	0	1	0	0
QSPFHLF	1/100	0	1	0	0
SPFFLTP	1/100	1	0	0	0
SVFFWDL	1/100	1	0	0	0
SPFWWHQ	1/100	1	0	0	0
FDPFGLA	1/100	1	0	0	0
NPGWLGS	1/100	1	0	0	0
SAVIKSS	1/100	1	0	0	0
SSHLLSS	1/100	1	0	0	0
LPSRSQT	1/100	1	0	0	0
NNPFQLW	1/100	1	0	0	0
SSFWWTD	1/100	1	0	0	0
SSWLPRG	1/100	0	0	1	0
FDPFGWS	1/100	0	0	1	0
SPFDWWF	1/100	0	0	1	0
NPFFLTA	1/100	0	0	1	0
SPNPPLH	1/100	0	0	1	0
SSPFFLW	1/100	0	0	1	0
SPFHLLP	1/100	0	0	1	0
NPFSLLA	1/100	0	0	0	1
YFTAPPD	1/100	0	0	0	1
DSPFRLW	1/100	0	0	0	1
TRPTASH	1/100	0	0	0	1
SESPGIA	1/100	0	0	0	1

FSPFFAP	1/100	0	0	0	1
SPFWLAA	1/100	0	0	0	1
SPFFLGP	1/100	0	0	0	1
TPFWFLD	1/100	0	0	0	1
PAPRSRQ	1/100	0	0	0	1
CRFGGLI	1/100	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>23</b>	<b>27</b>	<b>21</b>	<b>29</b>

O programa CLUSTAL W versão 2.0.12 foi utilizado para realizar múltiplos pareamentos com o intuito de identificar uma região conservada ou motivo comum entre os peptídeos selecionados (Tabela 3).

**Tabela 3:** Sequências consenso encontradas através do alinhamento de todos os peptídeos selecionados no *biopanning*.

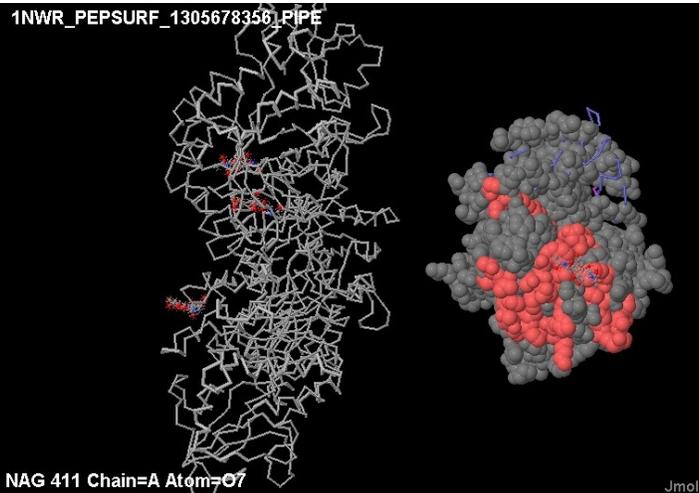
Clones selecionados	Peptídeos alinhados
OA1; SC7; PFR <sup>+</sup> A1; PFR <sup>-</sup> E7	--SPFWWSD
OC1; SF7; PFR <sup>+</sup> G1; PFR <sup>-</sup> C8	--SPFWWTD
OH3	--SPFWWSL
SG12	--SSFWWTD-
SB9	-SPFWWHQ-
PFR <sup>+</sup> F3	-SPFD-WWF
OC4	-FSPFFWN
PFR <sup>-</sup> G11	-TPF—WFLD
PFR <sup>+</sup> A5	SSPFF-LW-
PFR <sup>-</sup> F10	-SPFF-LGP-
PFR <sup>+</sup> F5	-SPFH-LLP
OH6; PFR <sup>+</sup> E1	-IDFLYP-
OE1	--PGLATNF
OA2	-PNPFVLD-
OF3	-LGSVQHT-
OD4	WILFFLD-
OB5	-NSPFQLF-
OC6	QFGPFH-S-
OF6	-QSPFHLF-
SB7; PFR <sup>+</sup> C1; PFR <sup>-</sup> F9	WNPFLD-
SA7	-SPFFLTP-

SE9	-NP-GWLGS
SB11	-SAVIKSS-
SB12	-SSHLLSE-
SD12	-LPSRSQT-
SE12	NNPFQLW--
PFR <sup>+</sup> G2	WSPF--LAP
PFR <sup>+</sup> A2	-SSWL-PRG
PFR <sup>+</sup> E3	FDPFG-WS-
PFR <sup>+</sup> A4	-NPF-LTA
PFR <sup>+</sup> E4	-SPNP-PLH
PFR <sup>-</sup> C7	-NPFS-LLA-
PFR <sup>-</sup> F7	--YFTAPPD-
PFR <sup>-</sup> E8	DSPFR-LW--
PFR <sup>-</sup> B9	--TRPTASH-
PFR <sup>-</sup> E9	-SESPGIA--
PFR <sup>-</sup> G9	FSPFF-A-P-
PFR <sup>-</sup> A10	-SPFW-LAA-
PFR <sup>-</sup> B12	--PAPRSQ-
PFR <sup>-</sup> D12	--RFGGLIA-

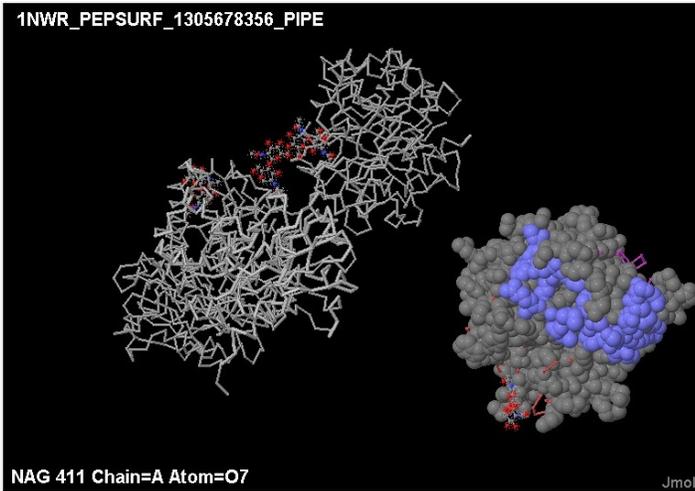
O: Oligoarticular; S: Sistêmica; PFR<sup>+</sup>: Poliarticular Fator Reumatóide Positivo; PFR<sup>-</sup>: Poliarticular Fator Reumatóide Negativo. \*: Regiões consenso mais comum (SPFWW).

Os peptídeos selecionados por *Phage Display* foram submetidos à análises de similaridade com a glicoproteína 39 da cartilagem humana (HC gp-39), principal constituinte da cartilagem e abundante em amostras sinoviais e cartilagens de pacientes portadores de artrite (Tabela 4). Os peptídeos selecionados também foram submetidos a análises de similaridade com o colágeno tipo II citrulinado, uma proteína que sofre uma modificação pós-traducional ao ser citrulinada nas articulações de pacientes com artrites, promovendo a produção de auto-anticorpos (Tabela 5). O programa *Pepitope Server* (<http://pepitope.tau.ac.il/index.html>) foi utilizado para o alinhamento em 3D dos peptídeos com as proteínas, evidenciando suas regiões de similaridades.

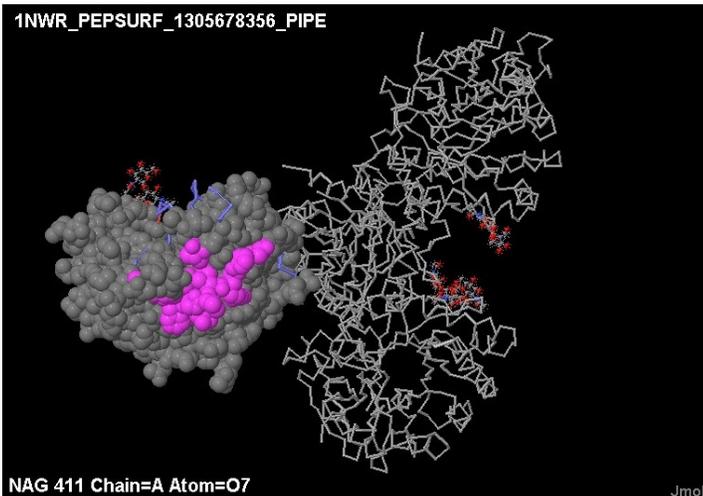
**Tabela 4.** Similaridade entre os peptídeos selecionados no *biopanning* e a proteína HC gp-39 utilizando o programa *Pepitope Server*.

Estrutura em 3D da HC gp-39 mostrando regiões de similaridade com os peptídeos selecionados	Regiões da proteína em 3D	Peptídeo	P-value*
	Região 1 (vermelho)	SPFWWSL	0.0001
		SPFWWSD	0.0003
		SPFWWTD	0.0002
		FSPFFWN	0.0001
		SPFQWLF	0.0001
		SPFWWVD	0.0002
		SPFFLTP	0.001
		SPFWWHQ	0.0004
		SVFFWDL	0.0005
		LPSRSQT	0.0002
		SSWLPRG	0.0006
		NPFFLTA	0.001
		SPFHLLP	0.0003
		SPFQWLF	0.0001
		SPFDWWF	0.0001
		PIRDWTS	0.0004
		SPFWLAA	0.001
		SPFQWLF	0.0001
		TRPTASH	0.0001

Estrutura em 3D da HC gp-39 mostrando regiões de similaridade com os peptídeos selecionados	Regiões da proteína em 3D	Peptídeo	P-value*
---	---------------------------	----------	----------



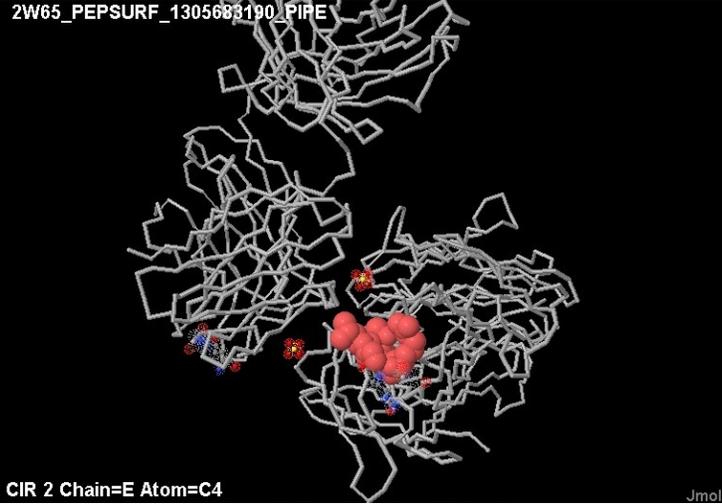
Região 2 (Azul)	PGLATNF	3.5
	FDPFGCL	3.4
	WSPFLAP	0.0003
	FDPFGWS	0.0009
	SESPGIA	0.0001
	PAPSRSQ	0.0001



Região 3 (Rosa)	QFGPFHS	0.0005
	LGSVQHT	0.0001
	RFGGLIA	0.0002

\*Considerado estatisticamente significativo se  $P\text{-value} < 0.01$  (MAYROSE et al., 2006)

**Tabela 5.** Similaridade entre os peptídeos selecionados no *biopanning* e o colágeno tipo II citrulinado

Estrutura em 3D do colágeno tipo II citrulinado mostrando regiões de similaridade com os peptídeos selecionados	Regiões da proteína em 3D	Peptídeo	P-value*
	Região 1 (vermelho)	PGLATNF	0.02
		LGSVQHT	0.05
		SPFFLTP	0.08
		NPGWLGS	0.04
		NPFFLTA	0.06
		RFGGLIA	0.03
		YFTAPPD	0.08

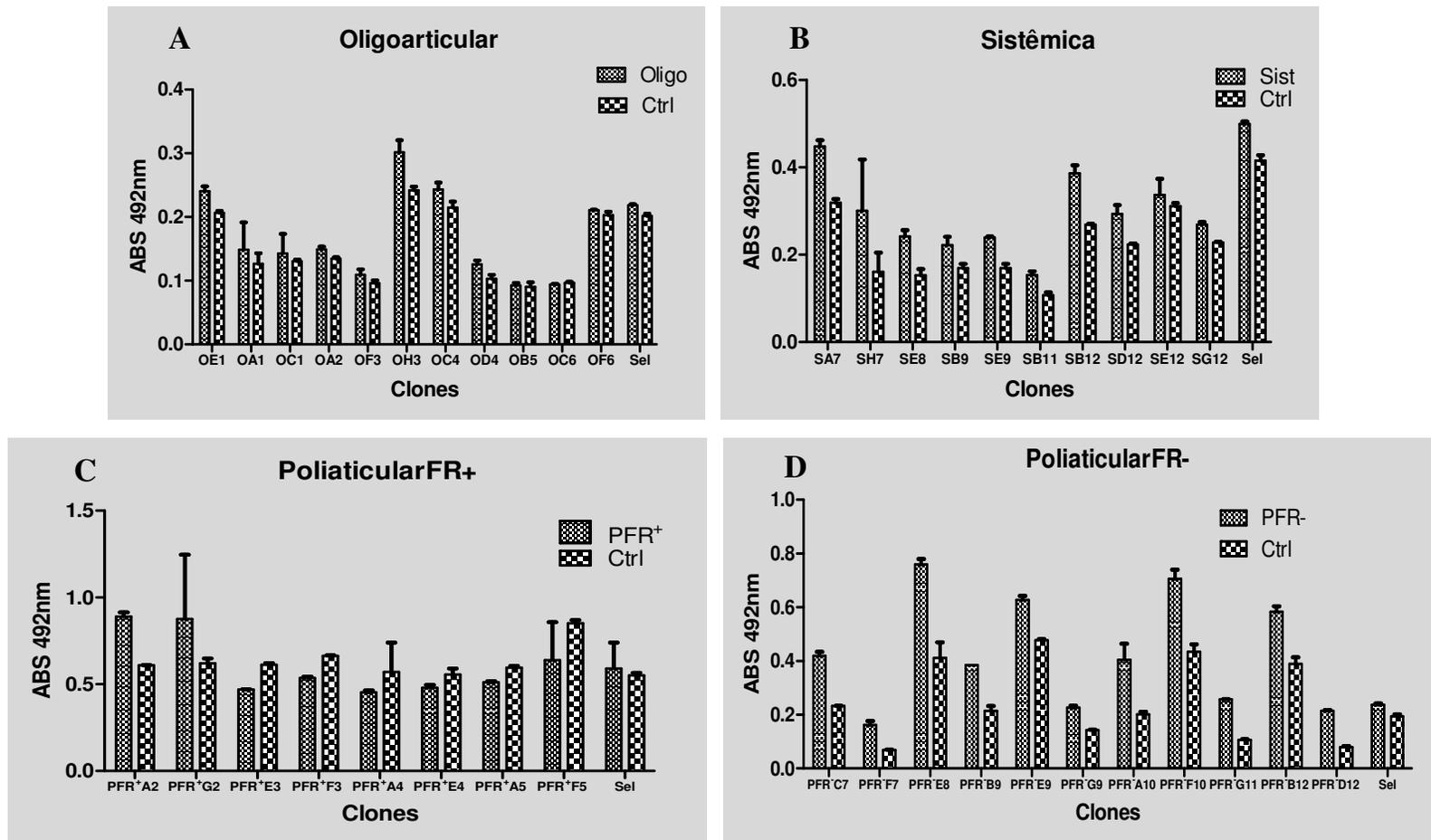
\*Considerado estatisticamente significativo se  $P\text{-value} < 0.01$  (MAYROSE et al., 2006)

A análise da similaridade entre os peptídeos selecionados no *biopanning* e a proteína HC gp-39 utilizando o programa *Pepitope Server* mostrou-se estatisticamente significativa, evidenciado pelo  $P\text{-value}$ , para quase todos o peptídeos que se alinharam com essa proteína. Já a análise da similaridade entre os peptídeos selecionados e o colágeno tipo II citrulinado, apesar de apresentar homologia com um fragmento de 10 aminoácidos da proteína, não obteve um  $P\text{-value}$  considerado estatisticamente significativo. O  $P\text{-value}$  é gerado automaticamente pelo programa *Pepitope Server*, sendo que a homologia entre os peptídeos e a proteína são considerados significativos se  $P\text{-value} < 0.01$ .

## **5 Validação por *Phage*-ELISA dos mimetopos selecionados no *biopanning***

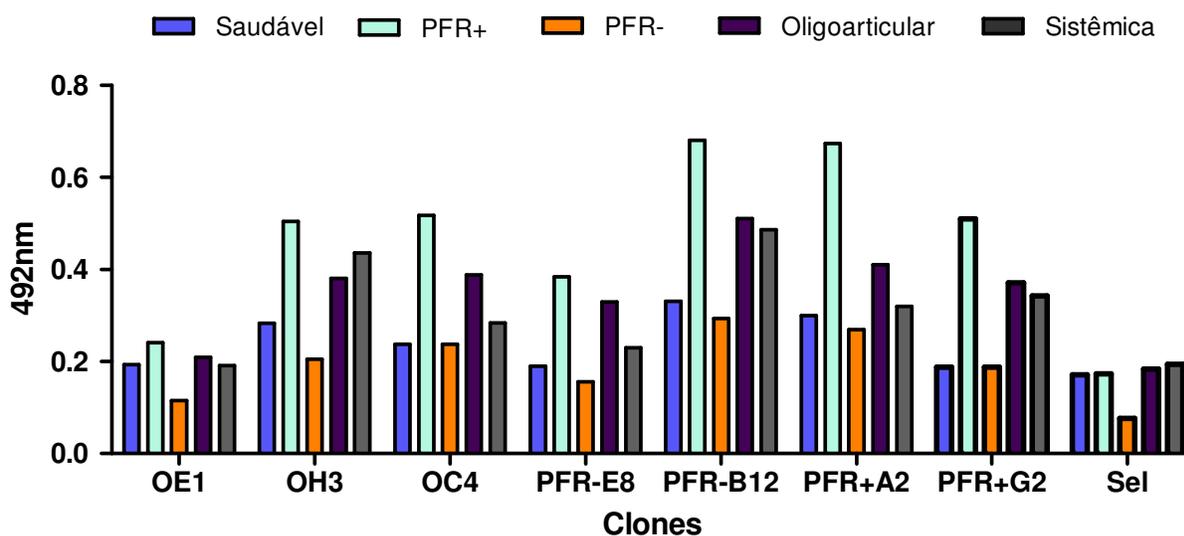
Os fagos eluídos do terceiro ciclo do *biopanning* de cada subtipo de AIJ foram submetidos ao ensaio de *Phage*-ELISA com pool de soro de pacientes portadores de AIJ para verificar a reatividade ao alvo. Utilizou-se o fago selvagem como controle negativo de reação, além de indivíduos aparentemente saudáveis.

A Figura 6 apresenta um painel de pré-validação dos clones obtidos mostrando a reatividade dos anticorpos presentes nos soros dos pacientes contra os clones selecionados nos quatro subtipos de AIJ. Os clones que obtiveram uma absorbância média superior ao controles saudáveis e ao fago selvagem foram selecionados como os prováveis mimetopos relacionados a proteínas expressas em indivíduos doentes.



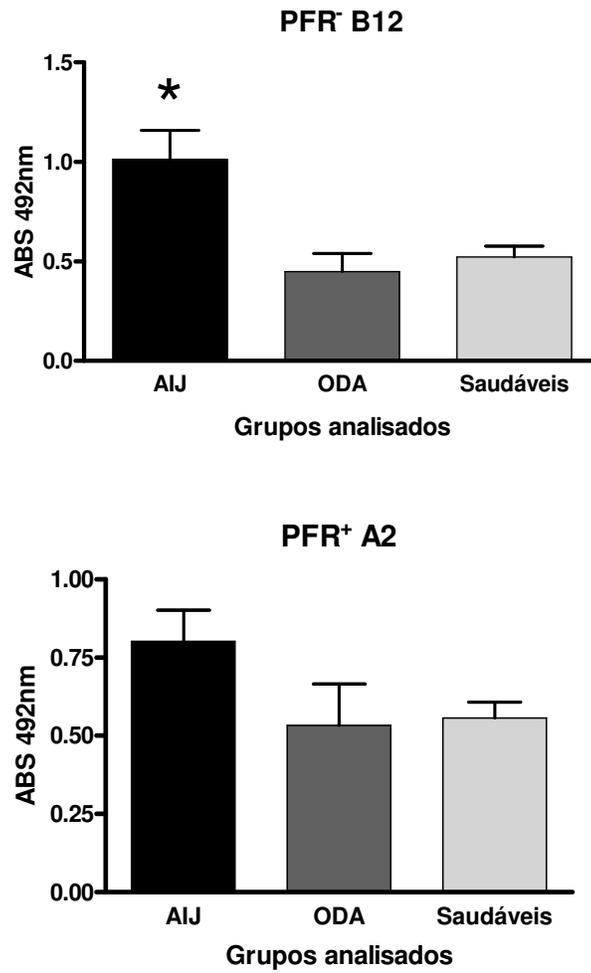
**Figura 6.** Gráfico representativo das leituras a 492nm do ensaio de ELISA mostrando a reatividade dos 40 clones obtidos no *biopanning* reconhecidos por IgG's de pacientes portadores de Artrite Idiopática Juvenil nos quatro diferentes subtipos da doença. Pool de soro de crianças aparentemente saudáveis foram utilizados como controle (Ctrl). Para comparação, o fago selvagem foi submetido as mesmas condições (Sel). No subtipo Oligoarticular, 3 clones selecionados mostraram maior afinidade quando comparado aos indivíduos saudáveis e ao selvagem (A), todos os clones selecionados no subtipo Sistêmica mostraram pouca afinidade quando comparado ao selvagem (B). No subtipo Poliarticular Fator Reumatóide positivo, 3 clones mostram maior afinidade quando comparado ao selvagem (C) e no subtipo Poliarticular Fator Reumatóide positivo, 7 clones mostraram maior afinidade quando comparados ao selvagem (D). O teste ANOVA foi utilizado para a análise estatística, com pós teste de correção de Bonferroni feito pelo *GraphPad Prism* versão 5.0 assumindo significância quando  $P < 0.05$ .

Os clones OE1, OH3, OC4, PFR<sup>-</sup>E8, PFR<sup>-</sup>B12, PFR<sup>+</sup>A2 e PFR<sup>+</sup>G2, por demonstrarem maior diferença e reatividade na absorbância dos pacientes positivos quando comparados aos saudáveis, foram submetidos ao teste *Phage*-ELISA para verificar se os mimetopos apresentam reatividade cruzada entre os quatro tipos de AIJ, além do controle aparentemente saudável. A Figura 7 mostra a comparação da imunorreatividade entre os 7 peptídeos selecionados na pré-validação, através de suas diferenças de absorbância média.



**Figura 7.** *Phage*-ELISA para comparação da imunorreatividade entre os peptídeos selecionados na pré-validação que assumiram significância estatística ( $P < 0.05$ ) de acordo com teste ANOVA. Os peptídeos FR<sup>-</sup>B12 e FR<sup>+</sup>A2 mostram maior reatividade quando comparados com os outros peptídeos.

Para avaliar o comportamento dos clones mais reativos realizou-se o *Phage*-ELISA (Figura 8). Neste experimento testou-se os clones PFR<sup>-</sup>B12 e PFR<sup>+</sup>A2 contra os soros de 34 pacientes com AIJ, 10 pacientes com outras doenças auto-imunes e 20 indivíduos saudáveis. Dos 34 pacientes com AIJ, 17 eram da forma oligoarticular, 9 sistêmica e 8 poliarticular.



**Figura 8.** *Phage*-ELISA com os dois peptídeos mais reativos. O clone PFR<sup>-</sup>B12 apresentou reatividade significativa ( $p < 0.05$ ) para os soros de pacientes portadores de AIJ quando comparado com os soros de pacientes portadores de outras doenças autoimune (ODA) e indivíduos saudáveis (A), já o clone PFR<sup>+</sup>A2 não conseguiu diferenciar os diferentes grupos (B).

## Discussão

O diagnóstico da AIJ é baseado em um conjunto de exames que incluem radiografias, exames laboratoriais e uma análise cuidadosa da história clínica do paciente. Sinais clínicos importantes, como doença sistêmica que precede a infecção, duração da febre e rash ajudam a diferenciar a AIJ de outras doenças auto-imunes (WEISS & ILOWITE, 2005). Não há ainda, exames laboratoriais considerados específicos para a definição diagnóstica da AIJ. Os testes laboratoriais bioquímicos e marcadores sorológicos disponíveis são úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial, classificar o subgrupo da doença, avaliar a extensão da inflamação, determinar o prognóstico e a resposta à terapia (CASSIDY E PETTY, 2001; OLIVIERA, S. K., 2001).

A seleção dos peptídeos obtidos neste trabalho foi realizada contra IgGs purificadas através de *beads* magnéticos. A escolha dos *beads* proteína-G como plataforma para a purificação das imunoglobulinas foi devido à correta orientação, que a proteína-G favorece ao anticorpo potencializando o seu uso (HÄRMÄ et al, 2000), da baixa ligação inespecífica e contaminação das micropartículas (WHITEAKER et al, 2007), além da diminuição do impedimento estérico entre o anticorpo e o antígeno (KIM et al, 2009), quando se compara às seleções feitas em placas de poliestireno. Outras técnicas têm sido utilizadas para separação de proteínas, porém as técnicas de purificação por afinidade, aplicado a substratos magnéticos têm se tornado cada vez mais usados em vários trabalhos, por ser uma metodologia rápida e eficaz na obtenção de IgGs de boa qualidade utilizando-se pequena quantidade de amostra (SARAFIK; SAFARIKOVA, 2004). A metodologia adotada para a captura de IgGs se mostrou eficiente uma vez que houve alta absorvância apresentada pelo reconhecimento do anti-IgG aos anticorpos acoplados aos *beads*, comparado ao controle. Além disso, a baixa absorvância do controle mostra a eficiência do bloqueio, garantindo uma boa seleção de mimetopos.

A seleção de peptídeos foi realizada contra IgGs provenientes de soro de crianças portadoras de AIJ nos quatro subtipos da doença. Afim de reduzir a possibilidade de ligação inespecífica, foi feito primeiramente uma seleção subtrativa com IgGs de indivíduos aparentemente saudáveis. Os fagos que não se ligaram foram transferidos para tubos contendo IgGs de pacientes com outras doenças auto-imunes que não AIJ, e

por fim, os fagos remanescentes que não se ligaram às IgGs anteriores foram incubados com IgGs dos pacientes com AIJ. Esta estratégia de seleção foi escolhida com o propósito de diminuir a ligação inespecífica e assim aumentar a seleção de peptídeos ligantes a IgGs associadas aos quatro tipos da doença. Vários trabalhos tem utilizado esse tipo de seleção com o objetivo de remover a reação cruzada com antígenos de clones comum em *Phage Display* em várias áreas de pesquisa. Este tipo de seleção já foi utilizada com sucesso por Min Wang et. al. 2010, para a seleção de peptídeos miméticos a partir de IgGs purificadas do soro de pacientes portadores de Espondilite Anquilosante, uma doença inflamatória crônica que acomete preferencialmente o esqueleto axial. Esta estratégia também já foi utilizada em pesquisas envolvendo neurônios de rato (HOU et al, 2004), de carcinoma hepatocelular metastática (JIA, 2006) e de câncer de próstata (MINTZ et al, 2003). Cientistas têm sido incentivados a aplicar a tecnologia de *Phage display* no estudo de doenças auto-imunes, pois a seleção de bibliotecas de fagos contra anticorpos confirmou ser uma técnica muito bem sucedida para a seleção e identificação de epítomos miméticos, os quais podem contribuir para a elucidação das bases moleculares do reconhecimento biológico, podendo ser úteis para diagnóstico e prognóstico (JADALI, SANATI, 2008).

Durante os três ciclos de seleção de peptídeos, foi observado um enriquecimento do número de fagos, já que os clones, que apresentam maior imuno-afinidade, ficaram retidos aos anticorpos para subsequente eluição e amplificação para o ciclo seguinte, enquanto que os fagos com baixa ou sem afinidade aos anticorpos foram removidos durante as lavagens. A fim de reduzir ao máximo a possibilidade de ocorrência de ligações inespecíficas, a estringência (*Tween-20*) das lavagens foi ampliada durante os três ciclos, variando de 0,1 a 0,5%. Ligações inespecíficas podem ser favorecidas devido ao excesso de fagos, os quais podem interagir com os anticorpos adsorvidos aos *beads*, o que pode induzir a interação de clones com baixa afinidade, que eventualmente não foram removidos. O enriquecimento de fagos pode ser claramente observado ao final do terceiro ciclo, o que comprova a eficiência da estratégia utilizada na seleção.

Uma abordagem alternativa para a identificação de ligantes e alvos em potencial através de programas de bioinformática é a busca de sequências consenso entre os clones selecionados. O alinhamento entre os 40 peptídeos selecionados foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W versão 2.0.12 que permitiu a visualização de uma região consenso (**SPFWW**) entre alguns peptídeos, mas não em todos, no entanto,

muitos aminoácidos comuns entre os peptídeos podem ser observados. O consenso compartilha similaridade de seqüência com a glicoproteína 39 da cartilagem humana (HC gp-39), principal constituinte da cartilagem e abundante em amostras sinoviais e cartilagens de pacientes portadores de artrite. Apesar de vários clones apresentarem um motivo comum, os dois clones mais reativos no teste ELISA não compartilham da região consenso. Isso pode ter ocorrido como consequência da utilização de pool de amostras de soro de pacientes soropositivos para a AIJ que durante o processo de seleção de fagos pode ter havido uma maior prevalência de anticorpos com maior afinidade pelos clones que compartilham o motivo comum ou pode ainda ter ocorrido uma maior amplificação desses clones durante os ciclos do *Biopanning*, tornando-o, assim, mais frequente no sequenciamento.

O mapeamento do epítipo de um anticorpo e seu antígeno correspondente é fundamental para a compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular, além de fornecer uma base sólida e racional para o desenvolvimento de medicamentos e vacinas (IRVING et al., 2001). A semelhança de um peptídeo selecionado e uma região linear de seu antígeno é geralmente um indicativo da localização do epítipo genuíno. Entretanto, epítipos conformacionais são, muitas vezes, compostos de uma série de segmentos descontínuos do antígeno que se dobram para se unir. Assim, peptídeos selecionados por afinidade podem ter semelhanças apenas com fragmentos não lineares do antígeno. Portanto, métodos avançados de computação se tornam extremamente importantes para sugerir prováveis epítipos dos peptídeos selecionados. Sendo assim, análises da similaridade estrutural do complexo antígeno-anticorpo em 3D é a maneira mais precisa de determinar um epítipo (MAYROSE et al., 2007). Com base nisso, o programa *pipetope server* se torna uma ferramenta muito importante na compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular.

O alinhamento tridimensional da HC gp-39 da cartilagem humana (HC gp-39) utilizando o programa *pepipote server* revelou similaridades com a grande maioria dos peptídeos selecionados no *biopanning*. Nas arites em geral, a cartilagem articular é destruída por uma inflamação crônica que é caracterizada pela ativação de linfócitos e expressão de genes do complexo MHC de classe II nas células do tecido sinovial (HARRIS, 1990). Embora a natureza dos antígenos responsáveis pela patogênese das arites seja desconhecida, há evidências de que moléculas HLA-DR estejam envolvidas na patogênese da doença (WINCHESTER, 1994). A hipótese de que a cartilagem é

susceptível de sustentar a resposta inflamatória sugeriu um papel para as proteínas da cartilagem como alvos de auto-antígenos (LASKIN, 1990; VERHEIJDEN, 1997). A glicoproteína 39 da cartilagem humana é o principal constituinte da cartilagem humana e é abundante em amostras sinoviais e cartilagens de pacientes com artrite reumatóide (VAN BILSEN et al., 2004) podendo apresentar uma função na remodelação tecidual, incluindo cartilagem articular (ŽIVANOVIĆ et al., 2009). Tem sido demonstrado que a HC gp-39 é eficientemente processada e apresentada no contexto de moléculas do MHC classe II por células dendríticas e macrófagos. O RNAm da glicoproteína da cartilagem humana é expresso em cartilagens de pacientes com AR, porém não é detectado em cartilagem humana normal (ŽIVANOVIĆ et al., 2009).

O alinhamento tridimensional do colágeno tipo II citrulinado utilizando o programa *pepipote server* revelou similaridades com 8 peptídeos selecionados no *biopanning*. Apesar de razoavelmente bem explorados em pacientes adultos, a frequência dos auto-anticorpos na AIJ ainda não está bem estudada. Recentes estudos sobre a prevalência de anticorpos contra peptídeos citrulinados nos pacientes com AIJ têm demonstrado que eles podem ser observados em pacientes com doença de início poliarticular FR<sup>+</sup> (VAN ROSSUM et al., 2003; MOORE et al., 2001). Os anticorpos anti-CCP têm sido considerados um importante marcador sorológico para o diagnóstico da artrites reumatóides, bem como um possível marcador prognóstico para a progressão desfavorável da doença (SCHELLEKENS et al., 2000; GAALLEN et al 2004). Os 8 peptídeos que mostraram homologia com o colágeno tipo II citrulinado, apesar de mostrarem similaridade com um fragmento de 10 aminoácidos dessa proteína, não foram considerados como tendo um alinhamento estatisticamente significativo.

Pelos testes de ELISA foi possível identificar a sensibilidade da seleção, visto que a maioria dos clones se ligou positivamente ao soro de pacientes portadores dos quatro subtipos de AIJ, enquanto que a maioria dos fagos não se ligou aos soros dos pacientes controles. Nenhum clone do subtipo AIJ sistêmica conseguiu reatividade maior que o selvagem, isso, provavelmente, foi devido a problemas de reação ou de lavagem, o que poderia ser corrigido com uma melhor padronização do teste para esse subtipo da doença. O clone PFR<sup>-</sup>B12 apresentou uma reatividade estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) com os soros de pacientes portadores dos quatro subtipos de AIJ quando comparado com os soros de outras doenças auto-imunes e indivíduos saudáveis. Então, o clone PFR<sup>-</sup>B12, selecionado através de IgGs purificadas de *pool* de soro de pacientes

portadores de AIJ Poliarticular Fator Reumatóide negativo, a partir de uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos demonstra alta reatividade com soro de pacientes portadores dos quatro subtipos da doença, demonstrando ser um candidato a biomarcador específico para diagnosticar a AIJ a partir do soro.

O presente trabalho apresentou a seleção de peptídeos recombinantes através da técnica de *Phage Display* contra imunoglobulinas obtidas através do soro de pacientes portadores dos quatro subtipos de Artrite Idiopática Juvenil com potencial para serem utilizados como biomarcadores séricos em imunodiagnóstico.

## Conclusões

- A estratégia adotada no processo de seleção de peptídeos por *Phage display* se mostrou eficiente, apresentando peptídeos imunorreativos contra os anticorpos circulantes em pacientes portadores dos quatro subtipos de AIJ.
- Análises de bioinformática mostraram similaridade entre proteínas altamente expressas em pacientes portadores de Artrite Idiopática Juvenil e a maioria dos peptídeos obtidos no *biopanning*.
- A partir do ensaio ELISA foi detectada imunorreatividade expressiva entre o clone PFRB12 clone selecionado e amostras de soro de pacientes portadores dos quatro subtipos de AIJ, pré-validando um provável biomarcador com potencial para o diagnóstico sorológico da doença, embora ainda seja necessário muitos estudos nesse sentido.
- Os resultados obtidos neste trabalho são promissores no que se refere ao uso de clones de fagos para a identificação de anticorpos no diagnóstico da Artrite Idiopática Juvenil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZZAY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. *Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry*, v.35, n. 6, p.425-445, 2002.

BARBAS, C. F. III; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

CASSIDY, J. T.; PETTY, R. E., Juvenile rheumatoid arthritis. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. *Textbook of Pediatric Rheumatology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co.* p.214-221, 2001.

FRENCH, A. R.; MASON, T.; NELSON, A. M.; O'FALLON, W. M.; GABRIEL, S. E. Increased mortality in adults with a history of juvenile rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis & Rheumatism*, v.44, p.523-7, 2000.

GNANASEKAR, M.; ANANDHARAMAN, V.; ANAND, S.B.; NUTNAN, T. B.; RAMASWAMY, K. A novel small heat shock protein 12.6 (HSP 12.6) from *Brugia malayi* functions as a human IL-10 receptor binding protein. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.159, p.98-103, 2005.

GOYNET, M.; CHINESTRA, P.; LAJOIE-MAZENC, I.; MEDALE-GIAMARCHI, C.; FAVRE, G.; FAYE, J. C. Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnology*, v.8, p.34-47, 2008.

HÄRMÄ, H.; TARKKINEN, P.; SOUKKA, T.; LÖVGREN, T.; Miniature Single-Particle Immunoassay for Prostate-specific Antigen in Serum Using Recombinant Fab Fragments. *Clinical Chemistry*. Washington. v. 46. n. 1. p. 1755-1761. Nov. 2000.

HOU, T. S.; DOVE, M.; ANDERSON, J. Z.; ZHANG, J.; MACKENZIE, C. Identification of polypeptides with selective affinity to intact mouse cerebellar granule neurons from a random peptide-presenting *phage* library. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 138, n.1-2, p.39-44, 2004.

JADALI, Z.; SANATI, M.H. The autoimmune diseases manifested by production of autoantibodies: The autoantigens identified by random peptide library. *Iranian Journal of allergy, asthma and immunology*, v.7, n.3, p.115-131, 2008.

JIA, W. D.; SUN, H. C.; ZHANG, J. B.; XU, Y.; QIAN, Y. B.; PANG, Y. B.; WANG, L.; QIN, L. X.; LIU, Y. K. N.; TANG, Z. Y. A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. *Cancer Letters*, v. 247, n. 2, p.234-242, 2006.

KIM, H. J.; AHN, K. C.; TECHERA, A. G.; SAPIENZA, G. G. G.; GEE, S. J.; HAMMOCKA, B. D. Magnetic *beads*-based *phage* anti-immunocomplex assay (PHAIA) for the detection of the urinary biomarker 3-phenoxybenzoic acid to assess human exposure to pyrethroid insecticides. *Analytical Biochemistry*. San Diego. v. 386. n. 1. p. 45-52. Mar. 2009.

MACHADO, C.; RUPERTO, N. Consensus in Pediatric Rheumatology Part I - Criteria Definition of Inactive Disease and Remission in Juvenile Idiopathic Arthritis / Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.45, p.9-13, 2005.

MINTZ, P.J.; KIM, J.; DO, K.A.; WANG, X.; ZINNER, R.G.; CRISTOFANILLI, M.; ARAP, M.A.; HONG, W.K. TRONCOSO, P.; LOGOTHETIS, C.J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nature Biotechnology*, v. 21, n.1, p. 57-63, 2003.

OEN, K.; MALLESON, P. N.; CABRAL, D. A.; ROSENBERG, A. M.; PETTY, R. E.; CHEANG, M. Disease course and outcome of Juvenile Rheumatoid Arthritis in a multicenter cohort. *The Journal of Rheumatology*, v.29, p.1989-99, 2002.

OHKUBO, S.; MIYADERA, K.; SUGIMOTO, Y.; MATSUO, K.; WIERZBA, K.; YAMADA, Y. Substrate *phage* as a tool to identify Novel substrate sequences of proteases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screen*, v.4, n.7, p.573-83, 2001.

OLIVEIRA, S. K., Artrite idiopática juvenil. In: Oliveira SK, Azevedo EC, editors. *Reumatologia Pediátrica*, 1ª ed. Rio de Janeiro: REVINTER; p.143-208, 2001.

PETTY, R. E.; SOUTHWOOD, T. R.; MANNERS, P.; BAUM, J.; GLASS, D. N.; GOLDENBERG, J.; HE, X.; MALDONADO-COCCO, J.; OROZCO-ALCALA, J.; PRIEUR, A. M.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E.; WOO, P. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision. *The Journal of Rheumatology*, v.31, p.390-2, 2004.

SAFARIK, L.; SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, v.2, p.7, 2004.

WALLACE, C. A.; LEVINSON, J. E. Juvenile rheumatoid arthritis: outcome and treatment for the 1990s. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v.17, p.891-905, 1991.

WANG, M.; LI, X.; CHEN, J.; ZHOU, Y.; CAO, H.; WU, X.; JIANG, H. Screening and evaluating the mimic peptides as a useful serum biomarker of ankylosing spondylitis using a phage display technique. *Rheumatology Internacional*, v.31, p.1009-1016, 2010.

WILLATS, W. G. *Phage display*: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, v.50, n.6, p.837-54, 2002.

WHITEAKER, J. R.; ZHAO, L.; ZHANG, H. Y.; FENG, L.; PIENING, B. D.; ANDERSON, L.; PAULOVICH, A. G. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic *beads* for mass-spectrometry-based quantification of serum bioMarkers. *Analytical Biochemistry*. San Diego. v. 362. n. 1. p. 44–54. Mar. 2007.

ŽIVANOVIĆ, S. et al. Human cartilage glycoprotein 39 – biomarker of joint damage in knee osteoarthritis. *International Orthopaedics*. Miami, v. 33, p.1165-1170, março, 2009.

# ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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 J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131  
e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL N°. 685/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO  
CEP/UFU 262/09

Projeto de Pesquisa: Isolamento e identificação de mimetopos de autoantígenos para utilização  
em imunodiagnóstico da artrite idiopática juvenil.

Pesquisador Responsável: Carlos Ueira Vieira

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

Data de entrega do relatório final: dezembro de 2010.

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

Uberlândia, 27 de novembro de 2009.

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

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da  
pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma  
cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo  
somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu  
parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a  
superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo  
(Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave  
ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância  
Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta,  
identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II  
apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o  
parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega  
de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista.