

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE
EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DA ESOFAGITE
EOSINOFÍLICA**

ANDRÉIA SANTOS NARCISO

UBERLÂNDIA

2018

ANDRÉIA SANTOS NARCISO

**PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE
EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DA ESOFAGITE
EOSINOFÍLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-orientador: Dr^a. Ana Paula Carneiro dos Santos

UBERLÂNDIA

2018

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

N222p
2018 Narciso, Andréia Santos, 1989
 Peptídeo ligante da proteína neurotoxina derivada de eosinófilo e
 suas aplicações no diagnóstico da esofagite eosinofílica / Andréia Santos
 Narciso. - 2018.
 62 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Coorientadora: Ana Paula Carneiro dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.710>

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Esofagite eosinofílica - Teses. 3.
Esôfago - Doenças - Teses. 4. Peptídeos - Teses. I. Goulart Filho, Luiz
Ricardo. II. Santos, Ana Paula Carneiro dos. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andréia Santos Narciso

PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

Presidente da banca: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Prof^a. Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia / UFU

Titular: Prof^a. Dr^a. Fabiana de Almeida Araújo Santos

Instituição: Universidade Presidente Antônio Carlos / UNIPAC

*Dedico este trabalho
ao Brasil.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart agradeço o amparo ao longo de toda a pesquisa, a confiança depositada no meu trabalho e principalmente por contribuir de maneira decisiva em minha capacitação para o exercício da carreira científica. À minha coorientadora Dra. Ana Paula Carneiro, pela paciência cotidiana nos ensinamentos e por ser uma profissional exemplar. Ao meu grande amigo de trabalho e de vida Tafarel Andrade, pelo companherismo e pela cumplicidade ao longo da pesquisa. À Dra. Cristina Palmer e demais médicas e profissionais envolvidos com a pesquisa, agradeço o suporte, a parceria e as importantes trocas de experiências que tivemos todo esse tempo. Aos meus pais amados Luiz Alberto e Fernanda pelo suporte e pela dedicação à minha educação e formação. Aos meus irmãos Luiz Fernando e Lucas, por serem parte importante de mim. Ao Fábio Balori, meu companheiro, por ser meu exemplo e por sempre me lembrar quem eu sou. A minha querida tia Lígia Maria, agradeço o cuidado e a atenção que sempre me deu. Aos professores e professoras que tive ao longo da vida, em especial o Prof. David Frances e o Prof. José Wilson, por fazerem parte da minha formação e por exercerem essa brilhante e tão admirada profissão. Aos amigos da vida e aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia meu muito obrigada pelo pouco e pelo muito. À Lilica e a Encrenca pela alegria que me trazem e pela festa que fazem ao me receberem!

*“O sonho é que leva a gente para frente.
Se a gente for seguir a razão, fica aquietado, acomodado”.*

Ariano Suassuna

RESUMO

Introdução: A esofagite eosinofílica (EEo) é uma doença crônica, alérgica e inflamatória caracterizada clinicamente por disfunção esofágica e fibrose, e histologicamente pelo aumento do número de infiltrado eosinofílico no epitélio do esôfago. Seus principais sintomas são disfagia e dor no peito e o principal desafio da ciência hoje é a definição de um diagnóstico seguro para a doença. Com isso, esclarecimento dessa questão conduz os esforços científicos para níveis moleculares com o intuito de obter marcadores de diagnóstico e prognóstico para a doença, que são inexistentes até o momento. **Objetivo:** Selecionar peptídeos através da técnica molecular de *Phage display* que possam ser utilizados como biomarcadores da EEo. **Material e métodos:** Num primeiro momento, foram realizadas análises proteômica comparativa usando cromatografia líquida - espectrometria de massa em biópsias esofágicas de pacientes pediátricos com EEo, doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e grupo controle. Em seguida, a tecnologia *Phage Display* foi utilizada para selecionar peptídeos ligantes à proteína identificada como uma das mais reguladas em pacientes com EEo. A reatividade dos fagos selecionados foi avaliada por *phage*-ELISA usando uma proteína recombinante humana comercial. Além disso, as sequências peptídicas foram determinadas por sequenciamento de DNA e a ligação dos peptídeos ao seu alvo proteico foi analisada por ferramentas de predição *in silico*. **Resultados:** Os resultados da espectrometria de massa mostraram que a proteína neurotoxina derivada de eosinófilos (NDE), uma proteína do grânulo de eosinófilo que é depositada em tecidos doentes, foi altamente regulada em pacientes com EEo. Através de ensaios de *phage*-ELISA, dois peptídeos altamente reativos à ligação com a NDE (D3 e C5) apresentaram reatividade similar e até maior quando comparados com anticorpos policlonais comerciais para NDE. **Conclusão:** O estudo demonstrou que os peptídeos selecionados por *Phage-display*, detectaram a proteína recombinante NDE e, por isso, eles podem ser uma importante ferramenta de diagnóstico para a detecção de pacientes com EEo.

Palavras-chave: Esofagite eosinofílica. Diagnóstico. *Phage display*. Proteína Neurotoxina Derivada de Eosinófilos.

ABSTRACT

Introduction: Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic, allergic and inflammatory disease characterized clinically by esophageal dysfunction and fibrosis, and histologically by an increase in the number of eosinophilic infiltrates in the esophagus epithelium. Its main symptoms are dysphagia and chest pain and the main challenge of science today is the definition of a safe diagnosis for the disease. Thus, clarification of these questions lead the scientific efforts to molecular levels with the aim of obtaining diagnostic markers and prognosis for the disease, which are not yet available. **Objectives:** To select peptides through the molecular technique of Phage-display that can be used as EoE biomarkers. **Material and methods:** Firstly, comparative proteomic analyzes were performed using liquid chromatography - mass spectrometry in oesophageal biopsies of pediatric patients with EoE, gastroesophageal reflux disease (GERD) and control group. Next, the Phage-Display technology was used to select peptides against the protein identified as one of the most regulated in patients with EoE. The reactivity of the selected phage was assessed by phage-ELISA using a commercial recombinant human protein. In addition, the peptide sequences were determined by DNA sequencing and binding of the peptides to their protein target was analyzed by in silico prediction tools. **Results:** Mass spectrometry results showed that the eosinophil-derived neurotoxin protein (EDN), an eosinophil granule protein that is deposited in diseased tissues, was highly regulated in patients with EoE. Through phage-ELISA assays, two peptides highly reactive to EDN binding (D3 and C5) showed similar and even greater reactivity when compared with commercial polyclonal antibodies to EDN. **Conclusion:** The study demonstrated that the peptides selected by Phage-display detected the EDN recombinant protein and, therefore, they can be an important diagnostic tool for the detection of patients with EoE.

Keywords: Eosinophilic esophagitis. Diagnosis. Phage-display. Eosinophil-derived Neurotoxin protein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina do soro bovino
CGA	Campo de grande aumento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágica
EEo	Esofagite eosinofílica
Eos	Eosinófilos
ER	<i>Escherichia coli</i>
IBP	Inibidor de bomba de prótons
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
LB	Meio Luria-Bertani
NDE	Neurotoxina derivada de eosinófilo
PBP	Proteína básica principal
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCE	Proteína catiônica eosinofílica
PE	Peroxidase eosinofílica
PEG	Polietilenoglicol
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
TGF β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	Célula auxiliar T
TSLP	Linfopoiética estromal tímica
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
	2.1 Definição e sintomas da EEO	13
	2.2 Epidemiologia da EEO	13
	2.3 Diagnóstico da EEO	13
	2.3.1 Sinais Endoscópicos	14
	2.3.2 Sinais histológicos	14
	2.3.3 Uso de IBP e exame de pHmetria	15
	2.4 Importantes fatores da EEO	15
	2.4.1 Dieta e aeroalérgenos	15
	2.4.2 Microbioma	16
	2.5 Tratamento da EEO	17
	2.6 Imunologia da EEO	18
	2.6.1 Eosinófilos	19
	2.6.2 Proteína Neurotoxina Derivada de Eosinófilos	20
	2.7 Phage display	21
3	OBJETIVOS	22
	3.1 Objetivo Geral	22
	3.2 Objetivos Específicos	22
	REFERÊNCIAS	23
	APÊNDICE	28

1. INTRODUÇÃO

Em 1978 o termo esofagite eosinofílica (EEo) foi registrado pela primeira vez em banco de dados científico. O estudo relatou a condição de um paciente adulto que apresentava acalasia e a presença de infiltração eosinofílica na mucosa esofágica (LANDRES et al., 1978). No entanto, foi considerada uma entidade clínica apenas em 1981, quando pesquisadores, através de manifestações radiológicas, relataram o caso de um paciente que apresentava intensa disfagia (PICUS; FRANK, 1981).

Considerada por muito tempo uma condição rara, a EEo é hoje uma doença alérgica que vem aumentando sua incidência e prevalência assim como outras alergias como asma, rinite alérgica, dermatite atópica e alergias alimentares (LIACOURAS et al., 2014). Um recente estudo sistemático de meta-análise mostrou a incidência de EEo na América do Norte e Europa, estimada em uma taxa de 3,7 / 100.000 pessoas por ano. Tal estudo afirma ainda que a prevalência populacional da EEo possui ampla diferença entre demais estudos de coorte, possivelmente devido a variações no diagnóstico da doença (ARIAS et al., 2016).

Embora a EEo venha apresentando crescente incidência e prevalência ao longo dos anos, a doença é ainda considerada nova, pois os dados que se tem à longo prazo são poucos e o diagnóstico da doenças ainda apresenta muitas falhas. Um dos desafios enfrentados pela pesquisa é a similaridade fenotípica da EEo com a doença do refluxo gastroesofágica (DRGE) (PATEL; HIRANO, 2018) pois, ambas as desordens possuem sintomas semelhantes, presença de eosinofilia esofágica (NGO et al., 2006; KIA; HIRANO, 2015).

A relação diagnóstica da EEo com a DRGE sempre foi foco de discussão pela similaridade clínica, endoscópica e histológica nas manifestações das duas doenças. A presença de evidências da DRGE, antes considerada fator excludente do diagnóstico de EEo, hoje não é mais apoiada (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2011). Cheng et al. (2014) apresentam argumentos que demonstram que as duas patologias podem coexistir e que esta interação parece envolver mecanismos complexos que merecem ser mais detalhadamente estudados.

Os métodos diagnósticos e de acompanhamento dos pacientes com EEO aplicados até o momento, apresentam falhas na identificação e no manejo dos grupos clínicos que possuem evolução fenotípica variada. Logo, o esclarecimento dessas questões conduzem os esforços científicos para níveis moleculares com o intuito de obter marcadores de diagnóstico e prognóstico para a doença, que são inexistentes até o momento.

Além disso, atualmente os gastos financeiros com o diagnóstico da EEO apresentam elevados custos devido a necessidade de pelo menos duas endoscopias digestivas, seguidas de análises histológicas das biópsias e intervenção terapêutica medicamentosa com inibidor de bomba de prótons (IBP), indispensáveis para a confirmação da EEO (LIACOURAS et al., 2011). De acordo com Jensen et al. (2015), os Estados Unidos possui um custo estimado de 1,4 bilhão de dólares por ano com cuidados de saúde de pacientes EEO. Além de dispendioso financeiramente, o processo de classificação baseada no tratamento com IBP apresenta falhas por não considerar a subjetividade metabólica da droga nos diferentes pacientes. Alguns deles podem ser medicados e não apresentarem qualquer efeito clínico, levando a possibilidade de erro na classificação dos mesmos.

As novas técnicas moleculares e a busca por marcadores universais para a EEO além de, futuramente, poderem minimizar os custos financeiros, podem também contribuir para que o diagnóstico da doença utilize-se cada vez menos de intervenções invasivas para o paciente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Definição e sintomas da EEO

A EEO é uma doença inflamatória crônica identificada pelo aumento do número de infiltrados eosinofílicos na mucosa esofágica (condição também conhecida por eosinofilia esofágica) e intensa hiperplasia no epitélio escamoso do esôfago. Os sintomas típicos da EEO são disfagia, dor no peito e impactação alimentar, resultantes dos sinais clínicos de disfunção e fibrose esofágica (LIACOURAS et al., 2011; PAPADOPOULOU et al., 2014; MUIR et al., 2015; WARNERS et al., 2017).

2.2. Epidemiologia da EEO

Encontrada tanto em crianças quanto em adultos, a EEO afeta significativamente mais indivíduos do sexo masculino que feminino (masculino/feminino, 3:1) (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2014). O típico paciente com EEO apresenta a doença logo na infância ou durante a terceira ou quarta década de vida (LIACOURAS et al., 2011), e a prevalência da doença tende a aumentar com a idade no período entre os 35-39 anos. (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2014). A EEO apresenta incidência maior em populações de países ocidentais (PRASAD et al., 2009; VAN RHIJN et al., 2013) com predomínio ainda não esclarecido em indivíduos de cor branca e não hispânicos (LIACOURAS et al., 2011).

2.3. Diagnóstico da EEO

Existem vários critérios que são indispensáveis para o diagnóstico da EEO, dentre eles estão os sintomas, os sinais clínicos, os sinais endoscópicos e as alterações histológicas dos pacientes. Outro importante critério de diagnóstico é a exclusão de qualquer outra causa de eosinofilia esofágica em particular as gastroesofágicas (PATEL; HIRANO, 2018).

2.3.1. Sinais Endoscópicos

Os sinais endoscópicos observados em mucosas esofágicas de pacientes com EEO podem apresentar importantes e variadas alterações. Dentre elas é possível observar anéis fixos (traquealização), anéis transitórios (fenilização), exudato brancocentro, estrias longitudinais, edema mucoso, estreitamento esofágico e lacerações esofágicas ocasionadas pela passagem do endoscópio (demonstrando haver debilidade na mucosa, que quando intensa confere ao esôfago a aparência de papel crepon) (LIACOURAS et al., 2011). Essas mesmas alterações também podem ser encontradas em outras patologias esofágicas, e por isso não podem ser consideradas determinantes para o diagnóstico da EEO. De acordo com Muller et al. (2007), alguns pacientes podem não apresentar qualquer tipo de alterações esofágicas ao exame endoscópico.

2.3.2. Sinais histológicos

Histologicamente a EEO é determinada por eosinofilia esofágica com presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento (eos / CGA). Além disso, pelo menos uma avaliação das mucosas do estômago e do duodeno deve ser realizada para afastar a doença eosinofílica gastro-duodenal que caracteriza uma entidade distinta da EEO (LIACOURAS et al., 2011).

Atualmente existem claras limitações nas avaliações de lâminas histológicas de biópsias esofágicas. Dentre elas ressalta-se que as alterações inflamatórias características da EEO podem não ser encontradas em todas as amostras de um mesmo paciente por tratar-se de uma distribuição não uniforme de infiltrados eosinofílicos. Outros fatores limitantes são a diferença de padronização do tamanho do CGA e a identificação da localização exata do infiltrado eosinofílico intraepitelial (LIACOURAS et al., 2011).

2.3.3. Uso de Inibidor de Bomba de Prótons e exame de pHmetria

A DRGE apresenta características sintomáticas e presença de eosinofilia esofágicas assim como a EEO, por isso, outro critério de diagnóstico da EEO é a inexistência de sinais sugestivos da DRGE pela ausência de resposta ao tratamento em altas dosagens de medicação inibidora de bomba de prótons (IBP) e também a normalidade nos exames de pHmetria esofágica no terço distal do esôfago (FURUTA et al., 2007).

No entanto, observa-se que a resposta ao uso de IBP não se relaciona ao resultado do exame de pHmetria esofágica. Indivíduos que responderam ao tratamento com IBP podem apresentar pHmetria negativa, sem evidências de DRGE ácida, dando origem a uma nova classe de pacientes denominada “Eosinofilia esofágica responsiva a IBP” (LIACOURAS et al., 2011).

Mesmo os pacientes com fenótipo de DRGE (azia dominante, esofagite erosiva, teste de pH anormal) é recomendado o teste de IBP antes de se concluir o diagnóstico, já que eles também podem apresentar presença de eosinofilia esofágica (LIACOURAS et al., 2011). Dada a alta prevalência populacional da DRGE, a sobreposição entre as doenças DRGE e EEO também pode ser considerada (PATEL; HIRANO, 2018).

2.4. Importantes fatores no estudo da EEO

2.4.1. Dieta e aeroalérgenos

A patogênese da EEO ainda é desconhecida pela comunidade científica, mas alguns autores sugerem que reações imunológicas de hipersensibilidade aos alimentos e à aeroalérgenos podem ter uma papel fundamental neste âmbito (SUGNANAM et al., 2007; CHEHADE; SAMPSON, 2008).

Uma pesquisa na Filadélfia mostrou que de 941 pacientes pediátricos diagnosticados com EEO, 319 indicaram, através de testes cutâneos, que a doença estava envolvida com o consumo de leite, ovo, trigo e soja. No mesmo estudo, a restrição de alimentos, previamente detectados como positivos em

testes de alergia, mostrou que 53% das avaliações histológicas das biópsias de esôfago dos pacientes tiveram redução do número de eos/CGA, e 77% nos pacientes que acrescentaram a restrição do leite na dieta (SPERGEL et al., 2012). Outro estudo também mostrou que nozes, soja, grãos e ovo, podem desempenhar um papel ativo na patogênese da EEO (HE et al., 2018).

Uma dieta de eliminação de leite e soja combinada com tratamento medicamentoso obteve bons resultados sintomáticos no tratamento de pacientes com EEO, mas não houve melhoria significativa nos resultados histológicos, sugerindo a necessidade de novos estudos prospectivos (REED et al., 2018).

Já em relação aos aeroalérgenos, embora as evidências ainda sejam muito limitadas, existem estudos em humanos e em modelos experimentais que sugerem que aeroalérgenos, tais como pólenes e fungos podem induzir a eosinofilia esofágica (MISHRA et al., 2001; WANG et al., 2007) e, conseqüentemente, levar a impactação alimentar. Por isso, a necessidade de novos estudos que considerem as estações do ano, pois ainda não há trabalhos científicos que comprovem se há um padrão sazonal estabelecido que influencie na exacerbação da eosinofilia esofágica (PAPADOPOULOU et al., 2014).

2.4.2. Microbioma

Diversos achados sustentam que a EEO apresenta causas multifatoriais que incluem histórico familiar, componentes genéticos (CIANFERONI; SPERGEL, 2016) e fatores ambientais principalmente aqueles relacionados à exposição nas fases iniciais da vida e que possivelmente afetarão o microbioma do esôfago (ALEXANDER et al., 2014; DELLON, 2016).

Secreções de mucosa esofágica foram coletadas de crianças e adultos para avaliar, através de PCR quantitativa, possíveis diferenças de carga bacteriana entre os grupos de pacientes com EEO, DRGE e normais. O estudo comprovou que as doenças associadas à eosinofilia esofágica apresentaram microbioma diferente do encontrado na mucosa normal, e que a microbiota pode contribuir para a

inflamação esofágica nos dois distúrbios (HARRIS et al., 2015). Além disso, Dellon et al. (2011) afirmam que a infecção por *Helicobacter pylori* parece estar associada a EEO.

A disbiose, ou desregulação microbiana, também foi associada ao aumento dos riscos de EEO (TSABOURI et al., 2014), seja ela relacionada ao nascimento por cesariana ou a ingestão de antibióticos e uso de alimentação por fórmulas na infância (JENSEN et al., 2013).

2.5. Tratamento da EEO

Conforme já mencionado, a restrição de alguns grupos de alimentos é considerada eficaz no tratamento de alguns pacientes com EEO (REED et al., 2018), mas ainda não foi completamente adotada devido ou a má aceitação do paciente e também porque as respostas ao tratamento foram limitadas em alguns casos (MOLINA-INFANTE et al., 2012; PAQUET et al., 2013).

Para aliviar os sintomas de impactação alimentar e a disfagia, a dilatação esofágica melhora o diâmetro luminal do esôfago e conseqüentemente facilita a passagem do alimento (PATEL; HIRANO, 2018). Recentemente um estudo de meta-análise relatou melhora sintomática de mais de 95% dos 845 pacientes submetidos à dilatação esofágica. Além disso, menos de 1% dos pacientes apresentaram complicações e hemorragias oriundas da dilatação. Assim, o estudo confirma a eficácia e a segurança da terapia por dilatação (MOAWAD et al., 2017). No entanto, o ideal é concentrar as buscas científicas em formas que interrompam a evolução das características fibroestenóticas reduzindo assim a necessidade das dilatações esofágicas (PATEL; HIRANO, 2018).

Os esteróides também são considerados muito eficazes no tratamento da inflamação esofágica eosinofílica, mas quando usado por um longo período de tempo e, uma vez interrompido seu uso, a infecção volta nos mesmos níveis de antes da terapia. Um estudo relatou que após quatro semanas de tratamento medicamentoso com esteroide por via oral em pacientes com EEO, a maior parte deles se tornaram clinicamente assintomáticos e diminuíram consideravelmente a infiltração eosinofílica após o tratamento. Após a interrupção da terapia, a maioria dos pacientes apresentaram recidiva e até piora nos sintomas e os eosinófilos

voltaram para os mesmos níveis de antes do tratamento (LIACOURAS et al., 2005). A EEO por ser considerada uma desordem crônica, os esteroides orais acabam não sendo eficientes no manejo diário da doença e, por isso, o seu uso passa a ser indicado apenas em casos de disfagia grave, perda de peso e hospitalização do paciente (CIANFERONI; SPERGEL, 2016).

Os corticosteróides inalados (ou tópicos) apresentam similar eficiência aos de esteróides de uso oral, mas atualmente vêm sendo muito usados, tendo em vista seu efeito direto na mucosa esofágica e conseqüentemente menor potencial de efeitos colaterais sistêmicos (PATEL; HIRANO, 2018).

2.6. Imunologia da EEO

Dellon (2013) descreve a atuação de mastócitos, fibroblastos, células epiteliais e linfócitos na determinação do processo inflamatório coadjuvante a ação clássica dos eosinófilos. Em particular, os eosinófilos induzem a remodelagem esofágica via ativação TGF- β resultando em fibrose subepitelial, transição epitélio-mesenquimal, disfunção do músculo liso e aumento da proliferação epitelial esofágica. Os mastócitos estão aumentados na EEO quando comparados a grupos controle e com DRGE, por provável resposta Th2 via ação da IL-9. Em alguns casos o número de mastócitos está mais elevado que o número de eosinófilos. Os fibroblastos também apresentam papel decisivo na deposição de colágeno e nas cicatrizes esofágicas responsáveis por muitas das manifestações clínicas. As células epiteliais são unidas por junções fortes, junções adesivas e desmossomas que contém proteínas como claudina-1 e -4, E-cadherin e desmogleina. Na EEO observa-se quebras nesses mecanismos de junção. A expressão da filagrina também apresenta-se reduzida na EEO. Estes defeitos alteram a função de barreira do epitélio permitindo a penetração de antígenos sensibilizadores.

A ação dos linfócitos está representada pela resposta Th2 a estímulos provenientes de alérgenos alimentares e aeroalérgenos. A IL-13 e IL-5 produzidas pelos linfócitos estimulam o epitélio esofágico a produzir eotaxina-3, uma potente citocina que recruta e ativa eosinófilos. Outro fator relacionado é o TSLP (*thymic stromal*

lymphopoietin) que representa uma citocina importante (IL-7 like) na deflagração da resposta alérgica. As moléculas co-estimuladoras de células T também parecem estar envolvidas neste processo (ZHANG et al., 2013).

2.6.1. Eosinófilos

Os eosinófilos são leucócitos do tipo granulócitos, produzidos na medula óssea. Em um adulto normal, os leucócitos representam em cerca de 7000 células por microlitro de sangue (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015) e desse total, cerca de 1-3% são granulócitos do tipo eosinófilos, que apresentam um tempo de vida na circulação de 8 à 12 horas e de 8 à 12 dias nos tecidos sem presença de estímulos (UHM et al., 2012).

Eles estão envolvidos na defesa do organismo contra infecções parasitárias helmínticas, nos infiltrados inflamatórios de resposta imune de fase tardia e ainda podem ser responsáveis por reações imunológicas desreguladas associadas a doenças alérgicas, tais como asma, dermatite atópica, EEO e demais síndromes hipereosinofílicas. Os eosinófilos também podem apresentar um papel importante e construtivo na manutenção da homeostase, quando envolvidos na defesa do organismo através da regulação imunológica, no reparo e na remodelação tecidual (JACOBSEN et al., 2012; FULKERSON; ROTHENBERG, 2013).

Os eosinófilos e as proteínas presentes nos seus grânulos, além de possuírem uma participação de resistência contra parasitas, especialmente helmintos, também apresentam atividades antimicrobianas contra bactérias, vírus e protozoários e são mediadores de doenças de hipersensibilidade (ACHARYA; ACKERMAN, 2014).

Várias pesquisas com enfoque em diferentes doenças alérgicas descrevem que os eosinófilos, quando estimulados, são recrutados da circulação para os tecidos e agem como mediadores pró-inflamatórios e moduladores da resposta imune adaptativa de fase tardia. Conforme já mencionado, o recrutamento e a ativação dos eosinófilos no local da inflamação é oriundo de citocinas produzidas pelas células Th2, em destaque a IL-5 e eotaxinas (LACY e MOQBEL, 2001; KITA, 2011; ZHANG et al., 2013).

Em condições alérgicas, os níveis de eosinófilos na corrente sanguínea e nos tecidos são muito elevados (MALM-ERJEFALT et al., 2005). Na asma, rinites alérgicas, dermatites atópicas e EEO, as técnicas histológicas mostram que, nos tecidos, os eosinófilos sofrem uma grande degranulação (AHLSTROM-EMANUELSSON et al., 2004). Esses grânulos apresentam em sua composição proteínas citotóxicas específicas de eosinófilos e também uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas imunorreguladoras (LACY; MOQBEL, 2001; UHM et al., 2012; MAZZEO et al., 2015).

Os grânulos dos eosinófilos são compostos basicamente por quatro proteínas: Proteína Básica Principal (PBP), Peroxidase Eosinofílica (PE), Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE) e Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (NDE) (HOGAN et al., 2008; FULKERSON; ROTHENBERG, 2013; ACHARYA; ACKERMAN, 2014).

2.6.2. Proteína Neurotoxina Derivada de Eosinófilos

A NDE é uma proteína pertencente à superfamília das ribonucleases, por essa razão, ela é também chamada de ribonuclease 2 (RNase 2). Está localizada na matriz do grânulo do eosinófilo e apresenta propriedades antivirais e quimiotáticas, além de induzir a migração e maturação de células dendríticas (YANG et al., 2008; YANG et al., 2017).

A ação enzimática ribonucleolítica da NDE irá depender do seu substrato de ligação, e essa é a condição precursora para suas atividades citotóxicas, neurotóxicas e antivirais. Contra helmintos, observa-se que a NDE apresenta uma toxicidade limitada, já contra vírus de cadeia simples, sua ação tóxica é considerada eficiente (ACHARYA; ACKERMAN, 2014).

Quando envolvida com a ativação e maturação das células dendríticas, a NDE contribui para expressão de diversas quimiocinas inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento e receptores solúveis, bem como na sinalização e no aumento da resposta imune da via Th2 (YANG et al., 2008).

Um estudo mostrou que a deposição extracelular de NDE em biópsias de esôfago de pacientes com EEO é significativamente maior quando comparada com a participação da PBP dos grânulos de eosinófilos (PETERSON et al., 2015). Ensaios de imunofluorescência revelaram que a NDE é detectada na infiltração e degranulação de eosinófilos em tecidos, e portanto pode servir como biomarcador para EEO (KEPHART et al., 2010). Um outro estudo, com o intuito de avaliar os biomarcadores presentes no soro de pacientes com EEO, identificou que os níveis médios de PCE e a NDE foram significativamente mais elevados em pacientes com EEO, quando comparados com pacientes controles (indivíduos que apresentaram os achados endoscópicos e histológicos nomais) (MIN et al., 2017).

2.7. Phage Display

Na busca por biomarcadores o Phage display é uma técnica utilizada para selecionar peptídeos ou proteínas que se ligam a moléculas alvo através da participação de bacteriófagos (SMITH, 1985). Essa seleção é baseada na relação direta entre o genótipo viral e o seu fenótipo. Assim, uma biblioteca de moléculas (peptídeos ou proteínas) que é expressa na superfície do bacteriófago (fago) fica exposta, permitindo que ocorram ligações de afinidade com moléculas alvo (anticorpo, enzima, receptores de superfície, etc.). Esse processo de identificação de ligantes específicos de um alvo é chamado de biopanning (GARGIR et al., 2002; JACOBSSON et al., 2003; ZHANG et al., 2005; PANDE et al., 2010). Quando selecionados, esses ligantes podem ser submetidos a outras técnicas laboratoriais para caracterização e validação.

3 OBJETIVO

3.3.1. Objetivo geral

Buscar marcadores moleculares que possam ser utilizados para auxiliarem no diagnóstico e no prognóstico da EEO.

3.3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar através da técnica molecular de *Phage display* peptídeos ligantes à proteína NDE;
- comparar a reatividade dos peptídeos selecionados com o anticorpo policlonal comercial, diante da proteína em questão;
- realizar análise *in silico* que demonstre as regiões de ligação entre os peptídeos selecionados e a proteína alvo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406-15. Jun. 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.546218>
- AHLSTROM-EMANUELSSON, C. A. et al. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. **European Respiratory Society**, v. 24, n. 5, p. 750-7. Nov. 2004. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00133603>
- ALEXANDER, E. S. et al. Twin and family studies reveal strong environmental and weaker genetic cues explaining heritability of eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 5, p. 1084-1092 e1. Nov. 2014.
- ARIAS, A. et al. Systematic review with meta-analysis: the incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 3-15. Jan. 2016. <https://doi.org/10.1111/apt.13441>
- CHEHADE, M.; SAMPSON, H. A. Epidemiology and etiology of eosinophilic esophagitis. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 18, n. 1, p. 33-44; viii. Jan. 2008.
- CHENG, E. et al. Eosinophilic esophagitis: interactions with gastroesophageal reflux disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 243-56. Jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2014.02.004>
- CIANFERONI, A.; SPERGEL, J. Eosinophilic Esophagitis: A Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 50, n. 2, p. 159-74. Apr. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8501-z>
- DELLON, E. S. The Esophageal Microbiome in Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterology**, v. 151, n. 2, p. 364-5. Aug. 2016. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.026>
- DELLON, E. S. et al. Tryptase staining of mast cells may differentiate eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 2, p. 264-71. Feb. 2011. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.412>
- DELLON, E. S. et al. Prevalence of eosinophilic esophagitis in the United States. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 4, p. 589-96 e1. Apr. 2014.
- FULKERSON, P. C.; ROTHENBERG, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 2, p. 117-29. Feb. 2013 <https://doi.org/10.1038/nrd3838>

FURUTA, G. T. et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1342-63. Oct. 2007. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.017>

GARGIR, A. et al. Single chain antibodies specific for fatty acids derived from a semi-synthetic phage display library. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1569, n. 1-3, p. 167-73. Jan. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00245-8)

HARRIS, J. K. et al. Esophageal microbiome in eosinophilic esophagitis. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0128346. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128346>

HE, Y. T. et al. Airborne and food sensitization patterns in children and adults with eosinophilic esophagitis. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v., n., p. Jan. 2018.

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-50. May. 2008.

JACOBSEN, E. A. et al. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. **Blood**, v. 120, n. 19, p. 3882-90. Nov. 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-330845>

JACOBSSON, K. et al. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. **Biological Procedures Online**, v. 5, n., p. 123-135. 2003.

JENSEN, E. T. et al. Early life exposures as risk factors for pediatric eosinophilic esophagitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 67-71. Jul. 2013. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318290d15a>

JENSEN, E. T. et al. Health-care utilization, costs, and the burden of disease related to eosinophilic esophagitis in the United States. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 5, p. 626-32. May. 2015.

KEPHART, G. M. et al. Marked deposition of eosinophil-derived neurotoxin in adult patients with eosinophilic esophagitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 2, p. 298-307. Feb. 2010. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.584>

KIA, L.; HIRANO, I. Distinguishing GERD from eosinophilic oesophagitis: concepts and controversies. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 7, p. 379-386. Jul. 2015. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.75>

KITA, H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. **Immunological Reviews**, v. 242, n. 1, p. 161-77. Jul. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01026.x>

LACY, P.; MOQBEL, R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 1, n. 1, p. 79-84. Feb. 2001. <https://doi.org/10.1097/00130832-200102000-0001>

LANDRES, R. T. et al. Eosinophilic esophagitis in a patient with vigorous achalasia. **Gastroenterology**, v. 74, n. 6, p. 1298-1301. Jun. 1978.

LIACOURAS, C. A. et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 3-20 e6; quiz 21-2. Jul. 2011.

LIACOURAS, C. A. et al. Eosinophilic esophagitis: clinical presentation in children. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 219-29. Jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2014.02.012>

LIACOURAS, C. A. et al. Eosinophilic esophagitis: a 10-year experience in 381 children. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 12, p. 1198-206. Dec. 2005. [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(05\)00885-2](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(05)00885-2)

MALM-ERJEFALT, M. et al. Circulating eosinophils in asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis lack morphological signs of degranulation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 35, n. 10, p. 1334-40. Oct. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02335.x>

MAZZEO, C. et al. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1603- 13. Jun. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.026>

MIN, S. B. et al. Longitudinal Evaluation of Noninvasive Biomarkers for Eosinophilic Esophagitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 51, n. 2, p. 127-135. Feb. 2017. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000621>

MISHRA, A. et al. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 83-90. Jan. 2001. <https://doi.org/10.1172/JCI10224>

MOAWAD, F. J. et al. Systematic review with meta-analysis: endoscopic dilation is highly effective and safe in children and adults with eosinophilic oesophagitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, n. 2, p. 96-105. Jul. 2017. <https://doi.org/10.1111/apt.14123>

MOLINA-INFANTE, J. et al. Selective elimination diet based on skin testing has suboptimal efficacy for adult eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 5, p. 1200-2. Nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.027>

MUIR, A. B. et al. Esophageal epithelial cells acquire functional characteristics of activated myofibroblasts after undergoing an epithelial to mesenchymal transition. **Experimental Cell Research**, v. 330, n. 1, p. 102-10. Jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.026>

MULLER, S. et al. Analysis of symptoms and endoscopic findings in 117 patients with histological diagnoses of eosinophilic esophagitis. **Endoscopy**, v. 39, n. 4, p. 339-44. Abr. 2007. <https://doi.org/10.1055/s-2007-966216>

NGO, P. et al. Eosinophils in the esophagus--peptic or allergic eosinophilic esophagitis? Case series of three patients with esophageal eosinophilia. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 7, p. 1666-70. Jul. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00562.x>

PANDE, J. et al. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 849-58. Nov/Dec. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>

PAPADOPOULOU, A. et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis in childhood. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 107-18. Jan. 2014. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182a80be1>

PAQUET, B. et al. Variable yield of allergy patch testing in children with eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 613. Feb. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.053>

PATEL, R. V.; HIRANO, I. New Developments in the Diagnosis, Therapy, and Monitoring of Eosinophilic Esophagitis. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, v., n., p. Jan. 2018.

PETERSON, K. A. et al. Extracellular Eosinophil Granule Protein Deposition in Ringed Esophagus with Sparse Eosinophils. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 9, p. 2646-53. Sep. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3665-1>

PICUS, D.; FRANK, P. H. Eosinophilic esophagitis. **American Journal of Roentgenology**, v. 136, n. 5, p. 1001-3. May 1981. <https://doi.org/10.2214/ajr.136.5.1001>

PRASAD, G. A. et al. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 10, p. 1055-61. Oct. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.06.023>

REED, C. C. et al. Combined and Alternating Topical Steroids and Food Elimination Diet for the Treatment of Eosinophilic Esophagitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v., n., p. Jan. 2018.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7. Jun. 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SPERGEL, J. M. et al. Identification of causative foods in children with eosinophilic esophagitis treated with an elimination diet. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 2, p. 461-7 e5. Aug. 2012.

SUGNANAM, K. K. et al. Dichotomy of food and inhalant allergen sensitization in eosinophilic esophagitis. **Allergy**, v. 62, n. 11, p. 1257-60. Nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2013.03.010>

TSABOURI, S. et al. Modulation of gut microbiota downregulates the development of food allergy in infancy. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 42, n. 1, p. 69-77. Jan/Feb. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2013.03.010>

UHM, T. G. et al. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 4, n. 2, p. 68-79. Mar. 2012. <https://doi.org/10.4168/aaair.2012.4.2.68>

VAN RHIJN, B. D. et al. Rapidly increasing incidence of eosinophilic esophagitis in a large cohort. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 1, p. 47-52 e5. Jan. 2013.

WANG, F. Y. et al. Is there a seasonal variation in the incidence or intensity of allergic eosinophilic esophagitis in newly diagnosed children? **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 41, n. 5, p. 451-3. May/Jun. 2007. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000248019.16139.67>

WARNERS, M. J. et al. Systematic Review: Disease Activity Indices in Eosinophilic Esophagitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 11, p. 1658-1669. Nov. 2017. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.363>

YANG, D. et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 79-90. Jan. 2008. <https://doi.org/10.1084/jem.20062027>

YANG, Q. F. et al. Eosinophilic biomarkers for detection of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease with or without pulmonary embolism. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 4, p. 3198-3206. Oct. 2017. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4876>

ZHANG, Y. et al. Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 11, p. 1275-81. Jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.11.020>

ZHANG, Z. et al. T cell co-stimulatory molecules: a co-conspirator in the pathogenesis of eosinophilic esophagitis? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 6, p. 1497-506. Jun. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2599-8>

APÊNDICE - COPIA D A P AT ENTE

09/02/2018 870180011660
16:16

29409161711204470

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 002842 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25648387000118

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121 - Campus Santa Mônica - Reitoria

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-902

País: Brasil

Telefone: (34)3239 4977

Fax:

Email: propriedade@intelecto.ufu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/02/2018 às 16:16, Petição 870180011660

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: FAPEMIG - FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21949888000183

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. José Cândido da Silveira 1500, Bairro Horto

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES

Resumo: A presente invenção refere-se à seleção de peptídeos ligantes da proteína recombinante humana Neurotoxina Derivada de Eosinófilo (NDE), utilizando a técnica de Phage Display. A eficiência dos peptídeos selecionados foi comparada com o anticorpo comercial policlonal Anti-NDE em ensaios de Phage-ELISA. Tais ensaios comprovaram que os peptídeos ligantes da NDE apresentaram sensibilidade e eficiência semelhantes quando comparado com o anticorpo comercial. Os peptídeos demonstram serem bons biomarcadores, sendo úteis no diagnóstico e nas técnicas de imunoterapia de doenças alérgicas e inflamatórias. A interação entre os epítomos da proteína com os peptídeos selecionados também foram mapeados e identificados por bioinformática.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/02/2018 às 16:16, Petição 870180011660

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5**Nome:** LUIZ RICARDO GOULART FILHO**CPF:** 44214570600**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Santa Catarina, 850, apto. 303, bairro Brasil**Cidade:** Uberlândia**Estado:** MG**CEP:** 38400-652**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 2 de 5****Nome:** ANDRÉIA SANTOS NARCISO**CPF:** 05950575601**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Mestrando**Endereço:** Rua Machado de Assis 1580, apto. 20, bairro Saraiva**Cidade:** Uberlândia**Estado:** MG**CEP:** 38408-378**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 3 de 5****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/02/2018 às 16:16, Petição 870180011660

Nome: ANA PAULA CARNEIRO DOS SANTOS

CPF: 07680690685

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Itumbiara, 1124, apt. 201, bairro Nossa Senhora Aparecida

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-617

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 5

Nome: TAFAREL ANDRADE DE SOUZA

CPF: 08569934688

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Bateia, 420

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 5

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 09/02/2018 às 16:16, Petição 870180011660

Nome: CRISTINA PALMER BARROS

CPF: 98716670604

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Geraldo Abrão, 611, Alameda Mediterrâneo, 65, Jardim Inconfidência

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38411-229

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU.pdf
Procuração	Procuração UFU .pdf
Declaração negativa	Declaração negativa de patrimônio genético patente .pdf
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Desenho	FIGURAS.pdf
Resumo	RESUMO.pdf

Sequências Biológicas

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Patent In .txt

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/02/2018 às 16:16, Petição 870180011660

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 09/02/2018 às 16:16, Petição 870180011660

SIAFI2017-DOCUMENTO-CONSULTA-CONLF (CONSULTA LISTA DE FATURA)

19/12/17 09:24

USUARIO : MANUELA

UG/GESTAO EMITENTE: 154043 / 15260 - FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLAND

NUMERO LF: 000387

FEC. NUMERO OB:

TIPO DE LISTA: EXTRA

BANCO : 001 BANCO DO BRASIL SEQ.: 000003

CODIGO DE BARRA: 00190.00009 02940.916170 11204.470170 1'73920000007000

BENEFICIARIO: 42521088000137 INSTITUTO NAC. DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

PAGADOR.....: 25648387000118

DATA DE VENCIMENTO: 02JAN2018

(=) VALOR DOCUMENTO: 70,00

(-) VALOR DESCONTO/ABATIMENTOS:

(-) OUTRAS DEDUCOES

(+) MORA/MULTA

(+) OUTROS ACRESCIMOS

(=) VALOR COBRADO: 70,00

PF1=AJUDA PF3=SAI PF12=RETORNA

BANCO DO BRASIL		001-9	00190.00009 02940.916170 11204.470170 1 73920000007000			Recibo do Pagador
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço						
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLANDIA CPF/CNPJ: 25648387000118						
AV JOAO NAVES DE AVILA 2121 CAMPUS SANTA MONICA REITORIA, UBERLANDIA -MG CEP:38400902						
Sacador/Avalista						
Nosso-Número	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(=) Valor Pago		
29409161711204470	29409161711204470	02/01/2018	70,00			
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço						
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37						
PRACA MAUA 7 - 14 ANDAR - SALA 1415 , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20081240						
Agência/Código do Beneficiário			Autenticação Mecânica			
2234-9 / 333028-1						

BANCO DO BRASIL		001-9	00190.00009 02940.916170 11204.470170 1 73920000007000			
Local de Pagamento						Data de Vencimento
PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO						02/01/2018
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ						Agência/Código do Beneficiário
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37						2234-9 / 333028-1
Data do Documento	Nr. Documento	Espécie DOC	Aceite	Data do Processamento	Nosso-Número	
04/12/2017	29409161711204470	DS	N	04/12/2017	29409161711204470	
Uso do Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	xValor	(=) Valor do Documento	
29409161711204470	17	R\$			70,00	
Informações de Responsabilidade do Beneficiário						(-) Desconto/Abatimento
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.						
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.						
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n						(+) Juros/Multa
o campo Número de Referência na emissão do pagamento.						
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de						
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT						(-) Valor Cobrado
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço						Código de Baixa
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLANDIA CPF/CNPJ: 25648387000118						
AV JOAO NAVES DE AVILA 2121 CAMPUS SANTA MONICA REITORIA,						
UBERLANDIA-MG CEP:38400902						
Sacador/Avalista						Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação



PROCURAÇÃO

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG, pessoa jurídica de direito público, com sede na Av. José Cândido da Silveira, n. 1500, Bairro Horto, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, inscrita no CNPJ sob o n. 21.949.888/0001-83, neste ato representada pelo seu Presidente, Evaldo Ferreira Vilela, brasileiro, MASP 116.3148-8 confere poderes especiais à **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU**, inscrita no CNPJ sob o n. 25.648.387/0001-18, na pessoa de seu representante legal ou procurador devidamente constituído, para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, no processo de proteção intelectual, intitulado “**PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES**”, conforme Deliberação 72/2013 da FAPEMIG, podendo efetuar o seguinte procedimento e seus desdobramentos: depósito de patente, conforme os atos previstos em lei, agindo em conjunto ou separadamente, para o bom e fiel cumprimento do presente mandato.

Belo Horizonte, ___ de _____ de _____.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Evaldo", is written over a vertical blue line that extends from the signature down to the stamp below.

Evaldo Ferreira Vilela

FAPEMIG
Prof. Evaldo Ferreira Vilela
PRESIDENTE
Masp 1163148-8
FAPEMIG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA – IBTEC
LABORATÓRIO DE NANOBIOLOGIA



DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que os peptídeos gerados no trabalho intitulado “**PEPTÍDEO LIGANTE DA NEUROTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES**” foram oriundos de bibliotecas de *Phage display* recombinantes. Portanto, não houve acesso ao Patrimônio Genético.

Estou à disposição para esclarecimentos adicionais pelo telefone fixo (34-3225-8440), celular (34-99192-6961) ou ainda pelo e-mail lrgoulart@ufu.br.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Instituto de Biotecnologia
Universidade Federal de Uberlândia

Av. Amazonas s/n , Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 248, CEP 38400-902 Uberlândia – MG.

**“PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE
EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES”**

[01]. Campo da invenção

[02]. A presente invenção refere-se à seleção de peptídeos ligantes da proteína recombinante humana Neurotoxina Derivada de Eosinófilo (NDE), utilizando a técnica de *Phage Display*. A eficiência dos peptídeos selecionados foi comparada com o anticorpo comercial policlonal Anti-NDE em ensaios de *Phage-ELISA*. Tais ensaios comprovaram que os peptídeos ligantes da NDE apresentaram sensibilidade e eficiência semelhantes quando comparado com o anticorpo comercial. Os peptídeos demonstram serem bons biomarcadores, sendo úteis no diagnóstico e nas técnicas de imunoterapia de doenças alérgicas e inflamatórias. A interação entre os epítomos da proteína com os peptídeos selecionados também foram mapeados e identificados por bioinformática.

[03]. Estado da técnica

[04]. Os eosinófilos são células efetoras do sistema imunológico que são caracterizadas pela presença de grânulos em seu conteúdo citoplasmático. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, **Elsevier**, 8. ed., 2015). Eles estão envolvidos na defesa do organismo contra infecções parasitárias helmínticas, nos infiltrados inflamatórios de resposta imune de fase tardia e ainda podem ser responsáveis por reações imunológicas desreguladas associadas a doenças alérgicas, tais como asma, dermatite atópica, esofagite eosinofílica e demais síndromes hipereosinofílicas.

[05]. Diversos estudos relatam que os eosinófilos também podem apresentar um papel importante e construtivo na manutenção da homeostase, quando envolvidos na defesa do organismo através da regulação imunológica, no reparo e na remodelação tecidual (FURUTA et al, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.130, p.607–612, 2012; JACOBSEN; HELMERS et al, **Blood**, v.120, p. 3882-3890, 2012; FULKERSON; ROTHENBERG, **Nature Reviews**

Drug Discovery, v.12, p.117-129, 2013). Os eosinófilos e as proteínas presentes nos seus grânulos, além de possuírem uma participação de resistência contra parasitas, especialmente helmintos, também apresentam atividades antimicrobianas contra bactérias, vírus e protozoários e são mediadores de doenças de hipersensibilidade (ACHARYA; ACKERMAN, **The Journal of biological chemistry**, v. 289, p. 17406-15, 2014).

[06]. Os eosinófilos são leucócitos do tipo granulócitos, produzidos na medula óssea. Em um adulto normal, os leucócitos representam em cerca de 7000 células por microlitro de sangue (GUYTON & HALL, **Elsevier**, 12.ed., 2011) e desse total, cerca de 1-3% são granulócitos de tipo eosinófilos, que apresentam um tempo de vida na circulação de 8 à 12 horas e de 8 à 12 dias nos tecidos sem presença de estímulos (UHM, KIM et al, **Allergy Asthma Immunology Research**, v.4, p. 68-79, 2012).

[07]. Várias pesquisas com enfoque em diferentes doenças alérgicas descrevem que os eosinófilos, quando estimulados, são recrutados da circulação para os tecidos e agem como mediadores pró-inflamatórios e moduladores da resposta imune adaptativa de fase tardia. O recrutamento e a ativação dos eosinófilos no local da inflamação é oriundo de citocinas produzidas pelas células Th2, em destaque a IL-5 e eotaxinas (LACY, MOQBEL, **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.1, p. 79-84, 2001; KITA, *Immunological Reviews*, v. 242, p. 161-177, 2011; ZHANG, SFERRA, EROGLU, **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, p.1497-506, 2013).

[08]. Em condições alérgicas, os níveis de eosinófilos na corrente sanguínea e nos tecidos são muito elevados (MALM-ERJEFALT; GREIFF et al., **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, p. 134-1340, 2005). Na asma, rinites alérgicas e dermatites atópicas, técnicas histológicas mostram que, nos tecidos, os eosinófilos sofrem uma grande degranulação (AHLSTROM-EMANUELSSON, et al, **The European Respiratory Journal**, v. 24, p. 750-7, 2004). Esses grânulos apresentam em sua composição proteínas citotóxicas específicas de eosinófilos e também uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas imunorreguladoras

(LACY; MOQBEL, **Current Opinion Allergy and Clinical Immunology**, v.1, p. 79-84, 2001; UHM, KIM et al, **Allergy Asthma Immunology Res**, v.4, p. 68-79, 2012; MAZZEO, CANAS et AL., **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, p. 1603-1613, 2015).

[09]. Os grânulos dos eosinófilos são compostos basicamente por quatro proteínas: Proteína Básica Principal (PBP), Peroxidase Eosinofílica (PE), Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE) e Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (NDE) (HOGAN; ROSENBERG, et al., **Clinical and Experimental Allergy**, v.38, p.709-750, 2008; FULKERSON, ROTHENBERG, **Nature Reviews Drug Discovery**, v.12, p.117-129, 2013; ACHARYA, ACKERMAN, **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, p.17406-17415, 2014). No que diz respeito às alergias, várias pesquisas vem sendo feitas para investigar a participação dessas proteínas dos grânulos de eosinófilos no diagnóstico dessas doenças.

[010]. Estudos recorrentes demonstraram que a NDE no soro de pacientes pediátricos asmáticos serviu como marcador de inflamação eosinofílica assim como a PCE, no entanto, a NDE se mostrou mais efetiva na avaliação da gravidade da doença (KIM, LEE et al., **Journal of Lung**, v.185, p.97-103, 2007; KIM, CALLAWAY et al., **Journal of Asthma**, v.47, p.568-573, 2010; KIM, **Korean Journal of Pediatrics**, v. 56, p. 8-12, 2013).

[011]. Com o intuito de investigar o papel da NDE e da PCE nas dermatites atópicas, um recente achado mostrou que a NDE é considerada uma potente candidata a biomarcador clínico na avaliação da doença (KIM, et al., **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 119, p.441-445, 2017). Outro trabalho também mostrou que a deposição extracelular de NDE em biópsias de esôfago de pacientes com esofagite eosinofílica (EEo) é significativamente maior quando comparada com a participação da proteína básica principal (PBP) dos grânulos de eosinófilos (PETERSON, COBELL et al., **Digestive Disease and Sciences**, v.60, p.2646-2653, 2015). Ensaios de imunofluorescência revelaram que a NDE é detectada na infiltração e degranulação de eosinófilos em tecidos, e portanto

pode servir como biomarcador para EEO (KEPHART, ALEXANDER et al., **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, p.298-307, 2010).

[012]. A NDE é uma proteína pertencente à superfamília das ribonucleases, por essa razão, ela é também chamada de ribonuclease 2 (RNase 2). Está localizada na matriz do grânulo do eosinófilo e apresenta propriedades antivirais e quimiotáticas, além de induzir a migração e maturação de células dendríticas (YANG, et al. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 79-90, 2008; YANG, et al. **Blood Journal**, v.102, p.3396-3403, 2017).

[013]. A ação enzimática ribonucleolítica da NDE irá depender do seu substrato de ligação, e essa é a condição precursora para suas atividades citotóxicas, neurotóxicas e antivirais. Contra helmintos, observa-se que a NDE apresenta uma toxicidade limitada, já contra vírus de cadeia simples, sua ação tóxica é considerada eficiente (ACHARYA, ACKERMAN, **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, p.17406-17415, 2014).

[014]. Quando envolvida com a ativação e maturação das células dendríticas, a NDE contribui para expressão de diversas quimiocinas inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento e receptores solúveis, bem como na sinalização e no aumento da resposta imune da via Th2 (YANG, et al. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 79-90, 2008).

[015]. Embora já existam na literatura estudos que mostrem que a presença da NDE é um bom indicativo para algumas doenças alérgicas, ainda não se tem descrito experimentos e invenções, em níveis moleculares, que estão relacionados com o desenvolvimento de ligantes da NDE nas alergias mediadas por eosinófilos. Portanto, o esclarecimento das questões moleculares, direcionam os esforços científicos para encontrar marcadores eficientes que contribuam para o diagnóstico e tratamento precisos de doenças alérgicas.

[016]. Na busca por biomarcadores o *Phage display* é uma técnica utilizada para selecionar peptídeos ou proteínas que se ligam a moléculas alvo através da participação de bacteriófagos (**Science**, v.228, p.1315-1317, 1985). Essa

seleção é baseada na relação direta entre o genótipo presente no capsídeo viral e o seu fenótipo. Assim, uma biblioteca de moléculas (peptídeos ou proteínas) que é expressa na superfície do bacteriófago (fago) fica exposta, permitindo que ocorram ligações de afinidade com moléculas alvo (anticorpo, enzima, receptores de superfície, etc.). Esse processo de identificação de ligantes específicos de um alvo é chamado de *biopanning* (GARGIR *et al.*, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1569, p.167–173, 2002; JACOBSSON *et al.*, **Biological Procedures Online**, v.5, p.123-135, 2003; ZHANG *et al.*, **Molecular Immunology**, v.42, p.1275–1281 2005; PANDE *et al.*, **Biotechnology Advances**, v.28, p.849–858, 2010). Quando selecionados, esses ligantes podem ser submetidos a outras técnicas laboratoriais para caracterização e validação.

[017]. A NDE foi encontrada em bancos de patentes como marcador de algumas doenças, mas não há registros de invenções que descrevam a criação de um peptídeo ligante da NDE. Além disso, existem documentos que sugerem formas de diagnosticar algumas doenças alérgicas, mas elas não se utilizam da NDE como marcador, e nem evidenciam sua participação no diagnóstico e na indução de tolerância imunológica.

[018]. A KR101611743 trata do uso da NDE como marcador para uma condição muito específica que é o diagnóstico de sibilância recorrente e asma após uma bronquiolite causada pela infecção viral.

[019]. A NDE também foi mencionada como marcador de células tumorais de câncer de ovário na WO2004064783. O método se baseia na detecção da NDE em amostras de urina de mulheres para determinar o risco de ter e desenvolver câncer de ovário.

[020]. A US20030152956 proporciona um teste para doenças alérgicas através de um método de rastreio que utiliza da IL-4 e IL-13 como indicadores de níveis de expressão de genes relacionados à alergias em amostras biológicas.

[021]. Baseado em resultados obtidos por espectrometria de massa, a presente

invenção utilizou-se de amostras de biópsias de pacientes pediátricos com EEO, que apresentaram um aumento da proteína NDE quando comparadas com grupos de pacientes controle e pacientes portadores de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Por esse motivo, a proteína NDE foi utilizada para ser alvo da técnica molecular de *Phage Display*, e dela as sequências peptídicas ID N° 1 a N° ID 4 foram selecionadas.

[022]. Tais sequências peptídicas poderão ser utilizadas em testes *in vitro* para diagnóstico das doenças alérgicas/inflamatórias, bem como suas patofisiologias e progressão. Elas poderão também ser úteis no desenvolvimento de fármacos, importantes no tratamento de pacientes com alergias e em doenças que a proteína NDE estiver desempenhando efeitos patogênicos. Esses fins permitirão a realização de ensaios imunológicos, *in vitro*, comumente utilizados em laboratórios, como ensaios de *ELISA*, *Western Blotting*, imunohistoquímica, imunocitoquímica, testes de imunoaglutinação, culturas de células, detecção de citocinas, citometria de fluxo, testes realizados em animais, testes feitos em sensores eletroquímicos, testes que utilizem esses peptídeos direta ou indiretamente com o intuito de compreender a sua fisiopatologia e obter o controle e o acompanhamento de inflamação de doenças alérgicas, podendo ser utilizadas amostras de fluidos corporais, tais como amostras sólidas (biópsias), muco, sangue, plasma, soro, urina e saliva.

[023]. Dessa forma, a presente invenção também propõe o uso das sequências peptídicas Seq. ID N° 1 a Seq. ID N° 4 fusionadas ou não a carreadores, tais como fagos filamentosos, fármacos e/ou substâncias fluorescentes/radioativas, ou a outro tipo de carreador que vise aumentar sua estabilidade e sua utilização no diagnóstico, tratamento e acompanhamento da inflamação de doenças alérgicas que apresentam a participação dos eosinófilos, tais como asma, rinite, dermatite atópicas e esofagite eosinofílica.

[024]. Descrição da Invenção

[025]. Para melhor compreensão, a seguir estão descritos os resultados obtidos da invenção. Os experimentos utilizados se encontram detalhados no final deste relatório.

[026]. Exemplo 1

[027]. Através da técnica analítica de espectrometria de massa foi selecionada uma proteína oriunda de eosinófilo que fosse melhor identificada em doenças alérgicas. Para isso, amostras de biópsias esofágicas de pacientes pediátricos diagnosticados com esofagite eosinofílica (EEo) foram utilizadas nos experimentos. Comparou-se, por meio da técnica, sete pacientes pertencentes do grupo controle, três pacientes com EEo e três pacientes com DRGE.

[028]. Essa metodologia demonstrou que, no grupo de pacientes alérgicos com EEo, a NDE foi mais expressiva quando comparada com os demais grupos, e por esse motivo foi a proteína selecionada para dar continuidade nos experimentos.

[029]. A FIGURA 1 mostra o resultado da quantificação realizada pelo programa PEAKS Studio, onde a intensidade de sinal da proteína NDE é maior no grupo de pacientes com EEo quando comparados com os demais grupos de pacientes controle e DRGE.

[030]. A FIGURA 2 mostra o resultado da junção dos três parâmetros de quantificação utilizados na espectrometria de massa, PEAKS Studio manual e automático e MaxQuant/Perseus. A figura mostra que a intensidade de sinal da proteína NDE foi significativamente maior nos pacientes com EEo.

[031]. Exemplo 2

[032]. A seleção dos clones reativos à proteína NDE foi realizada através da técnica de *Phage display* com uso de uma biblioteca conformacional de fagos Ph.D.-C7C (New England Biolabs, Inc.). Por meio do ensaio de *Phage-ELISA* (*screening*) foi realizada uma validação dos clones de fagos com maiores

reatividades à NDE. Dessa validação, dois fagos apresentaram melhores reatividades frente ao alvo.

[033]. Conforme FIGURA 3, as barras destacadas correspondentes aos clones D3 e C5, apresentaram altas absorbâncias e por isso esses fagos foram utilizados para posteriores experimentos. Já o fago irrelevante trata-se de um parâmetro de controle negativo do experimento. A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 450 nm.

[034]. A TABELA 1 mostra as sequências de aminoácidos referentes aos fagos D3 e C5. Devida à possibilidade de ligação dos peptídeos em seu alvo no sentido carboxi-terminal para amino terminal, foi também incluída as sequências no seu sentido reverso, identificadas como suas respectivas sequências invertidas.

TABELA 1

Clone	Peptídeo	Sequência Invertida
D3	Seq. ID Nº 01	Seq. ID Nº 3
C5	Seq. ID Nº 02	Seq. ID Nº 4

[035]. Exemplo 3

[036]. Foram realizadas análises *in silico* para identificar as regiões de interação entre os peptídeos Seq. ID Nº 1 e 2 e a NDE a partir da estrutura tridimensional da proteína. Deste modo, foi observada as regiões onde os peptídeos selecionados por *Phage display* se ligam à NDE conforme FIGURA 4.

[037]. Exemplo 4

[038]. Para determinar a melhor concentração de fagos e de proteína recombinante e otimizar os próximos ensaios, utilizou-se o peptídeo de Seq. ID Nº 2 para analisar sua relação com o alvo. Para isso foi realizado ensaio de *Phage-ELISA* que demonstrou o comportamento das ligações.

[039]. Na FIGURA 5 pode ser observada a curva de linearidade do peptídeo Seq. ID Nº 2 frente a diferentes concentrações de fagos e de proteína recombinante. Para tanto foi realizada a sensibilização da placa com a proteína recombinante da NDE nas concentrações 0 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, em um volume final de 50 µL e subsequente incubação dos fagos nas diluições de 1×10^8 pfu/poço e 1×10^9 pfu/poço. Verificou-se que a diluição dos fagos que apresentou melhor comportamento e linearidade foi a de 1×10^9 pfu/poço com a concentração de proteína recombinante de 40 ng/mL. A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 450 nm.

[040]. Exemplo 5

[041]. Para comparar a eficiência dos peptídeos Seq. ID Nº 1 e Seq. ID Nº 2 com os anticorpos anti-NDE, anti-PCE e anti-PE, outros ensaios de *Phage-ELISA* foram realizados. Conforme a padronização do ensaio anterior, a sensibilização da placa de *ELISA* foi realizada com 40 ng/mL (por poço) de proteína recombinante e os fagos incubados em uma diluição de 1×10^9 pfu/poço. Já os anticorpos anti-NDE, anti-PCE e anti-PE foram incubados com as respectivas diluições de 1:1000, 1:500 e 1:1000 conforme indicação dos fabricantes. Para controle negativo das reações (branco), alguns poços foram sensibilizados apenas com o tampão de sensibilização de carbonato bicarbonato, portanto, sem a presença da proteína recombinante.

[042]. A FIGURA 6 mostra que a Seq. ID Nº 1 e Seq. ID Nº 2, não apresentaram diferenças significativas frente a ação do anticorpo anti-NDE quando incubados com o alvo. Isso mostra que, a reatividade e o reconhecimento dos peptídeos na presença da proteína recombinante NDE é tão eficiente quanto a ação do anticorpo comercial Anti-NDE.

[043]. Além disso, os resultados das reatividades mostraram que tanto a Seq. ID Nº 1, quanto a Seq. ID Nº 2 apresentaram diferenças significativas em relação a reatividade do anticorpo Anti-PCE. A Seq. ID Nº 1 também apresentou diferenças significativas frente a ação do anticorpo Anti-PE. Essas diferenças mostram que

os peptídeos são mais eficazes no reconhecimento de seu alvo do que o anticorpo Anti-NDE, que não apresentou diferenças significativas quando comparado com a ação de anticorpos que reconhecem outras proteínas do grânulo de eosinófilo.

[044]. A absorvância foi mensurada no comprimento de onda de 450nm. Os dados representam a média de D.O. \pm desvio padrão dos ensaios realizados em duplicata.

[045]. Metodologia empregada

[046]. Segue abaixo uma descrição detalhada para melhor compreensão dos procedimentos empregados.

[047]. Espectrometria de massa

[048]. Para selecionar uma proteína oriunda de eosinófilo que fosse melhor identificada em doenças alérgicas, amostras de biópsias esofágicas de pacientes pediátricos diagnosticados com esofagite eosinofílica (EEo) foram submetidas a técnica analítica de espectrometria de massa. Tal técnica é capaz de detectar proteínas através da medição de sua massa e da determinação de suas estruturas químicas, separando-as conforme sua massa/carga (m/z), e consequentemente identificando-as qualitativa e quantitativamente por suas respectivas taxa de m/z e abundância (GROSS, JUNGER; Mass spectrometry a textbook, **Springer**, 1ª Ed., 2004). Para isso, utilizou-se biópsias de sete pacientes pertencentes ao grupo controle, três pacientes com EEo e três pacientes com DRGE.

[049]. As amostras de tecido esofágico foram digeridas usando o kit de digestão Trypsin All-In-One ProteoExtract® (Calbiochem) de acordo com o protocolo para amostras de tecido. Para isso, aproximadamente 10mg de tecido foram adicionados à 200uL de tampão de extração e mais 200uL de *beads* de vidro, submetidos a agitação por uma hora à 4°C. Foram reduzidos, alquilados e digeridos em condição padrão por três horas. Os peptídeos digeridos foram então dessalinizados usando C18 ZipTips (Millipore). Em seguida, foram

identificados por cromatografia utilizando uma coluna monolítica PepSwiX (25cm x 100 µm), acoplada a um espectrômetro de massa quadrupolo-orbitrap™ híbrido Q-Exactiv (Thermo Fisher Scientific). Os espectros fragmentados resultantes foram processados usando o MaxQuant/Perseus e o PEAKS Studio 7.5 (quantificação com o módulo Q incorporado e quantificação manual). Usamos para fazer as análises dos resultados obtidos o banco de dados humano UniProtKB. Os ensaios e análises foram realizados em triplicata.

[050]. *Phage display - Seleção dos peptídeos ligantes a NDE*

[051]. A metodologia de *Phage display* foi utilizada para obtenção dos peptídeos ligantes da NDE. Para tanto, foi utilizada a proteína neurotoxina derivada de eosinófilo recombinante humana (Abcam ab159356) como alvo da seleção desses peptídeos.

[052]. Utilizou-se uma biblioteca de peptídeos randômicos fusionados em fagos (Ph.D.- C7C, NEW ENGLAND BioLabs®Inc.). A biblioteca é composta de 7 aminoácidos conformacionais randômicos fusionados à região N-terminal da Proteína III de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos contêm peptídeos amino-terminais.

[053]. Foram realizados três ciclos de seleção (*biopanning*). Para o primeiro ciclo de seleção, sensibilizou-se um poço da microplaca com 1ug da proteína NDE recombinante humana diluído em 50ul de tampão bicarbonato (*overnight*). Após o período de sensibilização da placa, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 250 µL de tampão bloqueio (BSA 5% em PBS 1x) que foi incubado por 1h a 37°C. Após a retirada do bloqueio, foi adicionado 10 µL da biblioteca de fagos diluída em 90 µL de tampão PBS 1X, com período de incubação de 1h a 37°C. Os fagos não ligantes foram removidos por meio de cinco lavagens com PBST 0,01%. Para os próximos ciclos (2º e 3º) de seleção foram feitas cinco lavagens com PBST 0,01% para a remoção de fagos não ligantes.

[054]. Os fagos ligantes foram eluídos por eluição ácida com 150 µL de glicina (0,2M – pH 2,2). Em seguida 1µL do eluato de fagos foram recolhidos e utilizados

para titulação. Para a amplificação do eluato remanescente, foi retirada uma colônia isolada de *Escherichia coli* (linhagem ER2738) e em seguida amplificada em meio LB (0,2 g LB + 20 mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina (20 mg/mL diluída em etanol absoluto), sob agitação a 37°C até a fase *early-log* ($O.D._{600} \sim 0,3$). O eluato foi adicionado e incubado a 37°C por 4-5 horas sob 270 RPM de agitação.

[055]. A cultura foi submetida à centrifugação a 10000 RPM por 10 minutos a 4°C e centrifugada para total separação das bactérias. Logo após, 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril), incubando-se por 12-16 horas a 4°C. Decorrida a precipitação, a solução foi centrifugada a 10000 RPM por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e a centrifugação novamente realizada, para remoção de sobrenadante residual.

[056]. O precipitado foi suspenso em 1 mL de PBS 1X e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl e incubado em gelo por 1 hora. O microtubo contendo o precipitado foi submetido à centrifugação de 14000 RPM por 10 minutos a 4°C, e em seguida o sobrenadante foi descartado. A centrifugação foi novamente realizada. O precipitado foi ressuspenso em 200 μ L PBS 1X, obtendo-se então o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

[057]. Titulação

[058]. Para as titulações, os eluatos foram submetidos a diluições seriadas exponenciais (\log_{10}) crescentes em meio LB, sendo as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} para eluatos não amplificados e de 10^{-8} a 10^{-11} para eluatos amplificados. A cada diluição foi acrescido 200 μ L da cultura de *E. coli* ER2738 na fase *mid-log* ($D.O._{600} \sim 0,5$). Após a infecção, a cultura foi transferida para tubos contendo 3 mL de Ágar-Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 7 g Agarose, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ / litro) e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG (0,5mM) / Xgal (40 μ g/mL) e tetraciclina (20

mg/mL diluído em etanol absoluto). Para cada diluição foi confeccionada uma placa. As placas foram incubadas à 37°C *overnight*. Após este período, as colônias que se apresentavam azuis e bem individualizadas foram contadas manualmente. Para estimar os valores dos títulos multiplicou-se o número total de colônias pelo fator de diluição em cada placa.

[059]. Amplificação e purificação dos fagos

[060]. Distribui-se 1 mL da cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* (D.O. 600~0,3) em cada poço de uma placa *deepwell*. Com palitos para dente esterilizados, colônias azuis foram retiradas da placa de Petri (ciclos não-amplificados) e transferidas para a *deepwell*. A cada poço foi adicionado apenas uma colônia de bactéria infectada com fago, totalizando 96 colônias em cada *deepwell*. A placa foi vedada e incubada *overnight* sob agitação de 270 RPM a 37°C. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 20 minutos a 3700 RPM, transferindo o sobrenadante para outra *deepwell*. À esta segunda placa foi adicionado 1/6 de volume total de PEG/NaCl, sendo incubada por 14 horas a 4°C. Após esse tempo a placa foi centrifugada por 1 hora, o sobrenadante foi dispensado e o precipitado foi ressuscitado em PBS 1X.

[061]. Phage-ELISA- Seleção dos clones mais reativos

[062]. Foi utilizada uma microplaca de 96 poços de fundo chato (NUNC, USA), recobertas com 20 ng de proteína recombinante NDE em tampão carbonato bicarbonato (0.1 M de Carbonato de Sódio, 8.40 g NaHCO₃, 3.56 g de Na₂CO₃, pH = 9,4) e mantidas a 4°C por 18 horas. Posterior à sensibilização, as placas foram bloqueadas com 270 µL por poço de tampão PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina (SIGMA-USA), e incubada por 1 hora a 37°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas uma vez com uma solução de PBS 1X. Foram adicionados 50 µL de cada clone de fagos em um poço sensibilizado, oriundos do terceiro ciclo de seleção da técnica de *Phage Display*. A placa foi incubada a 37°C por uma hora, e lavada por seis vezes com uma solução de PBS 1X com 0,1% de Tween-20. Em seguida, adicionou-se 50 µl/poço do anticorpo anti-M13, marcado com peroxidase e diluído 1:5000 em PBS- 1X

contendo 5% soro albumina bovina. A placa foi reincubada por mais uma hora, a 37°C.

[063]. Após seis lavagens com PBS 1X com 0,1% de Tween-20, as ligações antígeno/anticorpo foram detectadas pela adição da solução reveladora TMB. 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 450nm.

[064]. Extração de DNA de Fagos

[065]. Os dois clones (fagos) que apresentaram as reatividades (absorbâncias) mais altas, foram submetidos à extração de DNA. Para isso, parte do sobrenadante desses dois clones, oriundos da amplificação das colônias azuis vindas do último ciclo de seleção (eluato não amplificado), foram transferidos para placas *deepwell* contendo cultura de *E. coli* ER2738, sendo então incubadas *overnight*. Após o tempo de incubação seguem-se os mesmos procedimentos da amplificação até a última centrifugação de 1 hora, onde é acrescentado ao precipitado 100 µL de tampão iodeto (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA e 4 M de NaI). As placas foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e, em seguida, foi adicionado 250 µL de etanol absoluto. Após uma incubação de 10 minutos, as placas foram centrifugadas (3700 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 150 µL de Etanol 70% e centrifugado novamente por mais 10 minutos. O sobrenadante foi dispensado e finalmente, o DNA foi diluído em 20 µL de água ultrapura e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com solução de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium 41003) na diluição de 1:500 em água destilada conforme orientação do fabricante.

[066]. Sequenciamento do DNA

[067]. A realização do sequenciamento foi feita utilizando o Genomelab DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, USA). Usou-se 500ng DNA molde dos fagos

selecionados no biopanning e 5 μ M do primer- 96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs). A reação de 30 ciclos ocorreu em um termociclador de placas Master Cycler (Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Os *amplicons* gerados da reação de sequenciamento foram precipitados com acetato de sódio 3 M, 100 mM Na₂-EDTA, 20 mg/ml glicogênio e 60 μ L etanol absoluto. A placa foi centrifugada por 1 hora a 4000 RPM e o sobrenadante descartado. Adicionou-se ao precipitado 200 μ L de Etanol 70%, centrifugando-o por 10 minutos, a 4000 RPM, descartando posteriormente o sobrenadante. A placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi centrifugada a 800 RPM, durante 1 minuto. Em seguida, a placa foi coberta com papel alumínio, ficando assim por cinco minutos para evaporar o etanol remanescente. O precipitado resultante foi ressuspenso no tampão de diluição e a leitura foi realizada em um sequenciador automático GenomeLab GeXP – Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

[068]. Bioinformática

[069]. Realizada a partir da sequência de DNA dos fagos selecionados Seq. ID. N°1 e Seq. ID. N°2, a dedução *in silico* das sequências de aminoácidos dos peptídeos, foram feitas através do *software online* Expasy Translate (<http://web.expasy.org/translate/>).

[070]. Para a predição estrutural tridimensional dos peptídeos selecionados utilizou-se o programa Raptorx (<http://raptorx.uchicago.edu/>). Para realização da modelagem, as sequências dos peptídeos precisaram ser repetidas e intercaladas entre as sequências GGGS.

[071]. A interação dos peptídeos com a NDE foi executada pelo programa Pathdock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>).

[072]. Phage ELISA- Curva de padronização

[073]. Em placa de 96 poços de fundo chato (NUNC, USA), foi adicionado três concentrações diferentes da proteína recombinante NDE (concentrações 0 ng/mL, 10 ng /mL, 20 ng /mL, 40 ng /mL) em tampão carbonato bicarbonato (0.1 M de Carbonato de Sódio, 8.40 g NaHCO₃, 3.56 g de Na₂CO₃, pH = 9,4) e mantidas a 4°C por 18 horas. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com 270 µL por poço de tampão PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina (INLAB 1870), e incubada por 1 hora a 37°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas duas vezes com uma solução de PBS 1X. Foram adicionadas para cada concentração de proteína, três diferentes diluições de fagos de Seq. ID. N^o2 (1x10⁸ pfu/poço e 1x10⁹ pfu/poço) em 50 µl/poço de PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina. Estas placas foram incubadas a 37°C por uma hora, e lavadas por seis vezes com uma solução de PBS 1X com 0,1% de Tween-20. Em seguida, foram adicionadas 50 µl/poço do anticorpo anti-M13, marcado com peroxidase e diluído 1:5000 em PBS- 1X contendo 5% soro albumina bovina, e a placa reincubada por uma hora, a 37°C.

[074]. Após seis lavagens com PBS 1X com 0,1% de Tween-20 a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição da solução reveladora TMB (BD OptEIA-BD Biosciences). 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 450nm.

[075]. A curva que se mostrou mais eficiente foi de diluição de 1.10⁹ pfu/poço incubada no poço com 40 ng de proteína recombinante. Por esse motivo, para o seguinte experimento sensibilizou-se a placa com 40 ng de proteínas por cada poço e utilizou-se apenas a diluição de fagos de 1.10⁹ pfu/poço.

[076]. Phage-ELISA – Teste de eficiência dos peptídeos

[077]. Os ensaios foram feitos todos em duplicatas. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (NUNC, USA), sensibilizadas com 40 ng de proteína recombinante NDE em tampão carbonato bicarbonato (0.1 M de Carbonato de Sódio, 8.40 g NaHCO₃, 3.56 g de Na₂CO₃, pH = 9,4) e mantidas a 4°C por 18

horas. Posterior à sensibilização, as placas foram bloqueadas com 270 µL por poço de tampão PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina (SIGMA-USA), e incubada por 1 hora a 37°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas uma vez com uma solução de PBS 1X. Foram colocados 1×10^9 de fagos (Seq. ID N° 1 e Seq. ID N° 2) em 50 µl/poço de PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina. Nos poços incubados com os anticorpos anti-NDE (LifeSpan BioScience, Inc. LS-B12991), anti-PCE (Abcam ab116017) e anti-PE (Abcam ab83525), diluídos em 1:1000, 1:500 e 1:1000 respectivamente em PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina, foram adicionados 50 µL/poço dessa diluição. Estas placas foram incubadas a 37°C por uma hora, e lavadas por seis vezes com uma solução de PBS 1X com 0,1% de Tween-20. Em seguida, nos poços incubados com fagos, foram adicionadas 50 µl/poço do anticorpo anti-M13, marcado com peroxidase e diluído 1:5000 em PBS- 1X contendo 5% soro albumina bovina. Já nos poços incubados com anticorpos, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo IgG anti-rabbit conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS 1X contendo 5% soro albumina bovina. Em seguida a placa foi reincubada por uma hora, a 37°C.

[078]. Após seis lavagens com PBS 1X com 0,1% de Tween-20 as ligações antígeno/anticorpo foram detectadas pela adição da solução reveladora TMB. 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 450nm.

[079]. Análise estatística

[080]. As comparações estatísticas foram realizadas por meio do teste de análises de variâncias de duas vias (ANOVA) com teste o teste de Kruskal Wallis. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0 (*GraphPad Softwares Inc., CA, USA*). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

REIVINDICAÇÕES

1 – PEPTÍDEOS LIGANTES DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILOS **caracterizados por** compreender as sequências Seq ID Nº 1 a Seq ID Nº 2 e suas sequências reversas Seq ID Nº 3 e Seq ID Nº 4.

2 - PEPTÍDEOS E SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados por** serem utilizados em diagnóstico imunológico de doenças alérgicas/inflamatórias, controle da inflamação e tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias, tais como asma, rinite, dermatite atópicas e esofagite eosinofílica.

3 - PEPTÍDEOS E SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por serem **utilizados para** detectar moléculas ligantes através de ensaios imunológicos, como testes imunoenzimáticos (tais como ELISA, Western Blot, imunofluorescência, imunohistoquímica, EIA, MEIA e outros), testes por imunoaglutinação, imunofenotipagem, citometria de fluxo, análise de citocinas, sensores eletroquímicos, ou de qualquer outra forma de detecção relacionada direta ou indiretamente em amostras sólidas (biópsias) ou de fluidos corporais, como saliva, urina, sangue, plasma, soro e muco.

4 - USO DOS PEPTÍDEOS E SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS conforme definidos na reivindicação 1, **caracterizados por** serem utilizados em composições farmacológicas e em processos de diagnóstico, prognóstico, marcadores de risco, adoecimento ou estado reacional, *in vitro* ou *in vivo*.

5 - USO DOS PEPTÍDEOS E SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS conforme definidos na reivindicação 1, **caracterizados por** ser na preparação de uma composição imunogênica, para regular o sistema imune humano ou animal contra doenças de desordem imunológica como doenças alérgicas e inflamatórias.

6 - COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizados por** compreender um ou mais compostos definidos pelas Seq

2 / 2

ID Nº 1 a Seq ID Nº 4 e um veículo farmacologicamente aceitável, ou ainda em associação com outras formulações terapêuticas.

1 / 4

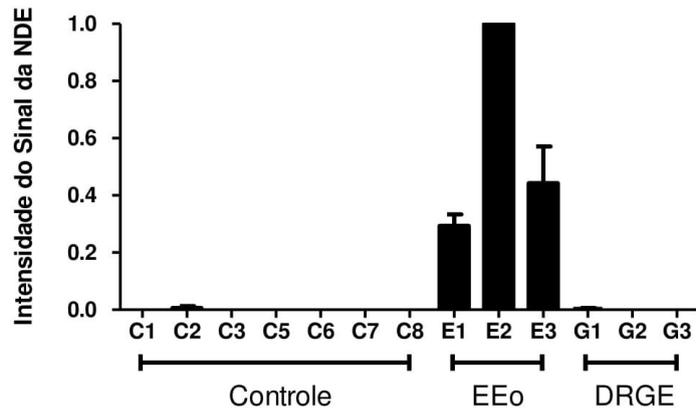


FIGURA 1

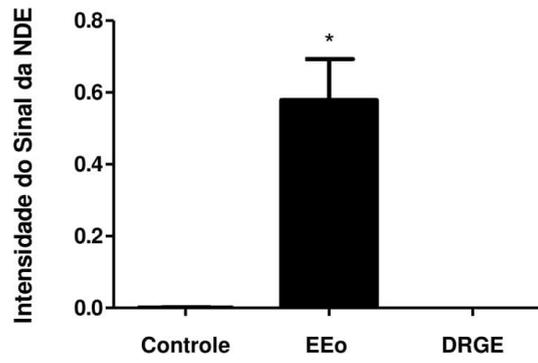


FIGURA 2

2 / 4

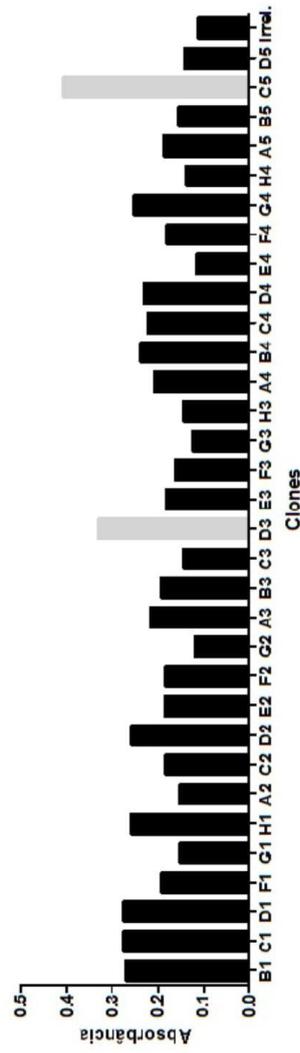


FIGURA 3

3 / 4

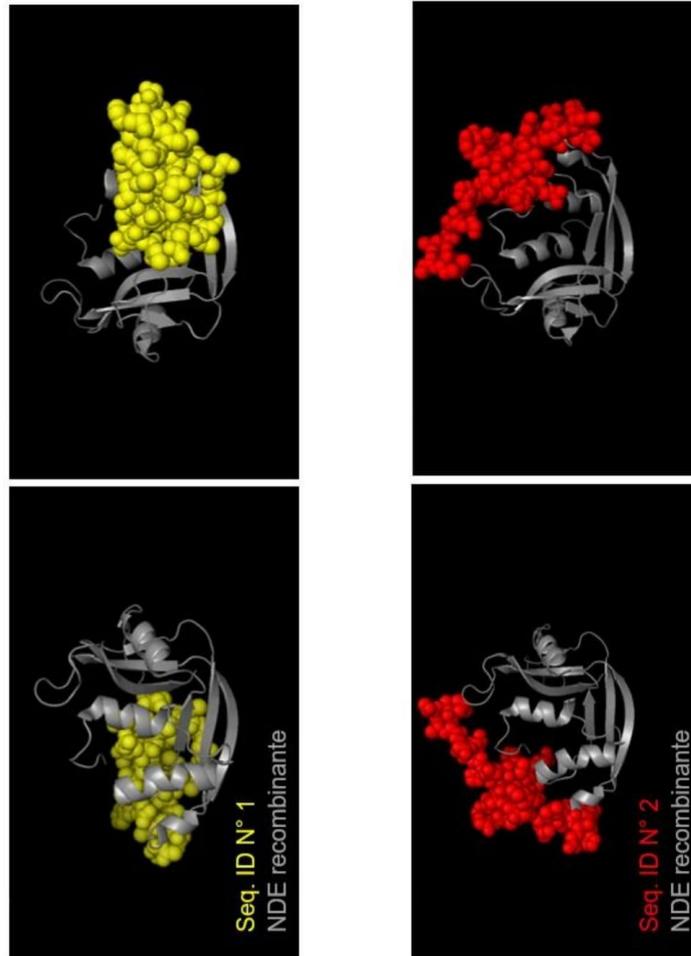


FIGURA 4

4 / 4

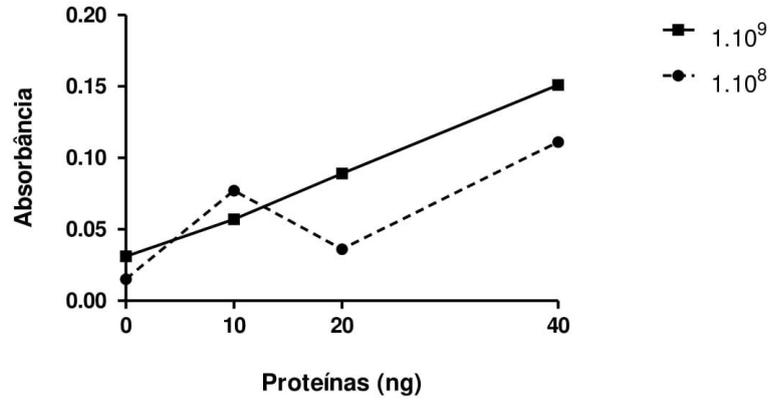


FIGURA 5

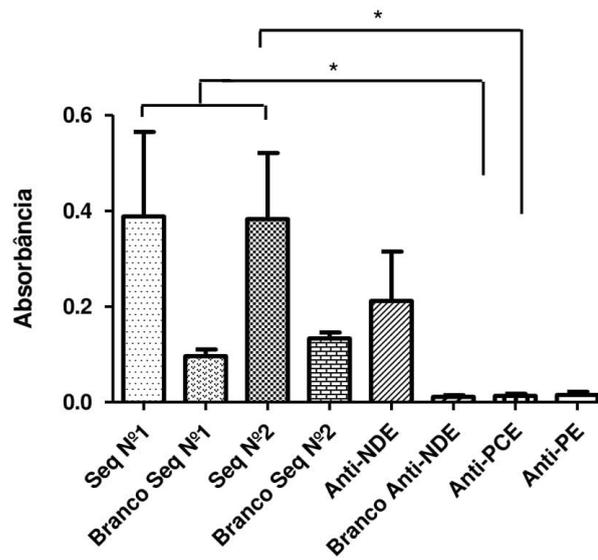


FIGURA 6

RESUMO**“PEPTÍDEO LIGANTE DA PROTEÍNA NEUROTOXINA DERIVADA DE EOSINÓFILO E SUAS APLICAÇÕES”**

A presente invenção refere-se à seleção de peptídeos ligantes da proteína recombinante humana Neurotoxina Derivada de Eosinófilo (NDE), utilizando a técnica de *Phage Display*. A eficiência dos peptídeos selecionados foi comparada com o anticorpo comercial policlonal Anti-NDE em ensaios de *Phage-ELISA*. Tais ensaios comprovaram que os peptídeos ligantes da NDE apresentaram sensibilidade e eficiência semelhantes quando comparado com o anticorpo comercial. Os peptídeos demonstram serem bons biomarcadores, sendo úteis no diagnóstico e nas técnicas de imunoterapia de doenças alérgicas e inflamatórias. A interação entre os epítomos da proteína com os peptídeos selecionados também foram mapeados e identificados por bioinformática.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Patent In .txt
- Data de Geração do Código: 09/02/2018
- Hora de Geração do Código: 16:16:28
- Código de Controle:
 - Campo 1: 62C9EF38C072F8E4
 - Campo 2: 7AAB143AF0994D52