



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

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DE PEPTÍDEOS  
INIBIDORES DE ACTIVINA A EM CÉLULAS PULMONARES**

**Aluno:** Victor Alexandre Félix Bastos

**Orientador (a):** Prof. Dr Luiz Ricardo Goulart

**UBERLÂNDIA - MG**

**2020**



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

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DE PEPTÍDEOS  
INIBIDORES DE ACTIVINA A EM CÉLULAS PULMONARES**

**Aluno:** Victor Alexandre Félix Bastos

**Orientador (a):** Prof. Dr Luiz Ricardo Goulart

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

**UBERLÂNDIA – MG**

**2020**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B327 Bastos, Víctor Alexandre Félix, 1985-  
2020 ii DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DE  
PEPTÍDEOS INIBIDORES DE ACTIVINA A EM CÉLULAS PULMONARES  
[recurso eletrônico] / Víctor Alexandre Félix Bastos. -  
2020.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.765>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo ,1962-,  
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-  
graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - Nº 04/2020 - PPGGB.				
Data:	Onze de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	11623GBI007				
Nome do Discente:	Victor Alexandre Félix Bastos				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento e Avaliação do Papel Biológico de Peptídeos Inibidores de Activina A em Células Pulmonares.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de produtos e processos baseados em nanobiotecnologia, sensores, materiais nanoestruturados e nanomagnéticos.				

Aos onze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 08:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Profª. Drª. Patrícia Tiemi Fujimura, Prof. Dr. Remo Castro Russo, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

**APROVADO.**

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/12/2020, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/12/2020, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thúlio Marquez Cunha, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/12/2020, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Tiemi Fujimura, Usuário Externo**, em 11/12/2020, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Usuário Externo**, em 11/12/2020, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2397538** e o código CRC **036F77CD**.



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

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DE PEPTÍDEOS  
INIBIDORES DE ACTIVINA A EM CÉLULAS PULMONARES.**

**ALUNO:** Victor Alexandre Félix Bastos

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

**Examinadores:** Prof. Dra. Patrícia Tiemi Fujimura

Prof. Dr. Remo Castro Russo

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Prof. Dr. Thulio Marquez Cunha

**Data da Defesa:** 11/ 12/2020

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

---

Luiz Ricardo Goulart

*“Encare a vida, as dores e os prazeres,  
não deixe de trilhar nenhum caminho”*

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho principalmente ao meu avô, *In memoriam*, José Sabino Alves Filho, que sem dúvida é um dos maiores responsáveis pela pessoa que me tornei.

Aos meus pais e ao meu irmão, que mais do que familiares são amigos e exemplos de dignidade, felicidade e honestidade.



## **Agradecimentos**

*Somos seres sociais, aquele que se isola perde a maravilha da descoberta e da experiência, sendo incapaz de contribuir consigo mesmo e com os outros...*

Agradeço a Deus pela força e perseverança, por ser um farol na tormenta.

Agradeço aos meus pais pelo exemplo, pelo apoio e pelo amor incondicional;

Agradeço aos meus amigos, em especial ao meu irmão pelo companheirismo, pelas risadas e por ajudarem a aliviar o peso dos dias;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, agradeço por ter acreditado no meu potencial, pelo aprendizado, incentivo e pela oportunidade de realizar este trabalho;

Aos membros da Banca Examinadora, agradeço pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho;

A Aline Gomes, agradeço por trilhar esse caminho comigo, por deixar meus dias mais leves e me mostrar o que realmente importa;

Aos amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia, Emília, Jéssica, Isabela, Hebréia, Paula, Larissa, Luciana e Natássia pela amizade, pela alegria e companhia. Foram muitos os momentos de descontração e boas risadas.

A secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, *Janaína Lobato*, por toda ajuda e atenção.

Aos médicos Thúlio Marquez Cunha e Cezar Augusto dos Santos pela disponibilidade, empenho e auxílio nas coletas de amostras biológicas.

Aos pacientes do ambulatório de pneumologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia por participarem deste estudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e a Universidade Federal de Uberlândia pelo ensino e pesquisa de qualidade.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

E a todos aqueles que estiveram presentes nesta caminha, com certeza ela não seria a mesma sem vocês.

*Muito obrigado!*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Esquematização da resolução de lesões epiteliais pulmonares em pulmões normais e em pulmões de indivíduos susceptíveis a FPI.</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2: Organograma para diagnóstico de FPI.</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3: Descrição dos diferentes tipos de activinas de acordo com suas subunidades.</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4: Mecanismo de sinalização da Activina A.</b>	<b>13</b>
<b>Figura 5: Esquematização das etapas de seleção por Phage display.</b>	<b>16</b>
<b>Figura 6: Avaliação em Phage-ELISA da reatividade dos 46 clones selecionados utilizando o activina A como alvo.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 7: Ensaio de ELISA demonstrando a reatividade dos clones selecionados contra a Activina A.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 8: Modelos de predições estruturais das moléculas utilizadas neste estudo.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9: Sítios de ligação da molécula de activina A e seu receptor ActRIIB e ALK4.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 10: Pontos de ligação entre os peptídeos A7, B9 e E10 com a molécula de activina A.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 11: Avaliação da toxicidade dos peptídeos A7, B9 e E10.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 12: Avaliação do efeito dos peptídeos A7, B9 e E10 sobre a migração de células A549.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 13: Avaliação do efeito do peptídeo E10 sobre a inibição da TEM.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 14: Avaliação do efeito do peptídeo E10 sobre a inibição da TFM.</b>	<b>40</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Critérios determinados pela American Thoracic Society para diagnóstico de FPI no ano de 2000.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabela 2: Recomendação de diagnóstico de FPI baseada na avaliação histológica de biópsias pulmonares e em padrões observados em TCAR. ...</b>	<b>7</b>
<b>Tabela 3: Estrutura dos peptídeos sintetizados. ....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 4: Titulação em pfu (<i>plaque-forming unit</i>) de fagos na entrada e na saída de cada ciclo de seleção. ....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 5: Sequências traduzidas dos clones sequenciados.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabela 6: Clones selecionados para o teste ELISA.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabela 7: Sequências dos peptídeos sintetizados a partir dos clones selecionados.....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVEATURAS

ActRIIA	Receptor de activina A tipo 2A
ActRIIB	Receptor de activina A tipo 2B
AKT	Proteína quinase B
ALK4	Receptor de ativina tipo 1B
BSA	Albumina sérica bovina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DPI	Doença pulmonar intersticial
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFR 1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FGFR 2	Receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos
FGFR 3	Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
FSH	Hormônio folículo-estimulante
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A
IL-23	Interleucina 23

IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
LBA	Lavado broncoalveolar
MEC	Matriz extracelular
MMP-7	metaloproteinase-7 de matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-11	Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo 11
PDGF-12	Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo 12
PDGFR A	Receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR B	Receptor B do fator de crescimento derivado de plaquetas
PIU	Pneumonia intersticial usual
pmTGF- $\beta$	Peptídeo mimético ao TGF- $\beta$
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TCAR	Tomografia computadorizada de alta resolução
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TFM	Transformação fibroblastos-miofibroblastos
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR 1	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 1
VEGFR 2	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 2
VEGFR 3	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 3
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\alpha$ -SMA	actina- $\alpha$ de músculo liso
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
JRS	<i>Japanese Respiratory Society</i>
ALAT	<i>Latin American Thoracic Society</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA	1
1.2. ACTIVINA A	11
1.3. DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES TERAPÊUTICOS	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1. REAGENTES E LINHAGENS CELULARES	18
3.2. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIAL ATIVIDADE INIBIDORA DE ACTIVINA A	18
3.2.1. <i>Phage Display</i>	18
3.2.2. <i>Amplificação dos fagos selecionados</i>	19
3.2.3. <i>Titulação dos fagos</i>	19
3.2.4. <i>Amplificação e purificação dos fagos selecionados</i>	20
3.2.5. <i>Pré-validação da seleção por Phage-ELISA</i>	21
3.2.6. <i>Extração de DNA dos fagos</i>	21
3.2.7. <i>Sequenciamento dos clones selecionados</i>	22
3.2.8. <i>Análise das sequências por bioinformática</i>	22
3.2.9. <i>Avaliação das sequências e síntese dos peptídeos</i>	23
3.3. CITOTOXICIDADE	23
3.4. ENSAIOS EM CULTURA CELULAR	24
3.4.1. <i>Avaliação de migração celular</i>	25
3.4.2. <i>Transição fibroblastos-miofibroblastos</i>	25
3.4.3. <i>Transição epitélio-mesenquimal</i>	26
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
4.1. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS POR PHAGE DISPLAY	27
4.2. <i>PHAGE-ELISA</i> PARA TRIAGEM DOS FAGOS SELECIONADOS	28
4.3. SEQUENCIAMENTO DO DNA DOS FAGOS SELECIONADOS	28
4.4. AVALIAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	29

4.5. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE .....	35
4.6. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR .....	37
4.7. AVALIAÇÃO DA TRANSIÇÃO DE FIBROBLASTOS - MIOFIBROBLASTOS (TFM) E DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL (TEM).....	38
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>



## RESUMO

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma pneumonia intersticial crônica, progressiva e fibrosante, de causa desconhecida, limitada aos pulmões e que afeta em sua maioria idosos. Seu caráter progressivo limita a sobrevida dos pacientes a cerca de dois a quatro anos. Os tratamentos atuais, apesar de retardarem a progressão da doença, não são capazes de impedir seu avanço ou reverter seus efeitos. A activina A desempenha um papel fundamental na progressão da FPI, sendo responsável principalmente pela transformação de fibroblastos em miofibroblastos no local da lesão pulmonar. Este estudo buscou inibir a ação da activina A através da utilização de peptídeos sintéticos, capazes de se ligarem e neutralizarem a ação da activina A. Através da seleção por *phage display* foi possível a seleção de 10 peptídeos únicos, ligantes a activina A. Após a avaliação do potencial de ligação, três peptídeos (A7, B9 e E10) foram escolhidos para terem suas sequências sintetizadas. Avaliação estrutural *in silico* dos peptídeos, bem como de sua interação com a molécula de activina A, demonstrou que os pontos de ligação peptídeo-proteína estão situados na mesma região de ligação da activina A com seu receptor celular (ActRIIB). Além disso, ensaios de migração celular demonstraram a capacidade dos peptídeos em diminuir a proliferação de células pulmonares, mesmo quando estimuladas com pmTGF- $\beta$ . O peptídeo sintético E10, demonstrou ainda capacidade de inibir a transição epitélio-mesenquimal em células A549 estimuladas com pmTFG- $\beta$ , bem como inibir a transformação de fibroblastos em miofibroblastos *in vitro*. Demonstramos assim o potencial inibitório de um peptídeo sintético ligante específico de activina A. Entretanto, estudos *in vivo* devem ser conduzidos a fim de melhor compreendermos os efeitos da inibição da activina A e seu impacto na progressão da FPI.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar idiopática, activina A, fibroblastos, miofibroblastos.

## ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, and fibrous interstitial pneumonia, of unknown cause, limited to the lungs, that mostly affects the elderly. Its progressive character limits patients' survival to about two to four years. Current treatments, despite slowing its progression, are not able to prevent the disease progress or reverse its effects. Activin A plays a fundamental role in the development of IPF, being mainly responsible for the transformation of fibroblasts into myofibroblasts at the site of the lung injury. This study sought to inhibit the action of activin A through the use of synthetic peptides, capable of binding and neutralizing the action of activin A. Selection of peptides by phage display made it possible to select ten unique peptides that are able of binding to activin A. After evaluation of the binding potential, three peptides (A7, B9, and E10) were chosen to have their sequences synthesized. Structural evaluation in silico of the peptides, as well as their interaction with an activin A molecule, demonstrated that the peptide-protein binding points are located in the same region used for the binding of activin A with its cell receptor (ActRIIB). In addition, cell migration assays demonstrated the ability of peptides to decrease lung cell proliferation, even when stimulated with pmTGF- $\beta$ . The synthetic peptide E10 was also capable of inhibiting an epithelial-mesenchymal transition in A549 cells stimulated with pmTGF- $\beta$ , as well as inhibiting the transformation of fibroblasts into myofibroblasts in vitro. We thus demonstrate the inhibitory potential of a specific synthetic peptide binding for activin A. However, in vivo studies must be conducted to understand the effects of inhibition of activin A and its impact on the progression of IPF.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis, activin A, fibroblasts, myofibroblasts.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fibrose pulmonar idiopática

Segundo a *American Thoracic Society* (ATS), a fibrose pulmonar idiopática (FPI) é classificada como uma forma específica de pneumonia intersticial crônica, progressiva e fibrosante, de causa desconhecida, limitada aos pulmões e que afeta em sua maioria idosos (RAGHU et al., 2011a). Dentre os principais sintomas e consequências da FPI estão a perda progressiva de função pulmonar, tosse crônica e dispneia (RAGHU et al., 2011a; RAGHU; RICHELDI, 2017). Além disso, dentre as pneumonias idiopáticas intersticiais, a FPI é a mais comum e com maior índice de mortalidade (BJORAKER et al., 1998; OLDHAM; NOTH, 2014). Apesar de possuir um desfecho clínico variável, podendo evoluir lentamente ou de forma rápida e com perda aguda da função respiratória, é de consenso que a maioria dos pacientes evoluem para um prognóstico ruim, indo a óbito dentro de dois a quatro anos após o diagnóstico (HUTCHINSON et al., 2015; LEY; COLLARD; KING, 2011; NAKAMURA; SUDA, 2016; NATHAN et al., 2011; OLDHAM; NOTH, 2014; RAGHU; RICHELDI, 2017).

O desenvolvimento da FPI apresenta certa correlação com a idade e sexo dos indivíduos, afetando geralmente homens acima de 50 anos (RAGHU et al., 2006; RAGHU; RICHELDI, 2017; RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017). Graças a complexidade de classificação dos pacientes, a incidência da FPI em diferentes países pode variar de 2 a 63 casos a cada 100.000 indivíduos por ano, a depender de critérios clínicos utilizados para diagnóstico, tamanho e heterogeneidade da população (NALYSNYK et al., 2012; RAGHU et al., 2006; ROGLIANI et al., 2016). No cenário nacional, é estimada uma incidência de 6,8 a 9,9 novos casos anuais para cada 100.000 habitantes (BADDINI-MARTINEZ; PEREIRA, 2015; RUFINO et al., 2013).

Tem se observado o crescimento do número de casos nacionais e mundiais, principalmente após a publicação de determinações oficiais para diagnóstico e classificação da FPI pelas agências *American Thoracic Society*, *European Respiratory Society*, *Japanese Respiratory Society* e *Latin American Thoracic Society* (ATS/ERS/JRS/ALAT) em 2000, com posterior revisão e alteração em 2011

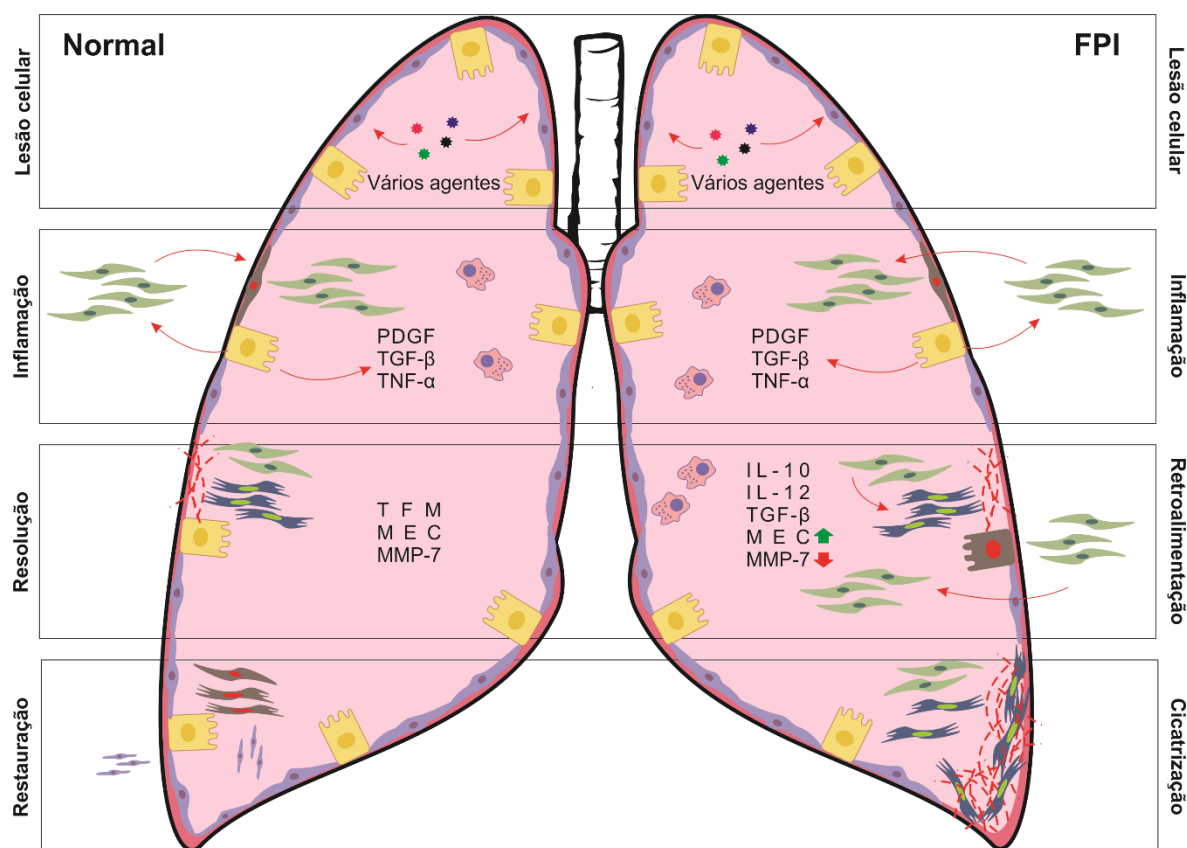
e em 2018 (BALDI, 2017; KING et al., 2000; RAGHU et al., 2011a, 2018a). Além disso o aumento da incidência de FPI na população é considerado uma consequência do aumento da expectativa de vida média e de métodos mais eficientes de diagnóstico (RAGHU et al., 2011b; SOO; ADAMALI; EDEY, 2017; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

Apesar de apresentar etiologia desconhecida, considera-se que a FPI é o resultado de um processo inflamatório pulmonar, frente a micro lesões constantes e do desbalanço da resposta imunológica pulmonar usual (RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017). Inúmeros agentes podem ser listados como desencadeadores desse processo inflamatório, sendo os principais tabagismo, exposição ocupacional a poeiras de madeira e metais, utilização de fogões de lenha, infecções virais, refluxo gastroesofágico, predisposição genética e efeitos colaterais referentes a utilização de determinados medicamentos (HOSSEINZADEH et al., 2018; RAGHU et al., 2011a; RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

Ainda que o processo inflamatório pulmonar localizado tenha um papel central no desenvolvimento e progressão da FPI, a ineficiência de medicamentos anti-inflamatórios em seu tratamento aponta que uma vez desencadeada a inflamação, o processo evolutivo da doença segue por outros caminhos. Atualmente a hipótese aceita aponta micro lesões em células epiteliais alveolares como a causa inicial de um processo inflamatório anormal que culmina no desenvolvimento da FPI (HOROWITZ; THANNICKAL, 2006; KEKEVIAN; GERSHWIN; CHANG, 2014; SGALLA et al., 2018).

Normalmente, a resposta imunológica pulmonar recruta fibroblastos para o local da lesão, tais células são estimuladas a se proliferar e se diferenciar em miofibroblastos, responsáveis pela deposição de matriz extracelular (MEC) no local da lesão a fim de conter o agente responsável. Uma vez resolvida a inflamação, os miofibroblastos sofrem apoptose, a MEC é reabsorvida e novas células epiteliais são responsáveis pela reconstituição e restauração final do tecido pulmonar (KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017; MORRIS, 2006).

Em indivíduos susceptíveis a FPI este processo se retro alimenta, fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos como TGF- $\beta$ 1, PDGF-11, PDGF12, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IL-17A continuam agindo, o recrutamento e proliferação de fibroblastos para o local da lesão é constante, o processo de transformação de fibroblastos em miofibroblastos (TFM) é potencializado, a deposição de MEC excede os níveis normais e necessários, células epiteliais adjacentes ou que seriam responsáveis pela restauração tecidual sofrem apoptose e intensificam o processo de destruição tecidual local, por fim a deposição excessiva de MEC sem sua reabsorção adequada, devido ao desbalanço na produção de metaloproteinase-7 da matriz (MMP-7), resulta na formação de tecido cicatricial e consequente diminuição da área útil pulmonar (Figura 1) (BERGERON et al., 2003; GHARAEI-KERMANI et al., 2009; KEKEVIAN; GERSHWIN; CHANG, 2014; RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017; ROACH et al., 2018; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017). Este processo ocorre simultaneamente em várias áreas da superfície pulmonar, variando de forma temporal, em nível de dano tecidual e tamanho de área afetada, criando um padrão entre áreas saudáveis e afetadas característico da FPI, a aparência de colmeia (KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017; MAHALANOBISH et al., 2020; WUYTS et al., 2013).



**Figura 1: Esquematização da resolução de lesões epiteliais pulmonares em pulmões normais e em pulmões de indivíduos suscetíveis a FPI.** As lesões podem ser causadas por diferentes fatores e são o ponto inicial para o desencadeamento da resposta inflamatória local. Durante a inflamação ocorre a morte de pneumócitos do tipo I, o recrutamento de fibroblastos para o local da lesão e a ativação de macrófagos e neutrófilos. No pulmão normal, na fase de resolução a inflamação diminui, fibroblastos se transformam em miofibroblastos, a produção de MEC é aumentada, porém controlada pela sua degradação através da produção de MMP-7. Em pacientes acometidos com FPI a inflamação persiste, pneumócitos do tipo 2 sofrem apoptose, intensificando o quadro inflamatório, fibroblastos continuam sendo recrutados e transformados em miofibroblastos, a produção de MEC é aumentada, porém a produção de MMP-7 não é suficiente para sua degradação. Na fase de restauração, no pulmão normal, os fibroblastos e miofibroblastos sofrem apoptose, a MEC é reabsorvida e novas células epiteliais são responsáveis pela regeneração tecidual. No caso da FPI, os miofibroblastos estão resistentes a apoptose a deposição de MEC juntamente com colágeno forma o tecido cicatricial e parte da área útil pulmonar é perdida nesse processo.

A dificuldade no diagnóstico da FPI impacta diretamente as taxas de incidência e prevalência desta doença. Trata-se de um processo difícil que requer uma análise multidisciplinar e acompanhamento atencioso do histórico do paciente (NALYSNYK et al., 2012; OLDHAM; NOTH, 2014).

Em 2000, visando padronizar a classificação e os métodos diagnósticos utilizados para a FPI a *American Thoracic Society* liberou diretrizes a serem seguidas pelos profissionais de saúde. Segundo tal documento, para ser diagnosticado com FPI o paciente deveria apresentar quatro fatores cruciais e pelo

menos três fatores complementares de acordo com a Tabela 1 (KEKEVIAN; GERSHWIN; CHANG, 2014; RAGHU et al., 2011a; SELMAN; KING; PARDO, 2001).

**Tabela 1: Critérios determinados pela *American Thoracic Society* para diagnóstico de FPI no ano de 2000.**

<b>Fatores cruciais</b>	<b>Fatores complementares</b>
Exclusão de causas conhecidas de doenças intersticiais pulmonares	Mais de 50 anos
Padrão restritivo na avaliação da função pulmonar e troca gasosa afetada em exercício ou repouso	Dispneia progressiva sem causa aparente
Anormalidades reticulares bi basilares em TCAR	Persistência dos sintomas por mais de três meses
Biopsia pulmonar ou LBA sem características de outras desordens	Estalar “tipo velcro” durante a inspiração

Em 2011, as normas ditadas pela *American Thoracic Society* em 2000 foram reavaliadas, os critérios baseados na presença de fatores cruciais e complementares foram descartados e substituídos por formas mais eficientes de diagnóstico para a FPI (RAGHU et al., 2011a). Baseando-se em evidências da alta eficiência e especificidade da identificação de padrões histopatológicos através de tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR), biopsias pulmonares não seriam mais indicadas como necessárias para o diagnóstico de FPI, pois acrescentam pouca informação sobre os padrões histológicos que podem ser observados, não há consenso claro sobre como e em quais áreas a biópsia deve ser obtida e a realização do procedimento apresenta em muitos casos um risco desnecessário para o paciente (FLAHERTY et al., 2003; HUNNINGHAKE et al., 2001; RAGHU et al., 2011a).

Além disso, uma das recomendações cruciais é de que se faça uma avaliação clínica completa e cuidadosa dos pacientes, considerando exames físicos, testes laboratoriais, riscos ocupacionais, histórico familiar, acompanhado da presença de padrões de pneumonia intersticial usual (PIU) em TCAR, a fim de

se diminuir a quantidade de diagnósticos errôneos para FPI e proporcionar o cuidado adequado aos pacientes acometidos (MORELL et al., 2013; RAGHU et al., 2011a; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

Deste modo, de acordo com as diretrizes revisadas pela *American Thoracic Society* em 2011, os fatores necessários para o diagnóstico da FPI incluíram: Exclusão de outras causas para doença pulmonar intersticial (DPI); padrões característicos de PIU em TCAR e quando necessário, confirmação dos padrões histológicos através da avaliação de biópsia pulmonar (FLAHERTY et al., 2004; RAGHU et al., 2011a; RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017).

Novamente em 2018 as diretrizes para o diagnóstico da FPI foram atualizadas, dividindo pacientes em três categorias:

- Pacientes com diagnóstico recente de DPI de causa aparente desconhecida e suspeita clínica de FPI;
- Pacientes com diagnóstico recente de DPI de causa aparente desconhecida, suspeita clínica de FPI e com padrão de possível PIU em TCAR, mas com diagnóstico indeterminado;
- Pacientes com diagnóstico recente de DPI de causa aparente desconhecida, suspeita clínica de FPI e com padrão de PIU em TCAR.

A revisão dos fatores de diagnóstico compreende pontos como a análise de células do lavado bronco-alveolar (LBA), necessidade de biópsia pulmonar em casos específicos, avaliação do histórico medicamentoso, avaliação de exposição a fatores de risco e sorologia para observação de biomarcadores e exclusão de doenças do tecido conjuntivo (RAGHU et al., 2018a). Além das avaliações clínicas, o diagnóstico de FPI se baseia nas informações obtidas pelos padrões observados na histologia e em TCAR de acordo com o observado na Tabela 2.

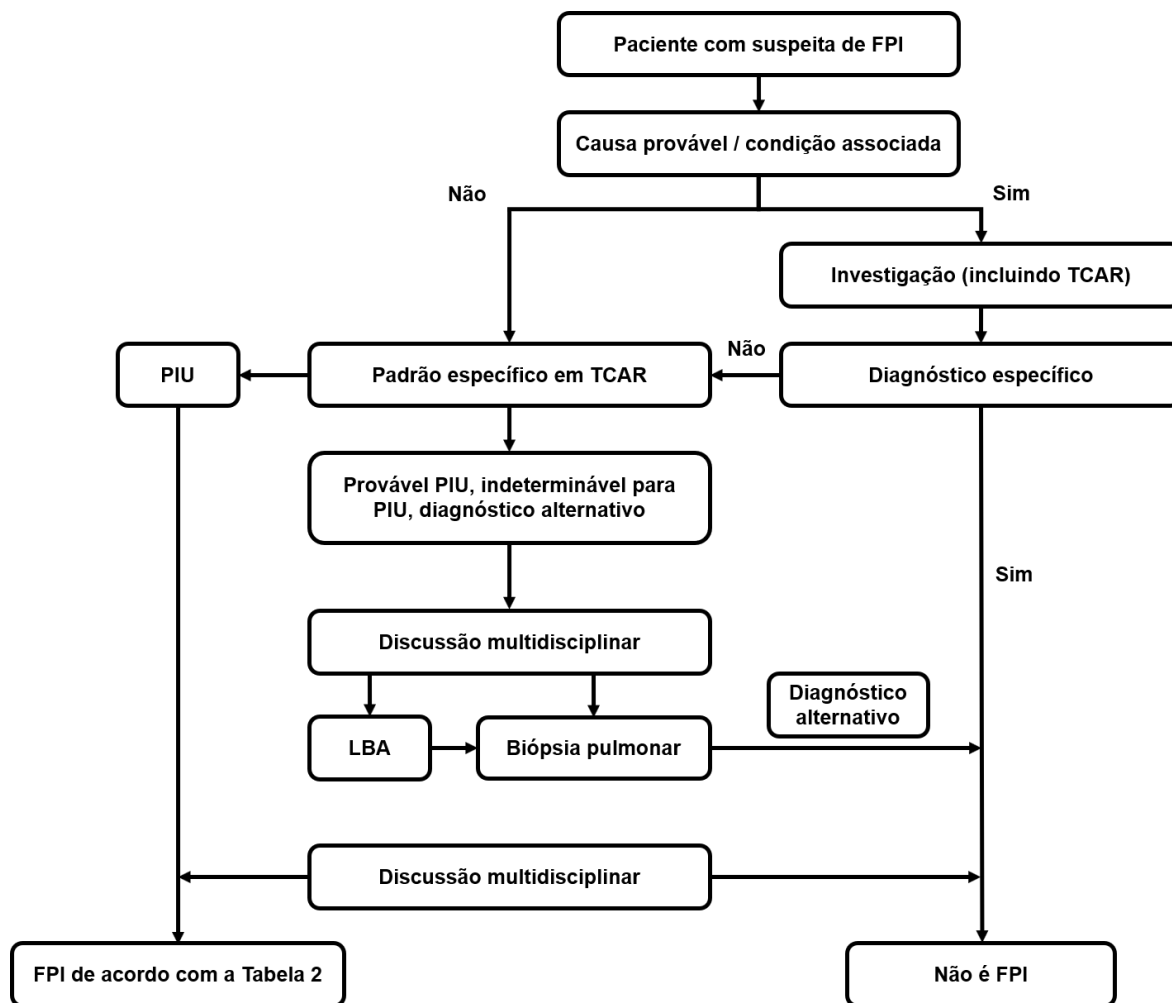


**Tabela 2: Recomendação de diagnóstico de FPI baseada na avaliação histológica de biópsias pulmonares e em padrões observados em TCAR.**

Suspeita de FPI		Padrão histológico			
		PIU	Provável PIU	Indeterminado para PIU	Diagnóstico alternativo
Padrão observado em TCAR	PIU	IPF	IPF	IPF	Não é IPF
	Provável PIU	IPF	IPF	Provável IPF	Não é IPF
	Indeterminado para PIU	IPF	Provável IPF	Indeterminado para IPF	Não é IPF
	Diagnóstico alternativo	Provável IPF	Não é IPF	Não é IPF	Não é IPF

Adaptado de (RAGHU et al., 2018b).

Com as alterações sugeridas em 2018 pela *American Thoracic Society*, o diagnóstico de FPI agora exige principalmente a exclusão de outras causas conhecidas de DPI, presença de padrões específicos de PIU em TCAR e/ou identificação de padrões específicos em TCAR e amostras histológicas em pacientes submetidos a biópsia pulmonar (RAGHU et al., 2018a). Ainda com o objetivo de esclarecer a metodologia recomendada para o diagnóstico de FPI, a *American Thoracic Society*, desenvolveu um organograma ilustrativo que aborda o passo a passo deste procedimento (Figura 2).



**Figura 2: Organograma para diagnóstico de FPI.** Este modelo destaca a necessidade de avaliações multidisciplinares e do estudo do histórico do paciente a fim de decidir o melhor curso para o diagnóstico e de diminuir a quantidade de diagnósticos errôneos, possibilitando uma intervenção clínica mais rápida. Adaptado de (RAGHU et al., 2018b).

Além disso, como a presença de padrões associados a PIU em TCAR não são exclusividade da FPI, é importante ressaltar a necessidade de avaliações multidisciplinares por parte dos agentes de saúde a fim de avaliar melhor o histórico do paciente, bem como a realização de testes sorológicos ou biópsia pulmonar em casos onde se julgar necessário (OLDHAM; NOTH, 2014; RAGHU; RICHELDI, 2017; RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

A ausência de medicamentos que permitam a cura ou reversão do quadro de perda progressiva de função pulmonar ressaltam a importância de um diagnóstico rápido da FPI, a fim de promover um maior tempo de sobrevida dos pacientes.

Tratada por muito tempo como uma doença de caráter inflamatório, pacientes diagnosticados com FPI eram tratados com glicocorticoides, corticosteroides e imunossupressores, em tratamentos isolados ou combinados, mesmo sem evidências científicas sobre a eficiência de tais tratamentos, com o intuito de diminuir a inflamação pulmonar e a proliferação de fibroblastos. O tratamento mais aceito era realizado pela administração de prednisolona, azatioprina e N-acetilcisteína, que recebia o nome de terapia tripla. Entretanto, tal terapia foi descontinuada após testes clínicos comprovarem a ineficácia do tratamento, bem como o aumento do número de óbitos e hospitalizações de pacientes tratados com esta terapia, frente a pacientes tratados com placebo (BADDINI-MARTINEZ et al., 2015; RAGHU; RICHELDI, 2017; WELLS et al., 2012; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

Atualmente, duas drogas com potencial antifibrótico são utilizadas para o tratamento da FPI, a pirfenidona (Esbriet®, Roche) e o nintedanib (Ofev®, Boehringer Ingelheim), ambas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2014. A utilização tanto de pirfenidona quanto de nintedanib, demonstrou eficácia no retardamento da evolução do quadro fibrótico, na diminuição da perda de função pulmonar e na capacidade de prolongar a sobrevida dos pacientes (AZUMA et al., 2005; MOLINA-MOLINA, 2019; ROGLIANI et al., 2016; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

Liberada para uso no tratamento de FPI no Japão em 2008, na Europa em 2011, no Canadá em 2012, nos Estados Unidos em 2014 e posteriormente recomendada como tratamento efetivo segundo as diretrizes da *American Thoracic Society*, a pirfenidona apresenta propriedades antifibróticas e anti-inflamatórias. Os mecanismos exatos de atuação da pirfenidona ainda não estão completamente elucidados, entretanto seu efeito anti-inflamatório é associado a sua capacidade diminuir os níveis de expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-12; enquanto que sua atividade antifibrótica está relacionada a sua capacidade de regular e reduzir a expressão e TGF- $\beta$ , PDGF, colágeno e a proliferação exacerbada de fibroblastos (KIM; KEATING, 2015; MOLINA-MOLINA, 2019; MOLINA-MOLINA et al., 2018; ROBALO-CORDEIRO et al., 2017; ZHU et al., 2020). Atualmente a posologia recomendada para o uso da pirfenidona é de três capsulas por dia durante sete

dias (801 mg/dia), aumentando para seis capsulas por dia (1602 mg/dia) nos próximos sete dias e por fim aumentando e mantendo a dose para nove capsulas diárias (2403 mg/dia), sendo recomendado a ingestão das capsulas juntamente com alimentos. A pirfenidona pode causar alguns efeitos colaterais como dispneia, náusea, anorexia, irritação cutânea, fotosensibilidade e em alguns casos problemas hepáticos, entretanto tais complicações são em sua maioria brandas e podem ser tratadas facilmente (KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017; MOLINA-MOLINA, 2019).

Por sua vez, o nintedanib foi aprovado em 2014 pela FDA e desde então é também utilizado no tratamento da FPI. Trata-se de um inibidor de tirosina-quinase e de receptores de fatores de crescimento (PDGF, FGF e VEGF). Apesar de seus mecanismos de ação também não estarem completamente elucidados, entende-se que o nintedanib é capaz de inibir processos chave relacionados a progressão da FPI, tais como a proliferação e migração de fibroblastos e sua transformação em miofibroblastos, mediada por TGF- $\beta$ . (KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017; LEHTONEN et al., 2016; ROBALO-CORDEIRO et al., 2017; SATO et al., 2017; ZHU et al., 2020). Além de inibir o desencadeamento de processos relacionados a evolução da doença, alguns estudos demonstraram que o nintedanib também foi capaz de afetar a deposição de colágeno mediada por TGF- $\beta$  e induzir o aumento da expressão de matriz metaloproteinase-2 afetando de maneira positiva a reabsorção de MEC (K. et al., 2017; WOLLIN et al., 2015). Assim como a pirfenidona, o nintedanib apresenta efeitos anti-inflamatórios, associados a diminuição do recrutamento de neutrófilos e linfócitos para o sítio da inflamação, redução da expressão de citocinas inflamatórias e diminuição de inflamação tecidual em análises histológicas (KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017; WOLLIN et al., 2014). A recomendação de tratamento para o nintedanib é de duas capsulas de 150 mg, diariamente, a cada 12 horas, tomadas com água e alimentos. Os efeitos colaterais mais comuns incluem diarreia, náusea, dor abdominal e aumento de enzimas hepáticas (FUKIHARA; KONDOH, 2016; MOLINA-MOLINA, 2019).

Outros tratamentos indicados para combater os efeitos da FPI incluem utilização de oxigênio, para auxiliar os pacientes na perda da função pulmonar, sendo indicado para pacientes com saturação de oxigênio arterial  $\leq 88\%$  em repouso; reabilitação pulmonar, eficiente nos estágios iniciais da doença; e

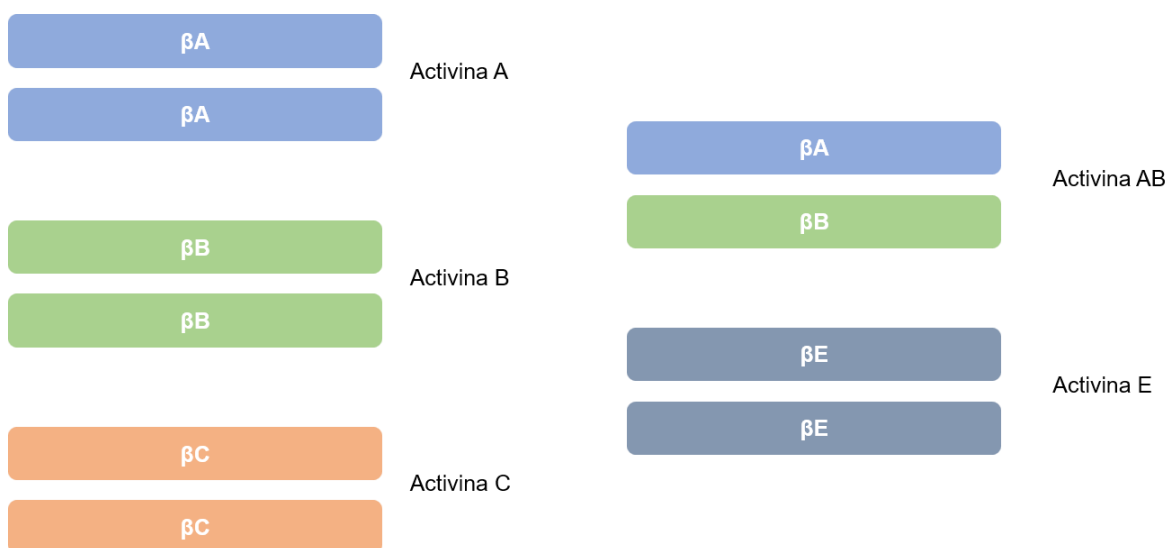
transplante pulmonar, que é o único tratamento disponível para a fase avançada da doença e indicado para pacientes que apresentem declínio de capacidade de força vital maior do que 10% nos últimos seis meses e saturação de oxigênio arterial  $\leq$  88% no teste de caminhada de seis minutos (SGALLA et al., 2018; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017).

Outras drogas estão continuamente sendo desenvolvidas e testadas a fim de suprir a necessidade dos pacientes de FPI, entretanto nenhuma candidata se mostrou tão eficaz até o momento como os medicamentos já utilizados. Mesmo assim, os efeitos da FPI são inevitáveis e o que pode ser feito é retardar a evolução da doença a fim de proporcionar uma melhor qualidade de sobrevida para os pacientes acometidos. Por este motivo é importante que o diagnóstico seja feito o quanto antes e que o tratamento seja iniciado imediatamente após o diagnóstico. Além disso, no caso do Brasil, os medicamentos utilizados são em grande parte fornecidos pela União, mediante Ministério Público e devido ao seu elevado custo, a liberação e distribuição para cada paciente é avaliada individualmente em um processo burocrático, que pode muitas vezes atrasar em meses o início do tratamento (BALDI, 2017; KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017; MOLINA-MOLINA, 2019; RAGHU; RICHELDI, 2017; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017). Nesse contexto, é importante ressaltarmos a necessidade da busca de novas moléculas que sejam capazes de retardar e principalmente reverter os efeitos da FPI, agindo em vias já conhecidas e relacionadas a progressão da doença, seja no desencadeamento da resposta inflamatória inicial, na inibição da proliferação e transformação dos fibroblastos ou na degradação e reabsorção da matriz extracelular.

## **1.2. Activina A**

Identificadas e descritas inicialmente em 1988 por sua capacidade de promover a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH), as activinas são citocinas pleiotrópicas, pertencentes a superfamília do TGF- $\beta$ . Tratam-se de proteínas diméricas e em mamíferos, de acordo com a composição de suas subunidades, temos as formas activina A ( $\beta$ A/ $\beta$ A), activina B ( $\beta$ B/ $\beta$ B), activina AB ( $\beta$ A/ $\beta$ B),

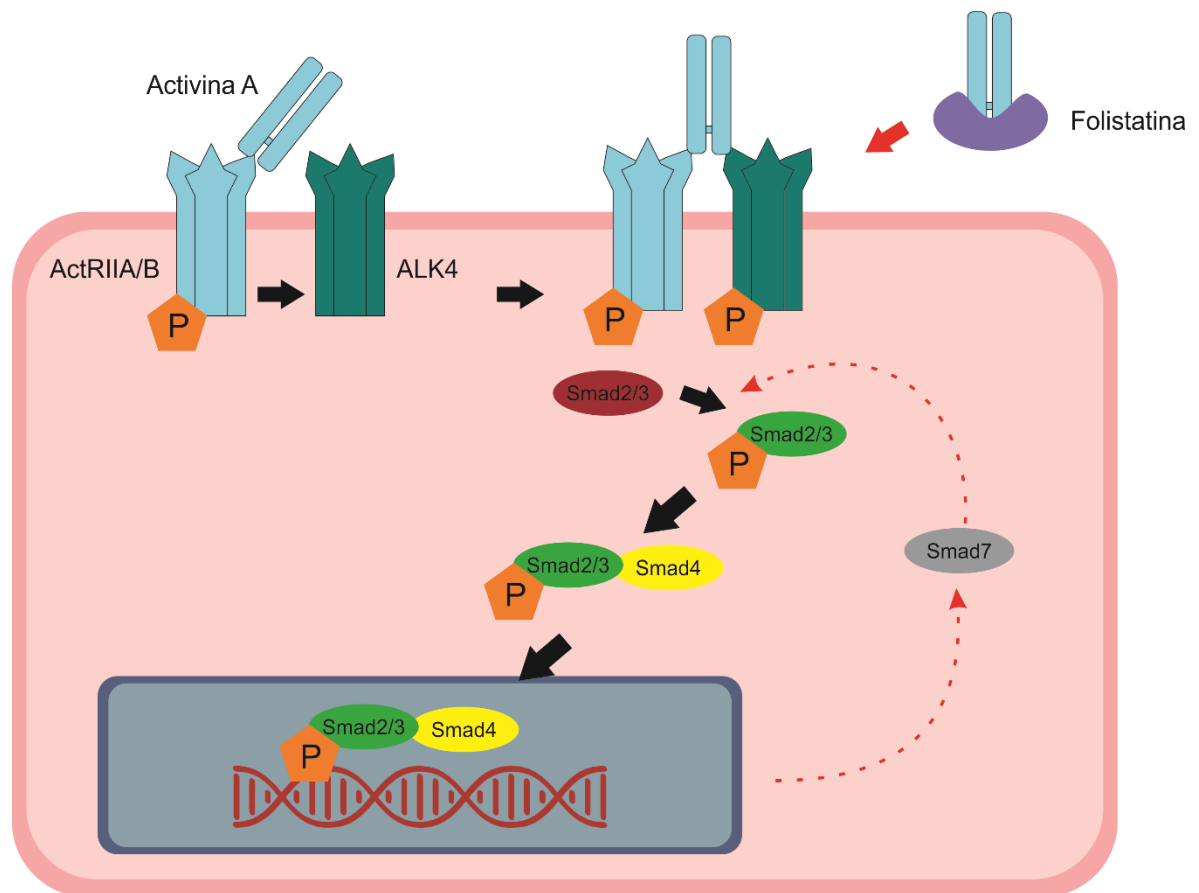
activina C ( $\beta C/\beta C$ ) e activina E ( $\beta E/\beta E$ ) (Figura 3) (BLOISE et al., 2019; HEDGER et al., 2011; MORIANOS et al., 2019; PETRAGLIA; VAUGHAN; VALE, 1989).



**Figura 3: Descrição dos diferentes tipos de activinas de acordo com suas subunidades.**

Dentre as activinas, a activina A é a isoforma mais importante em vertebrados, apresentando cerca de 95% de homologia entre as espécies, sendo a mais estudada e identificada em diferentes tecidos. A activina A apresenta grande importância biológica relacionada principalmente a embriogénese, diferenciação celular, neuroproteção, inflamação, desenvolvimento ovariano e uterino, miogénese, formação óssea, reparação tecidual, regulação de células tronco, pluripotência, hematopoese e fibrose (BLOISE et al., 2019; CHEN; TEN DIJKE, 2016; MORIANOS et al., 2019; SOZZANI; MUSSO, 2011). A atuação da activina A se dá inicialmente através de sua ligação com a porção extracelular de receptores transmembranares do tipo serina/treonina quinase (ActRIIA e ActRIIB), a partir da ligação inicial a conformação estrutural resultante da activina A permite sua ligação a receptores do tipo I (ALK4). A formação deste complexo desencadeia a fosforilação da porção intracelular destes receptores, que por sua vez promove a fosforilação das proteínas Smad2 e Smad3 e a incorporação da Smad4 neste complexo. Por fim o complexo Smad2/3/4 é direcionado para o núcleo onde irá atuar na regulação da expressão gênica. Este processo promove também a produção de Smad7, que irá regular de forma negativa o processo de fosforilação das proteínas Smad2 e Smad3, mantendo todo este processo sob controle (Figura

4) (BLOISE et al., 2019; HEDGER et al., 2011; NAGARAJAN et al., 1999; WERNER; ALZHEIMER, 2006).



**Figura 4: Mecanismo de sinalização da Activina A.** A partir da ligação da activina A com o receptor ActRIIA/B a fosforilação do receptor e a alteração da conformação da activina A permite sua ligação ao receptor ALK4, que por sua vez é também fosforilado. Este processo desencadeia a sinalização por proteínas Smad que afetarão a expressão de fatores inflamatórios, todo o processo é regulado pela expressão de Smad7 em um *feedback* negativo. Além disso a produção de folistatina auxilia na regulação, inibindo a ligação da activina A aos receptores celulares. Adaptado de (BLOISE et al., 2019).

Sendo uma molécula pleiotrópica, as ações da activina A em cenários inflamatórios pode divergir entre pró e anti-inflamatórias, a depender do órgão e da doença envolvida. Estudos demonstraram níveis elevados de activina A em doenças de caráter inflamatório, como em doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide e em casos de sepse bacteriana. Além disso, a resposta da activina A frente a inflamação é rápida e capaz de desencadear a liberação de outros fatores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , além de estimular a produção de óxido nítrico sintase (APOSTOLOU et al., 2012; D.J.; D.M.; M.P., 2009; HEDGER et al., 2011; NÜSING; BARSIG, 1999; SOZZANI; MUSSO, 2011). Por outro lado, atividades anti-inflamatórias também podem ser atribuídas a ação da activina A,

tais como indução da secreção de antagonistas de receptores de IL-1, maturação de células dendríticas, inibição da formação de células espumosas em casos de arteriosclerose, regulação negativa da produção de IFN- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 (APOSTOLOU et al., 2012; SEGERER et al., 2008; SOZZANI; MUSSO, 2011; WANG et al., 2008).

No que diz respeito a fisiologia pulmonar, a activina A está relacionada a resposta imunológica e ao processo de reparo tecidual, agindo como um mediador da inflamação no tecido pulmonar. Altos níveis de activina A podem ser responsáveis por casos de severidade em doenças pulmonares, bem como pelo desenvolvimento de padrões fibrosantes. Em modelos animais de doenças inflamatórias pulmonares, a activina A é capaz de gerar um quadro pró-inflamatório e pró-fibrótico, induzindo a produção de IL-6, IL-13, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, endotelina, angiotensina, trombina, aumentar a produção de MEC, do fator de crescimento do tecido conjuntivo, de colágeno tipo I e do inibidor tecidual de metaloproteinase-1, além de estimular a proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos (APOSTOLOU et al., 2012; BLOISE et al., 2019; HARDY et al., 2015; HEDGER et al., 2011; OHGA et al., 2000; SULYOK et al., 2004).

No caso da FPI, bem como de outras doenças de carácter fibrosante, um dos principais fatores ligados ao desenvolvimento da doença é a proliferação excessiva de fibroblastos, bem como sua transformação em miofibroblastos. Processos estes que podem ser afetados pela ação da activina A, sendo que seu desbalanço ou a ineficiência da sua inibição pela folistatina agravam o quadro dos pacientes (FUMAGALLI et al., 2007; WERNER; ALZHEIMER, 2006; WIETECHTA et al., 2020). Evidências da ação da activina A no desenvolvimento de doenças fibrosantes demonstram que esta molécula possui um papel central na cascata de reparo tecidual e que devido ao seu carácter pleiotrópico sua regulação é altamente delicada, dependendo de um *feedback* negativo através da Smad7 ou de sua inibição direta pela folistatina. Este conjunto de fatores tornam a activina A um alvo potencial para o tratamento de doenças fibrosantes, sendo que vários estudos já demonstraram a eficiência tanto da inibição dos receptores ActRIIA e ActRIIB quanto da utilização de folistatina, a fim de inibir a ação da activina A e reduzir a



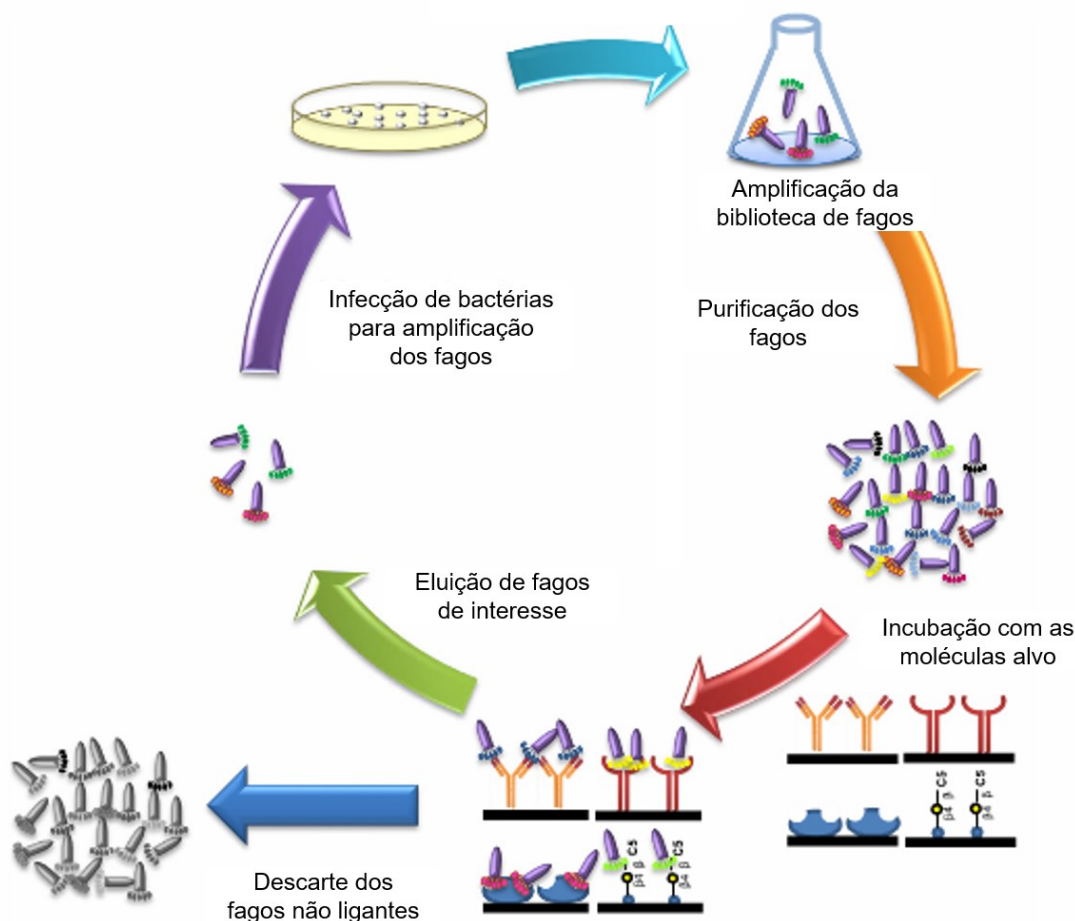
progressão de eventos inflamatórios e fibrosantes (BLOISE et al., 2019; HEDGER et al., 2011; OHGA et al., 1996; ZHANG et al., 2019). Entretanto, até o momento nenhum tratamento para FPI utilizando activina A como alvo foi desenvolvido.

### **1.3. Desenvolvimento de peptídeos recombinantes terapêuticos**

A maioria das reações biológicas são feitas através da ligação de moléculas a receptores específicos. Esse tipo de ação é vastamente explorado no desenvolvimento de medicamentos, onde o objetivo de uma droga pode ser se ligar a molécula alvo e impedir sua ligação a um receptor, ou agir como um competidor, se ligando ao receptor e impedindo a ligação de uma molécula específica (MOHS; GREIG, 2017; MOLEK; STRUKELJ; BRATKOVIC, 2011). A utilização de peptídeos como agentes terapêuticos recebe muita atenção, graças a sua diversidade estrutural, tamanho reduzido, alta especificidade de ligação e pela facilidade e baixo custo de sua síntese química (DIETRICH; DÜRR; KOCH, 2013; ZAMBRANO-MILA; SÁNCHEZ BLACIO; SANTIAGO VISPO, 2019). Além disso, utilizando a tecnologia de *phage display*, descrita por Smith em 1985, é possível selecionar peptídeos específicos, capazes de se ligarem com alta afinidade aos mais variados alvos, tais como compostos inorgânicos, moléculas pequenas, polímeros naturais, nanoestruturas, células, bactérias, tecidos, receptores de membrana, proteínas ou enzimas (LIEN; LOWMAN, 2003; SMITH, 1985; TAN et al., 2016; WU et al., 2016; ZAMBRANO-MILA; SÁNCHEZ BLACIO; SANTIAGO VISPO, 2019).

Basicamente, a técnica de *phage display* é uma técnica de seleção, onde uma biblioteca de fagos que expressam diferentes peptídeos nas proteínas de seu capsídeo viral é utilizada para selecionar peptídeos ligantes a alvos específicos (MIMMI et al., 2019; WU et al., 2016). Nesta técnica, fragmentos randômicos de DNA exógeno são inseridos no genoma de bacteriófagos M13, de modo que quando transcritos e traduzidos, os peptídeos resultantes são expressos fusionados as proteínas pIII ou pVIII dos fagos, sendo que cada fago é responsável por expressar uma sequência diferente, formando uma biblioteca de fagos. Esta biblioteca pode então ser utilizada para selecionar peptídeos contra os mais variados alvos, através da ligação específica dos peptídeos expressos nos fagos. E como a relação entre a sequência de DNA e os peptídeos expressos é direta, o

sequenciamento do DNA do fago permite a elucidação da sequência do peptídeo e sua síntese química (Figura 5) (DIETRICH; DÜRR; KOCH, 2013; MIMMI et al., 2019; WU et al., 2016).



**Figura 5: Esquemática das etapas de seleção por Phage display.** O processo de seleção utiliza uma molécula alvo onde os peptídeos expressos nas proteínas dos capsídeos virais se ligam e são selecionados através de ciclos de lavagem e eluição. Os fagos que permanecem ligados a molécula alvo são amplificados e utilizados em ciclos subsequentes a fim de aumentar a especificidade. Ao fim do processo fagos altamente específicos e ligantes a molécula alvo são obtidos e podem ser sequenciados para obtenção dos peptídeos. Adaptado de (WU et al., 2016).

O fato de proporcionar a seleção de peptídeos ligantes a alvos altamente específicos, torna a tecnologia de phage display uma ferramenta impar na descoberta e no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas. Além disso, a facilidade, o baixo custo e a possibilidade de edição dos peptídeos selecionados dão ainda mais força a uma técnica já bem descrita e amplamente aplicada pela indústria farmacêutica (DIETRICH; DÜRR; KOCH, 2013; MIMMI et al., 2019; WU et al., 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

- Desenvolver e avaliar a atividade inibitória de peptídeos ligantes a activina A.
- Avaliar os efeitos da inibição da activina A sobre a transformação de fibroblastos em miofibroblastos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Selecionar através da técnica de *phage display*, peptídeos ligantes a activina A;
- Avaliar a reatividade e especificidade dos peptídeos selecionados frente a activina A purificada;
- Realizar a caracterização *in silico* dos peptídeos selecionados;
- Avaliar os efeitos de citotoxicidade dos peptídeos selecionados;
- Avaliar *in vitro* os possíveis efeitos dos peptídeos selecionados frente as alterações celulares relacionada a progressão da FPI;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Reagentes e linhagens celulares**

A biblioteca de fagos M13 e as alíquotas da bactéria *Escherichia coli* ER2738 eram parte do *PhD-7mer phage display peptide library Kit* (New England Biolabs Inc. - Ipswich, MA, USA). Activina A humana recombinante (Cat# 592006) e o anticorpo anti-Activina A (Cat# 693603) foram adquiridos da BioLegend (San Diego, CA, USA). Para ensaios de cultura celular foram utilizadas células A549 (ATCC® CCL-185™) e fibroblastos humanos provenientes de cultura primária de amostras coletadas no Centro Cirúrgico da Universidade Federal de Uberlândia, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número parecer 0932/2015 e assinatura do termo de consentimento pelos pacientes.

#### **3.2. Seleção de peptídeos com potencial atividade inibidora de activina A**

##### **3.2.1. Phage display**

A fim de selecionar peptídeos com alta capacidade de ligação a activina A foi utilizada a biblioteca randômica de peptídeos de sete aminoácidos, *PhD-7mer phage display peptide library Kit* (New England Biolabs Inc. - Ipswich, MA, USA). O procedimento de seleção dos peptídeos foi realizado conforme descrito pelo fabricante e por Barbas et al. (BATZER, 2001), com as alterações necessárias. Um poço de uma placa de 96 poços de alta afinidade (Greiner Bio-One) foi sensibilizado *overnight* a 4°C com 100 µL de activina A (10 µg/mL), diluída em 0,1 M de tampão bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6). Moléculas de activina A que não se ligaram ao poço foram removidas através de duas etapas de lavagem com PBS 1X (137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2,7 mM KCl, e pH 7,4). Após a sensibilização o poço foi bloqueado por uma hora a temperatura ambiente e sob agitação de 200 rpm, com 300 µL de solução de bloqueio (5% w/v BSA em PBS 1X). Em seguida o poço passou por seis passos de lavagem com 200 µL de PBS-T 0,05% (137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2,7 mM KCl, Tween 0.05% e pH 7,4). Em seguida 10 µL da biblioteca de fagos (~1x10<sup>11</sup> fagos), diluídos em 90 µL de o PBS-T 0.05% foram adicionados ao poço sensibilizado com activina A. O processo de incubação se deu por uma hora a

temperatura ambiente e sob agitação de 200 rpm. Fagos que não se ligaram foram removidos durante 10 etapas de lavagem com PBS-T 0.05% (300 µL/poço).

A fim de selecionar fagos que apresentavam ligação específica a porção da activina A reconhecida pelo receptor celular ActRII, foi realizada eluição competitiva com 100 µL (0.1 µg/µL), de anticorpo monoclonal e neutralizante anti-activina A, por uma hora, a temperatura ambiente e sob agitação de 200 rpm. Os fagos eluidos foram inoculados em cultura líquida de *E. coli* ER2738 na fase logarítmica de crescimento para amplificação.

### **3.2.2. Amplificação dos fagos selecionados**

Após cada etapa de seleção, os fagos eluidos foram amplificados. Para amplificação, foram preparados 20 mL de meio Luria Bertani (LB), acrescido de tetraciclina e inoculado com uma colônia isolada de *Escherichia coli*, linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação de 250 rpm e 37°C até atingir a fase *early-log* (densidade óptica-DO<sub>600</sub> ~ 0,3). Após atingir a densidade óptica desejada, a cultura bacteriana foi inoculada com 80 µL do eluato obtido na etapa de seleção e incubada por 5 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm. Ao fim da incubação o meio de cultura foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi coletado e uma solução de PEG/NaCl na proporção de 1/6 v/v foi adicionada ao sobrenadante para precipitação dos fagos. A mistura foi mantida a 4°C *overnight*. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 4°C e 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuscitado em 1 mL de PBS 1X. Em seguida, 1/6 v/v de PEG/NaCl foi novamente adicionado e a amostra foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C para garantir que todas as células bacterianas fossem removidas. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 200 µL de PBS 1X e utilizado para o próximo *round* de seleção. O procedimento de seleção foi repetido por três vezes. Titulações foram realizadas ao fim e ao início de cada *round* para avaliação do grau de seleção.

### **3.2.3. Titulação dos fagos**

O processo de titulação é necessário para verificação da quantidade inicial e final de partículas virais em cada passo de seleção. A titulação foi realizada

conforme descrito por Barbas et al., (BATZER, 2001), com as modificações necessárias. Ao fim de cada round de seleção, foram preparadas diluições seriadas ( $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ ) do eluato, utilizando-se 1  $\mu$ L de eluato e 9  $\mu$ L de meio LB. Para a titulação do eluato dos *rounds* amplificados foram utilizadas as diluições de  $10^{-7}$  até  $10^{-10}$ , enquanto que para o eluato dos *rounds* não amplificados foram utilizadas as diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-4}$ . Para preparação das placas de titulação, alíquotas de 1  $\mu$ L das diluições foram adicionadas a 200  $\mu$ L de cultura de *E. coli* ER2738 na fase *early log* (OD<sub>600</sub> ~0,5) e incubadas por cinco minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 3 mL de agarose top Top (210 mg de agarose, 600 mg de LB, 30 mg MgCl<sub>2</sub>) a 45°C e a mistura foi espalhada sobre placas de petri previamente preparadas com meio LB sólido, IPTG/X-Gal e tetraciclina. As placas foram incubadas a 37°C *overnight*. A presença de colônias com a coloração azul confirma a quebra do substrato X-Gal e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase pelos fagos. As colônias azuis contadas foram multiplicadas pelo fator de diluição de cada placa de acordo com a seguinte equação, unidades formadoras de colônia (ufc/mL) = número de colônias x 100/fator de diluição.

#### 3.2.4. Amplificação e purificação dos fagos selecionados

Ao fim do terceiro round de seleção e após a titulação do eluato do *round* não amplificado, foi realizada amplificação individual das colônias selecionadas. Cada colônia foi inoculada em 1,2 mL de cultura de bactérias *E. coli* ER2738 em meio LB/tetraciclina e OD<sub>600</sub> ~0,3, devidamente acondicionados em um poço de uma placa *deepwell* de 96 poços. A placa foi selada e incubada *overnight* a 37°C e sob agitação se 250 rpm. Após a incubação, uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada colônia amplificada foi transferida para uma placa de micro titulação (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), foram adicionados 150  $\mu$ L de glicerol 50%, a placa foi selada e estocada a -20°C para a criação de um *backup* da seleção.

Após a retiradas das alíquotas para *backup*, a placa *deepwell* foi centrifugada por 20 min a 3.700 rpm e seu sobrenadante transferido para outra *deepwell*. Este sobrenadante foi utilizado em um teste ELISA para verificação preliminar da eficiência da seleção dos clones e para a extração de DNA dos fagos para posterior sequenciamento.

### 3.2.5. Pré-validação da seleção por *phage*-ELISA

A fim de identificar fagos com maior potencial de ligação a molécula de activina A, dentre os clones selecionados, foi realizado um teste ELISA. Basicamente, uma placa de 96 poços de alta afinidade foi sensibilizadas com activina A na concentração de 100 ng/poço, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M (pH 9,6) e incubada *overnight* a 4°C em câmara úmida. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e a placa bloqueada por uma hora a temperatura ambiente e sob agitação de 200 rpm, com PBS-BSA 5% (270 µL/poço). Após o bloqueio, o sobrenadante foi descartado e a placa passou por duas etapas de lavagem com PBS 1X. Na sequência, 100 µL do sobrenadante contendo os fagos foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por uma hora a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Após a incubação o sobrenadante foi descartado e a placa passou por seis etapas de lavagem com PBS-T 0,1%. Em seguida, 100 µL de anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, Holanda) na diluição 1:5000 em PBS-BSA 5% foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por uma hora a 37°C, agitação de 200 rpm e protegida da luz. Por fim, o sobrenadante foi descartado, a placa passou novamente por mais seis etapas de lavagem com PBS-T 0,1% e a revelação da reação foi realizada com TMB (BD Biosciences, San Jose, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi mantida por aproximadamente 10 minutos protegida da luz e interrompida com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2M. O ensaio foi realizado em duplicata e a densidade óptica (DO) foi obtida em leitora de microplacas (TP Reader, Thermo Plate, Brasil) a 492 nm. Os resultados foram todos expressos graficamente pela média das DO. O *cut-off* foi determinado pela soma das absorbâncias do controle negativo, mais duas vezes o desvio padrão e o índice ELISA pela divisão das médias de absorbâncias de cada clone pelo *cut-off*. Para extração de DNA e posterior sequenciamento foram selecionadas amostras que apresentaram índice ELISA maior do que dois.

### 3.2.6. Extração de DNA dos fagos

Para a extração do DNA dos fagos, 24 clones que apresentaram índice ELISA maior do que dois foram amplificados e purificados como descrito no item

1.2.4. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para uma nova placa *deepwell*, 200 µL de PEG/NaCl foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Na sequência, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* ressuspendido vigorosamente em 100 µL de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI). Em seguida, para precipitação do DNA dos fagos, 250 µL de etanol absoluto foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por 10 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm por 40 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 400 µL de etanol 70% e a placa foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi centrifugada por 40 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20 µL de água estéril. A qualidade do DNA obtido foi verificada em gel de agarose 0,8% e a quantificação do DNA foi realizada no aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

### **3.2.7. Sequenciamento dos clones selecionados**

O sequenciamento foi realizado pela empresa especializada Myleus Biotecnologia. As amostras foram acondicionadas e enviadas de acordo com suas instruções. As amostras foram preparadas contendo de 100 a 130 ng de DNA, 1 µL (5 pmol) de primer gIII (5' -OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - New England BioLabs Inc, Ipswich, EUA) e diluídas em tampão TE (TRIS HCl pH 8,0 10 mM, EDTA pH 8,0 1M) q.s.p. 7,5 µL.

### **3.2.8. Análise das sequências por bioinformática**

As sequências obtidas foram analisadas e traduzidas em aminoácidos utilizando o software *ExPASy Translate*, disponível em (<http://web.expasy.org/translate/>). Para predição e visualização das estruturas tridimensionais dos peptídeos selecionados foram utilizados os softwares Pep-fold3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) e Pymol (<https://pymol.org/2/>). Para verificação de interações entre os peptídeos, a activina A, o receptor ActRIII e a folistatina, utilizamos o software Galaxy Pepdock (<http://galaxy.seoklab.org/>).



### 3.2.9. Avaliação das sequências e síntese dos peptídeos

Após a avaliação das sequências de DNA selecionadas, os clones com potencial atividade inibitória para activina A foram novamente avaliados em um ensaio de ELISA, a fim de selecionar sequências específicas para a síntese. Os clones, **A7, A8, D8, F8, G8, B9, E10, F10, G10** e **D12** foram amplificados, purificados e quantificados previamente a realização do ensaio ELISA. Fagos selvagens foram utilizados como controle negativo e o ensaio foi realizado em triplicata. Os passos de amplificação e purificação foram realizados como descritos anteriormente. O processo de quantificação serviu para padronizar a quantidade de fagos em cada poço e se deu da seguinte maneira. Alíquotas de cada um dos fagos purificados (10 µL) foram diluídas em 990 µL de PBS 1X estéril, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro através da razão de dois comprimentos de onda (269/320 nm), PBS 1X foi utilizado como branco e a quantificação foi calculada pela fórmula:

$$\frac{Fago}{\mu L} = [(A_{269} - A_{320}) * 6 * 10^{11}] / 0,7222$$

Para o teste ELISA foram utilizados  $1 \times 10^{10}$  fagos por poço. Apenas os fagos que apresentaram melhor reatividade tiveram suas sequências de aminoácidos sintetizadas. Os peptídeos com melhor desempenho foram sintetizados pela empresa Genscript (GenScript, Piscataway, NJ). As sequências sintetizadas apresentaram a seguinte estrutura:

**Tabela 3: Estrutura dos peptídeos sintetizados.**

<b>Peptídeo</b>	<b>Estrutura</b>
A7-BIOTIN	<b>ACPTPLAWLCGGGSAETVES{LYS(BIOTIN)}</b>
B9-BIOTIN	<b>ACPRDLLWLCGGGSAETVES{LYS(BIOTIN)}</b>
E10-BIOTN	<b>ACPPTLHWLCGGGSAETVES{LYS(BIOTIN)}</b>
A7-PEG	<b>ACPTPLAWLCGGGSAETVESK{PEG2}</b>
B9-PEG	<b>ACPRDLLWLCGGGSAETVESK{PEG2}</b>
E10-PEG	<b>ACPPTLHWLCGGGSAETVESK{PEG2}</b>

Em negrito a sequência particular de cada peptídeo. Duas versões de cada peptídeo foram sintetizadas, uma com biotina para testes de ligação e uma com PEG2 para ensaios em cultura celular.

### 3.3. Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade dos peptídeos, foi realizado o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio). Células da linhagem celular A549 foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células por poço) em 100  $\mu$ L de meio DMEM de alta glicose com 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação o meio foi removido e foram adicionados 100  $\mu$ L de meio DMEM de alta glicose, incompleto e com os peptídeos a serem avaliados (A7, B9 e E10), nas concentrações 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. As placas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, por 24, 48 e 72 horas, na presença e na ausência de peptídeo mimético a TGF- $\beta$  (pmTGF- $\beta$ ) (1 ng/mL). Ao fim de cada período de incubação o meio com o tratamento foi removido e 90  $\mu$ L de meio DMEM de alta glicose, incompleto, com 10  $\mu$ L MTT (5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e as placas incubadas novamente por 4 horas. A seguir, 50  $\mu$ L de solução de dimetilformamida (20% SDS em 50% dimetilformamida) foi adicionada a placa para solubilização dos cristais, a placa foi incubada a 37°C *overnight*. A leitura da absorbância foi feita a 592 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \left( \frac{OD_{células\ tratadas}}{OD_{células\ não\ tratadas}} \right) * 100$$

Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4. Ensaios em cultura celular

Para ensaios envolvendo culturas celulares foram utilizadas as linhagens A549 (ATCC® CCL-185™), bem como células derivadas da cultura primária de fibroblastos isolados de doadores saudáveis. As células foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Além desses suplementos também foram adicionados aos meios 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Quando utilizadas, as linhagens foram cultivadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência, quando foram então tripsinizadas e plaqueadas para posteriores ensaios. Durante o cultivo os meios de cultura foram trocados a cada três dias.

#### 3.4.1. Avaliação de migração celular

Células A549 foram semeadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço e cultivadas em placas de 24 poços até atingirem 80% de confluência. Após atingir a confluência desejada, foi realizado um *scratch* na monocamada de células com uma ponteira (p200) estéril e os poços foram lavados duas vezes para retirada das células suspensas. Em seguida, foi adicionado 500  $\mu$ l de meio DMEN de alta glicose, incompleto e com os peptídeos nas concentrações de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, com ou sem a adição de pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL). A migração celular foi monitorada por microscopia, e as imagens foram fotografadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas. A quantificação da migração celular foi feita através do cálculo de área ocupada utilizando o *software Image J*. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 3.4.2. Transição fibroblastos-miofibroblastos

Para avaliar a transição de fibroblastos em miofibroblastos, fibroblastos primários de pacientes saudáveis foram plaqueados (2.500 células/poço) em uma placada de 96 poços. As células foram mantidas em condições normais de cultura celular por quatro dias (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, SFB 10%), com troca de meio a cada dois dias. Ao quarto dia, o meio foi trocado e as células foram tratadas com 1  $\mu$ M de pmTGF- $\beta$  em meio incompleto juntamente com o peptídeo E10, nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu$ M. As células foram novamente incubadas por 24 horas em condições normais de cultura. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X por cinco minutos a cada lavagem. As células foram então fixadas com formaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, permeabilizadas com metanol gelado 100% por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS 1X. As células foram então bloqueadas com PBS-BSA 5% por uma hora a 4°C. Após o bloqueio as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo primário anti  $\alpha$ -SMA (ab7817, Abcam, Cambridge, MA) *overnight* a 4°C e protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG-FITC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por uma hora a 37°C e protegidas da luz. Após a incubação as células foram novamente lavadas três vezes com PBS 1X e

incubadas com 100 µL de DAPI (1 µg/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente. O excesso foi removido através de três lavagens com PBS 1X e as marcações foram observadas por microscopia de fluorescência no aparelho EVOS® FL Auto Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

#### **3.4.3. Transição epitélio-mesenquimal**

Para avaliar a transformação epitélio-mesenquimal, células A549 foram plaqueadas (2.500 células/poço) em uma placada de 96 poços. As células foram mantidas em condições normais de cultura celular por quatro dias (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 1% antifibrótico/antimicótico, SFB 10%), com troca de meio a cada dois dias. Ao quarto dia, o meio foi trocado e as células foram tratadas com 1 µM de pmTGF-β em meio incompleto juntamente com o peptídeo E10, nas concentrações de 1, 10 e 50 µM. As células foram novamente incubadas por 24 horas em condições normais de cultura. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X por cinco minutos a cada lavagem. As células foram então fixadas com formaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, permeabilizadas com metanol 100% gelado por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS 1X. As células foram então bloqueadas com PBS-BSA 5% por uma hora a 4°C. Após o bloqueio as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo primário anti-fibronectina (ab6328, Abcam, Cambridge, MA) *overnight* a 4°C e protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG Atto 647 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 1 hora a 37°C e protegidas da luz. Após a incubação as células foram novamente lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com 100 µL de DAPI (1 µg/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente. O excesso foi removido através de três lavagens com PBS 1X e as marcações foram observadas por microscopia de fluorescência no aparelho EVOS® FL Auto Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

#### **3.5. Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas foi utilizando o programa computacional com pacotes estatísticos GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San

Diego, EUA). Foram aplicados os testes two-way ANOVA com pós teste de Dunnet. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor do que 0.05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Seleção de peptídeos por *phage display*

Para a realização da seleção dos peptídeos, foi utilizado activina A (Cat#592006, BioLegend, San Diego, CA) como alvo de ligação. O anticorpo monoclonal neutralizante, anti-activina A (Cat#693606 BioLegend, San Diego, CA) foi utilizado para realizar a eluição competitiva de fagos ligantes. Para a seleção dos fagos foi utilizada uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados a proteína pIII de fagos (Ph.D.-7aa New England BioLabs Inc, Ipswich, EUA), foram realizados um total de três ciclos de seleção. Ao fim de cada seleção o eluato resultante foi utilizado para realização de titulações a fim de determinar a quantidade de partículas virais na entrada e na saída de cada ciclo de seleção. A titulação foi realizada através da inoculação de diluições seriadas do eluato obtido ao fim de cada *round*, em culturas de *E. coli* (ER2738) na fase log de crescimento e posterior contagem das colônias azuis, indicativo da presença de fagos com o gene da  $\beta$ -galactosidase. A eficiência e aumento da especificidade da seleção a cada *round* pode ser confirmada através da titulação dos eluato amplificados e não amplificados resultantes de cada round (Tabela 4).

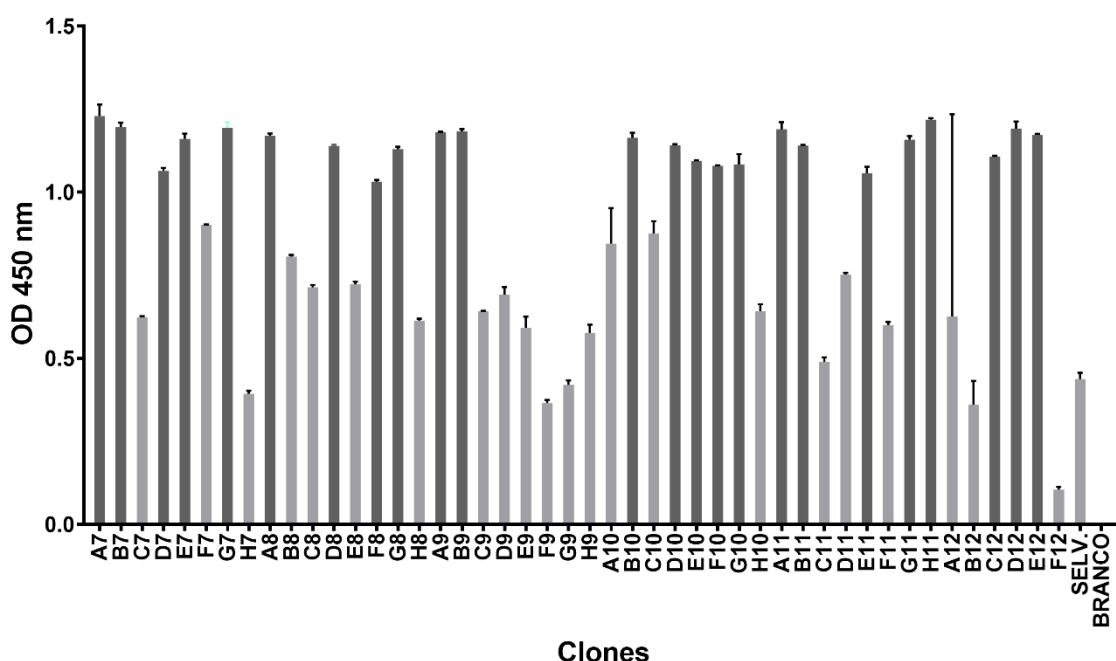
**Tabela 4: Titulação em pfu (*plaque-forming unit*) de fagos na entrada e na saída de cada ciclo de seleção.**

	Partículas de fagos (pfu)	
	Eluato amplificado	Eluato não amplificado
1° Round	$1,3 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^4$
2° Round	$6 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^5$
3° Round	$6,3 \times 10^{10}$	$2,9 \times 10^5$

Ao fim dos ciclos de seleção, foram selecionados 46 clones com potencial capacidade de ligação a molécula de activina A

#### 4.2. Phage-ELISA para triagem dos fagos selecionados

Após o terceiro round de seleção, foram obtidos 46 clones de fagos. Os clones foram amplificados e utilizados para um ensaio de ELISA, visando avaliar o potencial de ligação de cada clone a molécula de activina A. Os valores de absorbância obtidos foram avaliados, o *cut-off* foi determinado como a média da absorbância do fago selvagem, somada a duas vezes o desvio padrão do fago selvagem e o índice ELISA como a absorbância de cada clone dividida pelo *cut-off*. Um total de 24 clones apresentaram índice ELISA maior do que 2 e foram selecionados para o sequenciamento (Figura 6).



**Figura 6: Avaliação em Phage-ELISA da reatividade dos 46 clones selecionados utilizando o activina A como alvo.** Colunas mais escuras destacam os clones que apresentaram índice ELISA maior do que dois.

#### 4.3. Sequenciamento do DNA dos fagos selecionados

Dentre os 46 clones, 23 foram selecionados para extração e sequenciamento de DNA. Desses, 22 apresentaram sequências válidas, sendo 10 sequências únicas. (Tabela 5).

**Tabela 5: Sequências traduzidas dos clones sequenciados.**

<b>Sequência 3'5'</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Frequência (%)</b>
PTPLAWL	7 aa	10 (43.48)
PGSLYWL	7 aa	2 (8.70)
PSTLLWL	7 aa	2 (8.70)
TFSVTNK	7 aa	1 (4.35)
PRELAFL	7 aa	1 (4.35)
PRDLLWL	7 aa	1 (4.35)
PPTLHWL	7 aa	1 (4.35)
PPSLKWI	7 aa	1 (4.35)
PDTLTWL	7 aa	2 (8.70)
PDSLRLWL	7 aa	2 (8.70)

Aminoácidos alinhados e categorizados de acordo com o código de cores do software Clustal Omega (Vermelho: hidrofóbicos, Verde: polares, Azul: ácidos, Rosa: básicos).

#### **4.4. Avaliação das sequências e síntese dos peptídeos**

Os fagos com as 10 sequências (Tabela 6) encontradas foram então avaliados a respeito de seu potencial de ligação à activina A. Os clones foram amplificados, purificados e quantificados. Para esse teste ELISA foram utilizados  $1 \times 10^{10}$  partículas virais de cada clone.

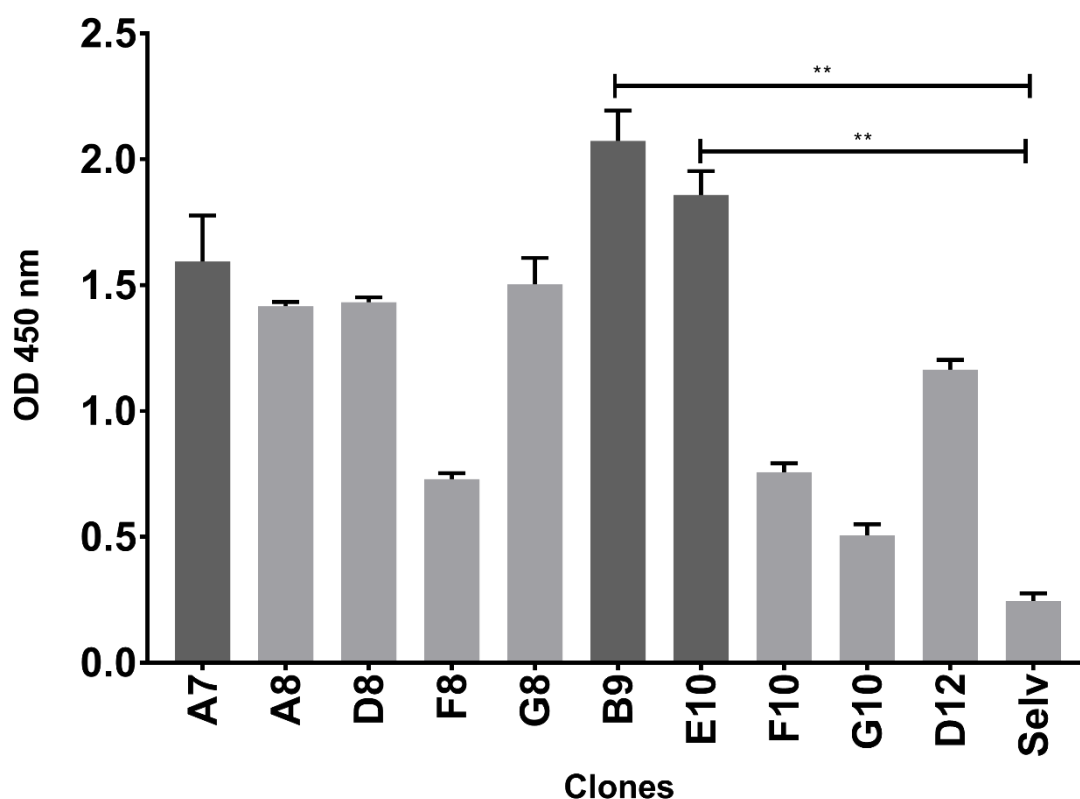
**Tabela 6: Clones selecionados para o teste ELISA.**

<b>Clone</b>	<b>Sequência</b>
A7	PTPLAWL
A8	PGSLYWL
D8	PSTLLWL
F8	TFSVTNK
G8	PRELAFL
B9	PRDLLWL
E10	PPTLHWL
F10	PPSLKWI
G10	PDTLTWL

D12	PDSLRWL
-----	---------

Através do sequenciamento dos fagos selecionados, foram identificadas 10 sequências distintas. Cada clone apresenta uma das sequências únicas identificadas no sequenciamento dos fagos.

Dentre os clones avaliados os que apresentaram maior reatividade foram os clones A7, B9 e E10 (Figura 7).



**Figura 7: Ensaio de ELISA demonstrando a reatividade dos clones selecionados contra a Activina A.** Clones mais reativos e com as sequências escolhidas para síntese estão destacados. Clones B9 e E10 apresentaram significância estatística frente ao fago selvagem (Kruskal-Wallis e ANOVA  $p < 0,05$ ).

Em seguida, as sequências A7, B9 e E10 foram avaliadas *in silico*, afim de verificarmos sua conformação e interação com a molécula de activina A. Tais análises foram realizadas considerando a adição de uma ponte dissulfeto em sua estrutura a fim de manter a conformação original das moléculas, bem como o manutenção de parte da proteína pIII do fago M13 (Tabela 7).

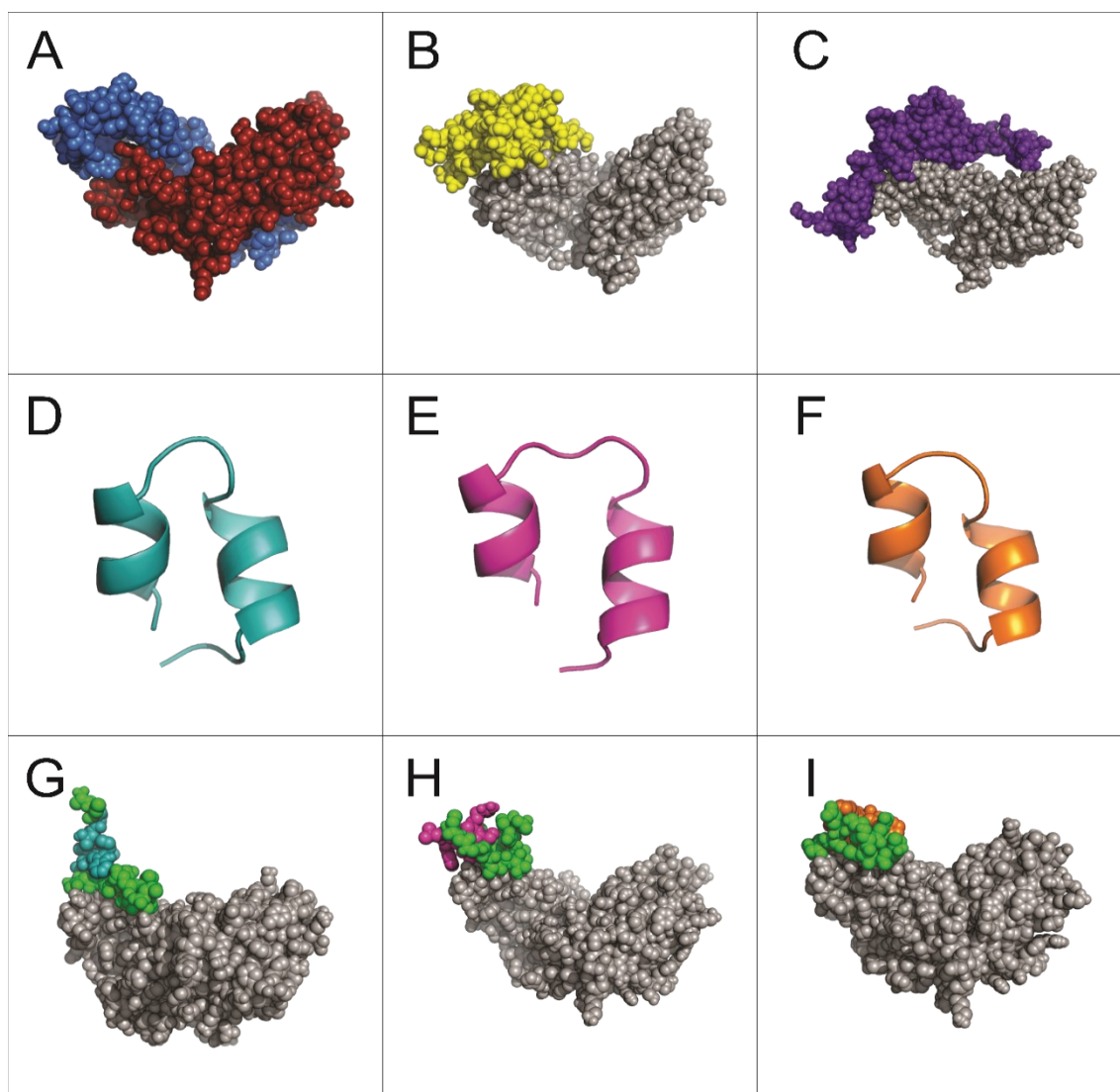


**Tabela 7: Sequências dos peptídeos sintetizados a partir dos clones selecionados.**

Clone	Sequência
A7	ACPTPLAWLCGGGSAETVES
B9	ACPRDLLWLCGGGSAETVES
E10	ACPPTLHWLCGGGSAETVES

Todas as sequências foram sintetizadas com uma ponte dissulfeto na posição 2,10 e parte da proteína pIII do fago M13. Em destaque estão demonstradas as sequências específicas de cada peptídeo.

A predição das conformações das sequências A7, B9 e E10, bem como sua provável interação com a molécula de Activina A, podem ser observadas na figura 8.

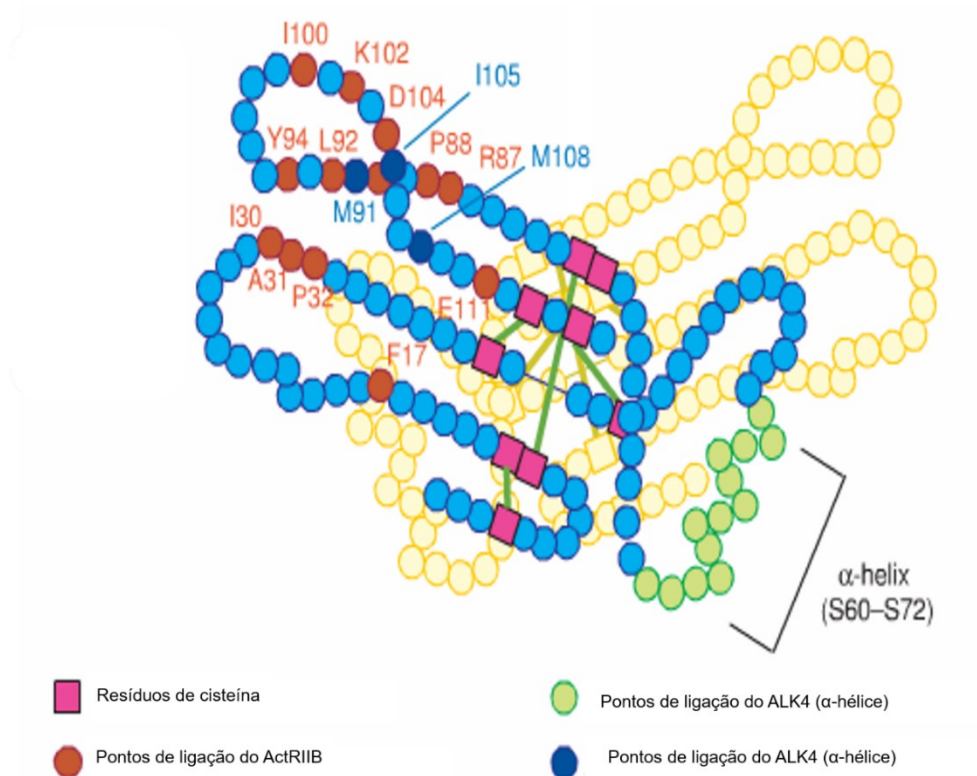


**Figura 8: Modelos de predições estruturais das moléculas utilizadas neste estudo.** A) dímero de activina A (PDB: 2ARV), B) interação entre activina A (cinza) e o receptor ActRIIB (amarelo), C) interação entre activina A (cinza) e a follistatina (roxa), D) predição estrutural do peptídeo A7, E)

predição estrutural do peptídeo B9, F) predição estrutural do peptídeo E10, G, H e I) predição da interação da molécula de activina A (cinza) com os peptídeos A7, B9 e E10 respectivamente, em verde a parte comum aos três peptídeos, referente a sequência da proteína pIII do fago M13.

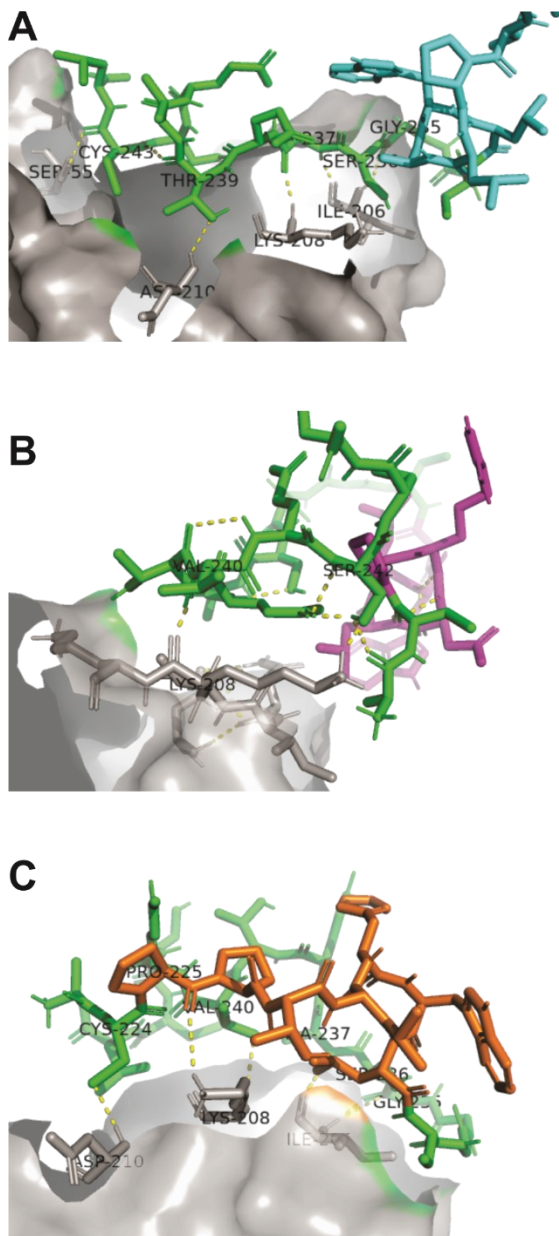
Apesar de todos os três peptídeos selecionados se ligarem ao mesmo sítio da Activina A, as análises demonstram que o a parte que interage do peptídeo A7 é uma sequência comum a proteína pIII do fago M13, no caso dos peptídeos B9 e E10, tanto a parte conservada da proteína pIII quanto a sequência singular de cada um dos peptídeos parece interagir diretamente com a molécula de activina A. É interessante ressaltar que os sítios de interações observados são similares aos sítios de interação da Activina A com o receptor extracelular ActRIIB e com a folistatina, um inibidor natural da activina A.

Conforme demonstrado por Mason e colaboradores, os aminoácidos isoleucina (I100 e I30), ácido aspártico (D104), lisina (K102), prolina (P88 e P32), arginina (R87), alanina (A31) e fenilalanina (F17) correspondem ao sítio de reconhecimento do receptor ActRIIB (Figura 9).



**Figura 9: Sítios de ligação da molécula de activina A e seu receptor ActRIIB e ALK4.** Adaptado de (HARRISON et al., 2005).

Nossas análises demonstraram que os três peptídeos selecionados, A7, B9 e E10 foram capazes de interagir com o sítio de ligação do receptor ActRIIB da activina A (Figura 14). O peptídeo A7 foi capaz de interagir covalentemente com a lisina, o ácido aspártico e com a isoleucina, descritos na região responsável pela ligação da activina A em seu receptor. Entretanto a região do peptídeo A7 responsável por estas interações é exclusivamente composta de aminoácidos presentes na região da pIII do fago M13, sendo uma região inespecífica e comum a todos os peptídeos selecionados. Entretanto a sequência do peptídeo A7, apresentou uma frequência de 43,48% dentre as 10 sequências selecionada. Este fato sugere que apesar da região responsável pela interação ser comum aos outros peptídeos, a conformação estrutural final do peptídeo A7 teve um papel chave em seu desempenho no processo de seleção. No caso do peptídeo B9, foi verificada uma interação covalente apenas com a lisina (K102). Assim como ocorrido com o peptídeo A7, no caso do peptídeo B9 a interação também se deu em uma região comum aos peptídeos selecionados. Por fim, o peptídeo E10 foi capaz de interagir covalentemente com a lisina (K102), com o ácido aspártico (D104) e com a isoleucina (I100) presentes no sítio de reconhecimento do receptor ActRIIB da activina A. Neste caso a interação se deu entre cinco aminoácidos do peptídeo E10, sendo que um deles, a prolina, se encontra na região específica deste peptídeo (Figura 10).



**Figura 10: Pontos de ligação entre os peptídeos A7, B9 e E10 com a molécula de activina A.** A) Regiões correspondentes a sequência da proteína pIII do capsídeo viral, expressas juntamente com o peptídeo A7 foram capazes de se ligarem a isoleucina(I206), ao ácido aspártico (D210) e a lisina (K208) do sítio de reconhecimento do receptor ActRIIB da activina A. B) O peptídeo B9 foi capaz de interagir covalentemente somente com a lisina (K208) presente no sítio de reconhecimento do receptor ActRIIB da activina A. C) O peptídeo E10 se ligou a isoleucina(I206), a lisina (K208) e ao ácido aspártico (D210) presentes no sítio de reconhecimento do receptor ActRIIB da activina A. No caso do peptídeo E10, um dos aminoácidos específicos de sua sequência, a prolina, foi responsável pela ligação.

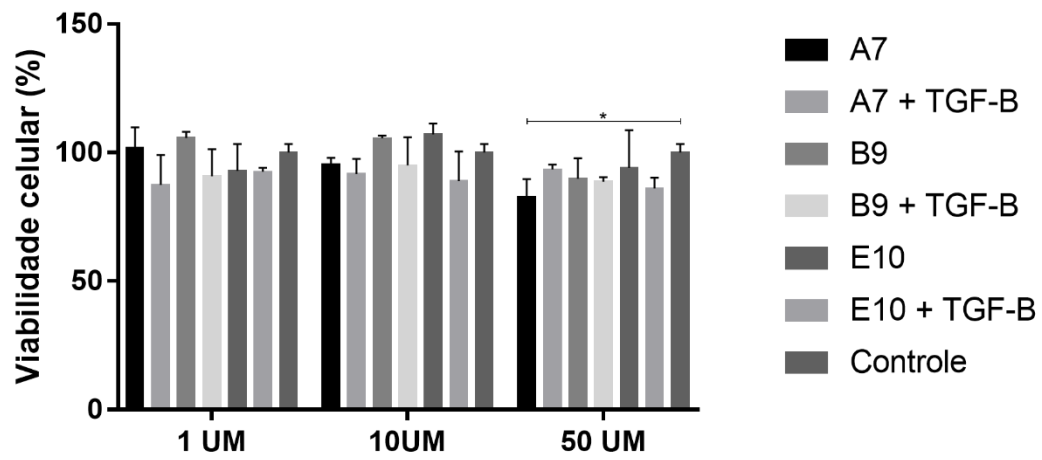
Baseando-se neste resultado, as sequências escolhidas para síntese dos peptídeos sintéticos foram as sequências correspondentes aos clones A7, B9 e E10.

#### **4.5. Avaliação de citotoxicidade**

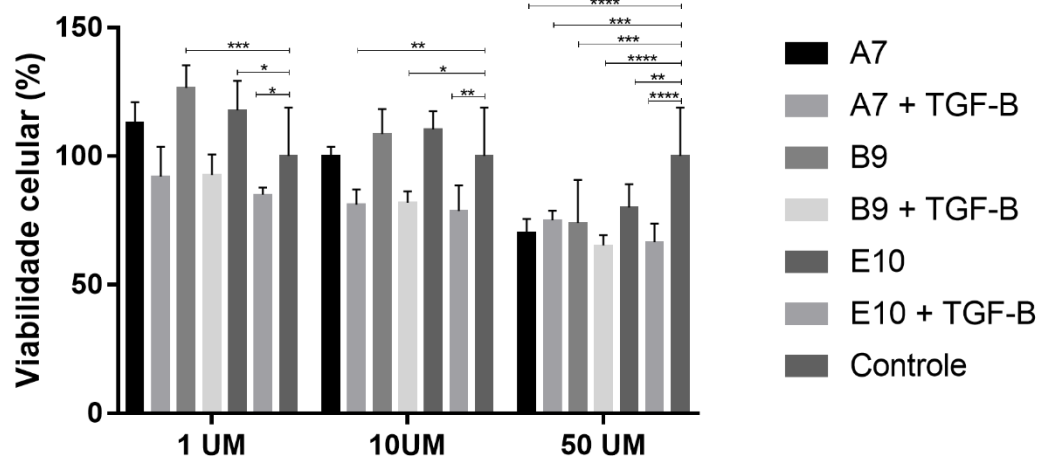
Com a comprovação da eficiência de seleção e as predições das interações entre os peptídeos e a molécula de activina A, foram iniciados os testes de atividade dos peptídeos em culturas celulares. Inicialmente verificamos a tolerância de diferentes concentrações dos peptídeos A7, B9 e E10 em culturas de células A549.

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos peptídeos em células, realizamos o ensaio de MTT, utilizando a linhagem celular A549. Os peptídeos A7, B9 e E10 foram utilizados nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$ , na presença e na ausência de pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL) e avaliados por 24, 48 e 72 horas (Figura 11). Os resultados mostraram que após 24 horas, apenas o peptídeo A7 apresentou toxicidade relevante e somente na maior concentração avaliada (50  $\mu\text{M}$ ). Após 48 horas, observa-se um declínio da viabilidade celular no tratamento com o peptídeo E10 (1  $\mu\text{M}$ ) quando em conjunto com pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL), vemos também declínio de viabilidade celular com significância estatística nos tratamentos com todos os três peptídeos (A7, B9 e E10) na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , quando utilizados em conjunto com pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL), por fim, na concentração mais alta utilizada (50  $\mu\text{M}$ ), todos os tratamentos apresentaram uma queda significativa na viabilidade celular. Após 72 horas de tratamento, apenas os peptídeos A7 e B9, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , apresentaram declínio na viabilidade celular, tanto quando administrados isoladamente quanto em conjunto com pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL) (Figura 11).

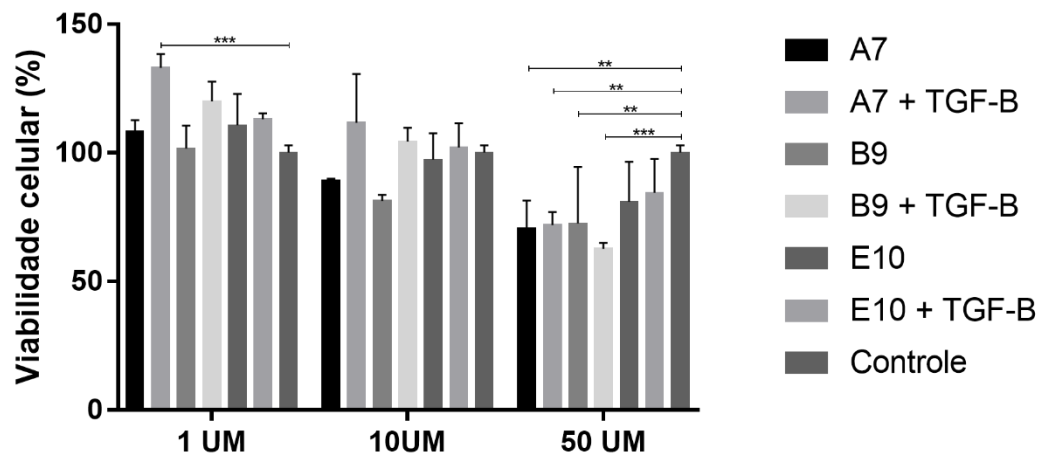
## 24 horas



## 48 horas



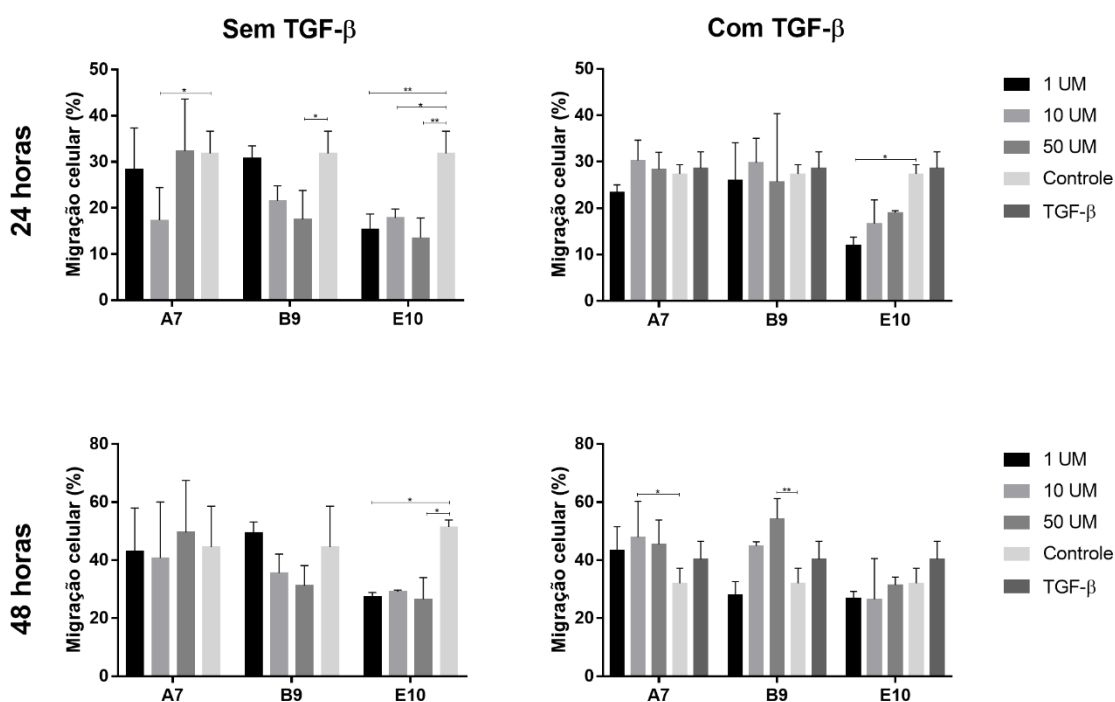
## 72 horas



**Figura 11: Avaliação da toxicidade dos peptídeos A7, B9 e E10.** Foram avaliadas três concentrações (1, 10 e 50  $\mu$ M), na presença e ausência de pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL), por 24, 48 e 72 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Variações estatísticas significativas foram destacadas (Two-way ANOVA  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Avaliação da migração celular

Para avaliarmos os efeitos dos peptídeos na migração celular, foi realizado o ensaio de *scratch*. Utilizamos a linhagem celular A549 e os peptídeos A7, B9 e E10, nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu$ M, na presença e na ausência de pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL), as imagens foram capturadas com 0, 24 e 48 horas e avaliadas com o auxílio do software ImageJ. Após 24 horas de tratamento e na ausência de pmTGF- $\beta$ , o peptídeo E10 demonstrou resultados mais consistentes de inibição da migração celular, resultados que foram confirmados após 48 horas de tratamento. O mesmo aconteceu na presença de pmTGF- $\beta$ , sendo que concentrações inferiores a 50  $\mu$ M se mostraram mais eficientes na inibição da migração celular (Figura 12).

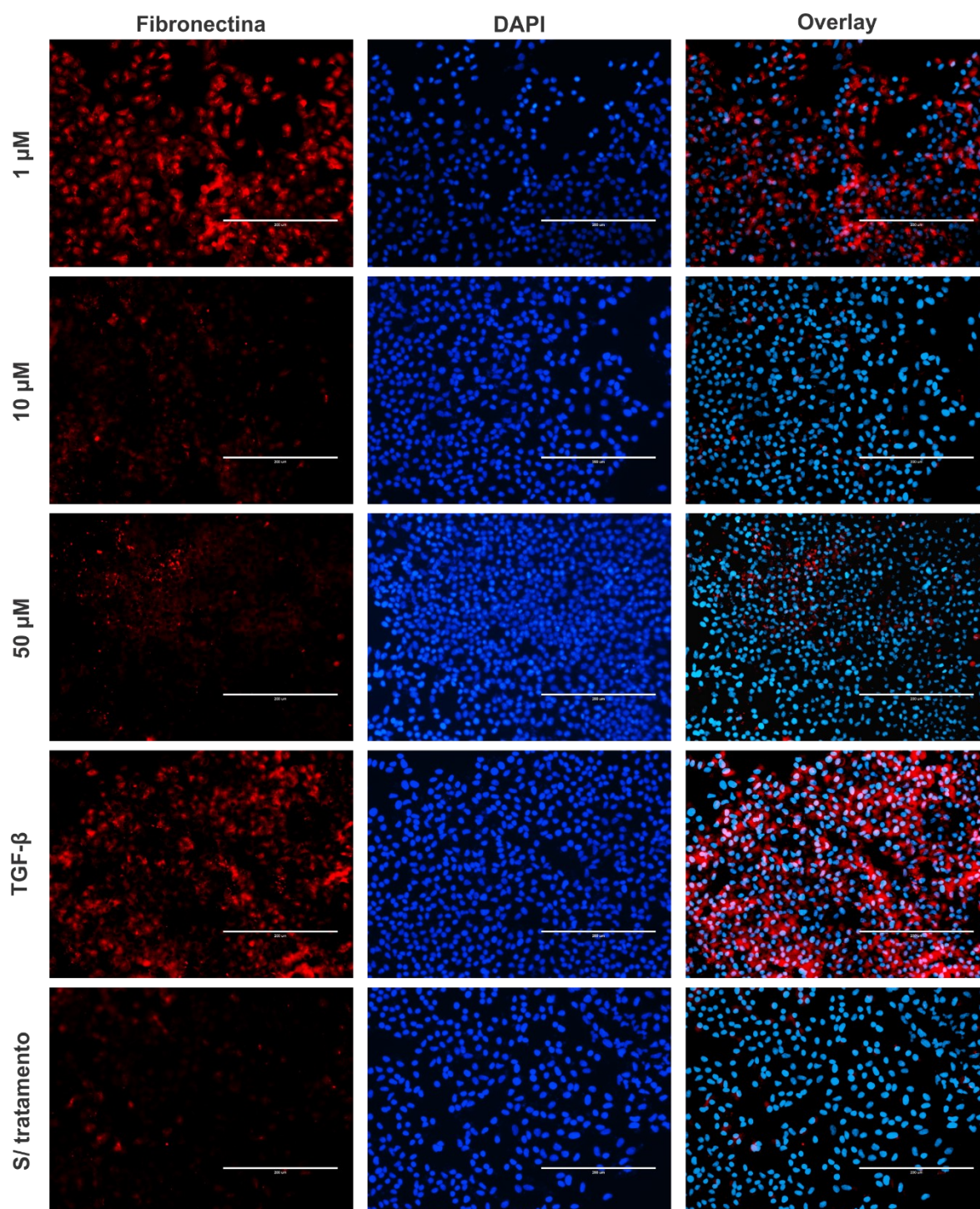


**Figura 12: Avaliação do efeito dos peptídeos A7, B9 e E10 sobre a migração de células A549.** Foram avaliadas três concentrações (1, 10 e 50  $\mu$ M), na presença e ausência de pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL), por 24 e 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Variações estatísticas significativas foram destacadas (Two-way ANOVA  $p < 0,05$ ).

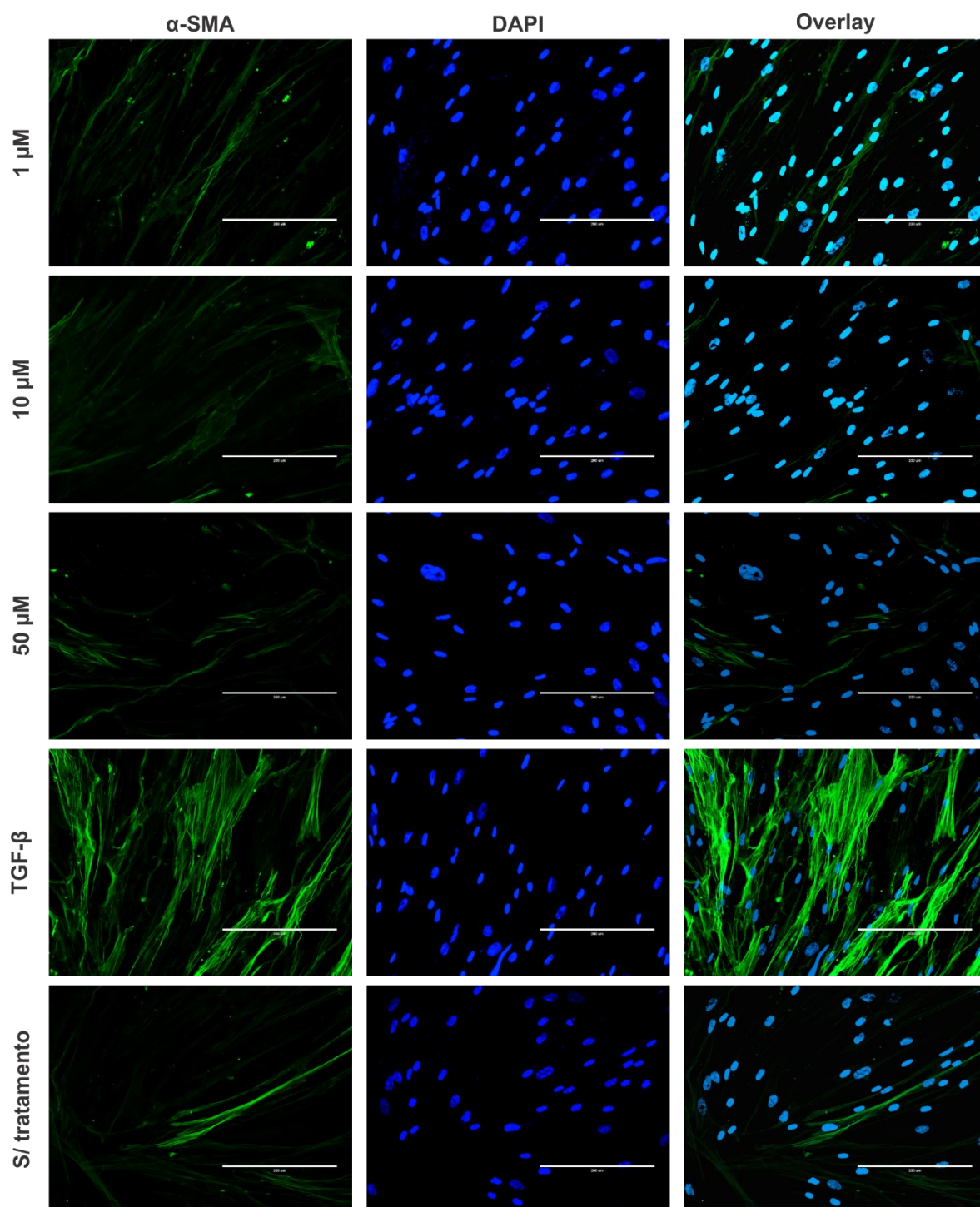
#### **4.7. Avaliação da transição de fibroblastos - miofibroblastos (TFM) e da transição epitélio mesenquimal (TEM)**

A fim de analisar o efeito do peptídeo E10 na inibição da transformação epitélio-mesenquimal, bem como da inibição da transição de fibroblastos em miofibroblastos, foi realizado um ensaio de imuno-histoquímica, onde células epiteliais A549 e fibroblastos primários de doador saudável foram cultivados, tratados com 1 ng/mL de pmTGF- $\beta$  e com o peptídeo E10 nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu$ M. Células tratadas somente com pmTGF- $\beta$  serviram de controle positivo, enquanto que células sem tratamento algum serviram de controle negativo. As células tratadas foram cultivadas por 72 horas, fixadas e marcadas. Células A549 foram marcadas com anticorpo anti-fibronectina para avaliação da inibição da EMT (Figura 13), enquanto que fibroblastos primários foram marcados com anticorpo anti- $\alpha$ -SMA para avaliação da inibição da TFM (Figura 14).





**Figura 13: Avaliação do efeito do peptídeo E10 sobre a inibição da TEM.** Células A549 foram marcadas para avaliação de fibronectina extracelular, DAPI foi utilizado para visualização nuclear. Células sem tratamento algum foram utilizadas como controle negativo, todos os outros tratamentos incluíram pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL). Imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência com aumento de 20X. Concentrações de 10 e 50  $\mu$ M de peptídeo E10 foram capazes de inibir de maneira eficiente a produção de fibronectina. O teste foi realizado em triplicata.



**Figura 14: Avaliação do efeito do peptídeo E10 sobre a inibição da TFM.** Fibroblastos primários de doador saudável foram marcadas para avaliação de  $\alpha$ -SMA, DAPI foi utilizado para visualização nuclear. Células sem tratamento algum foram utilizadas como controle negativo, todos os outros tratamentos incluíram pmTGF- $\beta$  (1 ng/mL). Imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência com aumento de 20X. Todas as concentrações do peptídeo E10 foram capazes de reduzir consideravelmente a expressão de  $\alpha$ -SMA. O teste foi realizado em triplicata.

## 5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na área clínica, a FPI ainda é uma doença de difícil diagnóstico, que exige uma abordagem multidisciplinar (RAGHU et al., 2011b). Além disso, considerando a curta sobrevida dos pacientes acometidos, um diagnóstico rápido e preciso, bem como um tratamento eficiente são questões imperativas no manejo da FPI. Os medicamentos disponíveis atualmente, a pirfenidona e o nintedanib retardam o progresso da doença, mas não tratam sua causa e não são capazes de reverter seus efeitos, sendo apenas tratamentos paliativos (CANESTARO et al., 2016; MOLINA-MOLINA, 2019; ROBALO-CORDEIRO et al., 2017). Nesse contexto, a necessidade da busca de novas moléculas que sejam igualmente capazes de retardar ou se possível, de reverter os efeitos da FPI, é de grande interesse.

Considerando o fato da FPI apresentar características de desbalanço da resposta inflamatória, que culminam em um quadro fibrótico, bem como a presença de níveis elevados de activina A em outras doenças fibrosantes (BLOISE et al., 2019; SAMITAS et al., 2016; XAUBET; ANCOCHEA; MOLINA-MOLINA, 2017). Hipotetizamos que a inibição da activina A através da utilização de peptídeos direcionados ao seu sítio ativo poderia ser um mecanismo eficiente para o tratamento do desenvolvimento da FPI. Os resultados aqui apresentados e discutidos colaboram com nossa hipótese, visto que os peptídeos selecionados se ligam na mesma região reconhecida pelo receptor ActRIIB e pela folistatina, além disso, a diminuição dos níveis de fibronectina e  $\alpha$ -SMA em células tratadas indicam sucesso na inibição das vias ativadas pela activina A.

Estudos recentes demonstram que o foco do desenvolvimento de tratamentos para FPI está principalmente na inibição de vias relacionadas ao processo inflamatório e de reparo tecidual pulmonar (KOLB; BONELLA; WOLLIN, 2017). Focando na resposta inflamatória, Oku e colaboradores, (OKU et al., 2008) demonstraram a eficiência do uso de pirfenidona na diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  em camundongos tratados com bleomicina e a inibição do desenvolvimento de FPI nestes animais, entretanto a prednisolona, outro anti-inflamatório, não demonstrou efeitos significativos na redução da FPI neste

mesmo estudo, sugerindo que a progressão da FPI não depende somente da resposta inflamatória inicial. Por outro lado, estudos como o de Wollin e colaboradores, (WOLLIN et al., 2014) demonstram a eficiência do nintedanib na diminuição da proliferação de fibroblastos, através da inibição de FGFR1, 2 e 3, PDGFR a e b, e VEGFR 1, 2 e 3. Em outra abordagem, Horan e colaboradores (HORAN et al., 2008) utilizaram anticorpos contra a integrina  $\alpha\beta6$  e demonstraram que a concentração dos anticorpos pode proporcionar efeitos distintos no tratamento, enquanto altas doses aumentaram a expressão de citocinas inflamatórias e a ativação de macrófagos, doses baixas foram capazes de diminuir a deposição de colágeno e de MEC. Por fim, Gagnon e colaboradores (GAGNON et al., 2015), demonstram a eficiência do composto PBI-4050, no tratamento de diferentes tipos de doenças fibrosantes, incluindo a FPI. O composto PBI-4050, atualmente em testes clínicos de fase 2 para FPI (KHALIL et al., 2019), foi capaz de diminuir a expressão de fatores pró-inflamatórios como TGF- $\beta$ 1, IL-6, IL-23, além de atuar na inibição da proliferação de fibroblastos, de sua diferenciação em miofibroblastos e na expressão de fatores como  $\alpha$ -SMA, colágeno do tipo I e fibronectina, envolvidos com o processo de cicatrização pulmonar. Estes exemplos demonstram a complexidade do tratamento da FPI e enfatizam a necessidade de moléculas que sejam capazes de agir em mais de um momento durante a cascata de desenvolvimento da doença.

No que diz respeito a activina A, seu potencial pró-inflamatório e pró-fibrótico já foi demonstrado, bem como sua relação com a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, fatores chave da progressão da FPI (HARDY; ROLLAND; O'HEHIR, 2015; ZHANG et al., 2019). Consequentemente, foram feitas várias tentativas de utilizar moléculas capazes de inibir sua ação, a fim de tratar pacientes acometidos com FPI (MORIANOS et al., 2019; WERNER; ALZHEIMER, 2006). Naturalmente a ação da activina A é regulada pela folistatina, seu inibidor natural e sua ação foi extensivamente explorada em estudos a fim de combater a atividade pró-fibrótica da activina A (AOKI et al., 2005; HARDY et al., 2015). A folistatina é capaz de se ligar à activina A de maneira altamente específica, e devido ao seu tamanho, promover uma neutralização estérica, que impede a ligação da activina A em seu receptor, ActRIIB. Além disso, uma vez formado o complexo activina



A/folistatina, uma região ligante de heparina fica estruturalmente disponível na folistatina, permitindo a ligação do complexo a proteoglicanos de heparan sulfato na superfície celular, sua fagocitose e a degradação deste complexo (HEDGER; DE KRETZER, 2013). Entretanto, até o momento, nenhuma terapia para FPI utilizando a folistatina foi desenvolvida ou aplicada. Nesse contexto, Hedger e colaboradores discutem que a inibição da ação de activina por anticorpos neutralizantes ou pela administração de folistatina exógena podem aumentar os níveis locais de inflamação, os autores ainda sugerem que no caso da activina A, a rota de administração de seus inibidores, bem como a dose e o momento de administração podem ser cruciais para o sucesso da terapia (HEDGER; DE KRETZER, 2013).

O uso de peptídeos como alternativas terapêuticas para as mais variadas doenças é uma realidade (WU et al., 2016; ZAMBRANO-MILA; SÁNCHEZ BLACIO; SANTIAGO VISPO, 2019). Para o tratamento da FPI temos exemplos da utilização de peptídeos naturais, onde Yu e colaboradores (YU et al., 2019), demonstraram a eficiência de um peptídeo de 16 aminoácidos isolado da alga *Eucheuma ssp.* na inibição de PDGFR, AKT, ERK, TGF- $\beta$ ,  $\beta$ -catenina e vitronectina; peptídeos sintéticos, onde Vittal e colaboradores (VITTAL et al., 2013), através da síntese de um peptídeo de 22 aminoácidos foram capazes de verificar o decréscimo da deposição de colágeno, da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, além de observarem a redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 em modelo animal; e de peptídeos mistos, como o demonstrado por Marudamuthu e colaboradores (MARUDAMUTHU et al., 2019), onde um peptídeo de sete aminoácidos derivado da sequência da *caveolin-1 scaffolding domain*, foi capaz de retardar o desenvolvimento da FPI em modelos animais, através da indução do aumento de expressão de p53, aumentando a viabilidade de células epiteliais alveolares e diminuindo o dano tecidual local.

Em nosso estudo, utilizamos a tecnologia de *phage display* a fim de selecionar um peptídeo de sete aminoácidos ligante de activina A. Entretanto após o processo de seleção, os peptídeos foram sintetizados com duas cisteínas nas posições 2 e 10, um espaçador curto (GGGS) e parte da sequência da proteína pIII do fago M13, para manter a conformação original do momento da seleção, visto que a

conformação dos peptídeos é um ponto chave para sua interação com a molécula alvo.

O modelo de ligação entre a activina A e seu receptor ActRIIB, bem como a região de ligação secundária ao receptor ALK4 e os pontos de interação no caso da ligação com a folistatina foram previamente descritos e corroboram com nossas análises de bioinformática (Figura 9, 10) (HARRISON et al., 2005; MASON, 1994).

Avaliando a potencial citotoxicidade do tratamento com os peptídeos em culturas celulares. Observamos que todas as concentrações dos três peptídeos avaliados, A7, B9 e E10, foram bem toleradas pelas células em cultura no período de 24 horas. Após 48 horas de observação, células tratadas com os peptídeos isolados nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M, apresentaram viabilidade superior ao controle (sem tratamento), enquanto que as células tratadas em conjunto com pmTGF- $\beta$  apresentaram declínio em sua viabilidade. Além disso na concentração de 50  $\mu$ M, todos os tratamentos diminuíram a viabilidade celular. Com 72 horas de tratamento, observamos uma maior tolerância das células nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ M em todos os tratamentos, enquanto que na concentração de 50  $\mu$ M observamos novamente o declínio da viabilidade em todos os tratamentos, exceto nos casos do peptídeo E10 isolado ou em conjunto com a adição de pmTGF-B. De uma maneira geral, todos os peptídeos foram bem tolerados pelas células tratadas, sendo que concentrações  $\leq 10$   $\mu$ M mostraram exercer um efeito mais brando sobre as células.

Em seguida, avaliamos a migração de células A549 frente aos tratamentos com pmTGF- $\beta$  e os peptídeos A7, B9 e E10.

Tendo em mente que o objetivo do trabalho é avaliar o potencial de inibição dos peptídeos selecionados e seus efeitos em eventos biológicos relacionados a FPI, utilizamos como estímulo a adição de pmTGF- $\beta$ , desenvolvido previamente por Vaz e colaboradores (VAZ et al., 2015). Com esta abordagem foi possível a indução da liberação de fatores pró-fibróticos pelas células em cultura através da indução de um perfil inflamatório, sem a adição direta da activina A. Esta abordagem permite que observemos o efeito dos peptídeos após o

desencadeamento de uma resposta inflamatória, ao contrário da estimulação direta pela activina A.

Após 24 horas de observação e sem o estímulo com pmTGF- $\beta$ , observamos que o peptídeo A7 conseguiu inibir de forma efetiva a migração celular apenas na concentração de 10  $\mu$ M, entretanto este efeito não se manteve após 48 horas de tratamento e em nenhuma das concentrações quando as células foram estimuladas com pmTGF- $\beta$ . No caso do peptídeo B9, observamos uma relação dose dependente tanto após 24 quanto 48 horas, para as células que não foram estimuladas com pmTGF- $\beta$ . Por outro lado, quando estimuladas, nenhuma das concentrações de tratamento do peptídeo B9 foi capaz de inibir a migração celular em 24 horas. Além disso, após 48 horas, o peptídeo B9 apresentou um comportamento completamente contrário ao esperado, demonstrando que concentrações maiores do tratamento estimularam a migração celular. Dados semelhantes foram observados por Horan e colaboradores, a respeito da avaliação do anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ v $\beta$ 6 na inibição de vias ativadas pelo TGF- $\beta$ . Os autores observaram que concentrações maiores de anticorpo acabaram por induzir um padrão inflamatório mais severo, enquanto que concentrações menores tiveram efeitos positivos na diminuição da expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos (HORAN et al., 2008). No caso do peptídeo E10, em todos os cenários avaliados houve a diminuição da migração celular. Após 24 horas e com as células estimuladas com pmTGF- $\beta$  observamos que a inibição da migração celular foi mais eficiente em menores doses, fato que foi confirmado após 48 horas, entretanto sem significância estatística. Além disso na concentração de 10  $\mu$ M do peptídeo E10, observamos resultados com menor variação entre os tempos e tratamentos.

Avaliando os dados obtidos até este ponto, decidimos realizar os testes de EMT e FMT apenas com o peptídeo E10.

A EMT é um processo celular dinâmico e natural, associado principalmente com a motilidade e invasividade celular. No caso da FPI, a EMT possui um papel importante, estando associada a transformação de células epiteliais do tipo 2 e a criação de um microambiente pró-fibrótico que colabora com a ativação dos

fibroblastos e sua diferenciação e miofibroblastos (HILL et al., 2019). Este processo pode ser avaliado diretamente pela expressão de fibronectina extracelular.

Através deste ensaio, conseguimos observar que as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  do peptídeo E10 foram capazes de inibir de maneira eficiente a expressão de fibronectina extracelular, um marcador da EMT em células A549, mesmo após o estímulo com pmTGF- $\beta$ .

No caso da FMT, trata-se de um processo crucial para o desenvolvimento da FPI, visto que o desbalanço inflamatório cria um microambiente favorável ao recrutamento constante de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos, que por sua vez são os grandes responsáveis pela deposição de MEC que culminará na formação do tecido cicatricial (ZHANG et al., 2019).

Nossos resultados demonstram a eficiência do peptídeo E10 na diminuição considerável de  $\alpha$ -SMA em fibroblastos primários de doador saudável, após tratamento com pmTGF- $\beta$ .

Tanto para o ensaio de EMT quanto de FMT, as células foram cultivadas e estimuladas com pmTGF- $\beta$  e tratadas concomitantemente com o peptídeo E10, desse modo a inibição da activina A pode se dar ao início do processo inflamatório, de modo que o processo fibrótico não ocorra. Entretanto, no caso da FPI, apesar de promissor, um tratamento profilático é pouco efetivo, pois em muitos casos o diagnóstico é realizado quando a perda da função pulmonar já causa danos ao paciente.

Correlacionando os dados expostos aqui e em outros estudos relevantes, verificamos que mesmo depois de tanto tempo a fibrose pulmonar idiopática continua uma doença elusiva, com mecanismos complexos e finamente orquestrados, que demanda novas terapias e métodos de diagnóstico eficientes, capazes de prolongar a sobrevida dos pacientes, bem como propiciar qualidade de vida.

O peptídeo E10, descrito neste trabalho apresenta grande potencial antifibrótico e é um potencial candidato para a terapia de FPI, entretanto outros estudos



precisam ser realizados para verificar seu potencial a frente da reversão do quadro fibrótico.

## **6. CONCLUSÃO**

De acordo com as evidências expostas nesse trabalho, verificou-se a eficiência da técnica de *phage display* para a prospecção de peptídeos ligantes e inibidores da ação da activina A.

A inibição da activina A se deu pela ligação direta dos peptídeos na mesma região da molécula, responsável pela comunicação com seu receptor ActRIIB. Foi possível verificar a eficiência da inibição da migração celular e dos processos envolvidos na transformação epitélio mesenquimal e da transformação de fibroblastos em miofibroblastos.

Sendo assim, a utilização de peptídeos inibidores, como o peptídeo E10 descrito aqui, demonstra o potencial terapêutico de tais moléculas, podendo ser uma potencial alternativa para o tratamento da fibrose pulmonar idiopática.

## 7. REFERÊNCIAS

- AOKI, F. et al. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by follistatin. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2005. <https://doi.org/10.1164/rccm.200412-1620OC>
- APOSTOLOU, E. et al. Activin-A overexpression in the murine lung causes pathology that simulates acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2012. <https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0784OC>
- AZUMA, A. et al. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2005. <https://doi.org/10.1164/rccm.200404-571OC>
- BADDINI-MARTINEZ, J. et al. Atualização no diagnóstico e tratamento da fibrose pulmonar idiopática. **J Bras Pneumol**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132015000000152>
- BADDINI-MARTINEZ, J.; PEREIRA, C. A. How many patients with idiopathic pulmonary fibrosis are there in Brazil? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2015. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562015000000165>
- BALDI, B. G. Idiopathic pulmonary fibrosis in Brazil: challenges for epidemiological characterization and management. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000060003>
- BATZER, M. A. Phage Display: A Laboratory Manual. Edited by C. F. Barbas III, D. R. Burton, J. K. Scott, and G. J. Silverman. **Analytical Biochemistry**, 2001. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5085>
- BERGERON, A. et al. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF- $\beta$  and IL-10. **European Respiratory Journal**, 2003. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00014703>
- BJORAKER, J. A. et al. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 1998. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9704130>
- BLOISE, E. et al. Activin A in mammalian physiology. **Physiological Reviews**,

2019. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2018>

CANESTARO, W. J. et al. Drug treatment of idiopathic pulmonary fibrosis systematic review and network meta-analysis. **Chest**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2015.03.983>

CHEN, W.; TEN DIJKE, P. Immunoregulation by members of the TGF $\beta$  superfamily. **Nature Reviews Immunology**, 2016. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.112>

D.J., P.; D.M., DE K.; M.P., H. Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.007>

DIETRICH, U.; DÜRR, R.; KOCH, J. Peptides as Drugs: From Screening to Application. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2013. <https://doi.org/10.2174/13892010113149990205>

FLAHERTY, K. R. et al. Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: Survival implications. **Thorax**, 2003. <https://doi.org/10.1136/thorax.58.2.143>

FLAHERTY, K. R. et al. Idiopathic interstitial pneumonia: What is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2004. <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-147OC>

FUKIHARA, J.; KONDOH, Y. Nintedanib (OFEV) in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 2016. <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1249854>

FUMAGALLI, M. et al. Imbalance between activin A and follistatin drives postburn hypertrophic scar formation in human skin. **Experimental Dermatology**, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00571.x>

GAGNON, L. et al. Oral treatment with PBI-4050 reduces lung fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2015.

GHARAEI-KERMANI, M. et al. Recent Advances in Molecular Targets and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Focus on TGF $\beta$  Signaling and the Myofibroblast. **Current Medicinal Chemistry**, 2009. <https://doi.org/10.2174/092986709787846497>

HARDY, C. L. et al. The activin A antagonist follistatin inhibits cystic fibrosis-like lung inflammation and pathology. **Immunology and cell biology**, v. 93, n. 6, p. 567–74, 2015. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.7>

HARDY, C. L.; ROLLAND, J. M.; O'HEHIR, R. E. The immunoregulatory and fibrotic roles of activin A in allergic asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, 2015. <https://doi.org/10.1111/cea.12561>

HARRISON, C. A. et al. Antagonists of activin signaling: Mechanisms and potential biological applications. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.003>

HEDGER, M. P. et al. **The Regulation and Functions of Activin and Follistatin in Inflammation and Immunity**. [s.l: s.n.]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385961-7.00013-5>

HEDGER, M. P.; DE KRETZER, D. M. The activins and their binding protein, follistatin-Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.03.003>

HILL, C. et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Contributes to Pulmonary Fibrosis via Aberrant Epithelial/Fibroblastic Cross-Talk. **Journal of Lung Health and Diseases**, 2019. <https://doi.org/10.29245/2689-999X/2019/2.1149>

HORAN, G. S. et al. Partial inhibition of integrin  $\alpha\beta6$  prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2008. <https://doi.org/10.1164/rccm.200706-805OC>

HOROWITZ, J. C.; THANNICKAL, V. J. Idiopathic pulmonary fibrosis: New concepts in pathogenesis and implications for drug therapy. **Treatments in Respiratory Medicine**, 2006. <https://doi.org/10.2165/00151829-200605050-00004>

HOSSEINZADEH, A. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) signaling pathways and protective roles of melatonin. **Life Sciences**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.032>

HUNNINGHAKE, G. W. et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**,

2001. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.2.2101090>

HUTCHINSON, J. et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review. **European Respiratory Journal**, 2015. <https://doi.org/10.1183/09031936.00185114>

K., T. et al. Nintedanib attenuates the polarization of profibrotic macrophages through the inhibition of tyrosine phosphorylation on CSF1 receptor. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2017.

KEKEVIAN, A.; GERSHWIN, M. E.; CHANG, C. Diagnosis and classification of idiopathic pulmonary fibrosis. **Autoimmunity Reviews**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.037>

KHALIL, N. et al. Phase 2 clinical trial of PBI-4050 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **European Respiratory Journal**, 2019. <https://doi.org/10.1183/13993003.00663-2018>

KIM, E. S.; KEATING, G. M. Pirfenidone: A review of its use in idiopathic pulmonary fibrosis. **Drugs**, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0350-9>

KING, J. et al. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). **American journal of respiratory and critical care medicine**, 2000. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00>

KOLB, M.; BONELLA, F.; WOLLIN, L. Therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Medicine**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.07.062>

LEHTONEN, S. T. et al. Pirfenidone and nintedanib modulate properties of fibroblasts and myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory research**, v. 17, n. 1, p. 14, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0328-5>

LEY, B.; COLLARD, H. R.; KING, T. E. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2011. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0894CI>

LIEN, S.; LOWMAN, H. B. Therapeutic peptides. **Trends in Biotechnology**, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.005>

MAHALANOBISH, S. et al. Matrix metalloproteinase: An upcoming therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis. **Pharmacological Research**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104591>

MARUDAMUTHU, A. S. et al. Caveolin-1–derived peptide limits development of pulmonary fibrosis. **Science Translational Medicine**, 2019. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat2848>

MASON, A. J. Functional analysis of the cysteine residues of activin A. **Molecular Endocrinology**, 1994. <https://doi.org/10.1210/mend.8.3.8015550>

MIMMI, S. et al. Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.12.005>

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005>

MOLEK, P.; STRUKELJ, B.; BRATKOVIC, T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: Targeting membrane receptors. **Molecules**, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16010857>

MOLINA-MOLINA, M. et al. Anti-fibrotic effects of pirfenidone and rapamycin in primary IPF fibroblasts and human alveolar epithelial cells. **BMC Pulmonary Medicine**, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0626-4>

MOLINA-MOLINA, M. The Future of Pharmacological Treatment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Archivos de Bronconeumologia**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2019.05.012>

MORELL, F. et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: A prospective case-cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2013. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70191-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70191-7)

MORIANOS, I. et al. Activin-A in the regulation of immunity in health and disease. **Journal of Autoimmunity**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102314>

MORRIS, D. G. Pulmonary Fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. In: **Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set**. [s.l: s.n.]. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2->

[200101160-00015](https://doi.org/10.1001/jama.287.10.1334)

NAGARAJAN, R. P. et al. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. **Journal of Biological Chemistry**, 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33412>

NAKAMURA, Y.; SUDA, T. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and clinical manifestations. **Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine**, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55582-7>

NALYSNYK, L. et al. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: Review of the literature. **European Respiratory Review**, 2012. <https://doi.org/10.1183/09059180.00002512>

NATHAN, S. D. et al. Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. **Chest**, 2011. <https://doi.org/10.1378/chest.10-2572>

NÜSING, R. M.; BARSIG, J. Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. **British Journal of Pharmacology**, 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702626>

OHGA, E. et al. Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1996. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1672>

OHGA, E. et al. Activin receptors are expressed on human lung fibroblast and activin A facilitates fibroblast-mediated collagen gel contraction. **Life Sciences**, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00480-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00480-X)

OKU, H. et al. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. **European Journal of Pharmacology**, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.046>

OLDHAM, J. M.; NOTH, I. Idiopathic pulmonary fibrosis: Early detection and referral. **Respiratory Medicine**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2014.03.008>

PETRAGLIA, F.; VAUGHAN, J.; VALE, W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, 1989.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.5114>

RAGHU, G. et al. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2006.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.200602-163OC>

RAGHU, G. et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2011a.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>

RAGHU, G. et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 6, p. 788–824, 15 mar. 2011b.

RAGHU, G. et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical practice guideline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2018a. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>

RAGHU, G. et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical practice guideline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 198, n. 5, p. e44–e68, 2018b.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1255ST>

RAGHU, G.; RICHELDI, L. Current approaches to the management of idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Medicine**, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.05.017>

RICHELDI, L.; COLLARD, H. R.; JONES, M. G. Idiopathic pulmonary fibrosis. **The Lancet**, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30866-8)

ROACH, K. M. et al. A model of human lung fibrogenesis for the assessment of anti-fibrotic strategies in idiopathic pulmonary fibrosis. **Scientific Reports**, 2018.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18555-9>

ROBALO-CORDEIRO, C. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in the era of antifibrotic therapy: Searching for new opportunities grounded in evidence. **Revista**



**Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.05.005>

ROGLIANI, P. et al. Pirfenidone, nintedanib and N-acetylcysteine for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.07.009>

RUFINO, R. L. et al. Incidence And Mortality Of Interstitial Pulmonary Fibrosis In Brazil. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2013.

SAMITAS, K. et al. Activin-A is overexpressed in severe asthma and is implicated in angiogenic processes. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 3, p. 769–782, 2016. <https://doi.org/10.1183/13993003.00437-2015>

SATO, S. et al. Anti-fibrotic efficacy of nintedanib in pulmonary fibrosis via the inhibition of fibrocyte activity. **Respiratory Research**, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0654-2>

SEGERER, S. E. et al. The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2008. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-17>

SELMAN, M.; KING, J.; PARDO, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. **Annals of Internal Medicine**, 2001. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>

SGALLA, G. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and management. **Respiratory Research**, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0730-2>

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SOO, E.; ADAMALI, H.; EDEY, A. J. Idiopathic pulmonary fibrosis: current and future directions. **Clinical Radiology**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2016.12.014>

SOZZANI, S.; MUSSO, T. The yin and yang of Activin A. **Blood**, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342691>

SULYOK, S. et al. Activin: An important regulator of wound repair, fibrosis, and

neuroprotection. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 225, n. 1–2, p. 127–132, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.07.011>

TAN, Y. et al. Advance in phage display technology for bioanalysis. **Biotechnology Journal**, 2016. <https://doi.org/10.1002/biot.201500458>

VAZ, E. R. et al. A short peptide that mimics the binding domain of TGF- $\beta$ 1 presents potent anti-inflammatory activity. **PLoS ONE**, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136116>

VITTAL, R. et al. Peptide-mediated inhibition of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 2013. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0389OC>

WANG, S. Y. et al. Inhibitory effect of activin A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. **Cytokine**, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.010>

WELLS, A. U. et al. Triple therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: An alarming press release. **European Respiratory Journal**, 2012. <https://doi.org/10.1183/09031936.00009112>

WERNER, S.; ALZHEIMER, C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 3, p. 157–171, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.01.001>

WIETECH, M. S. et al. Activin-mediated alterations of the fibroblast transcriptome and matrisome control the biomechanical properties of skin wounds. **Nature Communications**, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16409-z>

WOLLIN, L. et al. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the Tyrosine Kinase inhibitor Nintedanib in Experimental Models Of Lung Fibrosiss. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2014. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>

WOLLIN, L. et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. **European Respiratory Journal**, 2015.

WU, C. H. et al. Advancement and applications of peptide phage display technology

in biomedical science. **Journal of Biomedical Science**, 2016.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0223-x>

WUYTS, W. A. et al. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: A moving target. **European Respiratory Journal**, 2013.

XAUBET, A.; ANCOCHEA, J.; MOLINA-MOLINA, M. Fibrosis pulmonar idiopática  
Idiopathic pulmonary fibrosis. **Med Clin (Barc)**, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.004>

YU, H. et al. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the novel peptide EYZ-1 purified from: Eucheuma. **Food and Function**, 2019.  
<https://doi.org/10.1039/C9FO00308H>

ZAMBRANO-MILA, M. S.; SÁNCHEZ BLACIO, K. E.; SANTIAGO VISPO, N.  
Peptide Phage Display: Molecular Principles and Biomedical Applications.  
**Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, 2019.  
<https://doi.org/10.1177/2168479019837624>

ZHANG, Z. et al. Activin a promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells via STAT3-dependent Smad/CTGF pathway. **Cell Communication and Signaling**, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0361-3>

ZHU, Y. et al. Synthesis and biological activity of thieno[3,2-d]pyrimidines as potent JAK3 inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115254>

