



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

**SELEÇÃO *IN VIVO* DE PEPTÍDEOS LIGANTES À ARTICULAÇÕES
INFLAMADAS E SEU POTENCIAL USO EM DIAGNÓSTICO**

Aluna: Tamiris Aparecida da Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

UBERLÂNDIA - MG
2012



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

**SELEÇÃO *IN VIVO* DE PEPTÍDEOS LIGANTES À ARTICULAÇÕES
INFLAMADAS E SEU POTENCIAL USO EM DIAGNÓSTICO**

Aluna: Tamiris Aparecida da Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

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

UBERLÂNDIA - MG
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586s
2012 Silva, Tamiris Aparecida da, 1987-
 Seleção *in vivo* de peptídeos ligantes à articulações inflama-
 das e seu potencial uso em diagnóstico / Tamiris Aparecida da
 Silva . -- 2012.
 82 f. : il.
- Orientador: Carlos Ueira Vieira.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Genética - Teses. 2. Artrite reumatoide - Diagnóstico - Teses.
 3. Imunodiagnóstico - Teses. I. Vieira, Carlos Ueira, 1981- . II.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação
 em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575



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

**SELEÇÃO *IN VIVO* DE PEPTÍDEOS LIGANTES A ARTICULAÇÕES
INFLAMADAS E SEU POTENCIAL USO EM DIAGNÓSTICO**

Aluna: Tamiris Aparecida da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Examinadores:

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga

Data da Defesa: 31/07/2012

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

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

DEDICATÓRIA

Ao meu orientador Carlos Ueira, fonte de inspiração deste e de tantos outros projetos do Grupo Artrite, pelas idéias, apoio, confiança, amizade, imensa atenção e contribuição à minha formação pessoal e profissional

Ao meu pai, maior exemplo de profissionalismo, dedicação e caráter

À minha mãe, maior exemplo de Amor, Sabedoria e Fé

Às minhas mais que amadas e insubstituíveis irmãs, que sempre me apoiaram e amaram ainda que prevalecesse esse meu jeito torto

Aos meus amigos Nanos pelos quatro anos de acolhida, ensinamentos e amizade, sempre me proporcionando muito mais que “meros” enriquecimentos profissionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

Em seguida agradeço meus pais, por sempre começarem o meu começo, pelos exemplos de vida e dedicação, por toda educação dirigida e por me proporcionarem oportunidade de estudo, me mostrando ser a maior Herança e a única posse que ninguém me tira. Assim, se Deus me permitir o Dom da Maternidade, que eu retribua exatamente da mesma maneira;

Às minhas irmãs e cunhado, todos os meus familiares (em especial minha madrinha Margarida), e amigos Anjotacenos (principalmente Blayton, Meyrok, Aninha e Ceci), pela companhia e orações, pois sem eles esses anos longe de casa com certeza não teriam sido possíveis;

Ao Sr. Guedes pelo imenso Amor, compreensão, companhia e paciência principalmente nesta reta final;

Às eternas amigas da 63ª turma de Ciências Biológicas da UFU Flaves, Rê e especialmente você, Moniquelen, pela cumplicidade e zelo;

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo pelo exemplo profissional e paternal ao confiar e me acolher em sua “grande cozinha”;

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira por ter, acima de tudo, cumprido tão perfeitamente seu papel de orientador e amigo;

À todos os mestres que passaram pelo meu caminho, pois foram fundamentais para meu crescimento e formação acadêmica;

Aos “meus cinco dálmatas” que levarei e terei sempre como parte de mim:

Emilia, por ter se destacado em meio aos grandes e pela companhia tão saudável,

Galber, por ter participado com sábias palavras de minha desinibição e ousadia laboratorial,

Carol Reis, pela meiguice apaixonante,

Paty Tieme pela acolhida, enorme sabedoria e generosidade inacreditável, sendo – sem dúvida – a melhor pessoa que já conheci na vida,

e Fausto Capparelli, porque tenho por ele um apreço imenso por ter me recebido tão bem quando poucos o faziam, além dos maravilhosos momentos,

fotosdahora.com.br

Às minhas amigas Paty Terra e Mayarinha pela admiração imensurável que de mim conquistaram, e sem dúvida me acrescentaram um pouco de si tornando-se já partes de mim,

À vocês sete deixo o meu Muito Obrigada, e sem dúvida seria perfeito se todos fossem como vocês..

Às meninas superpoderosas NanoBio Juliana (Sister), Paula Souza, Ângela, Yarinha, Fabys, Lu, Lea, Thaise, Cláudia e Bruna que ao longo dessa caminhada tanto me surpreenderam e conquistaram, enquanto eu jamais imaginava aproximar;

A estes e também ao restante dos colegas do laboratório de Nanobiotecnologia e LabGen, agradeço pela amizade e atenção nesta etapa de minha vida;

Aos secretários do INGEB, Madson e Gerson pela prontidão e auxílio nos processos burocráticos;

Aos anjos do Biotério (Taisa e Junior) e da Histologia (“Xuxu”, “Fafa”) pela paciência, disposição e carisma;

Ao Prof. Dr. Marcelo Beletti pela paciência, gentileza, ensinamentos e acolhida em seu laboratório e auxílio para análise das lâminas;

Ao Prof. Dr. Marcelo Napimoga pela gentil doação dos murinos experimentais objetos de estudo deste trabalho;

Aos Professores Jair e Ana Bonetti pelos enriquecimentos científicos e práticos;

Ao CEUA pela aprovação desta pesquisa;

À todos os animais que inconscientemente doaram suas vidas para ciência;

Ao CNPq, financiador deste trabalho;

E por fim, mais uma vez, agradeço a Deus, por colocar todas estas pessoas e oportunidades em minha vida!

“Concedei-nos Senhor, Serenidade necessária, para aceitar as coisas que não podemos modificar, Coragem para modificar aquelas que podemos e Sabedoria para distinguirmos umas das outras.”

Reinhold Niebuhr

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo I - Fundamentação Teórica:	
Figura 1 – Prevalência da AR entre a população adulta mundial.....	11
Figura 2 – Deiminação da arginina pela enzima peptidilarginina deiminase.....	14
Figura 3 – Articulações acometidas pela artrite.....	16
Figura 4 – Modelo murino de linhagem DBA/1J.....	21
Figura 5 – Fago filamentoso.....	26
 Capítulo II - Seleção <i>in vivo</i> de peptídeos ligantes a articulações inflamadas e seu potencial uso em diagnóstico:	
Figura 1 – Estratégia do primeiro e segundo <i>rounds</i>	49
Figura 2 – Estratégia do terceiro <i>round</i>	50
Figura 3 – Camundongo DBA/1J apresentando edema.....	57
Figura 4 – Articulação edemaciada e sadia.....	58
Figura 5 – Titulação dos fagos.....	59
Figura 6 – Gel de agarose para quantificação e qualidade do DNA.....	61
Figura 7 – Escore do sequenciamento.....	62
Figura 8 – Imunohistoquímica.....	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo I - Fundamentação Teórica:	
Tabela 1 – Critérios necessários para classificação de AR.....	18
 Capítulo II - Seleção <i>in vivo</i> de peptídeos ligantes a articulações inflamadas e seu potencial uso em diagnóstico:	
Tabela 1 – Escore para análise subjetiva de gravidade da inflamação.....	48
Tabela 2 – Escore da inflamação dos grupos.....	58
Tabela 3 – Título obtido no processo de seleção dos fagos.....	60
Tabela 4 – Frequência de aa de todos os peptídeos sequenciados.....	62
Tabela 5 – Alinhamento de todos os peptídeos selecionados no <i>biopanning</i> por Clustal W.....	63
Tabela 6 – Mensuração das articulações dos animais submetidos à imunohistoquímica.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AR	Artrite Reumatóide
CEUA/UFU	Comitê de Ética na Utilização de Animais da UFU
CFA	Adjuvante de Freund completo
DNA	Ácido Desoribonucléico
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
EULAR	Liga Europeia contra o Reumatismo
FAGO	Bacteriófago
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
OD	Densidade ótica
pb	pares de bases
pIII	Proteína três do capsídeo do fago
pVI	Proteína seis do capsídeo do fago
pVII	Proteína sete do capsídeo do fago
pVIII	Proteína oito do capsídeo do fago
pIX	Proteína nove do capsídeo do fago
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietileno Glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D.- C7C	Biblioteca comercial de <i>Phage Display</i> de 7 aminoácidos de conformação rígida
Ph.D.- 12	Biblioteca comercial de <i>Phage Display</i> de 12 aminoácidos
PFU	Fagos por unidade
rnd	<i>round</i>
SEL	Selvagem
ssDNA	DNA de fita simples
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosídeo

LISTA DE NOTAÇÕES

°C	Graus Celsius
g	gramas
h	horas
M	Molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
N	normal
ng	nanogramas
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
μL	microlitro
μm	micrometros

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

SUMÁRIO

	Página
Apresentação	01
Capítulo I: Fundamentação Teórica	05
Resumo	06
Abstract.....	07
1. Doenças Autoimunes.....	08
1.1 Sistema imunológico.....	08
1.2 Artrite reumatoide.....	10
1.2.1 Epidemiologia.....	10
1.2.2 Patogenicidade na AR.....	12
1.2.3 Fisiopatogenia da AR.....	13
1.2.4 Diagnóstico.....	16
1.2.5 Tratamento.....	18
2. Modelos murinos.....	19
3. <i>Phage display</i>	22
3.1 Tecnologia.....	22
3.2 <i>Phage display in vivo</i>	28
Referências Bibliográficas.....	29
 Capítulo II: Seleção <i>in vivo</i> de peptídeos ligantes à articulações inflamadas e seu potencial uso em diagnóstico.....	 41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Objetivos.....	46
Casuísticas e métodos.....	47
1. Aspectos éticos.....	47
2. Modelos murinos de artrite reumatóide.....	47
3. Local de realização.....	47
4. Delineamento e método experimental.....	47

4.1 Indução da artrite.....	47
4.2 Mensuração do edema.....	48
4.3 <i>Biopanning in vivo</i>	48
4.4 Titulação.....	50
4.5 Amplificação e purificação dos fagos.....	51
4.6 Extração do DNA dos fagos selecionados.....	52
4.7 Sequenciamento do DNA fago inserto.....	52
4.8 Análises dos dados por bioinformática.....	53
4.9 Análises da distribuição dos fagos <i>in vitro</i> por imunohistoquímica.....	53
4.9.1 Fixação e descalcificação dos tecidos.....	54
4.9.2 Silanização, Inclusão e cortes histológicos	54
4.9.3 Desparafinização e imunohistoquímica.....	55
Resultados.....	57
1. Indução da artrite.....	57
2. Mensuração do edema.....	58
3. Seleção dos peptídeos ligantes à regiões inflamadas.....	59
3.1 <i>Biopanning</i> e Titulações.....	59
4. Extração do DNA dos fago selecionados.....	61
5. Sequenciamento de DNA e bioinformática.....	61
6. Validação por imunohistoquímica.....	64
Discussão.....	67
Conclusão.....	74
Referências bibliográficas.....	75
Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética.....	82

APRESENTAÇÃO

A artrite é um processo inflamatório que se manifesta nas articulações, apresentando como consequência alguns sinais e sintomas decorrentes de lesões articulares, como edema nas articulações, rigidez e dor. Dependendo de sua forma de manifestação, ela poderá ser classificada como Artrite Degenerativa, Artrite Gotosa, Artrite Piogênica Aguda, Artrite Psoriaca ou Artrite Reumatóide.

A Artrite Degenerativa é uma doença crônica, sendo a dor ao movimentar-se um de seus principais sintomas. Esta forma da doença degenera a cartilagem articular e causa hipertrofia nos ossos. As articulações mais acometidas por esta doença são as do joelho, coluna espinhal e as articulações coxofemorais. Enquanto que a Artrite Gotosa acomete principalmente o sexo masculino. É uma inflamação causada por microcristais minerais de urato, se manifestando principalmente no dedo e dorso do pé, tornozelos, joelhos e cotovelos. Entre seus sintomas pode haver febre e limitação de movimentos por causa da dor. Já a Artrite Piogênica Aguda afeta principalmente as articulações dos ombros, joelhos e coxofemorais, acometendo raramente as articulações dos tornozelos, cotovelos e punhos. A Artrite Psoriaca possui esta definição em decorrência da doença de pele denominada psoríase. Assim sendo, a articulação pode ser seriamente prejudicada por esta doença.

E por fim, a Artrite Reumatóide (AR) sendo a mais comum das Artrites, se caracterizando por ser uma doença autoimune, ou seja, o sistema imunológico do corpo ataca seus próprios tecidos, sendo o alvo, neste caso, sua própria cartilagem e revestimento articular. Esta doença é caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, levando à deformidade e à destruição das articulações por erosão do osso e cartilagem, consequente à inflamação e vermelhidão da articulação acometida, além de inchaço, dor, calor e perda da função. Na AR é característico existir um envolvimento simétrico e não apenas uma das localizações, afetando freqüentemente os punhos e os dedos, mas pode também atingir pés, ombros, joelhos, cotovelos, coluna cervical, entre outros. Ocasionalmente, a inflamação pode atingir o revestimento dos pulmões (causando pleurite) ou o revestimento do coração (causando pericardite). Pode ainda associar-se a secura dos olhos ou da boca, devido à inflamação das glândulas que produzem a saliva e as lágrimas, respectivamente. Ainda que rara, também pode acometer a inflamação dos vasos, levando a vasculite.

Ainda não sabem exatamente o que faz o sistema imunológico voltar-se contra o próprio organismo nos casos de AR, mas as pesquisas nos últimos anos indicam alguns fatores envolvidos, como genéticos, ambientais, hormonais, etc. Sendo assim, apesar de sua etiologia desconhecida, sabe-se que a artrite reumatoide é resultado das interações de muitos fatores. Sua incidência está relacionada com sexo e idade, afetando frequentemente mulheres, mas compromete também homens e crianças e geralmente inicia-se entre os 30 e 50 anos. Sua prevalência pode chegar a 1,5% da população em algumas regiões.

A forma mais frequente de início da doença é artrite simétrica (por exemplo, os dois punhos) e aditiva (as primeiras articulações comprometidas permanecem e outras vão se somando). Costuma ser de instalação lenta e pouco agressiva, localizando-se inicialmente nas pequenas articulações das mãos. O diagnóstico depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, minuciosos achados laboratoriais e radiográficos. A orientação para diagnóstico é baseada nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia, como rigidez matinal (rigidez articular durando pelo menos 1 hora), Artrite de três ou mais áreas com edema de partes moles ou derrame articular, Artrite de articulações das mãos (punho, interfalangeanas proximais e metacarpo falangeanas), Artrite simétrica, nódulos reumatoides, fator reumatoide sérico, alterações radiográficas (erosões ou descalcificações localizadas em radiografias de mãos e punhos), sendo que as características de rigidez matinal e artrite simétrica devem permanecer presentes por pelo menos seis semanas.

A inexistência de marcadores laboratoriais dificulta a identificação precoce desta doença. Trata-se de um diagnóstico de exclusão, uma vez que não existem sinais, sintomas ou exames laboratoriais exclusivos desta doença. A aplicabilidade da metodologia de *Phage Display in vivo* na apresentação de peptídeos ou bibliotecas proteicas na superfície de fagos filamentosos permite uma seleção altamente específica a determinados alvos, utilizando camundongos de linhagem pré-disposta à Artrite. Uma vantagem crucial dessa tecnologia é a conexão direta entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, a qual possibilita uma evolução clonal de ligantes selecionados. Nesse sentido, essa metodologia tem se mostrado significativa à prática clínica, ao permitir a seleção de peptídeos expressos na superfície viral.

No presente trabalho foram isolados peptídeos ligantes de regiões inflamadas de murinos DBA1J induzidos com Colágeno tipo II, por meio da metodologia de *Phage Display in vivo*. Para a seleção dos peptídeos foram realizados dois *rounds* de seleção positiva para regiões inflamadas utilizando uma biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C expressa na superfície do fago filamentoso M13, e um terceiro *round* passando por seleção negativa com articulações saudáveis, seguida de uma seleção positiva. O DNA dos clones selecionados foi sequenciado, traduzido, e o mais prevalente foi submetido à bioinformática e ensaio imuno-histoquímico.

CAPÍTULO I:

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Resumo

O sistema imunológico é constituído de uma complexa rede de moléculas e células que funciona a fim de proteger o organismo contra patógenos. O sistema imune sadio deve manter o balanço entre a capacidade de responder a agentes infecciosos e de sustentar a autotolerância. No entanto, podem ocorrer falhas que resultam em reações contra as células e tecidos do próprio organismo e que causam doenças autoimunes, como a Artrite Reumatóide (AR). Esta é uma doença autoimune caracterizada por artrite simétrica e aditiva, de causa desconhecida, que se inicia geralmente após os 30 anos, acometendo mulheres três vezes mais que em homens, com prevalência de 1,0% em algumas regiões. Nas artrites reumatóides, a membrana sinovial torna-se infiltrada por vários tipos de células inflamatórias, que sinergizam para causar destruição das articulações, provocando fortes dores articulares. O diagnóstico da artrite depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos. O objetivo do tratamento é aliviar as dores, melhorar ou manter a capacidade funcional, prevenir as incapacidades e melhorar sua qualidade de vida. Ainda não existe nenhum teste que confirme a presença da doença, não há exames laboratoriais considerados específicos para a sua definição diagnóstica. Modelos murinos são eficazes para ampliar nossa compreensão a respeito da artrite humana, como animais da linhagem DBA/1J que apresenta alta susceptibilidade ao desenvolvimento de artrite consequente de imunização com colágeno tipo II. *Phage Display* é um método de seleção no qual uma biblioteca contendo peptídeos que são expressos na superfície de fagos, com o material genético codificante para cada peptídeo localizado no genoma viral. O direcionamento com peptídeos ligantes à regiões altamente inflamadas são úteis para auxiliar no diagnóstico diferencial, avaliar a extensão da inflamação, determinar o prognóstico e resposta à terapia. Nesse sentido, a busca por novos biomarcadores podem levar a novos métodos para o diagnóstico e tratamento da AR. Essa revisão visa descrever alguns aspectos da Artrite Reumatóide e como a tecnologia de *Phage Display in vivo* pode ser utilizada na identificação de ligantes à diversos antígenos relacionados à inflamação.

Palavras chave: Artrite Reumatóide, diagnóstico, *Phage Display in vivo*

Abstract

The immune system is a complex of molecules and cells that functions to protect the organism against pathogens. The healthy immune system must maintain the balance between the ability to respond to infectious agents and sustain self-tolerance. However, failures may occur which result in reactions against cells and tissues of the organism and which cause autoimmune diseases such as Rheumatoid Arthritis (RA). This is an autoimmune disease characterized by symmetrical arthritis and additive, of unknown cause, usually beginning after age 30 and affects three times more women than men, with a prevalence of 1.0% in some regions. In rheumatoid arthritis, the synovial membrane becomes infiltrated by various types of inflammatory cells, which synergize to cause destruction of joints, resulting in strong joint pain. The diagnosis of arthritis depends on the association of a number of clinical signs and symptoms, laboratory findings, and radiographic findings. The goal of treatment is to relieve pain, maintain or improve functional capacity, prevent disability and improve their quality of life. Although there is no test that confirms the presence of the disease, there is no specific laboratory tests considered for confirming diagnosis. Murine models are effective to enrich our understanding of human arthritis, as DBA/1J strain animals presenting high susceptibility to development of arthritis resulting from immunization with type II collagen. Phage display is a selection method wherein a library of peptides that are expressed on the surface of phage, with genetic material coding for each peptide located in the viral genome. The targeting peptide ligands the highly inflamed regions are useful to assist in differential diagnosis, assess the extent of inflammation and determining prognosis and response to therapy. Accordingly, the search for novel biomarkers may lead to new methods for the diagnosis and treatment of RA. This review aims to describe some aspects of Rheumatoid Arthritis and how technology Phage Display in vivo can be used to identify ligands to various antigens associated with inflammation.

Key words: Rheumatoid Arthritis, diagnostic, Phage display in vivo

1. DOENÇAS AUTOIMUNES

1.1 Sistema imunológico

O sistema imune é constituído por células e moléculas responsáveis pelo desencadeamento do sistema imunológico, sendo a resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas no organismo chamada de resposta imune (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Deste modo, todo o sistema imunológico é constituído de uma complexa rede de moléculas e células que funciona a fim de proteger o organismo contra patógenos. Essa rede utiliza de vários tipos de células especializadas que se comunicam via interações celulares ou fatores humorais, como por exemplo, as citocinas. O sistema imunológico pode ser adaptativo ou inato, sendo o primeiro um sistema antígeno-específico, que gera memória imunológica e células T, além de anticorpos específicos para responder à microrganismos invasores ou células infectadas. Já o segundo compreende a primeira linha de defesa contra patógenos, utilizando um grupo de leucócitos, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, sendo de reconhecimento inespecífico, pois estas células fagocitam vários tipos de microrganismos (PIETROPAOLO et al., 2008).

Desta forma, o sistema imune sadio deve manter o balanço entre a capacidade de responder a agentes infecciosos e de sustentar a autotolerância, não respondendo aos antígenos próprios do organismo. A ausência de resposta adequada submete o indivíduo aos efeitos deletérios da invasão por patógenos, ao passo que o sistema respondendo de modo exacerbado pode gerar respostas inflamatórias prejudiciais ao mesmo (CRUVINEL et al., 2008).

Um processo de seleção celular negativa ocorre a fim de garantir a manutenção da autotolerância, eliminando ou alterando os linfócitos em desenvolvimento cujos receptores de antígenos se ligam fortemente aos auto-antígenos presentes nos órgãos linfóides geradores (medula óssea e timo, em humanos). Tanto as células B quanto as células T em desenvolvimento são suscetíveis à seleção negativa por um breve período, logo após o aparecimento dos receptores de antígenos (ABBAS et al., 2008).

As células T em desenvolvimento com alta afinidade para auto-antígenos são eliminadas por apoptose, um fenômeno conhecido como deleção clonal. Células B em desenvolvimento com alta afinidade para auto-antígenos podem ser

induzidas a fazer rearranjos no gene das imunoglobulinas, evitando, assim, a reatividade a auto-antígenos. Esse fenômeno é chamado de edição do receptor. A seleção negativa dos linfócitos em desenvolvimento é um mecanismo importante na manutenção da tolerância à auto-antígenos, sendo esse processo conhecido como tolerância central (ABBAS et al., 2008).

Mesmo sendo este um mecanismo eficiente, sabe-se que algumas células auto-reativas conseguem evadir esta barreira, saindo do timo e podendo ser ativadas na periferia com potencial de gerar auto-imunidade. O fato de que células auto-reativas possam ser detectadas na periferia demonstra, nitidamente, que o mecanismo de seleção tímica, responsável pela eliminação dos clones de células T auto-reativas, é incompleto (CRUVINEL et al., 2008).

Além da participação das células T, as células B influenciam a auto-imunidade através de múltiplas vias (JADALI, SANATI, 2008). Estas incluem a capacidade para gerarem auto-anticorpos, a secreção de citocinas inflamatórias, a apresentação de antígenos, o aumento da ativação das células T e a produção de linfogênese ectópica (JADALI & SANATI, 2008).

Complementar à seleção negativa e também com a finalidade de manter a autotolerância, ocorre ainda, na periferia (em órgãos linfóides periféricos, como o baço e os linfonodos), o mecanismo de tolerância periférica. Este mecanismo envolve um contínuo reconhecimento dos antígenos próprios. A atividade efetora dos linfócitos pode ser regulada na periferia através da deleção e/ou supressão, em que na primeira, as células efetoras autorreativas são eliminadas por apoptose (MACABEO-ONG et al, 2002), enquanto a segunda é a estimulação de linfócitos T na ausência de coestimulação, induzindo um estado não proliferativo conhecido como anergia, do qual não há produção de IL-2 pelos linfócitos (GODFREY et al, 2000; CRUVINEL et al., 2008). Existe a subpopulação de células T selecionadas positivas que tem a capacidade de se ligar com média a alta avides a antígenos próprios. Estas células são denominadas como células T reguladoras ou Tregs tendo um papel regulador e supressor sobre a resposta imunológica (CHUNG et al, 2008).

As células imuno-regulatórias estão diretamente envolvidas com a função suprimir as respostas do sistema imune aos antígenos próprios. De modo particular, entre as células com função imuno-regulatória, tem havido grande

destaque para as células T regulatórias de ocorrência natural (FOXP3⁺GITR⁺CD25⁺), descritas por Sakaguchi e colaboradores (1995), as quais são potencialmente capazes de suprimir a ativação, a proliferação e/ou a função efetora dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e, possivelmente, células NK, NK/T, linfócitos B e células dendríticas. Além do timo, as Tregs humanas foram isoladas em outros sítios anatômicos, como nos órgãos linfóides secundários, por exemplo, tonsilas e baço, além de sangue de cordão umbilical (CRUVINEL et al., 2008).

Apesar de todos esses mecanismos de tolerância central e periférica podem ocorrer falhas que resultam em reações contra as células e tecidos do próprio organismo e que causam doenças por auto-imunidade, as quais são denominadas doenças autoimunes (ABBAS et al., 2008). A maioria das respostas autoimunes contra antígenos próprios não resulta em progressão da doença, apenas quando respostas continuadas causam danos teciduais gerando um processo destrutivo é que se caracteriza uma doença como autoimune (PIETROPAOLO et al., 2008).

As doenças autoimunes podem ser sistêmicas, como o lúpus eritematoso ou órgão específicas, como o diabetes melito tipo 1. Os fatores que contribuem para o desenvolvimento dessas doenças são a suscetibilidade genética e os desencadeantes ambientais, como as infecções nos tecidos, que promovem o influxo de linfócitos auto-reativos e a ativação destas células, resultando em lesão tecidual (ABBAS et al., 2008).

Até atual conjuntura já foram descritas diversas doenças autoimunes, causadas por falhas no sistema imunológico, como Síndrome de Evans, Síndrome de Sjogren, Doença de Crohn, Esclerose múltipla, Vitiligo, Tireoidite de Hashimoto, Doença de Graves, Anemia hemolítica, Artrite Reumatoide, dentre outras (MDSAÚDE, 2002).

1.2 Artrite reumatoide

1.2.1 Epidemiologia

A Artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica, caracterizada por inflamação crônica dos membros e articulações, destruição cíclica dos ossos e cartilagens, além de gerar grave incapacidade (VINCELETTE et al., 2007).

Essa doença ocorre naturalmente por falhas no sistema autoimune, sendo caracterizada por infiltração de células T, células B, macrófagos e neutrófilos dentro do conteúdo sinovial e fluido do espaço periarticular. O infiltrado celular expressa moléculas de adesão e produz uma variedade de citocinas e quimiocinas inflamatórias que contribuem para a patogênese complexa da AR (FUJIKADO et al., 2006).

Embora haja diferentes tipos de tratamento para aliviar os sintomas da doença, não existe cura conhecida para a AR (VINCELETTE et al., 2007). Trata-se de uma doença três vezes mais frequente em mulheres e geralmente inicia-se entre 30 e 50 anos de idade, embora comprometa também homens e crianças (SOKKA, 2009). A prevalência da AR na população adulta de diversas regiões do mundo aparenta ser relativamente uniforme, com exceções importantes como a Austrália e a Jamaica, onde a prevalência é alta, e a África Sub-saariana, onde a prevalência é rara. No entanto, padrões epidemiológicos demonstram influência de etno-genética, de questões socioeconômicas, do fator rural-urbano e de fatores infecciosos de risco da doença (SHAPIRA et al., 2010). A figura 1 mostra a prevalência mundial da AR entre a população adulta no ano de 2010.

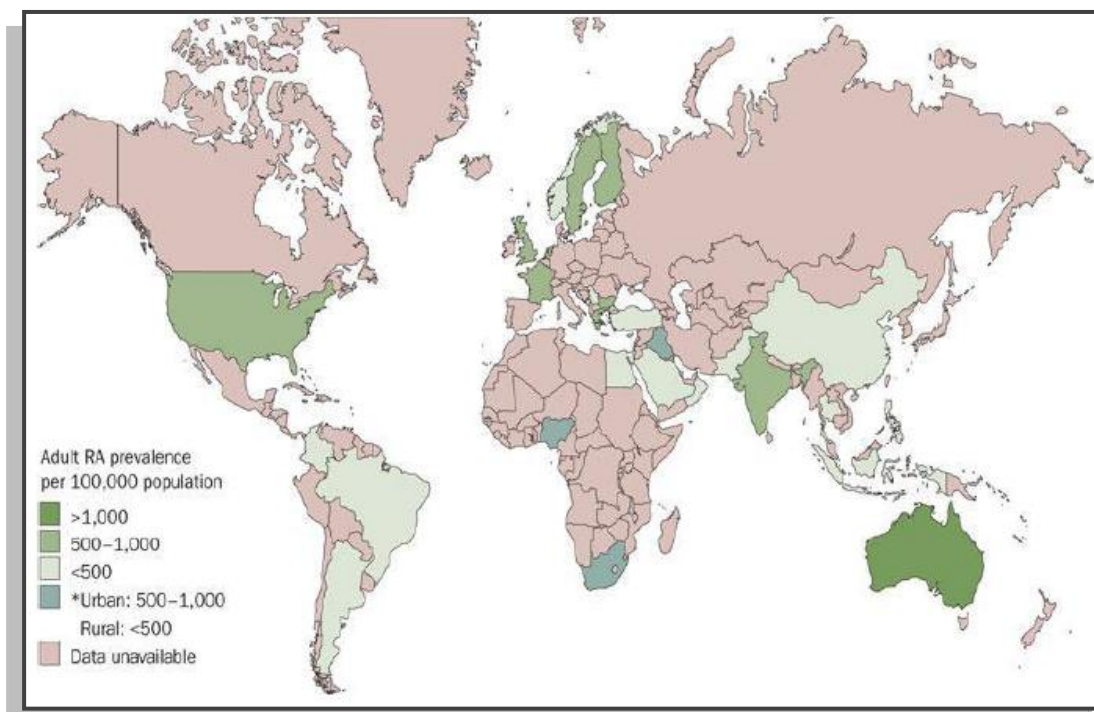


Figura 1: Prevalência da AR entre a população adulta mundial.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, Londres, v.6, nº8, p.468-476, 2010.

Durante anos, a AR foi considerada uma doença de caráter benigno, contudo estudos mais recentes mostraram que, devido a seus efeitos deletérios sobre a mobilidade física e a capacidade funcional, assim como a persistência do processo inflamatório (aterosclerose acelerada), pacientes com AR têm sua expectativa de vida significativamente diminuída quando em comparação com a população em geral (SHINOMIYA et al., 2008; UHLIG et al., 2008). Aproximadamente 50% dos indivíduos com AR ficam impossibilitados de trabalhar em 10 anos a partir do início da doença, o que representa significativo impacto econômico e social (FELSON, 2008).

1.2.2 Patogenicidade na AR

Estima-se em 60% a contribuição genética para o desenvolvimento da AR. Os fatores genéticos estão fortemente associados à positividade do anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) e à resposta do paciente ao tratamento (TAN et al., 2010).

A função de apresentar antígenos associados a células para serem reconhecidos pelas células T é desempenhada por proteínas especializadas que são codificadas por genes em um locus chamado de complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As moléculas do MHC humano são chamadas de antígeno leucocitário humano (HLA). Nos seres humanos, cada alelo HLA recebe uma designação numérica (ABBAS et al., 2008). Diversos locus já foram relacionados com o desenvolvimento da AR, sendo os alelos HLA-DRB1 a principal associação genética, estando também associados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (STAHL et al., 2010).

Os alelos HLA-DRB1 compartilham sequências de aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QRRAA, RRRAA ou QKRAA) chamadas epítipo comum (*shared epitope* [SE]), conservadas nas posições 71-75 da terceira região de hipervariabilidade da cadeia beta da molécula HLA-DRB1 (IOAN-FACSINAY et al., 2008). Numerosos estudos têm sido conduzidos a fim de esclarecer a relação entre a presença desses alelos e o desenvolvimento da AR, porém até o momento não há uma explicação consensual.

Já se encontra bem estabelecida a relação entre o uso de tabaco e a maior suscetibilidade ao desenvolvimento da AR em pacientes HLA-SE positivos

(LUDSTRÖM et al., 2009). Klareskog e colaboradores (2006) demonstraram que, em pacientes portadores do HLA-SE, o cigarro acelera as reações de citrulinização em proteínas pulmonares, o que dispara a produção de auto-anticorpos. O cigarro também afeta o curso da AR, elevando o aparecimento de nódulos reumatóides, bem como pode alterar o limiar da dor percebida pelo paciente (HARTY e VEALE, 2010).

1.2.3 Fisiopatogenia da AR

Nas artrites reumatóides, a membrana sinovial torna-se infiltrada por vários tipos de células inflamatórias, que sinergizam para causar destruição das articulações, que levam à sinovite, à infiltração celular e a um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea (FELDMANN, 1996). A membrana sinovial é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases e, em conjunto com osteoclastos e condrócitos, promove a destruição articular. Projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o *pannus*, característico da AR (FIRESTEIN, 2003).

Diversas hipóteses tentam explicar a sequência de eventos observados na AR. A mais aceita sugere que modificações pós-traducionais induzidas por agentes ambientais tornam moléculas próprias imunogênicas. Em consequência da exposição prolongada ao cigarro, por exemplo, ou a outros estímulos ambientais, a resposta do sistema imunológico adaptativo aos peptídeos citrulinados pode preceder em anos o aparecimento dos sintomas clínicos da AR (KLARESKOG, 2006; VAN DER WOUDE, 2010). Tanto o fibrinogênio como a vimentina citrulinados já foram identificados nas articulações de pacientes com AR e é provável que outras proteínas além dessas sofram reações de citrulinização (VOSSENAAR, 2004).

Induz-se de um papel para a inflamação mediada por células T nesta doença devido à sua semelhança com modelos animais, nos quais se sabe que a artrite é causada por células T específicas para colágeno articular. Os anticorpos também podem contribuir para inflamação articular nessa doença. Os pacientes com a forma adulta da artrite reumatóide frequentemente têm anticorpos circulantes, que podem ser IgM ou IgG, reativos com as porções Fc (e raramente

Fab) de suas próprias moléculas de IgG. Esses auto-anticorpos são chamados de fatores reumatóides, e sua presença é usada como teste de diagnóstico para AR (ABBAS et al., 2008).

A AR está associada com a citrulinização, que é a conversão de resíduos de arginina em resíduos de citrulina (figura 2). Peptídeos citrulinados têm sido encontrados na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide. Indivíduos com AR frequentemente têm auto-anticorpos para peptídeos citrulinados derivados da filagrina ou fibrina. No entanto, a participação desses auto-anticorpos na patogênese da doença permanece obscura, pois a filagrina não está presente nas articulações e a fibrina não é uma molécula específica da articulação (YOSHIDA et al., 2006).

O desequilíbrio entre populações de células regulatórias (como as células regulatórias naturais CD4+CD25+, Tr1 e Th3) e células efetoras pró-inflamatórias (Th1 e Th17) tem-se mostrado de importância fundamental para o desenvolvimento e a persistência da doença. Estudos demonstram o papel das células T CD4+ juntamente com os macrófagos no processo de dano articular com ênfase para as suas subpopulações TH1 e TH17, implicadas no processo inflamatório e de erosão óssea da cartilagem (CRUVINEL et al., 2008).

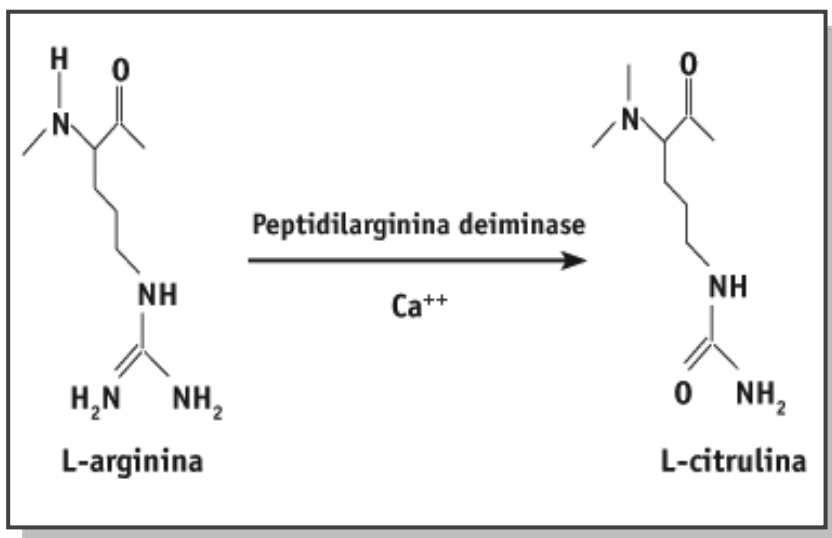


Figura 2: Deaminação da arginina pela enzima peptidilarginina deiminase.

Fonte: ALARCON e ANDRADE, 2007.

Numerosas citocinas, incluindo IL-1, IL-8, TNF- α e IFN- γ , têm sido detectadas no líquido sinovial (articulação). Acredita-se que as citocinas,

especialmente o TNF- α , ativem as células sinoviais residentes a produzir enzimas proteolíticas, como a colagenase, que medeiam a destruição da cartilagem, dos ligamentos e dos tendões das articulações. Muitas das citocinas que, supostamente, desempenham um papel no início da destruição articular provavelmente são produzidas em decorrência da atividade de células T e macrófagos locais (ABBAS et al., 2008). Há muitas evidências de que a IL-23, IL-17 e IL-27 também estão envolvidas na patogênese da artrite reumatóide (KUNZ e IBRAHIM, 2009).

Fatores que contribuem para o fenômeno de produção de citocinas são desconhecidos, contudo um desequilíbrio entre as taxas de proliferação celular e morte celular programada (apoptose) tem sido sugerido por estudos recentes da membrana sinovial em casos de AR, demonstrando que a apoptose de células sinoviais e a infiltração de linfócitos foram comuns no local. No sistema imune a apoptose está envolvida com o desenvolvimento e na seleção negativa dos linfócitos (BAUER et al., 2005).

Linfócitos T citotóxicos e células natural Killer (NK) podem eliminar seus alvos por indução da morte celular. Todas essas funções são mediadas principalmente através do receptor Fas/APO-1, do receptor do fator de necrose tumoral 1 e da via perforina (pfp)/granzima (BAUER et al., 2005).

A perforina é expressa principalmente em linfócitos T citotóxicos ativados (CTL's) e em células NK. O papel da perforina na artrite não é claro, contudo algumas observações sugerem um envolvimento desta molécula na patogênese da doença, por exemplo, CTL's expressando perforina tem sido demonstrados na membrana sinovial e camundongos deficientes em células CD8 parecem ser menos suscetíveis à indução de artrite com colágeno (BAUER et al., 2005).

A suscetibilidade à artrite reumatóide está ligada ao haplótipo HLA (Antígenos leucocitários humanos) – DR4 e menos ao DR1 e DRW1D. Em todos esses alelos, as sequências de aminoácidos das posições 65 a 75 da cadeia são quase idênticas. Esses resíduos estão localizados nas fendas de ligação a peptídeos das moléculas do HLA ou perto delas, sugerindo que influenciam a apresentação de antígenos ou o reconhecimento de células T (ABBAS et al., 2008).

1.2.4 Diagnóstico

As articulações ao longo do corpo não são todas iguais. Algumas articulações são conectadas por um tecido fibroso, que fixa um osso ao outro, tornando-os imóveis, como no caso dos ossos do crânio; outras são ligadas por cartilagens e permitem uma pequena mobilidade como os discos vertebrais que unem as vértebras da coluna; há ainda as articulações móveis, que normalmente são ligadas por uma cartilagem e uma bolsa cheia de líquido (líquido sinovial) permitindo amplo movimento dos ossos com mínimo atrito entre eles, como é o caso do joelho, cotovelo, ombros, dentre outros. Quando a articulação apresenta-se inflamada damos o nome de artrite, podendo acometer várias articulações (figura 3).



Figura 3: Articulações acometidas pela artrite, sendo mais comuns punhos, dedos, cotovelos, ombros, joelhos e tornozelos. **Fonte:** www.mdsaude.com. Disponível em <http://www.mdsaude.com/2010/02/artrite-reumatoide.html>

De acordo com Bértolo et al., (2007), o diagnóstico da artrite depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos. A orientação para diagnóstico é baseada nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia, como rigidez matinal: rigidez articular durando pelo menos uma hora; artrite de três ou mais áreas: pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular, observado pelo médico; artrite de articulações das mãos (punho, interfalangeanas proximais e meta-carpo-falangeanas); artrite simétrica; nódulo reumatóide; fator reumatóide (FR) sérico e alterações radiográficas: erosões ou descalcificações localizadas em radiografias de mãos e punhos, sendo que o primeiro e quarto critérios devem estar presentes por pelo menos seis semanas. A orientação para classificação exige quatro dos sete critérios como necessários para classificar um paciente como tendo AR.

O Colégio Americano de Reumatologia (ACR) em conjunto com a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) publicaram os novos critérios diagnósticos para AR, que são direcionados para o diagnóstico precoce da doença em pacientes que se apresentam com sintomatologia de curta duração (tabela 1).

Apesar da AR ser diagnosticada, primariamente, com base em suas manifestações clínicas, tem tradicionalmente, seu suporte sorológico dado pela determinação do fator reumatóide (FR) IgM. Porém, esse auto-anticorpo ocorre em pessoas com várias doenças inflamatórias, algumas doenças infecciosas e neoplásicas e, até mesmo, em pessoas hígdas, especialmente naquelas com idade elevada. O sistema de auto-anticorpos contra proteínas citrulinadas mostrou-se mais específico do que o FR e, portanto, de maior utilidade para o diagnóstico da AR, principalmente em suas fases iniciais (ALARCON e ANDRADE, 2007).

No contexto das doenças reumáticas, um biomarcador típico poderia ser um gene ou algum produto da expressão gênica, um auto-anticorpo, uma citocina, um agente da fase aguda, uma anormalidade tecidual possivelmente visualizada imunohistoquimicamente em uma biópsia sinovial ou um produto da degradação tecidual. As fontes desses biomarcadores poderiam ser soro, urina, fluido sinovial, tecido, células e assim por diante (SMOLEN et al., 2008).

Tabela 1: AR: artrite reumatoide; ACR: Colégio Americano de Reumatologia; EULAR: Liga Europeia contra o Reumatismo; FR: fator reumatoide; anti-CCP: antipeptídeo cíclico citrulinado; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação. Adaptado de Aletaha et al., 2010.

Tabela	Critérios classificatórios para AR (ACR e EULAR, 2010)	Pontuação
A	Envolvimento articular - por envolvimento entende-se edema ou sensibilidade à palpação, que pode ser confirmado por exames de imagem. Excluem-se: interfalangianas distais, primeira carpometacarpiana e primeira tarsometatarsiana	
	* 1 articulação grande (cotovelos, ombros, joelhos, coxofemorais e tornozelos)	0
	* 2-10 articulações grandes	1
	* 1-3 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangianas, interfalangianas proximais, segunda a quinta metatarsofalangianas, interfalangianas do hálux e punhos	2
	* 4-10 articulações pequenas	3
	* + 10 articulações (com pelo menos uma articulação pequena incluída)	5
B	Sorologia - o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação	
	* FR negativo e anti-CCP negativo (valores inferiores ou iguais ao limite fornecido pelo laboratório)	0
	*FR positivo fraco ou anti-CCP positivo fraco (valores positivos fracos = até três vezes o limite positivo fornecido pelo laboratório)	2
	* FR fortemente positivo ou anti-CCP fortemente positivo (valores fortemente positivos = três vezes acima do limite positivo fornecido pelo laboratório)	3
C	Reagentes de fase aguda - o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação	
	* PCR e VHS normais	0
	* PCR ou VHS alterados	1
D	Duração dos sintomas autorreferidos pelo paciente	
	* < 6 semanas	0
	* ≥ 6 semanas	1

1.2.5 Tratamento

No passado, acreditava-se que a AR fosse uma doença de caráter benigno e bom prognóstico. As terapias eram de baixo custo e visavam apenas ao controle dos sintomas, aguardando-se a regressão da doença. Entretanto, nas últimas décadas, a AR foi caracterizada como uma doença agressiva e associada

ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Diante desses fatos, a abordagem terapêutica da AR mudou radicalmente (EMERY, 2006).

O tratamento da AR para ser mais efetivo, deve ser associado a um diagnóstico precoce e intervenção adequada na tentativa de impedir o dano articular irreversível. O objetivo do tratamento é aliviar as dores, melhorar ou manter a capacidade funcional, prevenir as incapacidades, adaptar o paciente ao meio e melhorar sua qualidade de vida (REBELATTO e MORELLI, 2004). Este pode ser baseado em terapia não-farmacológica e terapia farmacológica. A abordagem não-farmacológica envolve repouso adequado, perda de peso no caso de pacientes obesos, terapia ocupacional, fisioterapia e aparelhos auxiliares podem melhorar os sintomas e ajudar a manter a função articular (WELLS et al., 2006).

O tratamento da AR também inclui drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (CGs) em baixa dosagem ou intra-articular, drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença (DMARD) e agentes imunobiológicos, que são produtos biológicos derivados de materiais vivos utilizados na cura, prevenção e tratamento de doenças em seres humanos, cuja escolha é sempre com base no balanço entre eficácia e segurança (LEE e WEINBLATT, 2001).

Já se encontram bem estabelecidos os benefícios decorrentes da implantação precoce do tratamento para a AR, que deve ser conduzido de forma agressiva, visando à remissão do processo inflamatório. Porém, ainda persistem diversas dúvidas e controvérsias sobre a terapia de escolha e o uso de agentes biológicos (EMERY, 2006).

2. MODELOS MURINOS

Modelos animais fornecem uma oportunidade experimental única para ampliar nossa compreensão a respeito da artrite humana (CORTHAY et al., 2000). Alguns genes já foram identificados, evidenciando um grau de parentesco genômico entre camundongos e humanos, descrito também homologia entre genes envolvidos em doença humana (BUCHBERG et al., 1989). Essas similaridades genômicas são bem acentuadas, sendo que dos 731 genes

identificados no cromossomo 16 de *Mus musculus*, apenas 1,92% dos genes não apresentam uma compatibilidade com genoma humano (MURAL et al., 2002).

Assim, considerando a necessidade de estudos para diagnóstico de Artrite, sendo essa ainda não totalmente descrita na literatura, faz-se necessário o uso de animais experimentais, sendo existentes inúmeros modelos para artrite. Camundongos geralmente são tidos como modelos excelentes para utilização de biblioteca de fagos em segmentação vascular devido o custo relativamente baixo, pequeno tamanho e predisposição à inúmeras doenças (PASQUALINI et al., 2002). Camundongos MRL/lpr, por exemplo, desenvolvem artrite espontânea e apresentam altos níveis sanguíneos de fatores reumatóides. No entanto, os mecanismos imunológicos da doença articular em camundongos MRL/lpr não são conhecidos. O modelo de indução da doença por colágeno demonstra que a auto-imunidade para o colágeno tipo II pode provocar um intenso processo inflamatório, que abrange a inflamação das articulações sinoviais, assim como o estímulo de diversas citocinas e mediadores podendo acarretar a destruição da cartilagem e erosão óssea (CHO et al., 2007). A artrite mediada por células T pode ser induzida em espécies susceptíveis de camundongos e ratos por imunização com colágeno tipo II (tipo este encontrado na cartilagem), e a doença pode ser transferida adotivamente para animais não imunizados com células T específicas do colágeno (ABBAS et al., 2008; CHEN et al., 2007).

Os modelos murinos são particularmente ferramentas muito poderosas para estudos genéticos da artrite reumatóide, uma vez que são linhagens puras de camundongos geneticamente homogêneas e, portanto, não possuem a heterogeneidade do complexo código genético humano. Camundongos DBA/1 (figura 4) também é um modelo murino de artrite induzida por colágeno (KUNZ et al., 2009).

O uso deste camundongo DBA/1J é de singular importância, por vários motivos. Primeiramente, ele é uma linhagem pura (isogênica), que não foi selecionada para qualquer fenótipo particular, sendo considerado como normal. Em segundo lugar, é altamente suscetível ao desenvolvimento de artrite após a imunização com colágeno tipo II heterólogo e homólogo bem como com pristane - terpenóides saturados (HOLMDAHL et al., 1992).



Figura 4: Modelo murino de linhagem DBA/1.

Fonte: Jackson Laboratory. Disponível em: <<http://jaxmice.jax.org/strain/000670.html>>

Após a imunização de camundongos DBA/1J com colágeno tipo II em adjuvante completo de Freund (CFA), a resposta proliferativa das células T CD4⁺ é observada em linfonodos em três semanas, e em quatro ou cinco semanas após a primeira imunização é observada no baço. Inflamação dos tecidos das articulações começa a se desenvolver cinco semanas depois da primeira imunização, e a artrite persiste no mínimo até a nona semana (CHO et al., 2007).

A susceptibilidade à artrite induzida por colágeno tipo II em camundongos DBA/1 é parcialmente controlada pelo Complexo MHC (major histocompatibility complex) classe II gene *A^q*. A linhagem parental altamente suscetível DBA/1 desenvolve artrite com um percentual entre 90-100 em machos e 60-100 em fêmeas (YANG et al., 1999).

Camundongo da linhagem DBA/1 pode desenvolver espontaneamente Artrite severa. Essa doença dependente da idade, do sexo e é geneticamente limitada nessa linhagem. Camundongos machos DBA/1 desenvolvem artrite espontaneamente na idade de quatro meses. A completa preponderância do sexo masculino para a susceptibilidade da doença foi investigada pela castração e pelo tratamento com testosterona em machos DBA/1. A artrite não se desenvolveu após a castração e a susceptibilidade à doença foi restaurada por tratamento com testosterona. (HOLMDAHL et al., 1992).

Considerando o desenvolvimento de doenças articulares espontaneamente em camundongos MRL/lpr e machos DBA/1, a artrite espontânea é uma doença muito mais grave no último, com formação mais acentuada de erosões das articulações (HOLMDAHL et al., 1992).

3. PHAGE DISPLAY

3.1 Tecnologia

Phage Display é uma técnica de clonagem muito utilizada em biologia molecular. Com o uso desta técnica, é possível selecionar e isolar vetores de clonagem gerados a partir de bibliotecas genômicas, juntamente com seu produto gênico (peptídeo), permitindo o rastreamento dos clones devido a ligação do fenótipo (peptídeo de interesse) com o genótipo (vetor de clonagem) que o expressou (WILSON et al., 2002).

As bibliotecas de peptídeos recombinantes apresentados em fagos são uma ferramenta fundamental para identificar os sítios ligantes de moléculas biológicas de interesse e no desenvolvimento de novas vacinas. *Phage Display* é um método de seleção no qual uma biblioteca contendo peptídeos ou proteínas são expressos na superfície de uma partícula viral (bacteriófago), com o material genético codificante para cada peptídeo localizado no genoma viral (AZZAZY e HIGHSMITH, 2002). Desta forma, é possível a correlação entre cada sequencia de proteína variante e sua respectiva sequencia de DNA (ADDA et al., 2002).

Smith (1985) foi o pioneiro em conseguir a expressão da enzima de restrição *Eco RI* em fusão com proteína oito (pVIII) do capsídeo do bacteriófago (fago). Smith e colaboradores estabeleceram um método de apresentação de polipeptídeos na superfície do bacteriófago filamentosso M13 (SERGEEVA et al., 2006), o qual pertence à família *Inoviridae* e possui como material genético DNA fita simples (ssDNA). Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias gram-negativas, sendo que a infecção ocorre via pilus sexual (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002). O vírus utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria hospedeira para se reproduzir. No entanto, o bacteriófago não gera uma infecção lítica em *Escherichia coli*, e preferencialmente induzem um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao f pilus de uma *E. coli* do gênero masculino (HEMMINGA et al., 2010). Vetores virais, como o fago lambda (STERNBERG e HOESS, 1995), bacteriófagos T4 e P4 (HOUSHMAND et al., 1999; LINDQVIST e NADERI, 1995), além dos vírus de eucariotos, tais como baculovírus, também podem ser utilizados neste processo (BOUBLIK et al., 1995).

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

As bibliotecas de peptídeos expressos em fagos mostraram complexidades suficientes para conter múltiplas sequências de DNA capazes de codificar os peptídeos de interesse. Ensaio foram realizados para desenvolver métodos alternativos, tais como a expressão de bibliotecas de peptídeos recombinantes na superfície de bactérias - *Cell display* (FUCHS et al., 1991), leveduras (BODER e WITTRUP, 1997) ou diretamente no DNA plasmidial (bibliotecas de peptídeos em plasmídeos) (CULL et al., 1992). Porém, todos estes sistemas resultaram em alterações nas células hospedeiras, e foram ineficazes em produzir bibliotecas com grandes diversidades de peptídeos, ou seja, baixa complexidade (AZZAZY e HIGHSMITH, 2002).

A apresentação de peptídeos em fagos apresenta a vantagem sobre outras tecnologias pela facilidade de mapear grande número de clones simultaneamente. Bibliotecas de cDNA, tal como as expressas em fagos lambda, são limitadas pelo número de colônias com o qual podem ser detectadas por hibridização, tipicamente na ordem de 10^4 colônias. Tecnologias baseadas em síntese química (química combinatorial) apresentam um limite máximo de peptídeos randômicos que podem ser mapeados com 10^3 a 10^4 sequências diferentes (NOREN e NOREN, 2001).

Cada membro da biblioteca apresenta uma forma distinta, que determinará a capacidade de interação deste com uma molécula alvo. Quanto maior for o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante afim à molécula alvo (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

Bibliotecas de peptídeos randômicos compreendem um vasto número de peptídeos de um dado tamanho (10^7 - 10^9), onde suas sequências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos (aa) em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou conformacional rígida, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos. A construção dessas bibliotecas é feita principalmente pela

inserção de oligonucleotídeos degenerados, sintetizados quimicamente, no gene que codifica a proteína do capsídeo (ROMANOV et al., 2001; AZZAZY e HIGHSMITH, 2002; DYBWAD et al., 2003).

Essas bibliotecas podem ser adquiridas comercialmente o que garante melhor a manutenção da variabilidade. As bibliotecas de peptídeos comerciais de 7 e 12-mer apresentam uma complexidade de 2 bilhões de clones independentes, que contêm muitas se não todas as $1,28 \times 10^9$ possíveis sequências hepta-peptídicas nas bibliotecas de 7-mer e C7C-mer e $4,1 \times 10^{11}$ sequências possíveis nas bibliotecas 12-mer (NEB, 2009).

O vetor M13KE, derivado do vetor de fagos m13mp19, possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou super-infecção por fago *helper*. Além disto, o gene *lacZ* presente neste vetor facilita a distinção entre colônias bacterianas, infectadas com fagos de bibliotecas, das colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (Messing et al., 1977; Messing, 1983). O vetor M13KE permite a construção e propagação de bibliotecas de *Phage Display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de seqüências e diversidade (BARBAS et al., 2001).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas - pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX (figura 5 B). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (PHIZICKY e FIELDS, 1995; BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002). Em uma extremidade da partícula existem 5 cópias, (33 resíduos de aminoácidos da pVII e 32 da pIX) de cada uma das proteínas hidrofóbicas pVII e pIX. Estas proteínas não são bem conhecidas, porém estudos sugerem que uma interaja com o DNA e a outra esteja exposta na superfície. A outra extremidade contém aproximadamente 5 moléculas de 112 resíduos de aminoácidos na pVI e 406 resíduos na pIII. Não se sabe muito sobre a estrutura da pVI, porém sabe-se que há interação da mesma com a pIII.

Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao pilus F da célula

bacteriana hospedeira. Ela apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. O domínio D1 contém 68 resíduos de aminoácidos da extremidade amino-terminal, sendo necessário durante a infecção por AB translocação de DNA e inserção de proteínas do capsídeo dentro da membrana. O domínio D2 estende-se do resíduo 87 ao 217 e é responsável pela ligação do pilus F. Ambos os domínios contêm moléculas de cisteína que formam pontes dissulfeto dentro de cada domínio. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo (LUBKOWSKI et al., 1998; HOLLIGER et al., 1999), ilustrado na figura 5C.

A extremidade carboxi-terminal da pIII é constituída de 150 resíduos de aminoácidos formando o domínio D3 que fornece estabilidade a proteína e interage com a pVI formando uma das extremidades da partícula (BARBAS et al., 2001). Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII as bibliotecas de peptídeos recombinantes fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas com apresentação na pVIII (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

Em sistemas nos quais todas as pIII ou pVIII são utilizadas, o tamanho da proteína inserida no vetor é limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, o que torna o fago pouco infectivo. Este sistema *Phage Display* foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos, correspondendo no máximo 30 aminoácidos (PHIZICKY e FIELDS, 1995).

Esta biblioteca de peptídeos é uma ferramenta poderosa para a identificação de ligantes específicos de uma proteína alvo. O peptídeo ou pequena proteína expressos na superfície do fago possibilita a seleção de sequências baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo (anticorpos, peptídeos, enzimas, receptores de superfície celular, etc.) por um processo de seleção *in vitro* denominado ciclo de seleção ou *Biopanning* (SMITH, 1985; PARMELY e SMITH, 1988).

A seleção é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos apresentados em fagos contra o alvo, a molécula alvo é imobilizada, geralmente, em uma placa de microtitulação (utiliza-se também, “beads”, resinas ou membranas); então uma população de fagos, em solução, é incubada com a

molécula alvo. Os fagos, contendo peptídeos recombinantes com afinidades pelo alvo, são capturados e permanecem ligados; já os fagos não ligados, ou seja, não específicos, são eliminados por sucessivas lavagens. O *pool* de fagos ligados ao alvo é eluído e amplificado em *Escherichia coli*. Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos a um novo ciclo, dado pela ligação ao alvo, eluição e amplificação, visando selecionar mais sequências específicas para o alvo. Após três à cinco repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas sequências de DNA podem ser obtidas por sequenciamento (BARBAS et al., 2001).

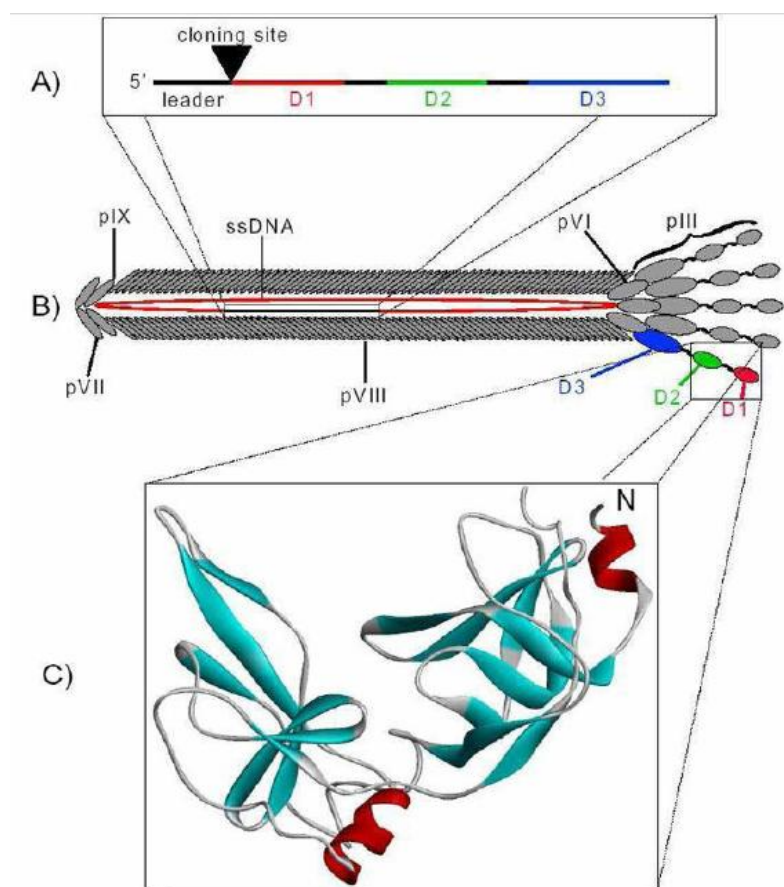


Figura 5: Fago filamentoso. A) Composição do gene III, representando o sítio de ligação de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral representando as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pXI; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da pIII (Holliger e Williams, 1999), as alfa-hélices mostradas em vermelho e as fitas β em ciano

O processo de eluição dos fagos ligados a alvos protéicos imobilizados compreende um ponto chave nos protocolos de seleção. Algumas alterações realizadas neste processo, durante o primeiro passo de seleção por afinidade, podem levar ao isolamento de clones com maior afinidade para a molécula alvo. D'Mello e Howard (2001), por exemplo, testaram tampões de eluição com pHs decrescentes, enquanto Gaskin et al. (2001) usaram a solução de proteína alvo como tampão de eluição e Yu et al. (2003) utilizaram tampão de baixo pH e proteína alvo para a eluição. Como resultado, todos obtiveram aumento na seleção de clones fortemente ligantes às respectivas proteínas.

Anticorpos protetores contra doenças infecciosas reconhecem peptídeos extraídos de bibliotecas recombinantes como seus epítomos. Estes peptídeos são capazes de induzir a formação de anticorpos efetivos contra a doença (DEMANGEL et al., 2000; LUNDIN et al., 1996). Peptídeos recombinantes dispersos em fagos podem se ligar a receptores hormonais (CWIRLA et al., 1997), proteínas (DENNIS et al., 2000) e componentes inorgânicos (WHALEY et al., 2000) e, assim, elucidar suas moléculas alvo.

A apresentação na superfície de fagos lambda pode ser eficaz para o isolamento de clones de DNA codificando auto-antígenos identificados no fluido sinovial ou soro de pacientes com artrite reumatóide ou com outras doenças autoimunes (NIWA et al., 2004).

A tecnologia de *Phage Display* pode levar a produção de uma enorme gama de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos, com especificidades pré-definidas. Além disso, tecnologias emergentes baseadas em *Phage Display* podem beneficiar diagnósticos através da produção de moléculas que seria inviável obterem por métodos tradicionais. Foram expressos na superfície viral anticorpos (BARBAS et al., 1992; LIU et al., 2004; RADER e BARBAS, 1997), peptídeos (NOREN e NOREN, 2001), enzimas (SOUMILLION, 1994), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas. Além disso, apresenta grande impacto na imunologia, biologia celular, desenvolvimento de medicamentos e outros fármacos (AZZAZY e HIGHSMT, 2002; WILLATS, 2002).

3.2 Phage display in vivo

Phage display é utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em alvos do tipo celular ou um órgão específico (PASQUALINI & RUOSLAHT, 1996). Neste caso, a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos e os fagos ligados por afinidade são eluídos e analisados (ARAP, 2005).

Embora essa abordagem venha sendo utilizada apenas em animais, Arap e colaboradores (2002) utilizaram o *Biopanning in vivo* em humanos para o mapeamento de receptores ligantes de vasos sanguíneos de um paciente com câncer.

Comparado com a abordagem *in vivo*, a tecnologia de *Phage display in vitro*, é mais rápida e simples, pois não são necessários construção de modelos em camundongos e *screening* contra a complicada vasculatura e muitos tipos de tecidos normais (DU et al., 2006). No entanto, o *Biopanning in vivo* representa uma recente tecnologia de alto potencial, com capacidade de identificar moléculas de peptídeos que se ligam de forma estável e em condições naturais em um determinado destino (BARBAS et al., 2001).

Modelos murinos geralmente são excelentes ferramentas para utilização de biblioteca de fagos em segmentação vascular, uma vez que apresentam vantagens, como custo relativamente baixo, pequeno tamanho, predisposição à inúmeras doenças, dentre outras (PASQUALINI et al., 2002).

Diante do exposto, o desenvolvimento de estratégias que direcionam a investigação de novos biomarcadores pode levar a novos métodos para o diagnóstico e tratamento da Artrite Reumatóide. A identificação de peptídeos ligantes à articulações inflamadas por meio da tecnologia de *Phage display in vivo* poderá ser potencialmente utilizada para o desenvolvimento de novas plataformas para diagnóstico precoce e estratégias terapêuticas apropriadas para as populações em risco, além de identificar marcadores seletivos, podendo ser úteis no direcionamento celular, com desenvolvimento de drogas em tecidos selecionados por meio de suas sequências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K, A.; LICHTMAN, A, H. *Imunologia Celular e Molecular*. **Elsevier Editora**, 5 ed., 2005.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. **Elsevier Editora**, 6 ed., 2008.

ADDA, C.G.; ANDERS, R.F.; TILLEY, L.; FOLEY, M. Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. **Comb. Chem. High Throughput. Screen.** 5:1-14, 2002.

ALARCON, R.T.; ANDRADE, L.E.C. Anticorpos Antiproteínas Citrulinadas e a Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 47, nº3, p.180-187, 2007.

ALETAHA, D. et al. Rheumatoid arthritis classification criteria. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 9, p. 2569-81, 2010.

ARAP, M.A. Phage display technology: applications and innovations. **Genet Mol Biol.** 28(1):1-9, 2005.

ARAP, W.; KOLONIN, M.G.; TREPEL, M.; LAHDENRANTA, J.; CARDO-VILA, M.; GIORDANO, R.J. et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. **Nat Med.** 8(2):121-127, 2002.

AZZAY, H.M.; HIGHSMITH, W.E.Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin Biochem.** 35:425-445, 2002.

BARBAS III C.F.; BAIN, J.D.; HOEKSTRA, D.M.; LERNER, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. **Proc Natl Acad Sci.** 89:4457, 1992.

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

BAUER, K. et.al. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v.7, nº4, p. 877-884, 2005.

BÉRTOLO, M.B, et.al. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.47, nº3, p.151-159, 2007.

BODER, E.T.; WITTRUP, K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. **Nat Biotechnol.** 15:553-557, 1997.

BOUBLIK, Y.; DI BONITO, P.; JONES, I.M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. **Biotechnology.** 13:1079-1084, 1995..

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº26, 2002.

BUCHBERG, A.M.; BROWNELL, E.; NAGATA, S.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G. A comprehensive genetic map of murine chromosome 11 reveals extensive linkage conservation between mouse and human. **Genetics**, 122: 153-161, 1989.

CHEN, Z.; TATO, C.M.; MUUL, L.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J.J. **Distinct Regulation of Interleukin-17 in Human T Helper Lymphocytes**. *Arthritis & Rheumatism*, 56(9):2936-2946, 2007.

CHO, Y.-G. et.al. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v.7, nº01, p.65-70, 2007.

CHUNG, J.Y. et al. Factors in tissue handling and processing that impact RNA obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 56: 1033-1042, 2008.

CORTHAY, A.; HANSSON, A.; HOLMDAHL, R. T lymphocytes are not required for the spontaneous development of enthesal ossification leading to marginal ankylosis in the DBA/1 mouse. **Arthritis & Rheumatism**, Atlanta, v.43, nº4, p.844-851, 2000.

CRUVINEL, W. et.al. Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.48, nº06, p.342-355, 2008.

CULL, M.G.; MILLER, J.F.; SCHATZ, P.J. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. **Proc Natl Acad Sci**. 89:1865-1869, 1992.

CWIRLA, S.E.; BALASUBRAMANIAN, P.; DUFFIN, D.J.; WAGSTROM, C.R.; GATES, C.M.; SINGER, S.C. et al. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. **Science**. 276:1696-1699, 1997.

DEMANGEL, C.; MAROUN, C.R.; ROUYRE, S.; BON, C.; MAZIÉ, J.C.; CHOUMET, V. Combining phage and molecular modeling to map the epitope of a neutralizing antitoxin antibody. **Eur J Biochem**. 267:2345 -2353, 2000.

DENNIS, M.S.; EIGENBROT, C.; SKELTON, N.J.; ULTSCH, M.H.; SANTELL, L.; DWYER, M.A. et al. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. **Nature**. 404:465-470, 2000.

D'MELLO, F.; HOWARD, C.R. An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. **J Immunol Methods**. 247:191–203, 2001.

DU, B.; QIAN, M.; ZHOU, Z.; WANG, P.; WANG, L.; ZHANG, X. et al. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. **Biochem Biophys Res Commun**. 342(3):956-962, 2006.

DYBWAD, A.; LAMBIN, P.; SIOUD, M.; ZOUALI, M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. **Scand J Immunol**. 57(6):583-590, 2003.

EMERY, P. Treatment of rheumatoid arthritis. **BMJ**, v. 332, n. 7534, p. 152-5, 2006.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. Rheumatoid arthritis. **Cell**, v. 85, p. 307-10, 1996.

FELSON, D. T. Comparing the prevalence of rheumatic diseases in China with the rest of the world. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 106, 2008.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 5, n. 423, p. 356-61, 2003.

FUCHS, P.; BREITLING, F.; DUBEL, S.; SEEHAUS, T.; LITTLE, M. Targeting recombinant antibodies to the surface of Escherichia coli: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. **Biotechnology**. 9:1369-1372, 1991.

FUJIKADO, N.; SAIJO, S.; IWAKURA, Y. Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v.8, nº4, p.1-13, 2006.

GASKIN, D.H.; STARCK, K.; TURNER, N.A.; VULFSON, E.N. Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. **Enzyme Microb Technol**. 28:766–772, 2001.

GODFREY, T.E. et al. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5´ nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Molecular Diagnostics**, 2: 84-91, 2000.

HARTY, L. C.; VEALE, D.J. Irish smokers with rheumatoid arthritis suffer more than their nonsmoking counterparts. **J Rheumatol**, v. 37, n. 5, p. 1062, 2010.

HEMMINGA, M.A., VOS, W.L., NAZAROV, P.V., KOEHORST, R.B.; WOLFS, C.J., SPRUIJT, R.B., STOPAR, D. Viruses:incredible nanomachines. **New advances**, 2010.

HOLLIGER, P.; WILLIAMS, R.L.; RIECHMANN, L. Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9: Evidence for conformational lability. **J Mol Biol**. 288:649-657, 1999.

HOLMDAHL, R. et.al. Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v.88, n°3, p.467-472, 1992.

HOUSHMAND, H.; FROMAN, G.; MAGNUSSON, G. Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. **Anal. Biochem.** 268:363-370, 1999.

IOAN-FACSINAY, A. *et al.* Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. **Arthritis Rheum**, v. 58, p. 3000-8, 2008.

KLARESKOG, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 1, p. 38-46, 2006.

KUNZ, M.; IBRAHIM, S.M. Cytokines and Cytokine Profiles in Human Autoimmune Diseases and Animal Models of Autoimmunity. **Mediators of Inflammation**, Londres, v. 2009, p.1-20, 2009.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, p. 903-11, 2001.

LINDQVIST, B.H.; NADERI, S. Peptide presentation by bacteriophage P4. **FEMS Microbiol Rev.** 17:33-39, 1995.

LIU, B.; CONRAD, F.; COOPERBERG, M.R.; KIRPOTIN, D.B.; MARKS, J.D. Mapping Tumor Epitope Space by Direct Selection of Single-Chain Fv Antibody Libraries on Prostate Cancer Cells. **Cancer Research**. 64:704–710, 2004.

LUBKOWSKI, J.; HENNEKE, F.; PLUCKTHUN, A.; WLODAWER, A. The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure domains of g3p. **Nature Struct Biol**. 5:140-147, 1998.

LUNDIN, K.; SAMUELSSON, A.; JANSSON, M.; HINKULA, J.; WAHREN, B.; WIGZELL, H. et al. Peptides isolated from random peptide libraries on phage elicit a neutralizing anti-HIV-1 response: analysis of immunological mimicry. **Immunology**. 89:579-586, 1996.

LUNDSTRÖM, E. *et al.* Gene-environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 6, p. 1597-603, 2009.

MACABEO-ONG, M. et al. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. **Modern Pathology**, 15(9): 979-987, 2002.

MDSAÚDE, 2002 - Disponível em <<http://www.mdsaude.com/2008/10/doena-auto-imune.html>>

MDSAÚDE, 2010 - Disponível em <<http://www.mdsaude.com/2010/02/artrite-reumatoide.html>>

MESSING, J.; GRONENBORN, B.; MULLER, H.B.; HANS, H.P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindIII fragment of the lac

regulatory region in M13 replicative form in vitro. **Proc Natl Acad Sci.** 74:3642-3646, 1977.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods Enzymol.** 101:20-78, 1983.

MURAL, R.J. et al. A Comparison of Whole-Genome Shotgun-Derived Mouse Chromosome 16 and the Human Genome. **SCIENCE**, v. 296, 2002.

NEW ENGLAND BIOLABS (NEB). Protein Tools: Ph.D. **Phage Display Libraries Instruction Manual.** Ipswich: New England Biolabs, 44p., 2009.

NIWA, M. et al. Efficient isolation of cDNA clones encoding rheumatoid arthritis autoantigens by lambda phage surface display. **Journal of Biotechnology**, v.114, p. 55-58, 2004.

NOREN, K.A.; NOREN, C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display peptide libraries. **Methods.** 23:169–178, 2001.

PARMELY, S.F.; SMITH, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene.** 73:305-318, 1988.

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

PASQUALINI, R.; ARAP, W.; RAJOTTE, D.; RUOSLAHTI, E. In Vivo Selection of Phage Display Libraries. In: BARBAS III, C.F. et al. **Phage Display: A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 22, 2002.

PHIZICKY, E.M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiol.** 59:94-123, 1995.

PIETROPAOLO, M. et.al. Primer: Immunity and Autoimmunity. **Diabetes**, Los Angeles, v.57, nº11, p.2872-2882, 2008.

REBELATTO, José Rubens; MORELLI, José Geraldo da Silva. **Fisioterapia Geriátrica**. Barueri - São Paulo: Editora Manole, 268p., 2005.

RADER, C.; BARBAS III, C.F. **Phage display of combinatorial antibody libraries. Current Opinion in Biotechnology.** 8:503-508, 1997.

ROBERTSON, M.W. Phage and Escherichia coli expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alfa-subunit ectodomain. **J Biol Chem.** 268:12736-12743, 1993.

ROMANO, V.I.; DURAND, D.B.; PETRENKO, V.A. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. **The Prostate.** 47:239-251, 2001.

SAKAGUCHI, S. et.al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 155, nº 3, p. 1151- 1164, 1995.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, Londres, v.6, nº8, p.468-476, 2010.

SHINOMIYA, F. et al. Life expectancies of Japanese patients with rheumatoid arthritis: a review of deaths over a 20-year period. **Mod Rheumatol**, v. 18, n. 2, p. 165-9, 2008.

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

SMOLEN, J.S. et al. The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now? **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v.10, n°3, p.208-208, 2008.

SOKKA, T. et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. **Arthritis Res Ther**, v. 11, p. R7, 2009.

SOU MILLION, P.; JESPERS, L.; BOUCHET, M.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; WINTER, G.; FASTREZ, J. Selection of β -lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. **J Mol Biol**. 237:415-422, 1994.

SERGEEVA, A.M.G., KOLONIN, J.J.; MOLLDREM, R.; PASQUALINI and ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Adv. Drug Delivery Rev.**, 58: 1622-1654, 2006.

STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study metaanalysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nat Genet**, v. 42, n. 6, p. 508-14, 2010.

STEMBERG, N.; HOESS, R.H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. **Proc Natl Acad Sci**. 92:1609-1613, 1995.

TAN, R. J. L. *et al.* Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor Treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p. 1029-35, 2010.

UHLIG, T. *et al.* Rheumatoid arthritis is milder in the new millennium: health status in RA patients 1994-2004. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 12, p. 1710-5, 2008.

VAN DER WOUDE, D. *et al.* Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 8, p. 1554-61, 2010.

VINCELETTE, J. *et.al.* Gait analysis in a murine model of collagen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v.09, nº6, p. 1-7, 2007.

VOSSENAAR, E. R.; VAN VENROOIJ, W. J. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, n. 6, p. 107-11, 2004.

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

WELLS, Bárbara G.; DIPIRO, Joseph T.; SCHWINGHAMMER, Terry L.; HAMITON, Cindy W.. **Manual de Farmacoterapia**. 6ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, 29p., 2006.

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

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 5 ed., 2002.

YANG, H.-T. et.al. Identification of genes controlling collagen-induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.163, nº5, p.2916-2921, 1999.

YOSHIDA, M. et.al. Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**. Tóquio, v.16, nº5, p. 276-281, 2006.

YU, H.; DONG, X.Y.; SUN, Y. An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a Phage Display peptide library. **Biochemical Engineering Journal**. 2003.

CAPÍTULO II:

Seleção *in vivo* de peptídeos ligantes a articulações inflamadas e seu potencial uso em diagnóstico

O formato deste capítulo atende as exigências do periódico da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Resumo

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença autoimune crônica, caracterizadas por inflamação persistente das articulações, sendo os sinais típicos desta inflamação a dor, inchaço e limitação dos movimentos. O termo Artrite se dá a uma inflamação da articulação, de causa pouco conhecida, podendo acometer diferentes articulações. O diagnóstico da AR depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos. Desta forma, trabalhos que são direcionados a investigar novos biomarcadores tornam-se de grande importância para o diagnóstico da AR. O objetivo deste estudo foi selecionar e identificar por meio da metodologia de *Phage Display in vivo*, peptídeos ligantes à regiões inflamadas de camundongos DBA/1 sintomatizados com alta inflamação induzida por colágeno tipo II. Para indução da artrite, camundongos de linhagem isogênica DBA/1J foram imunizados com 100ug de colágeno tipo II emulsificado com adjuvante de Freund completo. Para seleção de peptídeos ligantes à regiões inflamadas foi realizado um *biopanning* in vivo utilizando uma biblioteca de peptídeos Ph.D.-C7C expressa na superfície do fago filamentoso M13 por três ciclos de seleção, sendo a última realizada com subtração dos inespecíficos utilizando articulações saudáveis. O DNA dos clones selecionados foi sequenciado, traduzido e os diversos clones foram submetidos aos ensaios de Imunohistoquímica. Dentre os 144 clones sequenciados, 115 apresentaram sequências válidas, dos quais foram identificadas 20 sequências diferentes. As análises de bioinformática demonstraram que não há consenso entre a maioria dos peptídeos selecionados. O ensaio de Imunohistoquímica permitiu a pré-validação de dois clones com potencial biomarcador para o imunodiagnóstico da Artrite Reumatóide.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide, *Phage display in vivo*, imunodiagnóstico

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by joints persistent inflammation. Pain, swelling and limitation of movement are the typical signs of this inflammation. Arthritis is the name given to a joint inflammation, with a barely known root, and may affect different joints. The diagnosis of RA depends on the association of a number of symptoms and clinical signs, laboratory and radiographic examinations. Thus, studies directed to investigate new biomarkers become of great importance for the diagnosis of RA. The aim of this study was to select and identify the methodology by *Phage Display in vivo* binder peptides to inflamed regions of mice DBA / 1J with high inflammation induced by collagen type II. For induction of arthritis, mice of isogenic DBA/1J were immunized with 100ug of type II collagen emulsified with complete Freund's adjuvant. For the selection of binder peptides to the inflamed regions was performed an *in vivo* biopanning using a peptide library Ph.D.-C7C expressed on the surface of filamentous phage M13 for three cycles of selection, the last one being performed with subtraction of nonspecific using healthy joints. The DNA of selected clones was sequenced, translated and several clones were subjected to the tests Immunohistochemistry. Among the 144 clones sequenced, 115 had valid sequences. Among the last ones were identified 20 different sequences. The bioinformatics analysis demonstrated that there is no consensus among the majority of selected peptides. The test Immunohistochemistry allowed the pre-validation of two clones with a potential biomarker for Immunodiagnosis of Rheumatoid Arthritis.

Key words: **Rheumatoid Arthritis, Phage display in vivo, Immunodiagnostic**

INTRODUÇÃO

A primeira descrição da artrite reumatóide foi em 1800 pelo médico francês Dr. Augustin Jacob Landré-Beauvais, baseado no Hospital Salpêtrière, em Paris. O termo "artrite reumatóide" (AR) foi cunhado posteriormente em 1859 pelo reumatologista britânico Dr. Alfred Baring Garrod (LANDRE-BEAUVAIS, 2001).

Artrite reumatóide, também usualmente conhecida como artrite anquilosante, artrite degenerativa, poliartrite crônica evolutiva ou artrite infecciosa crônica é uma doença autoimune sistêmica crônica, que se caracteriza pela inflamação das articulações, como indica o termo artrite (ite = inflamação, art = articulação). Esta doença pode acarretar incapacidade funcional dos pacientes acometidos, além de danificar as articulações, apresentando manifestações como rigidez matinal por, no mínimo, uma hora, fadiga, limitação dos movimentos e perda de peso (BERTOLO et al., 2009).

A AR é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, afetando mulheres três vezes mais do que homens e aumenta sua prevalência com a idade (LIPSKI, 1998). Em geral, a AR acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos. Com a progressão da doença, os pacientes com AR desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades s tanto de vida diária como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (ACR, 2002).

O diagnóstico depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos (ARNETT et. al., 1988).

Nesse sentido, a busca por novos biomarcadores pode levar a novos métodos para o diagnóstico e tratamento da AR. A biblioteca combinatória de peptídeos de *Phage display*, emergiu como um recurso de triagem para a identificação de peptídeos ligantes em molécula alvo. Essa tecnologia tem sido aplicada em vários estudos, tais como interações de proteína ligante; maturação de afinidade de peptídeos ligantes isolados previamente; mapeamento de epítomos ligantes em sítios e identificação de especificidade de enzima substrato.

Além disso, apresenta grande impacto na imunologia, biologia celular, desenvolvimento de medicamentos e outros fármacos (AZZAZY e HIGHSMITH, 2002; OHKUBO et. al., 2001; WILLATS, 2002).

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

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

Os resultados esperados e observados nos testes *in vitro* nem sempre correspondem àqueles empregados *in vivo*, por isso torna-se fundamental realizar os experimentos em animais. O uso do modelo murino nesse trabalho se justifica devido a necessidade de um modelo vivo que se assemelha ao observado em humanos, já que a linhagem DBA/1J é geneticamente modificada para portar predisposição para desenvolver artrite após estimulação por colágeno tipo II.

OBJETIVOS

- Induzir a Artrite em camundongos DBA/1J com Colágeno tipo II;
- Identificar peptídeos ligantes a regiões vasculares inflamadas em modelo murino de artrite reumatóide, por meio da técnica de *Phage Display in vivo*;
- Caracterização *in silico* das sequências dos peptídeos isolados por bioinformática;
- Validação por imuno-histoquímicas dos clones selecionados;
- Avaliação do potencial dos clones selecionados para padronização de novas plataformas diagnósticas da doença.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na utilização de animais (CEUA), sendo o número de seu registro 020/12, e desenvolvido no laboratório de Nanobioecnologia e da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2011 – 2012.

2. Modelos murinos de artrite reumatóide

Foram utilizados camundongos isogênicos machos (*Mus musculus*) da linhagem DBA/1, obtidos pela reprodução de matrizes mantidas no CEBEA (Centro de Experimentação Animal) – UFU.

3. Local de realização

Todos os experimentos relacionados ao manuseio de camundongos foram realizados no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (LEA – UFU). Todos os procedimentos experimentais envolvendo análise da seleção, caracterização dos biomarcadores foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

4. Delineamento e método experimental

4.1 Indução da artrite

Um grupo de nove animais com 12 semanas de vida (BARBAS et al., 1992) foi imunizado com 62,5 µL contendo 100µg de Colágeno bovino tipo II (BD Biosciences) homogeneizado com adjuvante de Freund completo - CFA (Sigma Chemical Co) na proporção 1:1, utilizado como imunopotenciador, com micobactérias para emulsão da solução, sendo injetada na base da cauda e então mantidos sob observação diária, em gaiolas forradas com maravalha, ração

e água *ad libitum*, em ambiente monitorado com ciclo de luz de 12 horas e temperatura ambiente de 25°C. Os animais não foram submetidos a situações de estresse ou dor, sendo somente observado o curso natural de manifestação da artrite.

Outro grupo com apenas três animais foi utilizado como controle negativo, recebendo na imunização apenas PBS (1x) com CFA.

4.2 Mensuração do edema

Após determinado período da imunização, de aproximadamente 2-3 meses, os animais do grupo positivo e negativo tiveram o edema formado medido pelo uso de um paquímetro e análise visual da inflamação, conforme BRAND et al. (2007), no protocolo de indução de Artrite por colágeno, como mostra tabela 1.

Tabela 1: Escore para análise subjetiva de gravidade da inflamação.

Sistema de Score para avaliação subjetiva de gravidade da artrite	
Score da gravidade	Grau da inflamação
0	Sem evidencia de eritema ou edema
1	Eritema e suave edema confinado no tarso ou articulação do joelho
2	Eritema e suave edema estendendo do joelho ao tarso
3	Eritema e moderado edema estendendo do joelho para articulação do metatarso
4	Eritema e grave edema abrangendo o joelho, patas e digitais, ou anquilose dos membros

4.3 Biopanning *in vivo*

Para selecionar biomarcadores específicos para a artrite reumatóide, foi escolhida a biblioteca de peptídeos randômicos fusionados em fagos (Ph.D.c7c, NEW ENGLAND BioLabs®Inc.). A biblioteca é composta de 7 aminoácidos randômicos e mais dois resíduos de cisteína nas extremidades, que se encontram entre duas curtas sequências espaçadoras Gly-Gly-Gly fusionada à região N-terminal da Proteína III de bacteriófagos filamentosos M13. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos contêm peptídeos amino-terminais. Para realização do *panning*, os animais utilizados para cada ciclo apresentavam características evidentes de inflamação, como edema e vermelhidão. Foram realizados três

ciclos de seleção, utilizando articulações saudáveis dianteira e traseiras para subtração dos inespecíficos no último ciclo.

Nos três ciclos de seleção realizados, foi utilizado um animal por ciclo, totalizando três animais para a seleção de peptídeos ligantes à articulação inflamada. Para o primeiro ciclo de seleção, foram adicionados 10 uL contendo 1×10^{11} da biblioteca, diluída em 10 uL PBS 1x, e injetado em um camundongo com uma ou mais articulações inflamadas. Para a migração dos fagos até a articulação inflamada do camundongo, foram aguardados intervalos de 40 min. Após este tempo, foi feito um aprofundamento da anestesia com 20uL de Xylasina 2% e 10uL de Ketamina 10% com administração intraperitoneal (TELMO et al., 2004) e posterior retirado a(s) articulação(ões) acometidas pela doença. Os pelos e peles foram removidos, de modo que a sua articulação ficasse mais exposta e livre de contaminantes. Este material foi macerado no nitrogênio líquido e transferido para um microtubo estéril, onde os fagos ligantes foram desligados por eluição ácida com 1000uL de glicina (0,1M; pH 2,2) e agitada por 10 min à 25°C. Posteriormente foi submetido à centrifugação de 2000 rpm, à 4°C por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo. O sobrenadante foi neutralizado com 150uL de Tris-HCl (1M; pH 9,1) e armazenado à 4°C. O segundo ciclo ocorreu conforme o anterior (figura 1).

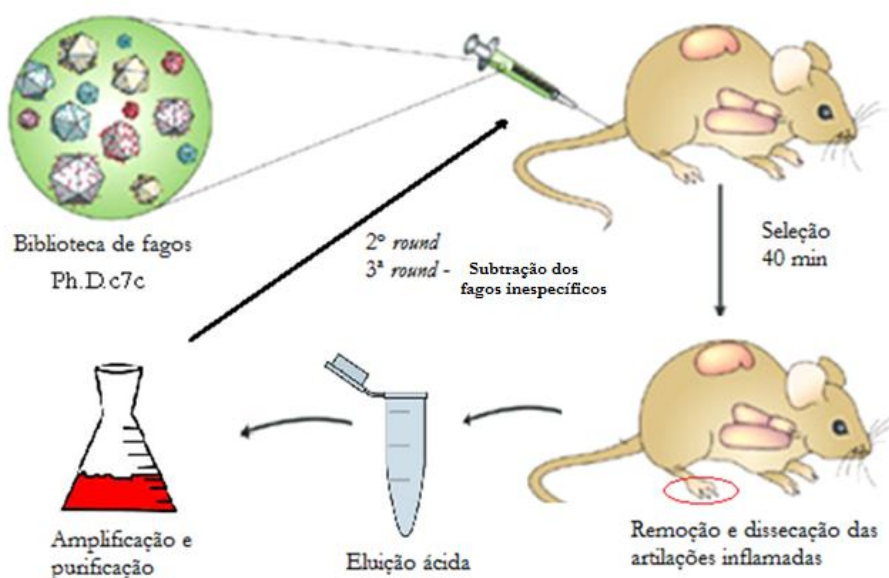


Figura 1: Estratégia do primeiro e segundo rounds.

Três ciclos foram suficientes para selecionar fagos ligantes aos tecidos específicos, sendo o último ciclo diferenciado pela etapa de subtração dos fagos inespecíficos em tecidos saudáveis, em gelo a fim de evitar fagocitose, por trinta minutos cada par de patas, com esporádicas suaves agitações (figura 2).

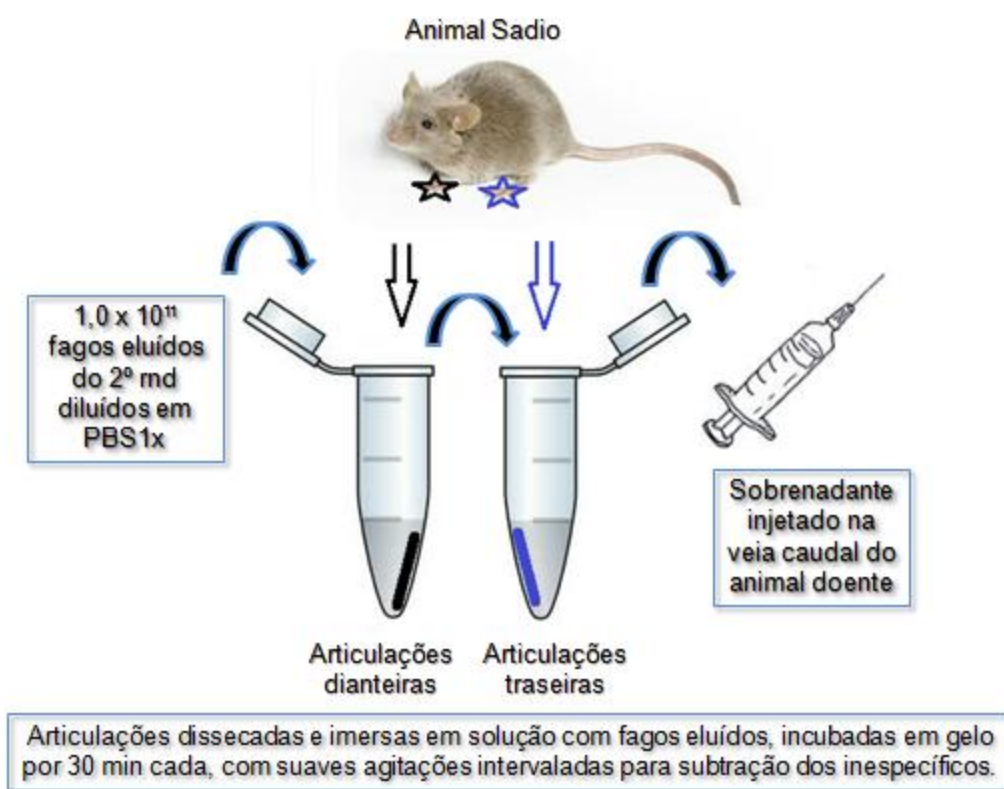


Figura 2: Estratégia do terceiro round.

4.4 Titulação

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

Para titulação, 10µL do eluato de fagos não amplificados e 1uL do eluato amplificado foram recolhidos. A quantidade de entrada das partículas virais durante os ciclos do *biopanning* foi constante de 1×10^{11} . A solução de fagos foi submetida à diluições seriadas de dez vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10^1 até 10^4 , sendo utilizado para

soluções com fagos amplificados a faixa de diluição de 10^8 a 10^{11} . Para cada diluição foi acrescentado 200µL da cultura de ER2738 na fase mid-log (OD600 ~ 0,5). Esta mistura foi brevemente agitada e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (BARBAS et al., 1992). As bactérias, já infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de agarose Top (0,06g LB; 0,003g MgCl₂.6H₂O; 0,021g agarose) à 55°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetraciclina.

Para cada diluição foi confeccionada uma placa. Então, as placas foram incubadas a 37°C durante um período de 16 horas. Após este período, as colônias azuis das placas foram contadas.

Cada número das colônias obtidas foi multiplicado pelo fator de diluição de cada placa para se obter o título dos fagos. Os procedimentos do primeiro *round* foi repetido por mais dois *rounds*, a fim de tornar mais específica a seleção dos motivos.

4.5 Amplificação e Purificação dos fagos

Para a amplificação do eluato remanescente, uma colônia isolada de *Escherichia coli* (linhagem ER2738) foi previamente crescida em meio LB (0,2g LB + 20mL de água destilada e posterior esterilização) com tetraciclina, sob agitação a 37°C até a fase early-log (OD 600 ~ 0,3). O eluato foi adicionado e incubado a 37°C por 5 horas sob agitação de 300rpm. A cultura amplificada foi submetida à centrifugação de 10000 rpm por 10 min à 4°C e recentrifugada para total separação das bactérias. Logo após, 80% do sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril), sendo incubada por 16 horas à 4°C. Decorrida a sedimentação, a solução foi centrifugada a 10000 rpm por 15 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado e a centrifugação novamente realizada, para remoção de sobrenadante residual. O sedimento foi suspenso em 1mL de PBS 1x e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl incubado em gelo por 1 hora. Assim, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 min à 4°C, descartado o sobrenadante e a centrifugação novamente realizada. O sedimento foi ressuspenso em 200µL PBS 1x, obtendo-

se então o eluato amplificado e purificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

4.6 Extração do DNA dos fagos selecionados

As colônias obtidas nas placas tituladas do 3º ciclo de seleção que apresentam coloração azul, confirmando a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β -galactosidase pelo fago, foram novamente amplificadas separadamente em poços de uma placa de cultura (do tipo *deep well*) contendo 1,2mL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase early-log (OD600 ~ 0,3) para a extração do DNA dos fagos. A placa foi, então, vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C por 24 horas, sob agitação de 250 rpm. Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm a 20°C, durante 40 min. Então, 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 15 min à 25°C, com 200µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 min para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de Tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram acrescentados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 min em temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas à 3700 rpm à 20°C por 40 min e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500µL de etanol a 70% e incubado por 10 min em à 25°C, e recentrifugado nas mesmas condições anteriores. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído em 20µl de água Milli-Q e armazenado a 4°C. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pelo processo eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

4.7 Sequenciamento de DNA do fago

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 400ng de DNA molde, 5pmol do primer GIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um Termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf) nas seguintes condições: Desnaturação a 95°C por 20 segundos;

anelamento do primer a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 60 segundos. A precipitação do DNA amplificado foi feita com 1µL de Acetato de Amônio e 27,5µL Etanol Absoluto. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 min a 3700 rpm à 4°C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de Etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 min a 3700 rpm. A solução de Etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 10 min a fim de secar totalmente, evaporando o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

4.8 Análises dos dados por bioinformática

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

Para a obtenção das sequências complementares invertidas de DNA utilizou-se o programa *Sequence Manipulation Suite* (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html).

As sequências de aminoácidos (aa) foram deduzidas utilizando o programa *ExPASy translate* (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). O alinhamento dos peptídeos selecionados foi gerado utilizando o programa *CLUSTAL W2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html/>).

4.9 Análises da distribuição dos fagos *in vitro* por imunohistoquímica

Para a validação de peptídeos ligantes como carreadores de partículas, foram utilizados tecidos de dois animais com artrite para cada peptídeo encontrado, juntamente com tecidos de outros dois animais saudáveis utilizados para o grupo controle. Os animais selecionados para o grupo positivo tinham 4-5 meses de idade e apresentavam características evidentes de inflamação.

4.9.1 Fixação e descalcificação

As articulações sadias e inflamadas foram fixadas em formol tamponado pH 7,0 (10% formaldeído + 90% PBS 1x) por 48h em temperatura ambiente, e em seguida os fragmentos foram descalcificados em EDTA 14% (390mM em PBS1x) por 15 dias em temperatura ambiente sob agitação, posteriormente lavados em água mili-Q e incubados em etanol 70%.

4.9.2 Silanização, inclusão e cortes histológicos

As articulações do joelho/pata dos animais tratados e controle foram dissecadas, emblocadas, laminadas e analisadas por imunohistoquímica.

A silanização da lâmina permite maior fixação do tecido a mesma, assim todas as lâminas foram mergulhadas em água corrente contendo 0,5% de detergente neutro por trinta min, e posteriormente as mesmas foram lavadas em água corrente por 1h. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) 2N por cinco min, seguida de imersão por um min em água mili-Q, cinco min em solução HCl 1% (diluída em etanol 70%) e lavada em água destilada, sendo submetida à secagem em estufa 70°C por 16h. Novas imersões foram realizadas, em Acetona por dois min, Silano 4% (3-Aminopropyltryethoxysilane 99%, ACROS ORGANICS) diluído em Acetona, por dois min e novamente Acetona com breve imersão, secando à 45°C por 16h.

Para inclusão da parafina, os fragmentos teciduais incubados em etanol 70% foram dispostos em cassetes individuais e imersos em novo etanol 70% por 16h. Posteriormente, os cassetes foram incubados em etanol 85% por trinta min, etanol 95% por trinta min, três incubações em etanol absoluto com trinta min cada. Em seguida os cassetes foram transferidos para Xilol I, II e III por trinta min cada, e enfim incubados em parafina I, II e III à 70°C por trinta min cada. Terminado a bateria, os tecidos foram retirados dos cassetes e emblocados em blocos de parafina quente por 16h à 25°C.

Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados seriadamente utilizando micrótomo, obtendo seções de 5 µm de espessura para confecção das lâminas. Cada lâmina foi montada com dois tecidos semelhantes, sendo feitas várias lâminas com cortes seriados dos mesmos animais, a fim de utilizá-las para os diferentes clones selecionados.

4.9.3 Desparafinização e imuno-histoquímica

Foram utilizadas lâminas com cortes seriados dos mesmos animais (dois de cada grupo, doente e sadio) para cada clone selecionado.

Os cortes foram desparafinizados em três banho de xilol à 25°C e, a seguir, foram hidratados em banhos subsequentes de álcool etílico nas concentrações constantes e decrescentes de 100%, 100%, 100%, 95%, 85%, 70% e lavadas duas vezes por três min em PBS 1x. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com incubação de 1mL de água oxigenada 10% por lâmina em câmara úmida, com duração de trinta min, seguidas de duas lavagens em PBS 1x.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio (10mM, pH 6,0) por sete min à 25°C. Após esfriarem, lavou-se duas vezes por três min em PBS 1x, e bloqueou-se com leite em pó 3% (Molico desnatado com cálcio) diluído em PBS 1x. Depois retirou-se o excesso do leite e lavou-se duas vezes por três min em PBS 1x.

Após esta etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com os clones selecionados, com fago selvagem (6×10^{11} pfu/tecido) e com PBS 1x diluídos em tampão de bloqueio. Incubou-se por trinta min à 37°C e posteriormente as lâminas foram incubadas a 4°C por 16 horas. Depois da incubação, as lâminas foram passadas por duas lavagens em PBS 1x de três min cada.

As lâminas foram então incubadas por uma hora a 37°C com anti-M13 marcado com HRP (peroxidase) 1:650 (Sigma), e após esse procedimento, foram lavadas por duas vezes de três min cada em PBS 1x e a revelação foi feita com DAB líquido (3-3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako código K3468) durante um período máximo de cinco min em temperatura ambiente.

Depois as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris durante 3 segundos e lavadas em água corrente por dez min. Os cortes foram desidratados em dez imersões instantâneas de álcool etílico nas concentrações crescentes e constantes de 70%, 85%, 95%, 100%, 100% e 100% cada e diafanizadas em três banhos de xilol por dez min, sendo posteriormente montadas com lamínulas e resina Entellan (Merck 1079610100). A observação e análise foi feita por meio de microscópio óptico.

Para atestar a positividade da reação imuno-histoquímica, foram usados controles negativos dos mesmos blocos com a ausência do fago; e outro controle negativo usado foi o fago selvagem M13, que não apresenta na PIII nenhum peptídeo.

RESULTADOS

1. Indução da artrite

A indução da inflamação em camundongos machos DBA/1J com colágeno bovino tipo II se mostrou eficiente e satisfatoriamente sendo que 80% dos animais apresentaram algum sinal clínico de artrite. Os animais apresentaram diferentes características clínicas, tais como pata normal; um dedo da pata inflamado e edemaciado; mais de um dedo inflamado e edemaciado, embora não toda pata, ou edema moderado da pata toda; pata toda inflamada e edemaciada; pata muito inflamada e edemaciada. A figura 3 demonstra um animal com característica inflamatória, marcada pelo inchaço da articulação atingida. A figura 4 demonstra articulações sadia e inflamada, respectivamente, antes de serem dissecadas e submetidas à eluição e imuno-histoquímica.



Figura 3: Camundongo DBA/1J apresentando edema na articulação traseira direita, como aponta a seta.



Figura 4: Articulação edemaciada e sadia respectivamente, antes de serem dissecadas e submetidas à análise.

2. Mensuração do Edema

Os animais que demonstraram eficiência de 80% do colágeno tipo II para indução de artrite, ou seja, aqueles que apresentaram características de inflamação dentro do grupo imunizado, tiveram as suas articulações mensuradas e visualmente avaliadas como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Escore dos dois grupos imunizados. I: imunizados com Colágeno tipo II e CFA. C: Controle com PBS1x e CFA.

Animal	Escore
I-1	4
I-2	4
I-3	3
I-4	3
I-5	3
I-6	3
I-7	2
I-8	0
I-9	0
C-1	0
C-2	0
C-3	0

3. Seleção dos peptídeos ligantes à regiões inflamadas

3.1 *Biopanning* e titulações

A estratégia de seleção dos ligantes às articulações inflamadas de camundongos machos DBA/1J utilizou-se de dois passos subtrativos realizados no último ciclo, de articulações normais dianteiras e traseiras de um camundongo sadio. A eficiência do *biopanning* pode ser observada com o enriquecimento das titulações dos ciclos (figura 5).

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

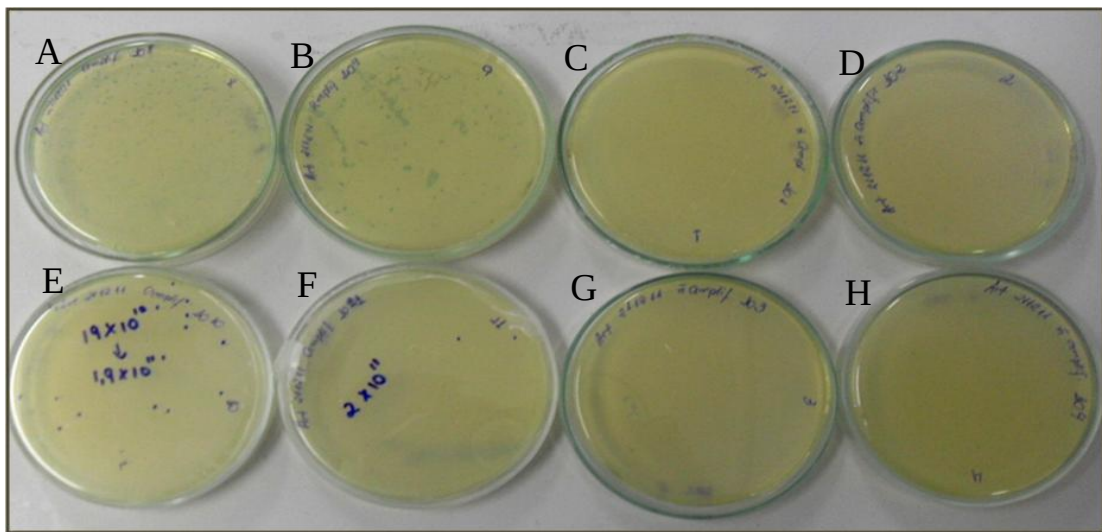


Figura 5: Titulação dos fagos. As colônias azuis representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com os fagos M13 carregando o gene da β -Galactosidase. A figura mostra a titulação dos fagos amplificados e não amplificados obtidos no primeiro ciclo de seleção do *biopanning in vivo*, sendo o mesmo procedimento para os demais *rounds*. A e B representam os fagos amplificados nos títulos 10^8 e 10^9 , bem como E e F referente a 10^{10} e 10^{11} , enquanto C, D, G e H representam os fagos não amplificados nos títulos 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 , respectivamente.

Os resultados obtidos nos títulos de entrada e saída (fagos amplificados e não amplificados) são mostrados na tabela 3, que demonstra o enriquecimento dos clones a favor do alvo durante os ciclos de seleção. Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade à receptores de regiões inflamadas ficam ligadas através da interação proteína/proteína, enquanto o restante dos fagos com baixa ou nenhuma afinidade são removidos durante as lavagens. Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

Tabela 3: Seleção dos fagos com peptídeos ligantes à articulações inflamadas. Título obtido (pfu) no processo de seleção dos fagos.

Ciclos		Número de Partículas de Fagos	
		Entrada	Saída
1º Ciclo de Seleção	Biblioteca original	1×10^{11}	8×10^2
2º Ciclo de Seleção	Pool de Fagos obtidos no 1º Ciclo	1×10^{11}	1×10^3
3º Ciclo de Seleção	Pool de Fagos obtidos no 2º Ciclo	1×10^{11}	2×10^4

Nota-se que no terceiro ciclo de seleção houve um enriquecimento de fagos, levando-se em conta a estratégia de seleção com duas etapas a mais, aumentando assim, a especificidade. Esse enriquecimento claramente observado comprova a eficiência da estratégia aplicada para a seleção.

4. Extração do DNA dos fagos selecionados

Após o crescimento individual de 144 colônias isoladas, foi feita a extração do DNA de todos os clones para posterior sequenciamento. Para a análise da qualidade e quantificação do DNA em gel de agarose de 0,8%, foram escolhidos randomicamente amostras de DNA de 12 clones. O gel foi corado com brometo de etídeo (figura 6). Este procedimento demonstrou que a extração do DNA foi eficiente, e com quantidade suficiente para a realização da reação de sequenciamento.



Figura 6: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. M: DNA do fago M13 padrão 400ng (GE); 1-12: amostras aleatórias do DNA dos clones selecionados no *Biopanning in vivo*.

5. Sequenciamento de DNA e Bioinformática

Após a confirmação da qualidade do DNA, foi realizado o sequenciamento de 144 clones. Os cromatogramas gerados pelo sequenciador foram analisados pelo programa *Phred basecalling* para análise da qualidade do sequenciamento (figura 7). Dentre os 144 clones sequenciados, 115 apresentaram sequências válidas, das quais foram identificadas 20 sequências diferentes, sendo uma sequência ocorrendo repetidas vezes. Já a tabela 4 representa a frequência de aminoácidos de todos os peptídeos válidos sequenciados, bem como a frequência dos mesmos. Os clones selecionados foram identificados como PBIT (Peptide Binder to Inflamed Tissues).

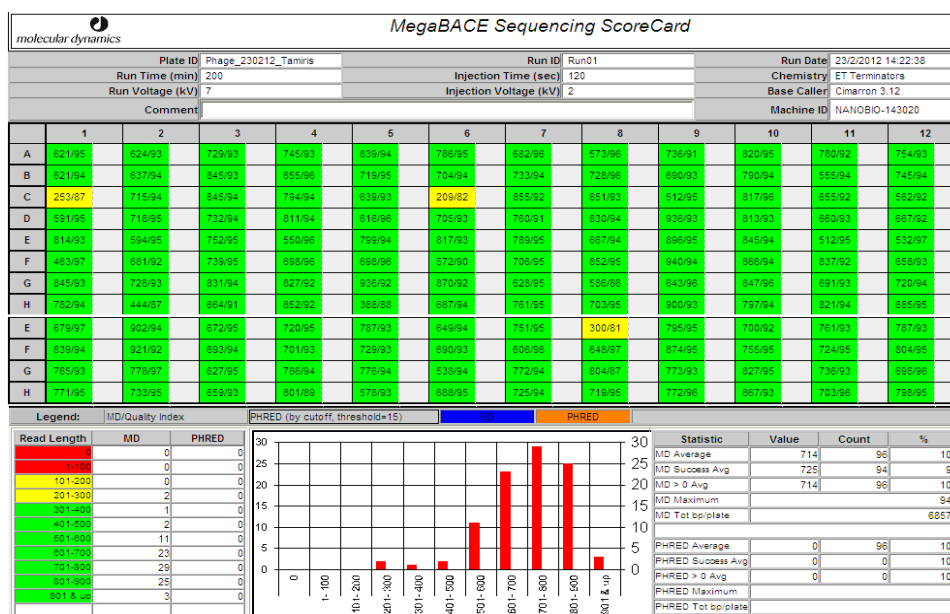


Figura 7: Escore do sequenciamento, mostrando a eficiência dos nucleotídeos sequenciados, bem como porcentagem do DNA confiavelmente lidos. As sequencias em verde significa que foram sequenciadas mais de 500 pares de bases (PB); em amarelo entre 101 e 500 pb.

Tabela 4: Frequência de aminoácidos de todos os peptídeos sequenciados.

ID	Sequencia de aa	Frequência
PBIT-1	PPSNHLL	96/115
PBIT -2	STHPSSQ	1/115
PBIT -3	SSQARVP	1/115
PBIT -4	ISARSPV	1/115
PBIT -5	SSARGAS	1/115
PBIT -6	FPPAFPA	1/115
PBIT -7	NLSSSWI	1/115
PBIT -8	PLPHQPW	1/115
PBIT -9	DIHRHVQ	1/115
PBIT -10	FPPGKPS	1/115
PBIT -11	PWSSMHL	1/115
PBIT -12	SPPSSSW	1/115
PBIT -13	LSPFPGT	1/115
PBIT -14	PASSRAL	1/115
PBIT -15	LPGHGGG	1/115
PBIT -16	PHFPFSP	1/115
PBIT -17	SHSYFAF	1/115
PBIT -18	VSASLNA	1/115
PBIT -19	SQLGRMA	1/115
PBIT -20	LPGSASS	1/115
Total Sequências válidas		115

O programa CLUSTAL W, versão 2.0.12, foi utilizado para realizar múltiplos alinhamentos com o intuito de identificar regiões conservadas ou motivo comum entre os peptídeos selecionados (tabela 5). Não foi possível gerar uma região consenso entre todos os peptídeos selecionados pela metodologia de *Phage Display*, entretanto, podemos observar que alguns peptídeos possuem características iguais entre si, que é evidenciado na tabela abaixo, pela representação das cores dos aminoácidos. Desta forma, aminoácidos com cores iguais possuem uma característica bioquímica semelhante.

Tabela 5 - Alinhamento de todos os peptídeos selecionados no *biopanning* por Clustal W. Os aminoácidos representados pelas mesmas cores possuem as mesmas características. Sendo vermelho considerados hidrofóbicos, azul ácidos, magenta básico, verde Hydroxila.

Clones Selecionados	Peptídeos Alinhados
PBIT-11	---PWSSMHL-
PBIT-14	---PASSRAL-
PBIT-1	---PPSNHLL-
PBIT-6	--FP-PAFPA-
PBIT-10	--FP-FGKPS-
PBIT-16	PHFP-FS-P--
PBIT-8	P-LP-HQ-PW-
PBIT-15	--LP-GHGG-
PBIT-20	--LP-GSASS-
PBIT-7	N-LS-SSWI--
PBIT-12	SPPS-SSW---
PBIT-17	---S-HSYFAF
PBIT-18	--VS-ASLNA-
PBIT-3	--SSQAR-VP-
PBIT-5	--SS-ARGAS-
PBIT-4	--IS-AR-SPV
PBIT-2	--ST-HPSSQ-
PBIT-13	--LS--PFPGT
PBIT-9	---DIHRHVQ-
PBIT-19	--SQLGRMA--

6. Validação por Imuno-histoquímica dos mimetopos selecionados no *biopanning in vivo*.

A leitura dos resultados foi realizada em microscópio óptico de luz (Leica, DM500) com captura de imagem (Leica, ICC50), em aumento de 40, sendo examinados todos os campos de todos os fragmentos de tecido. Foram considerados apenas positividade e negatividade de acordo com a coloração do tecido e região marcada, baseado nas lâminas controles, com fago selvagem e ausente de fago. A tabela 6 mostra as quatro articulações (traseiras e dianteiras) dos cinco animais, sendo três doentes e dois sadios, mensuradas por meio de um paquímetro.

Tabela 6: Os animais 1, 3 e 5 apresentam uma ou mais articulação edemaciada, enquanto os animais 2 e 4 apresentam tamanho normal das articulações. Os cinco animais foram submetidos à imuno-histoquímica in vitro. Os animais estavam com 5 meses de idade.

Articulação	(mm)				
	Animal 1 <i>Doente</i>	Animal 2 <i>Sadio</i>	Animal 3 <i>Doente</i>	Animal 4 <i>Sadio</i>	Animal 5 <i>Doente</i>
Dianteira Direita	1,83	1,14	1,19	1,54	1,48
Dianteira Esquerda	2,59*	1,4	2,59*	1,47	1,47
Traseira Direita	1,58	1,48	1,5	1,47	3,85*
Traseira Esquerda	2,05*	1,43	1,59	1,91	3,16*

* articulação inflamada.

Ensaio de imuno-histoquímica foram realizados para avaliar a capacidade de ligação do peptídeo expresso no fago ao tecido inflamado. O teste imuno-histoquímico realizado no tecido de sadio e inflamado foi realizado com todos os clones selecionados, em dois animais de cada grupo. Foram testados os 20 peptídeos selecionados, dos quais dois apresentaram melhor marcação. A figura 8 mostra as lâminas de dois grupos, inflamado e saudável, com reação dos clones PBIT-1 e PBIT-4, que apresentaram melhor marcação dentre os 20 peptídeos selecionados, e como controle negativo reação com fago Sel e sem fago.

A figura 8A e 8B representa a imunoreatividade positiva (PBIT-1 e PBIT-4, respectivamente) na qual é possível observar marcação no citoplasma inflamado (caracterizado pelo infiltrado celular de mono e polimorfonucleados), de modo

mais homogêneo com marcações em paredes endoteliais na figura 8A e especificamente em endotélios (setas vermelhas) na 8B. Em 8A pode-se observar uma marcação característica em região mais inflamada, atenuando conforme afasta-se da inflamação. Em 8B verificamos uma marcação bem evidente em todos os vasos de região inflamada, o que não é observado na mesma reação com tecido sadio. A figura 8C, tanto em tecido inflamado quanto tecido saudável, está representando o controle de reação dos mesmos cortes histológicos, com incubação do fago selvagem, mostrando marcação no tecido epitelial e anexos epiteliais, como glândulas sudoríparas (também observado em 8A-inflamado e 8B-saudável apontados por setas azuis), demonstrando alguma afinidade de proteínas do capsídeo do fago com essas regiões, no entanto apresentando ausência total ou fraca reatividade em tecido inflamado e vasos (setas pretas). Já na figura 8D, não houve nenhuma marcação quando o fago foi omitido, inclusive no epitélio, demonstrando a ausência de afinidade do anticorpo secundário pelo tecido.

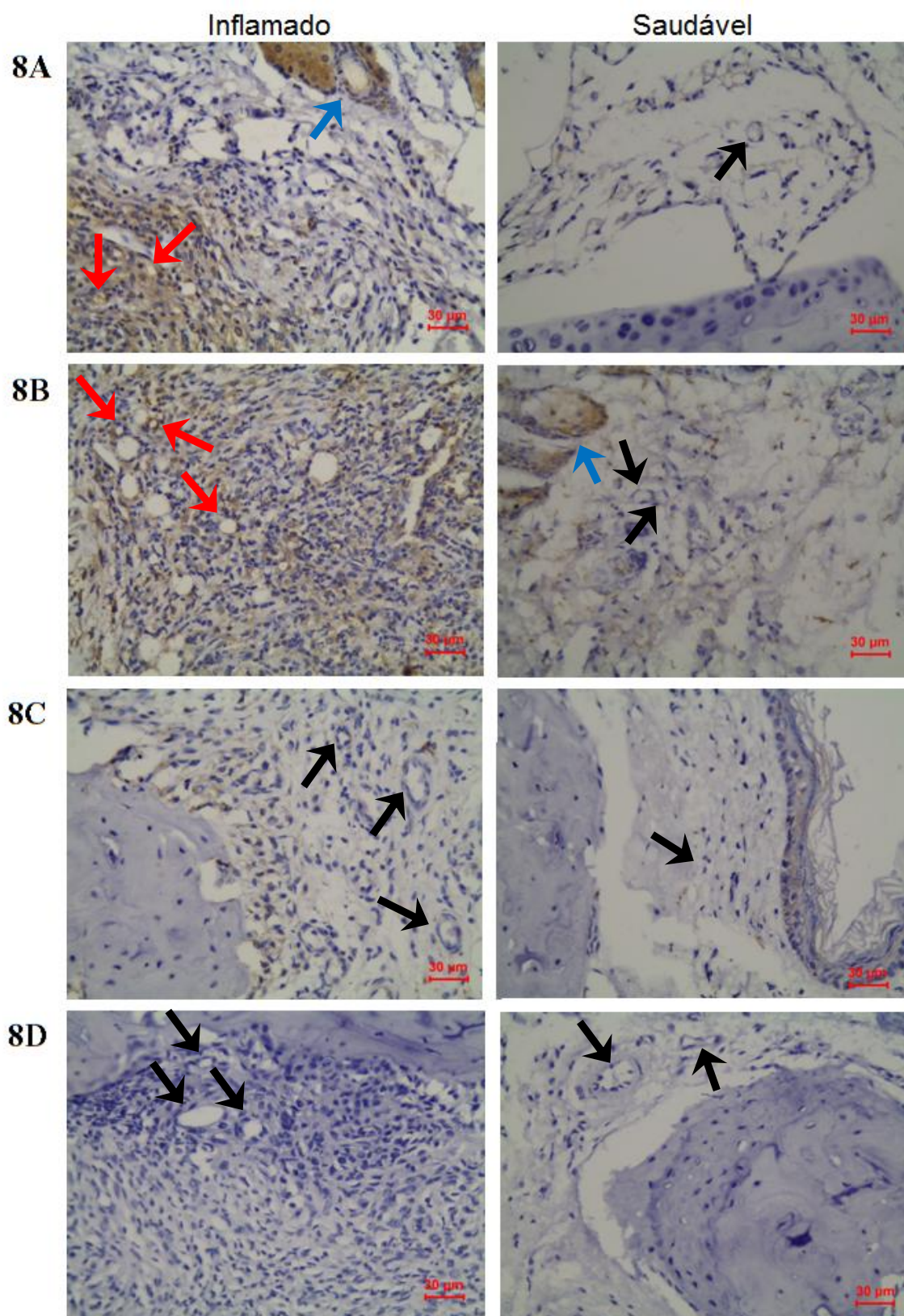


Figura 8 : Imuno-histoquímica de fagos ligantes a regiões inflamadas. 8A: PBIT-1. 8B: PBIT-4. 8C: Fago selvagem. 8D: Controle negativo (omissão de clones, somente secundário). As setas vermelhas apontam endotélios marcados, enquanto as pretas indicam endotélios não marcados. Já as setas azuis indicam glândulas sudoríparas.

DISCUSSÃO

A Artrite Reumatoide é uma doença crônica, cuja principal característica é a inflamação das articulações, embora possa comprometer outros órgãos como os pulmões levando à inflamação e fibrose, e seus efeitos sistêmicos incluem osteoporose, anemia e fadiga profunda (PRATT et al., 2009). A AR é uma doença auto-imune, ou seja, é uma condição em que o sistema imunológico, que normalmente defende o nosso corpo de infecções à antígenos exógenos, passa a atacar o próprio organismo, como o tecido que envolve as articulações, conhecido como sinóvia (YANG et al., 2011).

Sérios danos colaterais assumem a forma de aterosclerose precoce, a qual responde em grande parte pela redução do tempo de vida útil de pacientes com a forma severa da doença, como uma consequência de ataques cardíacos e derrames cerebrais (GABRIEL, 2008). Em síntese, a AR é uma doença devastadora, afetando o indivíduo como um todo, reduzindo sua contribuição para a sociedade, destruindo sua qualidade de vida, limitando suas atividades diárias e encurtando sua vida útil (ISAACS, 2010).

A AR, embora seja uma doença tratada inicialmente em ambulatório, exige uma longa duração e elevado custo em seu acompanhamento continuado (monitoramento) e gerenciamento. O financiamento do tratamento é um importante componente dos provedores de cuidadores de saúde, como por exemplo, no Brasil o custo por paciente que faz uso simultâneo de infliximabe e metotrexato por um período de 48 meses é referente à R\$ 9.292.879,31 (MONTEIRO e ZANINI, 2008).

O diagnóstico da Artrite Reumatoide é basicamente baseado no quadro clínico do paciente, embora haja exames complementares, como de sangue ou de imagem que podem ser úteis, incluindo as provas que medem a atividade inflamatória, o fator reumatoide, o anticorpo antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP), radiografias das articulações acometidas e, eventualmente, ultrassonografia ou ressonância das articulações. No entanto, tais exames não são precisos, pouco específicos, baixa sensibilidade nos primeiros anos da doença e valor prognóstico controverso, além da necessidade atual de um

diagnóstico precoce, para que possa ser instituída uma terapêutica agressiva já na fase inicial da doença, (TAN et al., 2010; ALETAHA et al., 2010).

A indústria de desenvolvimento de drogas continua a investir fortemente no desenvolvimento de novas drogas contra Artrite Reumatoide (AR), com base em reguladores biológicos e antagonistas de moléculas de pró-inflamatórias, tais como anticorpos monoclonais ou moléculas receptoras solúveis, estimulando busca por novos testes diagnósticos e novos marcadores prognósticos para a doença (SILVA, 2006). As aplicações são baseadas na expectativa de que drogas biológicas vão agir mais especificamente e com menos efeitos colaterais do que os tratamentos clássicos não biológicos ou tratamentos anti-inflamatórios (VIERBOOM et al., 2010).

As limitações do atual sistema devem-se à incapacidade de levar em considerações determinantes biológicos, novos alvos que podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico ou resposta ao tratamento, pois ainda há poucos biomarcadores clinicamente úteis para a Artrite Reumatóide (KLARESKOG et al., 2009). Não há ainda, exames laboratoriais considerados específicos para a definição diagnóstica da AR, deste modo este trabalho objetivou a detecção de um biomarcador específico, apresentando-se bastante útil para auxiliar no diagnóstico da doença.

Modelos animais fornecem uma oportunidade experimental única para ampliar nossa compreensão a respeito da artrite humana (CORTHAY et al., 2000). Alguns genes já foram identificados, evidenciando um grau de parentesco genômico entre camundongos e humanos, descrito também homologia entre genes envolvidos em doença humana (BUCHBERG et al., 1989). Essas similaridades genômicas são bem acentuadas, atingindo 98% (MURAL et al., 2002). A utilização de camundongos para utilização de biblioteca de fagos em segmentação vascular, ligantes à regiões inflamadas favoreceu um resultado rápido, barato e eficaz (PASQUALINI et al., 2002).

A reatividade auto-imune ao colágeno tipo II teve seu primeiro teste experimental induzido em rato por Trentham em 1977, com injeção intradérmica de colágeno II em CFA, resultando em uma poliartrite inflamatória com características bastante semelhantes à artrite reumatóide humana. Murino de linhagem DBA/1 é um modelo animal de artrite induzida por colágeno (KUNZ et

al., 2009), advinda de um linhagem pura, e altamente suscetível ao desenvolvimento de artrite posterior a imunização com colágeno tipo II (HOLMDAHL et al., 1992).

O modelo de indução da doença por colágeno demonstra que a auto-imunidade para o colágeno tipo II pode provocar um intenso processo inflamatório, que abrange a inflamação das articulações sinoviais, assim como o estímulo de diversas citocinas e mediadores podendo acarretar a destruição da cartilagem e erosão óssea (CHO et al., 2007). Neste projeto, a indução de artrite com colágeno tipo II com CFA mostrou-se eficaz, o que pode ser comprovado pela alta taxa de 80% de animais imunizados que desenvolveram Artrite, como sugere Brand et al. (2007) no protocolo de indução com colágeno II, no entanto, o intervalo de tempo para as primeiras evidências de inflamação se estende em 20 a 30 dias do que traz a literatura em 21 a 28 dias (BRAND et al., 2007). Não houve uma evolução dos sinais clínicos de inflamação eficiente com re-injeções de Colágeno II e CFA a partir do 28º dia, como Otto et al. (2000) com camundongos de linhagem BALB e Vierboom et al. (2010) com primatas, contudo não interferiu nos sinais clínicos posteriores com uma única dose de imunização, apesar do prazo maior de tempo. O alongamento do tempo pode ter ocorrido devido alguma desnaturação do Colágeno II, preparo instável da emulsão, erro durante a injeção intradérmica, idade e saúde inapropriadas dos animais, dentre outros (BRAND et al., 2007).

A escolha da técnica de *phage display* como plataforma foi devido o incentivo que os cientistas têm tido para estudo de doenças auto-imunes, pois o *biopanning* de bibliotecas de fagos confirmou ser uma técnica muito bem sucedida para a seleção e identificação de epítopos miméticos, os quais podem contribuir para a elucidação das bases moleculares do reconhecimento biológico, podendo ser úteis para diagnóstico e prognóstico (JADALI e SANATI, 2008).

Embora a tecnologia de *Phage display in vitro* seja vantajosa por ser mais rápida e muito mais simples por não se fazer necessário construção de modelos em camundongos e *screening* contra a complicada vasculatura e muitos tipos de tecidos normais (DU et al., 2006), a seleção dos peptídeos obtidos neste trabalho foi realizada por meio *in vivo* devido seu alto potencial, com capacidade de identificar moléculas de peptídeos que se ligam de forma estável e em condições

naturais em um determinado destino (BARBAS et al., 2001). O endotélio, revestimento dos vasos sanguíneos, expressa moléculas que são específicos de um determinado tecido ou órgão. Estas moléculas são alvos atraentes para terapias e diagnósticos, porque elas permitem identificar agentes que podem ser entregues especificamente para os vasos sanguíneos do tecido desejado (GEORGE et al., 2003). No entanto, é difícil identificar estas moléculas de tecidos específicos, porque endotélio perde muito de sua natureza de especificidade, quando removido do órgão. Assim, a seleção por meio da tecnologia de *phage display in vivo* permite uma seleção de ligantes específicos a vasos de determinado tecido (GEORGE et al., 2003; LEE et al., 2002). Também há evidências de que exista um "direcionamento vascular", expressos na superfície de linfócitos que migram para endotélis de microvasos específicos de diferentes órgãos, e contribui para o recrutamento seletivo de diferentes populações de leucócitos para vários tecidos (SPRINGER, 1994), aumento a possível ligação de peptídeos específicos (BAGGIOLINI, 1994).

A seleção dos fagos ligantes às regiões inflamadas foi realizada com a bibliotecas de peptídeos expressos em fagos M13 contendo sete aminoácidos conformacionais, a biblioteca Ph.D.-C7C (LEE et al., 2002), devido menor tamanho quando comparado à biblioteca de doze aminoácidos, apresentando mais facilidade e precisão ao circular na vascularização do animal. Houve também um controle da quantidade de fagos que entravam na seleção por meio da titulação, constante de $1,0 \times 10^{11}$ fagos, o que permitiu um padrão comparativo de entrada e saída dos fagos de cada ciclo.

No decorrer da seleção de peptídeos ligantes às regiões inflamadas de camundongos com artrite auto-induzida, verificou-se o enriquecimento da seleção claramente observado ao final do terceiro ciclo 25 vezes maior quando comparado à saída de fagos do primeiro ciclo, pois os clones que apresentaram maior afinidade ficaram retidos ao tecido para subsequente eluição e amplificação no próximo ciclo, o que comprova a eficiência da estratégia utilizada na seleção, ou seja, tinham-se a mesma quantidade de alvos, mas uma maior quantidade do ligante específico, pois os inespecíficos foram eliminados. Já os fagos com baixa ou sem afinidade pela região inflamada foram centrifugados e removidos. Ligações inespecíficas podem ser favorecidas devido ao excesso de fagos, os

quais podem interagir com contaminantes presentes no tecido durante a dissecação, o que pode induzir a interação de clones com baixa afinidade, que eventualmente não foram removidos.

A fim de reduzir ao máximo a possibilidade de ocorrência de ligações inespecíficas, uma subtração dos fagos inespecíficos, incubando os fagos em tecidos sadios antecedendo a injeção dos fagos em animal doente, foi realizada no último ciclo, o que favoreceu uma maior especificidade aos ligantes de receptores e produtos de inflamação dos selecionados. Essa metodologia de subtração utilizada neste trabalho foi baseada na literatura, como HOU e colaboradores (2004) que obteve sucesso ao identificar peptídeos ligantes específicos aos neurônios de camundongo, subtraindo os inespecíficos incubando os fagos primeiro em contato com células da glia, e posteriormente os fagos que não se ligaram a essas células foram colocados em contato com cultura de neurônios, possibilitando assim a seleção de ligantes mais específicos. Após a seleção dos peptídeos por *Phage Display in vivo*, o DNA dos clones foi extraído e posteriormente sequenciado.

Os alinhamentos entre as 20 sequências peptídicas selecionadas por *phage display* não encontrou similaridades perfeitas entre si. Alguns autores relatam a falta de similaridades perfeitas dos peptídeos selecionados entre si, ou com as proteínas catalogadas (Santamaria et al. 2001, Hu et al. 2006, Du et al. 2006).

Foram identificadas 115 sequências válidas, no entanto somente a sequência PBIT-1 (PPSNHLL) se repetiu por 96 vezes, isso provavelmente ocorreu devido a grande complexidade de ligantes envolvidos no processo inflamatório do qual o peptídeo PBIT-1 teve afinidade, uma vez que apresentou reação mais abrangente no tecido inflamado na imuno-histoquímica. As demais 19 sequências encontradas não tiveram repetição.

As evidências experimentais pela reação de imuno-histoquímica com os clones selecionados apontaram maior positividade para dois clones, PBIT-1 (PPSNHLL) e PBIT-4 (ISARSPV), pois apresentaram reatividade com os tecidos inflamados de camundongos portadores de artrite. Entretanto, o clone PBIT-1 não foi o mais reativo, em termos vasculares, apesar de ser o mais frequente, em comparação com o clone PBIT-4 e demais clones selecionados. Isso pode ter

ocorrido devido à incubação *in vitro* do fago, como consequência pode ter havido uma maior prevalência de receptores-alvo possíveis ligantes, como uma série de citocinas e mediadores químicos para sinalização, como IL1, IL8, TNF- α , óxido nítrico, prostaciclina, histamina, serotonina, bradicinina, PAF, LTD4, plasminogeneo, proteoglicana, colágeno, fibrinopeptídeos, formilpeptídeos, desintegrinas, enzimas lisossomiais, dentre outras inúmeras estruturas químicas e celulares (COTRAN, 2000), com mais afinidade pelo clone PBIT-1 ou pode ainda ter ocorrido uma maior amplificação do clone PBIT-1 durante os ciclos do *Biopanning*, tornando-o assim, mais frequente no sequenciamento. Conforme os resultados obtidos por Yang e colaboradores (2011) também demonstram marcações diferentes e repetições entre os clones selecionados ligantes à vasos sinoviais, corroborando com a hipótese de que a ligação dos diferentes peptídeos para a vasculatura da articulação inflamada se dá à diferentes receptores.

O fago selvagem não demonstrou reatividade na maioria dos tecidos, mas sempre apresentou reatividade com epitélio e anexos epiteliais, como glândulas sudoríparas e sebáceas, marcações estas também encontradas na reação com todos os clones testados. Isso sugere que, exista alguma afinidade de proteínas do capsídeo do fago com essas regiões, embora não exista evidências descritas na literatura. A maioria das células chega ao local da injúria via corrente sanguínea, como acontece com os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), os monócitos e os linfócitos, assim torna-se evidente o processo inflamatório quando comparado ao tecido sadio, devido a presença dessas células, em especial macrófagos, dentre outras estruturas do sistema inflamatório no tecido conjuntivo (COTRAN et al., 2000).

Os inúmeros artefatos presentes nas lâminas contendo tecido de animais sadios são devido a fragilidade do tecido conjuntivo, pobre em fibra e células (tanto sadias como inflamatórias, uma vez que a inflamação é basicamente uma resposta localizada do tecido conjuntivo), tornando-as mais propícias à rupturas durante os processos de desparafinização, recuperação antigênica e reação de imuno-histoquímica. No entanto, ainda assim foi possível observar uma marcação atenuada quando comparados aos tecidos inflamados.

Foram feitas também imuno-histoquímica *in vivo*, com injeção do fago, como sugere YU et al. (2008), mas sem sucesso, pois houve provável perda ou

desligamento dos fagos ao tecido durante as etapas de fixação, descalcificação e parafinização devido a pobre estabilidade dos peptídeos ligantes (LI et al., 2006). Necessita-se ainda de uma melhor padronização da reação *in vivo*, além de uma imuno-histoquímica comparativa utilizando um número maior de animais.

Há um aumento nas oportunidades proporcionada para alvejar terapias especificamente aos vasos sanguíneos (KOLONIN et al., 2001; TREPEL et al., 2002; RUOSLAHTI, 2000), isto porque os vasos sanguíneos são importantes em processos patológicos, por exemplo, a expressão coordenada de moléculas de adesão e quimiocinas é responsável pelo recrutamento de células inflamatórias nos tecidos durante a rejeição de transplantes, doenças autoimunes e arteriosclerose (GEORGE et al., 2003). A vasculatura é um bom alvo porque é altamente acessível a agentes que são administrados por via intravenosa, o que é particularmente importante no caso de grandes proteínas ou vetores de terapia gênica que são relativamente pobres em tecido parenquimatoso. Contudo, um problema ainda sem solução é como identificar adequado alvos para a terapia (MARSHALL e HASKARD, 2002).

Deste modo, *Phage display in vivo* é uma tecnologia adequada para identificar conjuntos de proteínas específicas para endereços vasculares (EL-MOUSAWI et al., 2003; KOIVUNEN et al., 1999; RAFII et al., 2003; LI et al., 2006). As duas proteínas PBIT-1 e PBIT-4 selecionadas por meio desta técnica, identificadas e pré-validadas por imuno-histoquímica neste trabalho podem ser de grande importância para um futuro imuno-diagnóstico mais rápido, eficaz e barato aos pacientes acometidos por essa doença. Por meio do diagnóstico precoce será possível modificar as formas de tratamento impedindo a evolução da doença, promovendo melhor qualidade de vida para os portadores. Com o desenvolvimento de drogas imunomoduladoras será possível modular uma resposta regulatória de pacientes portadores de doenças autoimunes. No entanto, ainda devem ser feitas investigações com acoplamento a marcadores fluorescentes, a fim de direcionar à regiões inflamadas.

CONCLUSÃO

- A indução com Colágeno bovino tipo II e escolha da linhagem DBA/1J foram favoráveis para desenvolvimento satisfatório de Artrite;
- A técnica de *Phage Display in vivo* foi eficaz para a seleção de peptídeos miméticos a receptores de articulações inflamadas de modelo murino;
- A estratégia adotada no processo de seleção de peptídeos por *Phage display in vivo* se mostrou eficiente, apresentando peptídeos imunorreativos contra tecidos inflamados de camundongos DBA/1J doentes;
- A partir da imuno-histoquímica foi detectada imuno-reatividade expressiva dos clones PBIT-1 e PBIT-4, pré-validando um provável biomarcador com potencial para o diagnóstico da doença, embora ainda seja necessário muitos estudos nesse sentido;
- Os resultados obtidos neste trabalho são promissores no que concerne ao uso de clones de fagos para a identificação peptídeos no diagnóstico da Artrite Reumatóide, e futuro para tratamento, sendo usado como carreador de drogas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 46:328-46, 2002.

ALETAHA, D. et al. Rheumatoid arthritis classification criteria. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 9, p. 2569-81, 2010.

ARNETT, F.C.; EDWORTHY, S.M.; BLOCH, D.A. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 31:315-24, 1988.

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

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**. 1994.

BARBAS III C.F.; BAIN, J.D.; HOEKSTRA, D.M.; LERNER, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. **Proc Natl Acad Sci**. 89:4457, 1992.

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

BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. *Temas de Reumatologia Clínica*, v.10, n.1, 2009.

BRAND, D.D.; LATHAM, K.A.; ROSLONIEC, E.F. Collagen-induced arthritis. **Nature Protocols**. Vol 2, N 5, 2007.

BUCHBERG, A.M.; BROWNELL, E.; NAGATA, S.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G. A comprehensive genetic map of murine chromosome 11 reveals extensive linkage conservation between mouse and human. **Genetics**, 122: 153-161, 1989.

CHO, Y.-G. et.al. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v.7, nº01, p.65-70, 2007.

CORTHAY, A.; HANSSON, A.; HOLMDAHL, R. T lymphocytes are not required for the spontaneous development of enthesal ossification leading to marginal ankylosis in the DBA/1 mouse. **Arthritis & Rheumatism**, Atlanta, v.43, nº4, p.844-851, 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.. SCHOEN, F.J. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DU, B.; QIAN, M.; ZHOU, Z.; WANG, P.; WANG, L.; ZHANG, X. et al. In vitro panning of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library. **Biochem Biophys Res Commun**. 342(3):956-962, 2006.

EL-MOUSAWI, M.; TCHISTIAKOVA, L.; YURCHENKO, L.; PIETRZYNSKI, G.; MORENO, M.; STANIMIROVIC, D.; AHMAD, D.; ALAKHOV, V. A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library. **Biological Chemistry**. 278: 46681-46691, 2003.

GABRIEL, S. E. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. **The American Journal of Medicine**, Tucson, v. 121, nº10, p.9-14, 2008.

GEORGE, A.J.T.; LEE, L.; PITZALIS, C. Isolating ligands specific for human vasculature using in vivo phage display selection. **TRENDS in Biotechnology**. Vol 21, n 5, 2003.

HOLMDAHL, R. et.al. Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v.88, nº3, p.467-472, 1992.

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

HU, S. et al. Phage display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 341(4):964-972, 2006.

ISAACS, J.D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? **Nature Reviews Immunology**, Londres v.10, nº8, p.605-611, 2010.

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

KLARESKOG, L.; CATRINA, A.I. & PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.373, p.659-672, 2009.

KOIVUNEN, E.; ARAP, W.; VALTANEN, H.; RAINISALO, A.; MEDINA, O.P.; HEIKKILA, P.; KANTOR, C.; GAHMBERG, C.G.; SALO, T.; KONTTINEN, Y.T.; SORSA, T.; RUOSLAHTI, E.; PASQUALINI, R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. **Nature Biotechnology**. 13: 265-270, 1999.

KOLONIN, M. et al. Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. **Current Opinion in Chemistry Biology**. 5: 308–313, 2001.

KUNZ, M.; IBRAHIM, S.M. Cytokines and Cytokine Profiles in Human Autoimmune Diseases and Animal Models of Autoimmunity. **Mediators of Inflammation**, Londres, v. 2009, p.1-20, 2009.

LANDRE-BEAUVAIS, A.J. The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. **Joint Bone Spine**. 68:130–143, 2001.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, p. 903-11, 2001.

LEE, L.; BUCKLEY, C.; BLADES, M.C.; PANAYI, G.; GEORGE, A.J.T. PITZALIS, C. Identification of synovium-specific homing peptides by in vivo phage display selection. **Arthritis & Rheumatism**. Vol 46, n 8, 2002.

LI, X-B.; SCHLUESENER, H.J.; XU, S-Q. Molecular addresses of tumors: selection by in vivo phage display. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. 54: 177-181, 2006.

LIPSKI, P.E. Rheumatoid arthritis. In: KASPER, D.L.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.S. et al.: **Harrison's Principles of Internal Medicine**. International edition, ed 14, NY: McGraw Hill, 1998.

MARSHALL, D. e HASKARD, D.O. Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now? **Seminar in Immunology**. 14: 133–140, 2002.

MONTEIRO, R. D. C.; ZANINI, A. C. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n.01, p. 25-33, 2008.

MURAL, R.J. et al. A Comparison of Whole-Genome Shotgun-Derived Mouse Chromosome 16 and the Human Genome. **SCIENCE**, v. 296, 2002.

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

OTTO, J.M.; CHANDRASEKERAN, R.; VERMES, C.; MIKECZ, K.; FINNEGAN, A.; RICKERT, S.E.; ENDERS, J.T.; GLANT, T.T. A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, 165: 5278-5286, 2000.

PASQUALINI, R.; ARAP, W.; RAJOTTE, D.; RUOSLAHTI, E. In Vivo Selection of Phage Display Libraries. In: BARBAS III, C.F. et al. **Phage Display: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap 22, 2002.

PRATT, A.T.; ISAACS, J.D. & MATTEY, D.L. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, Amsterdam, v. 23, nº01, p.37-48, 2009.

RAFII, S.; AVECILLA, S.T.; JIN, D.K. Tumor vasculature address book: identification of stage-specific tumor vessel zip codes by phage display. **Cancer Cell**. 4: 331-333, 2003.

RUOSLAHTI, E. Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. **Seminars in Cancer Biology**. 10: 435–442, 2000.

SANTAMARIA, H. et al. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from Papillomavirusinfected patients using Phage Display Libraries. **Clinical immunology**, 101(3):296-302, 2001.

SILVA, A.F. et al., Associação do Anticorpo Anticitrulina e Gravidade da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.46, nº3, p.165-173, 2006.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**. 76: 301–14, 1994.

TAN, R. J. L. et al. Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor Treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p. 1029-35, 2010.

TELMO J.; MEZADRI, TOMAS, V.A.; AMARAL, V.L.L. **Animais de laboratório: Cuidados na iniciação experimental**, 2004.

TRENTAM, D.E.; DYNESIUS-TRENTAM, R.A.; ORAV, E.J.; COMBITCHI, D.; LORENZO, C.; SEWELL, K.L., HAFER, D.A.; WEINER, H.L. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. **Science**, 261: 1727-1730, 1993.

TREPEL, M. et al. In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. **Current Opinion in Chemistry Biology**. 6: 399–404, 2002.

VIERBOOM, M.P.M.; BREEDVELD, E.; KONDOVA, I.; HART, B.A. Collagen-induced arthritis in common marmosets: a new nonhuman primate model for chronic arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, 2010.

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

YANG, Y.H.; RAJAIAH, R.; RUOSLAHTI, E.; MOUDGIL, K.D. Peptides targeting inflamed synovial vasculature attenuate autoimmune arthritis. **PNAS**, v. 108, n. 31: p.12857-12862, 2011.

YU, Y.; WANG, Z.; DU, T. Mouse thymus targeted peptide isolated by in vivo phage display can inhibit bioactivity of thymus output in vivo. **Journal of Biomolecular Screening**. 13(10), 2008.

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 023/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 020/12

Projeto Pesquisa: "Seleção de peptídeos ligantes a articulações inflamadas e seu potencial uso em diagnóstico e tratamento".

Pesquisador Responsável: PROF.DR. CARLOS UEIRA VIEIRA

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 04 de Abril de 2012

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU