UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LEILA DA SILVA MAGALHÃES

Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/05/2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Magalhães, Leila da Silva
M188i Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese / Leila da Silva Magalhães. -- São Paulo, 2016.
107p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Bioquímica
Orientador: Giordano, Ricardo José

1. Receptores : Membrana : Célula : Biologia 2. Peptídeos 3. Vasos sanguíneos 4. Retina I. T. II. Giordano, Ricardo José, orientador.

574.875 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LEILA DA SILVA MAGALHÃES

Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/05/2016

LEILA DA SILVA MAGALHÃES

Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano
Co-orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

São Paulo

2016

À minha família, em especial aos meus pais, Milton e Nucinélia, e ao meu marido Laszlo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro ao desenvovimento do projeto.

Ao meu orientador Dr. Ricardo José Giordano por ter me recebido em seu laboratório e ter acreditado em mim, contribuindo de maneira muito importante para o meu amadurecimento científico e profissional ao longo desses seis anos.

Ao professor Dr. Alexander Henning e alunos pela contribuição ao meu aprendizado e amadurecimento científico durante o trabalho em seu laboratório.

Aos professores Dra. Maria Júlia M. Alves e Dr. Walter Coli, por terem nos recebido tão bem em seu laboratório e por terem dividido um pouco do conhecimento e sabedoria.

Aos professores Dr. Ivan Schumacher e Dra. Débora Schechtman pela simpatia e carisma. Especialmente ao Ivan, pela amizade e momentos gastronômicos fora do laboratório.

Ao meu amigo, companheiro e amado Laszlo Lueska, que além de apoio, carinho e amor compartilhado, acompanhou e vivenciou todos os momentos desse doutorado comigo.

À minha família, por ter me dado equilíbrio, base e sustentação durante toda a minha vida, contribuindo decisivamente em minhas escolhas. Em especial aos meus pais Milton e Nucinélia, aos meus irmãos Rose, Lucinha e Dedé e aos meus amados sobrinhos, Ítalo, Gabriel, Luís Felipe e Enzo, por todo o amor, alegria, apoio e inspiração. Amo muito todos vocês!

À minha amiga de trabalho e amiga da vida, Fenny, por toda a amizade, apoio, carinho, risadas, conversas e desabafos.

Aos meus queridos colegas de trabalho Carlos, Jussara, André, Alexandre e Laura, pelas conversas, idéias e contribuições e principalmente por terem feito os meus dias mais felizes e divertidos.

Às amigas Darlene e Nayra pela amizade, estudos e vivências compartilhadas.

À Celinha, Maria Luiza e Robertinho pelo trabalho, disposição, ajuda e bom humor no laboratório.

Aos integrantes dos demais grupos de pesquisa do laboratório que compartilharam momentos e experiências, Eliciane, Chrislaine, Matheus, Ana Zen, Tanize e aos demais colegas do Instituto de Química/USP.

À Dra. Renata Pasqualini, ao Dr. Wadih Arap e seu grupo de pesquisa por terem me recebido tão bem durante o estágio de pesquisa na Universidade do Novo México, Estados Unidos, cuja experiência foi bastante enriquecedora.

À todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma maneira participou dessa trajetória, muitíssimo obrigada!

“Os ideais que iluminaram o meu caminho

são a bondade, a beleza e a verdade.”

Albert Einstein

RESUMO

Magalhães, L.S. **Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese**. 2016. 107p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tie1 é um receptor tirosina quinase expresso em células endoteliais importante em angiogênese, formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Este receptor pertence a uma família pequena composta por apenas dois membros (Tie1 e Tie2) para os quais angiopoietinas foram identificadas como ligantes de Tie2. No entanto, Tie1 continua a ser um receptor órfão, sem ligantes identificados até o momento. Sendo assim, é difícil compreender completamente as propriedades biológicas de Tie1 e seus mecanismos moleculares em angiogênese sem um ligante identificado. Entretanto, como sugerido através de estudos de deleção gênica, este receptor é uma molécula essencial na angiogênese, apresentando um papel importante no desenvolvimento da vascularização da retina e desenvolvimento de tumores. O nosso objetivo foi estudar a participação do domínio extracelular de Tie1 na neovascularização e, no processo, identificar possíveis ligantes para este receptor. Através da tecnologia de *phage display*, identificamos um peptídeo específico e seletivo para Tie1, sugerindo a existência de um sítio de ligação único neste receptor. Mostramos que este peptídeo é capaz de inibir a proliferação de células endoteliais induzida por Ang1, um ligante bem caracterizado de Tie2 que também modula a atividade de Tie1. Além disso, também mostramos que este peptídeo inibe a angiogênese *in vivo* num modelo animal bastante relevante para estudo de doenças humanas, o modelo da retinopatia induzida por oxigênio. Uma vez que este peptídeo liga-se a um sítio único e seletivo para Tie1, hipotetizamos que o mesmo poderia mimetizar possíveis ligantes naturais deste receptor. Para

identificá-los, proteínas com mimetopo cruzado com este peptídeo foram identificadas em extrato proteico de diferentes linhagens celulares. Tais proteínas são possíveis candidatos a interação com Tie1. Em resumo, demonstramos que o domínio extracelular de Tie1 é importante para a angiogênese patológica e identificamos proteínas como possíveis ligantes deste receptor, o que poderá contribuir para um melhor entendimento da participação de Tie1 na formação de vasos. O peptídeo aqui identificado poderá ser ainda uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas terapias anti-angiogênicas com importantes aplicações à saúde humana.

Palavras-chaves: Tie1, angiogênese, receptor tirosina quinase, *phage display*

ABSTRACT

Magalhães, L.S. **The importance of Tyrosine Kinase Receptor Tie1 extracellular domain in angiogenesis.** 2016. 107p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tie1 is a tyrosine kinase receptor expressed by endothelial cells and important in angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones. This receptor belongs to a small family of receptors composed of two members only (Tie1 and Tie2) to which angiopoietins have been identified as ligands for Tie2. On the other hand, Tie1 is still an orphan receptor with no ligand identified to date. Thus, it is difficult to assess Tie1 mechanism of action in neovascularization without a known ligand. Nevertheless, gene deletion studies have shown that Tie1 is essential in angiogenesis, and plays an important role in retinal and tumoral vascularization. The aim of our study was to evaluate the participation of Tie1 extracellular domain in angiogenesis, and in the process, to identify putative ligands for this receptor. Utilizing phage display, we have identified and characterized a Tie1 specific and selective ligand peptide, which suggests the existence of a binding site unique to this receptor and not shared by other family members. We show that this peptide prevents endothelial cells proliferation, induced by angiopoetin-1, a ligand for Tie2 but which also modulates Tie1 activity. Using a well-accepted mouse model for human diseases, the oxygen induced retinopathy model, we show that this peptide inhibits angiogenesis *in vivo*. Since this peptide maps to a unique binding site in Tie1, we hypothesized that it might mimic a natural ligand for this receptor. To identify them, proteins with cross reactive epitopes with an anti-peptide sera were identified by proteomic approaches. These proteins are thus possible ligands for Tie1. In summary, we have shown that Tie1 extracellular domain is important in angiogenesis

and we have identified putative ligand for this receptor, which might contribute to a better understanding of the molecular mechanisms associated with Tie1 in blood vessel formation. The peptide here characterized may also be an important tool for the development of novel anti-angiogenesis therapeutic approaches for disesase with an angiogenic component.

Keyword: Tie1, angiogenesis, tyrosine kinase receptor, phage display

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Serina-treonina quinase
Ang	Angiopoietina
BRASIL	Biopanning and rapid analyses of selective interactive ligands
BSA	Albumina de soro bovino
CFS	Receptor do Fator estimulador de colônias
CO_2	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido deoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo
DR	Retinopatia diabética
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento epidermal
Erk	Extracellular Signal-regulated Kinase-1
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FGFR	Receptor do Fator de crescimento fibroblástico
FKHR	Fator transcricional Forkhead
FLISA	*Fluorophore-Linked Immunosorbent Assay*
FNIII	Fibronectina do tipo III
HEC	Células endoteliais de coração
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
Ig	Imunoglobulina
IL-11α	Interleucina-11 α
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LB	Lysogeny broth
LEC	Células endoteliais de pulmão
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NRP	Neuropilina

O_2	Oxigênio
OIR	Retinopatia induzida por oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reações de cadeia da polimerase
PDGFR	Receptor do Fator de crescimento devirado de plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfoinositídeo 3 quinase
PKC	Proteina quinase C
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROP	Retinopatia da prematuridade
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TGFR	Fator de transformação de crescimento
Tie	Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains
TU	Unidades transdutoras
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1 ANGIOGÊNESE 14

1.2 A FAMÍLIA DE RECEPTORES TIE 18

1.3 O RECEPTOR TIROSINA QUINASE TIE1 24

1.3.1 *O papel de Tie1 em angiogênese in vivo* 28

1.4 ANGIOGÊNESE PATOLÓGICA 30

1.4.1 *Angiogênese na retina e o modelo da retinopatia induzida por oxigênio* 32

1.5 PHAGE DISPLAY E A IDENTIFICACAO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS 35

2. OBJETIVOS 40

3. MATERIAIS E METODOS 42

3.1 REAGENTES E CÉLULAS 42

3.2 SELEÇÃO DE PEPTÍDEO LIGANTE A TIE1 POR PHAGE DISPLAY 43

3.3 PRECIPITAÇÃO DE FAGOS 44

3.4 SEQUENCIAMENTO DE FAGOS 44

3.5 ENSAIO DE LIGAÇÃO DO PEPTIDEO SELECIONADO CONTRA TIE1 45

3.6 ENSAIO DE LIGAÇÃO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS 46

3.7 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO 46

3.8 ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO CYRADRFLIC SINTÉTICO E O FAGO-CYRADRFLIC PELA LIGAÇÃO A TIE1 48

3.9 ALANINA *SCANNING* E ENSAIO DE LIGAÇÃO DE FAGOS 48

3.10 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR 49

3.11 MODELO ANIMAL DA RETINOPATIA INDUZIDA POR OXIGENIO 49

3.12 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CYRADRFLIC 51

3.13 PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CYRADRFLIC POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE 51

3.14 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS POR FLISA 52

3.15 EXTRATO TOTAL DE PROTEINAS DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES 52

3.16 WESTERN BLOT 53

3.17 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL 53

3.18 ESPECTROSCOPIA DE MASSAS 54

3.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 54

4. RESULTADOS **56**

4.1 TIE1 RECOMBINANTE COMO ALVO PARA A SELEÇÃO DE PEPTIDEOS 56

4.2 SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES DE TIE1 58

4.3 O PEPTÍDEO CYRADRFLIC INTERAGE ESPECIFICAMENTE COM TIE1 *IN VITRO* 60

4.4 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO PEPTÍDEO CYRADRFLIC 62

4.5 O FAGO CYRADRFLIC SE LIGA A CÉLULAS ENDOTELIAIS 64

4.6 O FAGO CYRADRFLIC É INTERNALIZADO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS 66

4.7 EFEITO DO PEPTÍDEO CYRADRFLIC EM MODELO DE ANGIOGÊNESE *IN VITRO* 68

4.8 EFEITO DO PEPTÍDEO CYRADRFLIC NA ANGIOGENESE *IN VIVO* 70

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS LIGANTES NATURAIS DE TIE1 73

5. DISCUSSÃO **83**

6. CONCLUSÃO **93**

7. REFERENCIAS **96**

8. ANEXO **106**

ANEXO I – SÚMULA CURRICULAR 106

ANEXO II – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO 109

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANGIOGÊNESE

Os vasos sanguíneos são componentes do sistema circulatório e apresentam papel central para funções do aparelho cardiovascular, incluindo transporte de gases (oxigênio, dióxido de carbono) e nutrientes, crescimento e diferenciação de órgãos durante o desenvolvimento embrionário e reparo de tecidos lesados em adultos (CARMELIET, 2003; CARMELIET, 2005; GIORDANO et al., 2010; CHUNG et al., 2010).

A angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, enquanto a vasculogênese refere-se à formação de vasos a partir de células progenitoras. Enquanto a vasculogênese é, de forma geral, restrita ao período embrionário, a angiogênese persiste na vida adulta. Este processo ocorre de maneira complexa e regulada, com a expressão diferenciada de fatores que atuam de maneira coordenada em diferentes etapas que vão desde o momento em que o vaso sai do estado basal para que as células endoteliais proliferem, até o processo inverso que envolve o amadurecimento e conclusão do processo de formação do novo vaso sanguíneo (CARMELIET, 2005; CARMELIET e JAIN, 2011).

Um fator central nesse processo é o VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Também chamado de apenas VEGF este fator é membro de uma família multigênica de fatores de crescimento que inclui o VEGFB, VEGFC, VEGFD e PlGF. Estas moléculas podem interagir de forma diferenciada e seletiva com uma família de receptores tirosina quinase de VEGF (VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3) e com seus co-receptores neuropilinas1 e 2 (NRP1 e NRP2), sendo importantes em diferentes

etapas da angiogênese (Figura 1). Enquanto as NRPs atuam como co-receptores de VEGFA, aumentando sua ligação aos VEGFRs e portanto a sua atividade em células endoteliais, a atividade deste ligante é principalmente mediada pela ligação ao receptor VEGFR2, de maneira que a sua ativação resulta na proliferação e diferenciação das células endoteliais durante a formação de novos vasos sanguíneos. A atividade de VEGFA também é regulada por VEGFR1, receptor de mais alta afinidade pelo fator, mas com menor atividade tirosina quinase (FISCHER et al., 2008). VEGFR3 por outro lado é o principal mediador de VEGFC e VEGFD, fatores de crescimento importantes em linfangiogênese, mas também é um receptor importante em angiogênese, uma vez que camundongos deficientes para este receptor morrem durante o desenvolvimento embrionário devido a problemas na formação do plexo vascular primário (SAHARINEN et al., 2011).

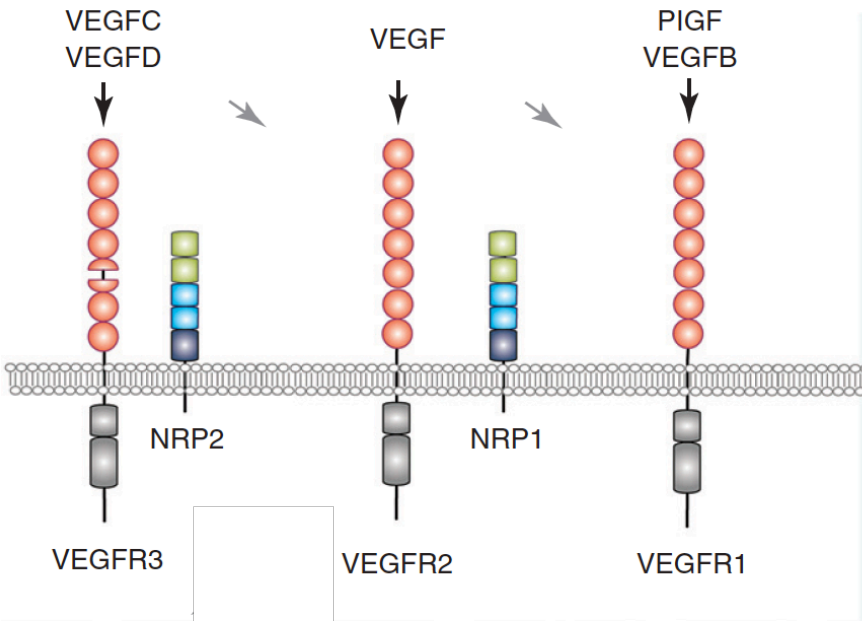

Figura 1. **A família de receptores de VEGF regula a angiogênese**. A atividade de VEGFA (identificado como VEGF na figura) é principalmente mediada por VEGFR2. VEGFC e VEGFD são importantes em angiogênese e linfangiogênese. PIGF está envolvido em arteriogênese e angiogênese patológica, enquanto que VEGFB está envolvido no crescimento de vasos coronários. Esses ligantes atuam através da interação diferenciada com os receptores VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 ou com os co-receptores NRP-1 e NRP-2 (Adaptado de SAHARINEN et al., 2011).

No indivíduo adulto e saudável, os vasos sanguíneos são estáveis e permanecem em estado de quiescência. Numa situação de hipóxia ou inflamação, como por exemplo durante a cicatrização do tecido, fatores angiogênicos como VEGF, FGFs (*Fibroblast Growth Factor*) e angiopoietinas são produzidas e secretados pelas células do tecido e pelas próprias células endoteliais, onde interagem com receptores presentes na superfície celular, disparando o processo de angiogênese. Cascatas de sinalização são ativadas e uma série de eventos como degradação de proteínas de matriz, dissociação dos pericitos da parede do vaso sanguíneo, afrouxamento das junções intracelulares e dilatação do vaso ocorrem para permitir o início da formação do novo vaso (Figura 2). A permeabilidade vascular aumentada contribui para que proteínas do plasma extravasem e formem uma matriz extracelular rica em fatores angiogênicos, onde as células endoteliais migram e proliferam (CARMELIET e JAIN, 2011). A expressão de diferentes receptores na superfície das células endoteliais permite que as mesmas respondam diferentemente ao estímulo angiogênico. Enquanto células de ponta (*tip cells*) organizam o processo migratório em direção ao gradiente de VEGF, as células seguidoras (*stalk cells*) proliferam e formam o lúmem do vaso nascente (Figura 2B). À medida que as *stalk cells* proliferam, as junções celulares são reestabelecidas e os pericitos são recrutados, o que permite o amadurecimento e estabilidade do novo vaso. O processo chega ao fim quando *tip cells*, migrando em direções opostas, se encontram e o fluxo sanguíneo é estabelecido (Figura 2C).

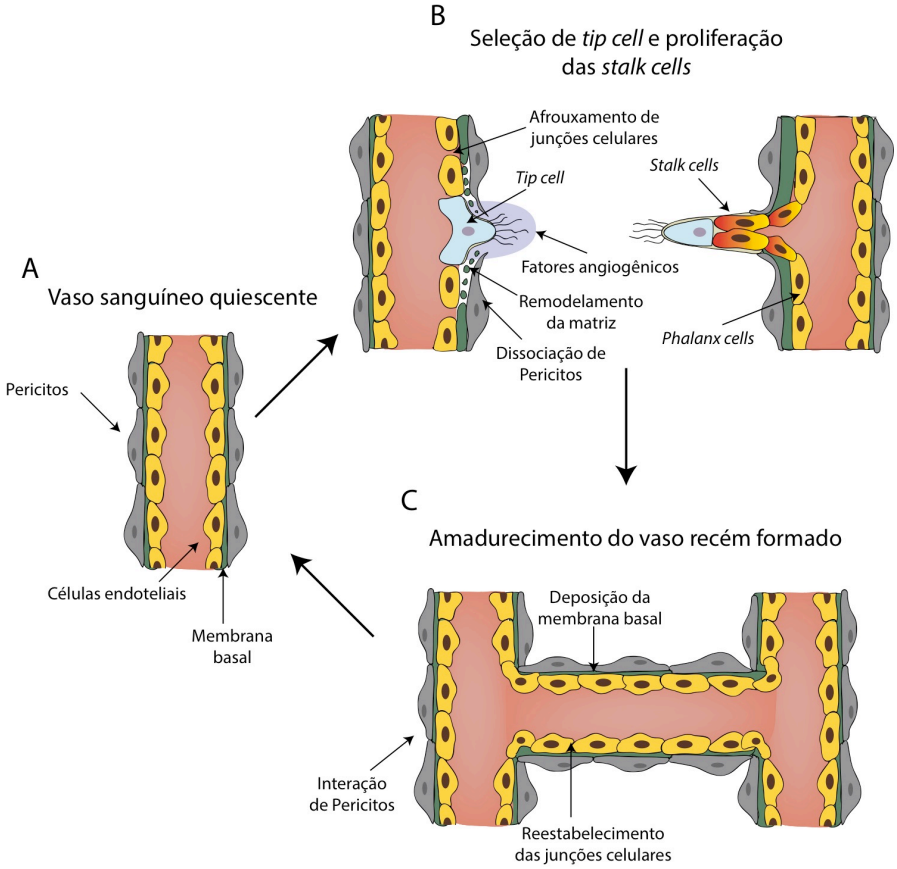

Figura 2. **Formação de vaso sanguíneo por angiogênese**. **(A)** O vaso sanguíneo é formado por uma monocamada de células endoteliais cobertas pelos pericitos que compartilham uma membrana basal comum. O estado de quiescência é mantido pela ação de fatores como VEGF, NOTCH, angiopoietinas e FGF. **(B)** Em um estado de hipóxia no tecido, há o aumento na expressão e liberação dos fatores angiogênicos que atuam nos receptores expressos na superfície das células endoteliais. Metaloproteinases promovem o remodelamento da matriz, afrouxamento de junções celulares e dissociação dos pericitos da membrana basal. As *tip cells* migram em direção ao estímulo angiogênico, enquanto as *stalk cells* proliferam, dando subsequentemente origem ao lúmem do vaso nascente. **(C)** Quando *tip cells* de vasos adjacentes migrando em direção opostas se encontram, os fatores retornam ao nível basal, com reestabelecimento das junções celulares, amadurecimento dos pericitos, deposição da membrana basal e reestabelecimento do fluxo sanguíneo (Adaptado de CARMELIET e JAIN, 2011).

Como pode-se observar, a angiogênese é um processo coordenado no tempo e no espaço, e conta com a participação de vários outros fatores além da família do VEGF. Outros receptores tirosina quinase como, FGFR, PDGFR, TGFR e Tie também apresentam papéis importantes na angiogênese. Em particular, por ser objetivo de estudo desta tese, gostaria de destacar a família de receptores Tie (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains*). Esta família de moléculas é importante na manutenção da quiescência dos vasos recém-formados, ao mesmo tempo que permite que as células do endotélio respondam a um novo

estímulo angiogênico, quando necessário. A atividade dos receptores Tie em controlar a estabilidade e angiogênese dos vasos, juntamente com os ligantes angiopoietinas, torna esses fatores alvos interessantes de estudos para melhor entender os mecanismos moleculares da angiogênese e para o desenvolvimento de tratamentos de doenças dependentes da angiogênese.

1.2 A FAMÍLIA DE RECEPTORES TIE

Os receptores Tie são receptores transmembrana expressos em células endoteliais, que foram identificados através de reações de cadeia da polimerase (PCR) em estudos que buscavam novos membros da família de receptores do tipo tirosina quinase em linhagens de células de leucemia (PARTANEN et al., 1990; PARTANEN et al., 1992). O nome Tie vem de *Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains*, e refere-se às regiões extracelulares dos receptores Tie que apresentam similaridades estruturais com domínios de Imunoglobulina (Ig) e do Fator de Crescimento Epidermal (EGF). Os dois receptores da família Tie, Tie1 e Tie2, compartilham estrutura geral similar e são compostos por três domínios do tipo Ig, três domínios do tipo EGF e três domínios do tipo Fibronectina do tipo III (FNIII) em sua porção extracelular, além dos domínios transmembrânicos e tirosina quinase com inserto quinase em sua porção intracelular (PARTANEN et al., 1992; SATO et al., 1993) (Figura 3). Estes receptores compartilham entre si cerca de 30% de identidade de aminoácidos na porção extracelular e 76% na porção intracelular. Os receptores Tie são bastante conservados entre as espécies, de maneira que Tie1 humano e o seu homólogo murino apresentam 96% de identidade (SATO et al.,1993).

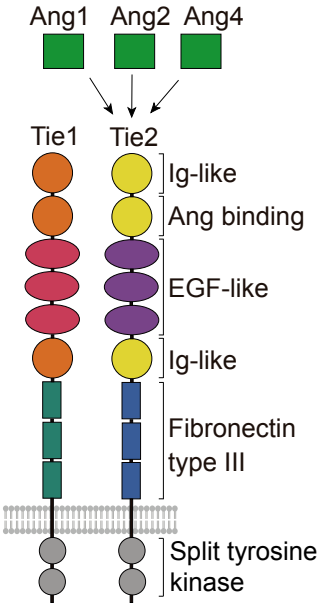

Figura 3. Propriedades estruturais dos receptores Tie. Os receptores Tie são receptores tirosina quinase transmembrana que consistem de um domínio amino-terminal extracelular e um domínio carboxi-terminal intracelular. O domínio extracelular é composto por dois domínios Imunoglobulina-Like (Ig-like), seguido de três domínios EGF-like, outro Ig-like e finalmente três domínios de Fribronectina tipo III, mais próximo à membrana celular. O domínio intracelular contém a atividade de tirosina quinase.

Esses receptores são expressos predominantente em células endoteliais e em um grupo de células progenitoras hematopoiéticas (PARTNEN et al., 1992), e juntamente com as angiopoietinas (ligantes de Tie2), são importantes para regular a maturação e plasticidade dos vasos sanguíneos (PARTANEN et al., 1992; DUMONT et al., 1992; DAVIS et al., 1996; MAISONPIERRE et al., 1997). Enquanto o receptor Tie1 ainda é considerado um receptor órfão, ou seja, nenhum ligante foi identificado até o momento, as angiopoietinas (Ang) foram isoladas e caracterizadas como ligantes de Tie2 (DAVIS et al., 1996; MAISONPIERRE et al., 1997; NISHIMURA et al., 1999). Há três angiopoietinas descritas, denominadas Ang1, Ang2 e Ang4 (em murinos, esta última é denominda de Ang3). As angiopoietinas compreendem uma família de glicoproteínas secretadas de aproximadamente 70 kDa e atuam no controle da vasculatura sanguínea através da interação com o segundo domínio de imunoglobulina de Tie2 (DAVIS et al., 1996; MAISONPIERRE et al., 1997).

Ang1 é requerida para a sobrevivência das células endoteliais e maturação do vaso sanguíneo (KIM et al., 2000). Além disso, alguns trabalhos relatam que Ang1 promove a migração e a proliferação de células endoteliais (KOBLIZEK et al., 1998)

através da produção de interleucina-8 (ABDEL-MALAK et al., 2008). Contudo, diferentemente de fatores de crescimento como VEGF e FGF, Ang1 possui uma baixa atividade mitogênica (KOBLIZEK et al., 1998). Por outro lado, Ang2 e Ang4 parecem atuar como antagonista do receptor Tie2, conforme discutido abaixo.

Com a identificação dos ligantes de Tie2, as funções gerais desta subfamília de receptores tirosina quinase em angiogênese foi de maneira geral estabelecida (Figura 4). Estudos propõem que Ang1, expressa e liberada pelos pericitos que cobrem o vaso sanguíneo, interage com Tie2 expresso pelas células endoteliais e contribui para a quiescência do endotélio (AUGUSTIN et al., 2009). O complexo Tie2-Ang1 é translocado para as junções inter-endoteliais, onde liga-se com outra molécula de Tie2 nas células endoteliais adjacentes, contribuindo para a quiescência e integridade do vaso (Figura 4A). Já Ang2 tem efeito antagonista sobre Tie2. A superexpressão de Ang2 tem efeito prejudicial sobre a formação de vasos, induzindo a morte embrionária com fenótipo similar à ausência de produção de Ang1 (MAISONPIERRE et al., 1997; SURI et al., 1996). Outro exemplo da ação antagonista de Ang2 é quando ele compete com Ang1, o que contribui para o afrouxamento das junções intercelulares e para a proliferação das células endoteliais estimuladas por VEGF (Figura 4B) (AUGUSTIN et al., 2009). Por outro lado, Ang2 também pode atuar como agonista de Tie2, dependendo do estado celular. Foi demonstrado que em altas concentrações, ou na ausência de Ang1, Ang2 pode ativar Tie2, promovendo sinais de sobrevivência (KIM et al., 2000; TEICHERT-KULISZEWSKA et al., 2001; KIM et al., 2006; DALY et al., 2006). Ang4 também atua como antagonista.

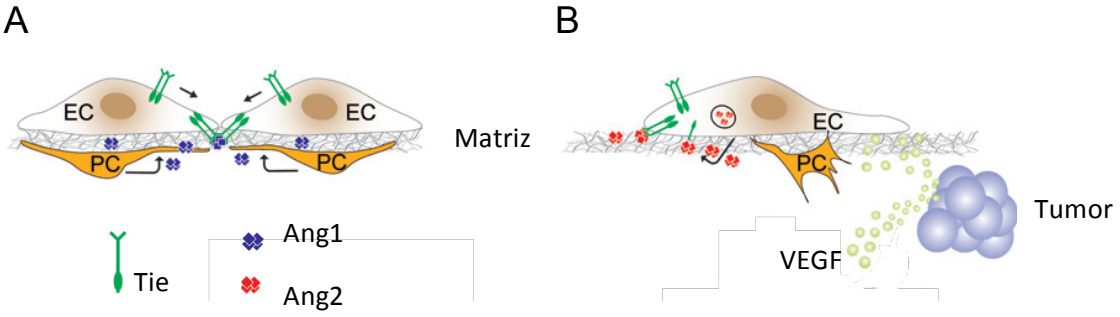

Figura 4. **Regulação da angiogênese por receptores Tie**. **(A)** No vaso quiescente, as células endoteliais (EC) são cobertas por pericitos (PC) que secretam Ang1. Este ligante induz a interação de duas moléculas de Tie2 em células adjacentes, próximo a matriz extracelular, promovendo a estabilização do vaso sanguíneo. **(B)** Em tecidos sob remodelamento vascular, Ang2 é secretada de estoques de células endoteliais, competindo com Ang1 e promovendo o afrouxamento das junções celulares, e portanto permitindo que as células endoteliais se tornem mais responsivas aos fatores angiogênicos, como o VEGF, liberados pelo tecido tumoral por exemplo, Adaptado de SAHARINEN et al., 2011).

Sabe-se que a interação de Ang1 com os receptores Tie na superfície do endotélio é responsável pela ativação de uma série de vias de sinalização importantes para sobrevivência, migração endotelial, mobilidade e quiescência do vaso sanguíneo (Figura 5). O efeito celular principalmente estudado de Ang1 é a sua capacidade de inibir a apoptose em células endoteliais. A ativação de Tie2 mediada por Ang1 promove a ativação das vias de PI3K-Akt (PAPAPETROPOULOS et al., 2000; KIM et al., 2000). Akt ativado por PI3K fosforila e inibe o fator transcricional Forkhead (FKHR) em células endoteliais, e consequentemente promove a inibição da apoptose endotelial e da expressão de diferentes genes envolvidos na remodelação vascular, incluindo Ang2 (DALY et al., 2004; BRINDLE et al., 2006; FIEDLER e AUGUSTIN, 2006).

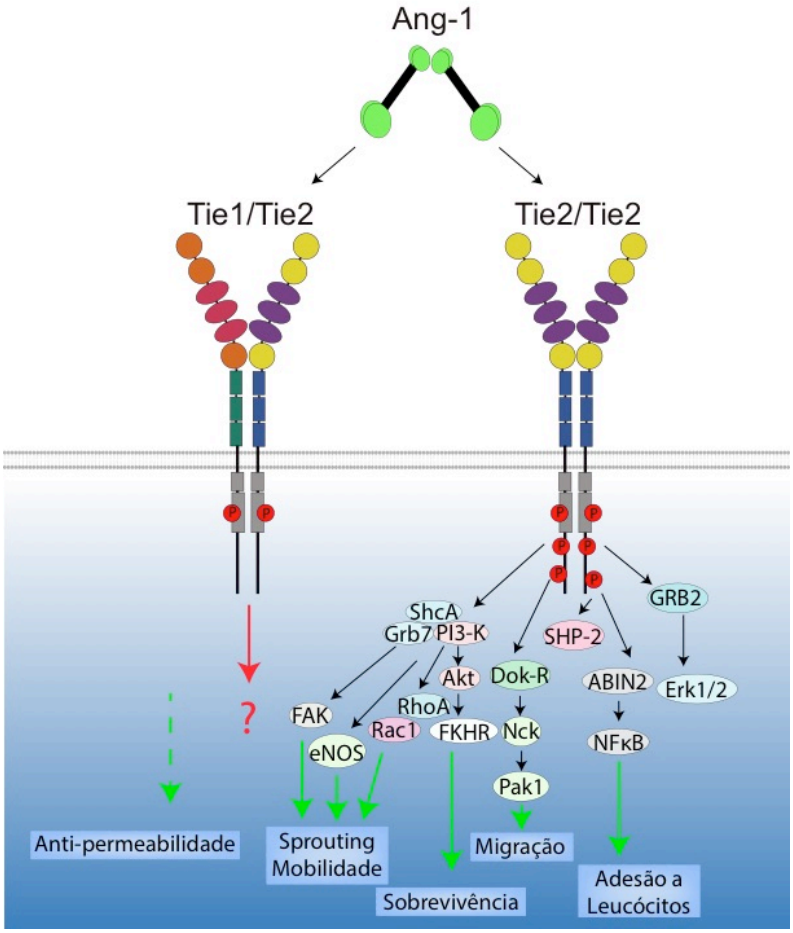

Figura 5. Sinalização de receptores Tie mediado por Ang1 em células endoteliais. Ang1 ativa atua como um oligômero que se liga ao domínio Ig-2 da porção extracelular de Tie2. Resíduos de tirosinas chaves mostradas no carboxiterminal de Tie2 são fosforiladas mediante a ligação de Ang1 ao domínio extracelular deste receptor. As funções celulares reguladas por Ang1 são então indicadas na parte inferior da figura. O domínio intracelular de Tie2 é bastante similar ao receptor tirosina quinase relacionado, Tie1. Tie1 é também ativado através da ligação de Ang1 nos heterodímeros formados entre Tie1 e Tie2, com a ativação de Akt. (Adaptado de BRINDLE et al., 2006).

Recentemente, para entender melhor a contribuição de Tie1 na sinalização de Tie2 mediada por Ang1 durante o remodelamento e maturação da vasculatura sanguínea, experimentos foram realizados em células endoteliais silenciadas para Tie1. Essas células estimuladas com Ang1 apresentaram redução nos níveis de Tie2 total e fosforilado, e este resultado foi associado à degradação mais rápida de Tie2 após ativação por Ang1. A ativação de Akt mediado por Ang1 após fosforilação de Tie2 foi também reduzido na ausência de Tie1, mas não houve alteração na ativação de Erk. Juntamente com esses dados, estudos na retina pós-natal sob remodelamento vascular sugerem que Tie1 pode afetar de maneira negativa e positiva a função de Tie2. Durante a angiogênese, Tie1 superexpresso em *tip cells* suprime a apresentação de Tie2 na superfície das células endoteliais. Por outro lado, no remodelamento vascular envolvendo as *stalk cells*, Tie1 é importante por sustentar a sinalização de Tie2 mediada por Ang1, promovendo sobrevivência das células

endoteliais e quiescência do vaso sanguíneo (Figura 6). Este sinergismo entre Tie1 e Tie2 é essencial para uma angiogênese coordenada e esses dados indicam que Tie1 é importante para a sinalização de Tie2 mediado por Ang1 (SAVANT et al., 2015).

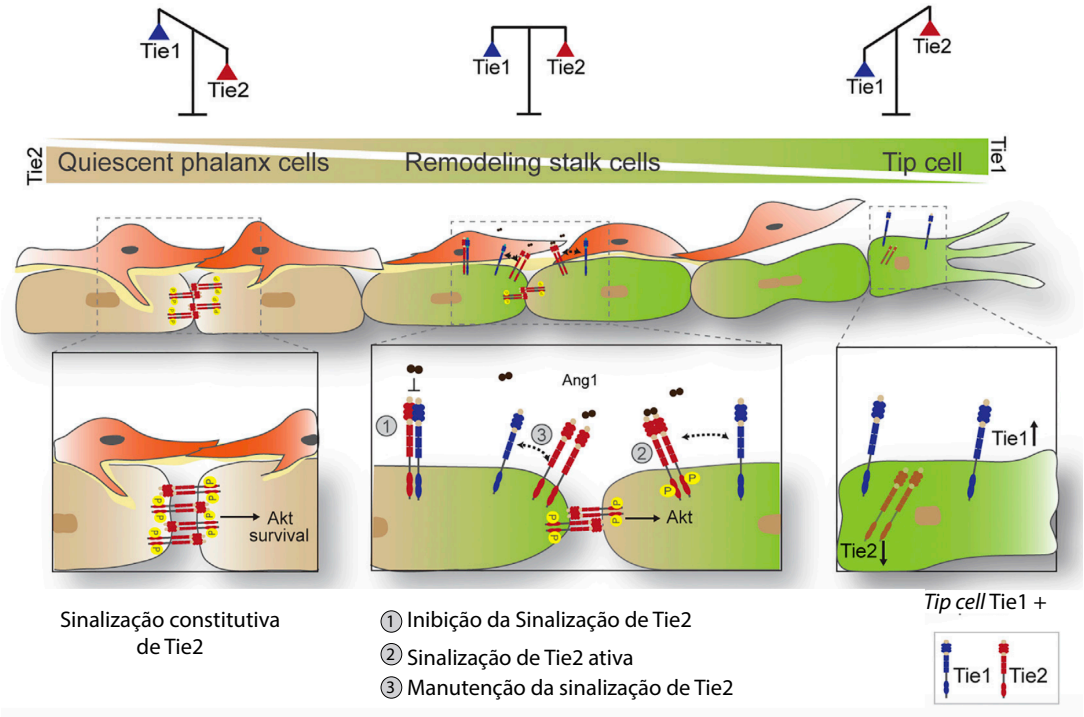

Figura 6. **Tie1 regula a atividade de Tie2 de maneira contexto dependente**. Os receptores Tie são diferentemente expressos nas células endoteliais de um vaso sanguíneo em angiogênese, criando um gradiente desta família de receptores. Em *phalanx cells*, células endoteliais que permanecem quiescentes durante o remodelamento vascular, Tie2 sinaliza promovendo sinais de sobrevivência e manutenção da integridade das mesmas. Em *stalk* cells, células endoteliais sob remodelamento vascular, heterocomplexos entre Tie1 e Tie2 são importantes para manter a sinalização mediada por Ang1. Em *tip cells* Tie1 está superexpresso e a apresentação de Tie2 é suprimida da superfície celular (Adaptado de SAVANT et al., 2015).

Ainda assim, a participação de Tie1 nesse processo precisa ser melhor esclarecida. Com não há ligantes para Tie1 identificados até o momento, fica difícil estabelecer os mecanismos moleculares de atuação deste receptor. Sabe-se que o domínio intracelular é autofosforilado, ativando vias de sinalização em células endoteliais importantes para a angiogênese e homeostase dos vasos (KONTOS et al., 2002; CHO et al., 2004; SAHARINEN et al., 2005; YUAN et al., 2007). Porém, a

participação do domínio extracelular ainda não foi esclarecida, com apenas um estudo preliminar sugerindo que anticorpos monoclonais dirigidos contra este domínio inibem a angiogênese (LAAKONEN et al., 2008). Como os dados ainda não são conclusivos, mas as pesquisas indicam que Tie1 atue como um regulador da ativação de Tie2, ora aumentando, ora diminuindo a sua fosforilação (MARRON et al., 2007; YUAN et al., 2007; SAVANT et al., 2015), vamos investigar a função do domíno extracelular deste receptor.

1.3 O RECEPTOR TIROSINA QUINASE TIE1

A forma madura de Tie1 é de uma proteína transmembrânica tipo I, encontrada na superfície de células endoteliais e progenitoras hematopoiéticas, com um peso molecular de 135 kDa. Assim como muitas proteínas de membrana, Tie1 é glicosilada e contém oligossacarídeos N-ligados com resíduos de ácido siálico nas pontas. Conforme falamos anteriormente, Tie1 apresenta nove domínios extracelulares, incluindo três do tipo Ig, três do tipo EGF e três do tipo FNIII, e o domínio intracelular que apresenta atividade quinase. Em um mecanismo dependente da ativação de PKC (Proteína Quinase C), metaloproteinases e VEGF, Tie1 sofre clivagem gerando um fragmento solúvel de 100 kDa, que corresponde a sua porção extracelular, e um fragmento de 40 kDa associado à membrana, contendo os domínios transmembrana e intracelular (YABKOWITZ et al., 1997; MCCARTHY et al., 1999). Estes fragmentos truncados de Tie1 encontram-se superexpressos em diferentes linhagens celulares de câncer de mama (YANG et al., 2003; REES et al., 2007). A importância da clivagem ainda não é completamente compreendida, mas este mecanismo pode estar relacionado à inibição da

sinalização de Tie1 e à consequente desestabilização da vasculatura quiescente para facilitar a angiogênese (KONTOS et al., 2002). Tie1 tem uma carga total positiva, com ponto isoletétrico de 9,3, e seu potencial eletrostático é resultado da aproximação de várias argininas e lisinas, incluindo R38, R82, K95, R91, R260, R279, R349, R388, R427, R437 e R438, localizadas nos domínio do tipo Ig-1, EGF-2 e Ig-3 (SEEGAR et al., 2010).

Tie1 é expresso em células hematopoiéticas positivas para CD34 purificadas de sangue de cordão umbilical ou de medula óssea e a sua expressão diminui durante a diferenciação (BATARD et al., 1996). Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão de Tie1 é detectada a partir do oitavo dia de gestação (E8,0) no mesoderma extraembrionário, tecido em que subsequentemente a vasculatura se desenvolverá. Já em adultos, a sua expressão é aumentada em eventos fisiológicos como cicatrização de tecidos e desenvolvimento de folículos ovarianos (KORHONEN et al., 1992). Com relação a função de Tie1 no organismo, estudos mais recentes mostram que a expressão de Tie1 é aumentada em células endoteliais de pulmão de filhotes de camundongos no sexto dia de vida (P6), enquanto a sua expressão é reduzida no pulmão de adultos (SAVANT et al., 2015). Animais nesta fase (P6), apresentam angiogênese ativa nos pulmões, evento essencial para a maturação deste órgão no período pós-natal. Outro exemplo da função de Tie1 é no desenvolvimento da vasculatura da retina pós-natal, onde Tie1 é expresso de maneira heterogênea em um conjunto de *tip cells* e de *stalk cells* na região central do plexo vascular. Contrário a isso, Tie2 tem menor expressão em *tip cells* e expressão mais homogênea nas *stalk cells*. A deleção pós-natal de Tie1 em células endoteliais resulta em excessiva regressão de vasos na região do plexo,

acompanhado de aumento de apoptose nas células endoteliais da retina (SAVANT et al., 2015).

É importante ressaltar também que Tie1 participa não apenas da angiogênese fisiológica, como sugerido pelos estudos no pulmão e retina, mas também na angiogênese patológica. Durante o desenvolvimento tumoral, a expressão de Tie1 encontra-se aumentada tanto no endotélio como nas próprias células tumorais. Isto foi demonstrado para diferentes tipos tumorais, como carcinoma mamário (CANCE et al., 1993; YANG et al., 2003), gástrico (LIN et al., 1999), cerebral (HATVA et al., 1995) e em melanoma (KAIPAINEN et al., 1994), apontando portanto, uma importância para o desenvolvimento e progressão destes tumores.

A ausência de um ligante natural conhecido para Tie1 dificulta os estudos de ativação das vias de transdução de sinal deste receptor. Entretanto, estudos utilizando Ang1 nativa ou uma forma quimérica mais potencialmente ativa chamada de COMP-Ang1 (CHO et al., 2004; SAVANT et al., 2015) mostraram que essas proteínas são capazes de ativar a fosforilação de Tie1 em células endoteliais. Esses resultados também foram observados em células não endoteliais superexpressando Tie1, cuja fosforilação foi ainda mais forte mediante co-expressão de Tie2. Ang4 nativa também foi capaz de promover a ativação de Tie1, enquanto Ang2 não (SAHARINEN et al., 2005; YUAN et al., 2007). Esta ativação de Tie1 por Ang1 é indireta, através da formação de um complexo Tie1-Tie2. A formação do complexo Tie1-Tie2 ocorre mais expressivamente em células endoteliais do que em suas precursoras (KIM et al., 2006).

Em experimentos de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) realizados com células epiteliais e endoteliais vivas, foi possível visualizar e

acompanhar em tempo real a associação entre Tie1-Tie2 na superfície celular, mesmo na ausência de angiopoietinas, indicando que esses receptores já se encontram como um complexo heterodimérico pré-existente independente da presença do ligante. Conforme mencionado anteriormente, enquanto Tie1 é rico em resíduos carregados positivamente (Arg e Lys), Tie2 é rico em resíduos de aminoácidos ácidos, como aspartato e glutamato, apresentando uma área de superfície negativamente carregada (SEEGAR et al., 2010). Através de múltiplas mutações realizadas simultaneamente nestes resíduos de aminoácidos expostos, foi sugerido que esse complexo envolve a interação entre regiões básicas e ácidas de Tie1 e de Tie2, respectivamente, demonstrando que as regiões carregadas desses receptores são importantes para a formação do complexo. As análises apontam que os resíduos de aminoácidos R260, R437 e R438 de Tie1 apresentam um papel importante nessa interação (SEEGAR et al., 2010).

Mesmo sem conhecermos um ligante para Tie1, sabe-se que ele é capaz de ativar vias de sinalização. Para entender um pouco das vias de sinalização ativadas por este receptor, foi necessária a construção de uma versão quimera composta pelo domínio quinase de Tie1 fusionada ao domínio extracelular do receptor de CFS-1 (*colony stimulanting factor receptor*). Quando células expressando este receptor híbrido são estimuladas por CFS-1, Akt é fosforilada e ativada por PI3K, promovendo sinais de sobrevivência através da inibição de apoptose (KONTOS et al., 2002; SAVANT et al., 2015). Este estudo, indica que a tirosina 1113 do domínio quinase de Tie1 é requerido para a ativação das vias de sinalização observadas (KONTOS et al., 2002).

1.3.1 *O papel de Tie1 em angiogênese in vivo*

Embora Tie1 não tenha ligantes identificados até o momento, a sua importância na manutenção da integridade vascular e na angiogênese durante o desenvolvimento embrionário e na fase adulta do indivíduo foi demonstrada através de estudos genéticos. Esses estudos de deleção do gene de Tie1 mostram que este receptor é essencial para o desenvolvimento embrionário. Embriões que não expressam Tie1 morrem durante o desenvolvimento embrionário em torno dos dias 13,5 e 14,5 (E13,5 e E14,5) de gestação (PURI et al., 1995). Estes animais apresentam edema severo e hemorragia espalhada pela superfície do corpo, ponta da cauda e dos dedos, cavidade sagital da cabeça, região dorsal e também em órgãos internos como intestino e estômago, sugerindo uma quebra da integridade vascular (PURI et al., 1995; SATO et al., 1995). Análises morfológicas mostram que não há diferenças visíveis entre embriões E13 homozigotos e heterozigotos para a ausência de Tie1, sugerindo que Tie1 não é essencial nos estágios iniciais de desenvolvimento da vasculatura embrionária. Entretanto, Tie1 é importante para a maturação dos vasos formados e a partir de E13,5 os vasos apresentam hemorragia em locais específicos. Nos locais onde não ocorrem hemorragias, a vasculatura apresenta-se morfologicamente normal (PURI et al., 1995). Curiosamente, outro grupo de pesquisadores obteve resultados distintos para animais suprimidos para a produção de Tie1 (SATO et al., 1995). Diferentemente dos animais produzidos anteriormente (PURI et al., 1995), este grupo relata que vários embriões se desenvolvem a termo. Porém, esses animais morrem logo após o nascimento devido a problemas respiratórios. Análises realizadas em E18,5 descreveram edemas e hemorragias, como visto nos embriões em E13,5 relatados acima. Neste estudo não havia sinal de hemorragia nos embriões E13,5, mas o edema subcutâneo já era observado na

região dorsal (SATO et al., 1995). Essas análises mostram que a perda do receptor Tie1 funcional durante o desenvolvimento embrionário tem como consequência perda da integridade vascular, que se manifesta na forma de edemas seguidos de hemorragia localizada (PURI et al., 1995; SATO et al., 1995). De forma singular, análises do tecido acometido pela hemorragia mostraram que os eritrócitos extravasam através das células e não entre as células endoteliais (SATO et al., 1995). Em resumo, Tie1 não parece ser importante para a diferenciação dos precursores angioblastos em células endoteliais durante a vasculogênese, mas é essencial durante o desenvolvimento embrionário e para a integridade e sobrevivência das células endoteliais e da microvasculatura durante o processo de angiogênese (PURI et al., 1995; SATO et al., 1995).

Como animais que não expressam Tie1 morrem durante o desenvolvimento embrionário ou logo após o nascimento, para estudar a importância de Tie1 na angiogênese pós-natal, Tie1 foi condicionalmente eliminado nas células endoteliais. Neste modelo, foi observado crescimento reduzido de tumores nos animais e também reduzida expressão de Tie1 e menor densidade vascular no tecido tumoral, indicando que esse receptor é importante para o crescimento e angiogênese tumorais. De maneira geral, os parâmetros analisados mostram que a formação de vasos tumorais são relacionados com menor viabilidade das células do endotélio e maior apoptose de células tumorais (D'AMICO et al., 2014).

Além disso, também foi avaliado o efeito da ausência de Tie1 na angiogênese da retina de filhotes de camundongo no quinto dia pós-natal (P5). Após a remoção condicional do gene de Tie1 entre P1 e P4, as retinas avaliadas em P5 apresentaram área vascular reduzida, redução no número dos pontos de ramificação, menor distância entre a frente angiogênica e o nervo óptico, e menor

número de extensões de filopodias nas células que guiam o processo angiogênico (D'AMICO et al., 2014; SAVANT et al., 2015). Esta regressão de vasos foi acompanhada de um aumento de apoptose e redução do número total de células endoteliais por área da retina (SAVANT et al., 2015). Esses efeitos só foram observados em filhotes cuja supressão de Tie1 foi superior a 85%. De maneira interessante, apesar da redução da densidade vascular na retina dos animais em geral, em alguns filhotes também foi observada a presença de tufos, que são regiões altamente vascularizadas, formadas devido ao crescimento exacerbado de vasos sanguíneos protuberantes na cavidade vítrea (D'AMICO et al., 2014).

Assim, Tie1 também é importante para a vascularização fisiológica na retina de filhotes de camundongos e na angiogênese patológica e crescimento de tumores. A inibição de angiogênese mediante a ausência de Tie1 funcional é similar à inibição promovida por anticorpos contra VEGF e VEGFR-2, e o importante é que a eliminação da produção de Tie1 não afetou a homeostase dos vasos sanguíneos de diferentes órgãos de animais adultos saudáveis (D'AMICO et al., 2014).

1.4 ANGIOGÊNESE PATOLÓGICA

O equilíbrio entre fatores que estimulam e inibem a angiogênese é importante para controlar o crescimento normal dos vasos sanguíneos no tempo necessário a conclusão dos eventos a que está associado. Por outro lado, um crescimento desregulado do vaso está associado ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças que são, portanto, caracterizadas ou causadas pela angiogênese excessiva (CARMELIET, 2003). Esse processo de formação de vasos sanguíneos é essencial para o desenvolvimento e progressão das diversas doenças dependentes de

angiogênese, que incluem câncer, retinopatias, obesidade, endometriose, artrites, arteroesclerose, entre outras (FOLKMAN et al., 2007).

Entretanto, a angiogênese associada a estas doenças apresenta características distintas da angiogênese fisiológica. Na angiogênese patológica há uma sinalização desequilibrada de fatores, como expressão exarcebada de VEGF, que resulta em vasos sanguíneos frágeis, desorganizados e com maior permeabilidade (ZHONG e BOWEN, 2006; WHITTAKER et al., 2010). Enquanto a angiogênese fisiológica se limita no tempo e no espaço, a angiogênese patológica é crônica e persistente, muitas vezes, participando da etiologia da doença em questão.

Desde a hipótese de que a inibição da angiogênese poderia reduzir o crescimento tumoral e consequentemente aumentar as expectativas de vida de pacientes (FOLKMAN, 1971), cientistas em todo o mundo procuram entender as bases moleculares da angiogênese. Este conhecimento, que cresce a cada ano, identificou diversos fatores que atuam de maneira distinta na angiogênese fisiológica e patológica. Estes fatores são alvos interessantes para o desenvolvimento de terapias mais seletivas para o tratamento de doenças com um componente angiogênico.

Terapias anti-angiogênicas atuais tem como alvos centrais o VEGF e seu principal receptor, o VEGFR-2 (FISCHER et al., 2008; MEDINGER e MROSS, 2010). Embora as terapias anti-VEGF sejam eficazes, ainda apresentam pontos a serem melhorados e esclarecidos. Por exemplo, alguns pacientes não respondem às terapias anti-VEGF, ou desenvolvem resistência ao medicamento (ELLIS e HICKLIN, 2008; JAIN, 2014). Esta terapia também provoca efeitos indesejados, tais como trombose, hemorragia e hipertensão, afetando as células endoteliais quiescentes

FISCHER et al., 2008; MEDINGER e MROSS, 2010). Parte desses efeitos deve-se ao fato do VEGF ser além de fator angiogênico, um fator de sobrevivência endotelial. Portanto, é necessário identificar novos fatores envolvidos na formação de vasos sanguíneos que possam servir de alvo para o desenho racional de novas terapias anti-angiogênicas. Com essa perspectiva, novos peptídeos e anticorpos específicos para as diferentes proteínas envolvidas em angiogênese tem sido pesquisados e avaliados para o desenvolvimento de terapias anti-angiogênicas alternativas, eficazes e com menores efeitos colaterais.

1.4.1 *Angiogênese na retina e o modelo da retinopatia induzida por oxigênio*

Em humanos, a vascularização da retina inicia-se no útero aproximadamente na 16° semana de gestação, tendo completado a vacularização na 40° semana. Em contraste aos humanos, o desenvolvimento vascular da retina em camundongos inicia-se logo após o nascimento, de maneira que o plexo vascular se forma durante a primeira semana de vida. Em ambos os casos, vascularização da retina se origina de vasos partindo do nervo óptico em direção à periferia do tecido, atingindo as bordas por volta de P8, no caso de camundongos (Figura 7).

O crescimento anormal de novos vasos sanguíneos na retina está associado a uma série de doenças oculares capazes de provocar a perda da visão. Entre essas principais patologias encontra-se a retinopatia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI), retinopatia diabética (DR) e retinopatia da prematuridade (ROP) (DORRELL e FRIEDLANDER, 2006; CHEN e SMITH, 2007).

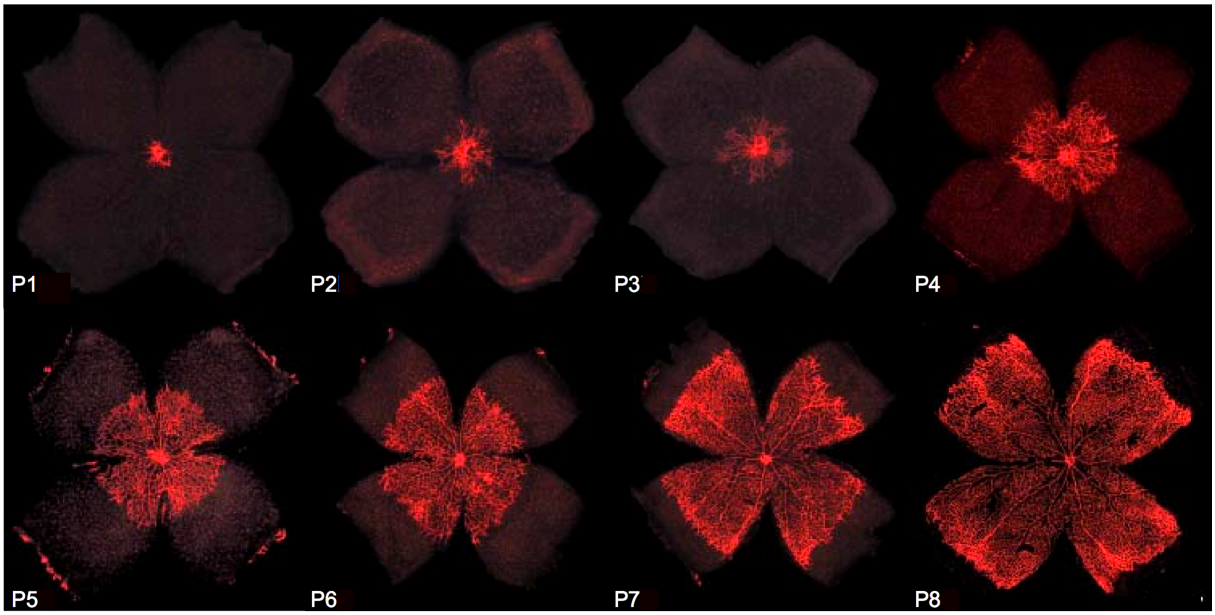

Figura 7. **Desenvolvimento vascular retinal em camundongos**. Vasos sanguíneos de retinas de camundongo do dia pós-natal 1 (P1) a P8 corados com Isolectina B4-Alexa 594. Notem os vasos saindo do nervo óptico (P1), migrando em direção às bordas da retina (Adaptado de STAHI et al., 2010).

A ROP é a principal causa de cegueira entre crianças nascidas prematuramente e é provocada pela administração de oxigênio (O_2) nas incubadoras neonatais (DORRELL e FRIEDLANDER, 2006; CHEN e SMITH, 2007; GARIANO, 2010). Em função do desenvolvimento incompleto do pulmão, crianças prematuras são submetidas a altas concentrações de oxigênio para permitir uma troca eficiente de gases. Entretanto, a vascularização da retina em humanos é completa apenas na última semana de gestação, logo antes do nascimento. Isso quer dizer, que crianças prematuras possuem uma vascularização incompleta da retina. Assim, a administração de altos níveis de oxigênio nas incubadoras neonatais tem como resultado a inibição da produção de VEGF necessário para a formação dos vasos na retina. Nesta fase, os vasos sanguíneos param de desenvolver e também ocorre uma obliteração dos vasos já formados. Quando as crianças são retiradas das incubadoras e retornam aos níveis de normóxia, há uma exacerbação na produção

de VEGF na retina avascular, resultando na angiogênese patológica e na retinopatia (DORRELL e FRIEDLANDER, 2006; CHEN e SMITH, 2007). Com o tempo e com o crescimento dos vasos, forma-se uma cicatriz fibrosa que pode se estender da retina ao cristalino. A retração deste tecido fibroso pode provocar descolamento da retina e, portanto, cegueira (DORRELL e FRIEDLANDER, 2006; CHEN e SMITH, 2007; GARIANO, 2010).

Como mencionado, a formação da vasculatura da retina em camundongos ocorre pós-nascimento. Portanto, é possível estudar os mecanismos moleculares envolvidos na vascularização da retina reproduzindo a ROP em camundongos recém-nascidos (SMITH et al., 1994; PIERCE et al., 1995). Neste modelo, reproduzimos em camundongos eventos similares àqueles de crianças nascidas prematuras. Camundongos na primeira semana de vida (P7-P12) são colocados numa câmara com 75% de O_2 (SMITH et al., 1994; FRUTTIGER, 2007). Nesse período, ocorre a vasoconstrição em resposta às altas concentrações de O_2 (Figura 8). Os animais são então transferidos para a atmosfera ambiente (20,8% de O_2), o que induz um quadro de hipóxia relativa. Como resultado, há uma proliferação exarcebada e desorganizada de novos vasos sanguíneos, caracterizando um estado de neovascularização patológica (com pico em P17) em resposta a variação complexa de uma série de fatores angiogênicos (SMITH et al., 1994; ALON et al., 1995; PIERCE et al., 1995; OKAMOTO et al., 1997).

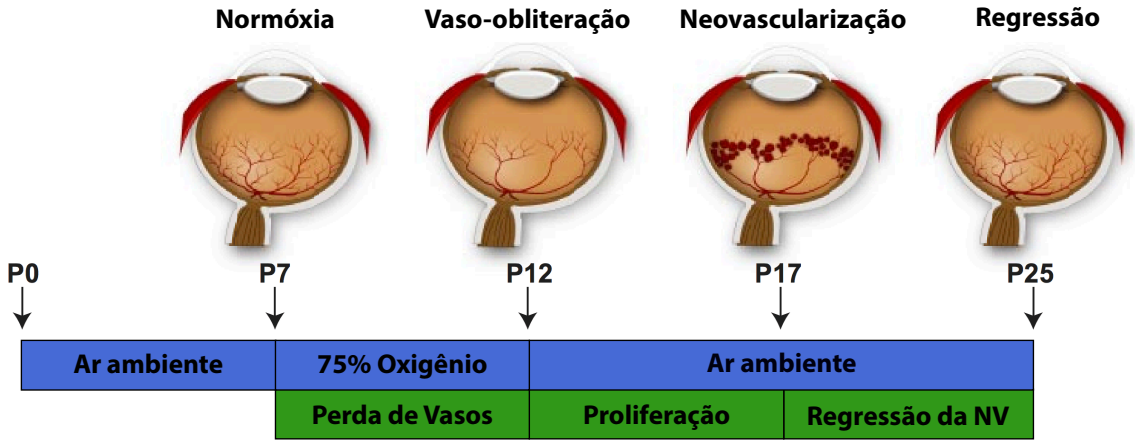

Figura 8. **Modelo animal para estudo da retinopatia**. Representação do modelo da retinopatia induzida por oxigênio em camundongos, indicando as diferentes fases (normóxia, vaso-obliteração, neovascularizção e regressão). Camundongos recém-nascidos (P7) são expostos a 75% de oxigênio por 5 dias. Em P12 eles retornam à concentração ambiente de O_2, o que resulta na expressão elevada de VEGF e consequentemente, na formação excessiva de novos vasos sanguíneos através da angiogênese que atinge o pico máximo em P17. Após esse período os vasos resultantes da neovascularização regridem e em torno de P25 atingem a normalidade (Adaptado de CONNOR et al., 2009).

O modelo animal da retinopatia induzida por oxigênio é amplamente utilizado para estudar os diferentes fatores moleculares envolvidos na neovascularização da retina. O modelo é bem aceito, não apenas como modelo para ROP, mas também como o melhor modelo para estudar o componente angiogênico de outras retinopatias. Além disso, é um importante modelo de angiogênese *in vivo* para avaliar o efeito de compostos candidatos a terapias de doenças que possuem um componente vascular.

1.5 PHAGE DISPLAY E A IDENTIFICACAO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Pequenos peptídeos (6 a 20 aminoácidos) são ferramentas importantes para estudos de estrutura e função de proteínas e para o desenvolvimento de fármacos pois apresentam uma série de vantagens comparados a outras alternativas terapêuticas, entre elas proteínas e anticorpos, como fácil obtenção e menores

custos por síntese química em laboratório, alta especificidade ao ligante, baixa imunogenicidade, maior penetração e baixa toxicidade a órgãos e tecidos (VLIEGE et al., 2010; KASPAR e REICHERT, 2013; OTVOS e WADE, 2014). Por outro lado, o uso terapêutico de peptídeos podem também enfrentar limitações como baixa estabilidade no plasma, meia vida curta devido a suscetibilidade a ação de proteases ou mesmo a rápida remoção da circulação devido a depuração renal (LATHAM, 1999; VLIEGE et al., 2010; FOSGERAU e HOFFMANN, 2015). De fato, se um peptídeo for administrado oralmente a um paciente, o mesmo deve ser capaz de resistir a inúmeras peptidases presentes no intestino delgado e nas microvilosidades de membrana das células epiteliais. Por isso, peptídeos terapêuticos eram em sua maioria administrados através de injeções, causando desconforto a pacientes. Entretanto, a atividade biológica e estabilidade desses peptídeos tem sido melhoradas através de otimizações na estrutura como ciclização para aumentar a permeabilidade membranar, substituição de um L-aminoácido por um D-aminoácido e/ou glicosilação para aumentar estabilidade no plasma ou a conjugação de moléculas de polietilenoglicol para aumentar o peso molecular do peptídeo e consequentemente para aumentar a sua biodisponibilidade na circulação – permitindo, portanto, que vias alternativas de administração sejam utilizadas (VERONESE e PASUT, 2005; VLIEGE et al., 2010; FOSGERAU e HOFFMANN, 2015). Assim, o menor custo de produção associado com a maior seletivivade e menor toxicidade, tornam os peptídeos candidatos potenciais para o desenvolvimento de fármacos. De fato, o interesse em peptídeos pela indústria farmacêutica, bem como o aumento no número destas moléculas em testes clínicos e/ou sua aprovação como fármacos tem aumentado cada vez (VLIEGE et al., 2010; FOSGERAU e HOFFMANN, 2015). Tais peptídeos podem comumente ser obtidos

de fontes naturais, e derivados, por exemplo, de fragmentos de proteínas ou peptídeos hormonais, ou de bibliotecas químicas ou recombinantes.

Phage display consiste de uma técnica combinatorial que permite a identificação de peptídeos ligantes para diferentes moléculas biológicas de interesse. Esta técnica consiste na expressão de peptídeos fusionados a proteínas de superfície de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), de maneira que as bibliotecas contenham uma grande diversidade de peptídeos de um determinado tamanho. Por exemplo, enquanto a biblioteca do tipo CX8C é uma biblioteca cíclica onde cada peptídeo possui 8 aminoácidos (C corresponde ao aminoácido cisteína e X corresponde a qualquer resíduo de aminoácido), a biblioteca do tipo X_6 contém peptídeos lineares de 6 resíduos de aminoácidos. Bibliotecas de *phage display* são, portanto, grandes coleções destes bacteriófagos, cada um apresentando um peptídeo diferente na sua superfície. Estas bibliotecas comumente contém mais de 1 bilhão (10^9) de peptídeos distintos, que podem ser selecionados num processo denominado de *biopanning* (SMITH e SCOTT, 1993). *Phage display* é largamente utilizado em pesquisas que visam estudar interações de proteína-proteína, ou identificar peptídeos bioativos ligantes das mais diversas moléculas biológicas de interesse (SMITH e SCOTT, 1993; SMOTHERS et al., 2002; GIORDANO et al., 2001).

Essas bibliotecas podem ser utilizadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, contra a superfície de células, tecidos, órgãos ou diretamente contra proteínas purificadas (SMITH e SCOTT, 1993; GIORDANO et al., 2001; SMOTHERS et al., 2002) e depende da interação dos peptídeos fusionados à proteínas do capsídeo viral, com o alvo de interesse (Figura 9). Após a aplicação, os fagos não ligantes são removidos por lavagem e os fagos com afinidade ao alvo são amplificados e submetidos a

novos ciclos de seleção. O processo é repetido até a obtenção de um conjunto de fagos específicos para o alvo. O genoma do fago contém entre os genes necessários à replicação, montagem e empacotamento da partícula viral, um gene que confere resistência a antibióticos para garantir que os fagos selecionados cresçam e sejam amplificados ao longo dos ciclos de seleção através do aparato bacteriano (MAGALHÃES et al., 2015). Deste modo, a técnica de phage display tem sido caracterizada como uma potente metodologia que pode ser aplicada no diagnóstico de doenças e no desenvolvimento de fármacos (GIORDANO et al., 2001; SMOTHERS et al., 2002), pois permite a seleção de peptídeos únicos. No presente trabalho, combinamos a metodologia do *phage display* para isolar peptídeos ligantes à porção extracelular do receptor tirosina quinase Tie1, com o objetivo de estudar a participação de tal domínio em angiogênese.

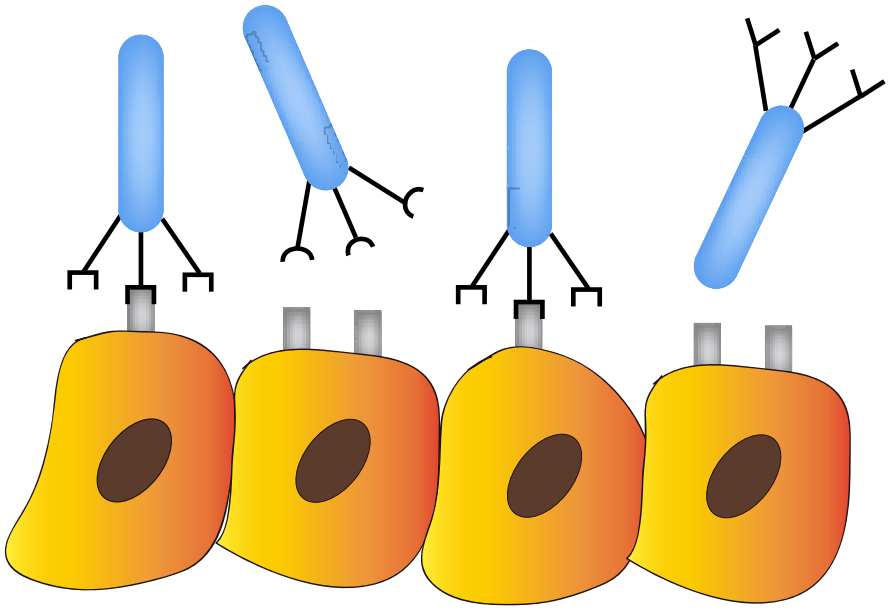

Figura 9. **Seleção de peptídeos ligantes a alvos biológicos**. Nesta imagem está representado o processo de seleção de peptídeos por *phage display*. Os fagos contendo os diferentes peptídeos, que estão representados pelos vários formatos na extremidade da partícula viral em azul, são incubados com os alvos de interesse – neste caso estamos representando células (em laranja) expressando receptores na sua superfície. Os peptídeos que se "encaixam" em tais receptores são preferencialmente selecionados. As bibliotecas são construídas de maneira que os peptídeos são expressos em fusão com proteínas do capsídeo viral (Adaptado de MAGALHÃES et al., 2016).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Tie1 é um receptor tirosina quinase importante para a progressão da angiogênese fisiológica e patológica. Vários estudos mostram que este receptor tem a sua expressão elevada em determinadas patologias e a sua importância para a angiogênese tumoral já foi assinalada através de estudos genéticos. Porém, o mecanismo de ação deste receptor neste processo permanece obscuro, em parte, pela dificuldade de identificar ligantes específicos. Assim, mais estudos são necessários para entender melhor o papel desse receptor na angiogênese. Por isso, o presente estudo tem como objetivos:

1. **Determinar a importância do domínio extracelular de Tie1 na angiogênese.** Para isto, selecionamos peptídeos ligantes específicos para a porção extracelular de Tie1. Utilizando a metodologia de *phage display*, buscamos peptídeos que interagissem seletivamente com a porção extracelular do receptor Tie1. O peptídeo selecionado foi utilizado em um modelo de angiogênese *in vivo* para determinar a importância deste receptor na neovascularização da retina.

2. **Identificar um ligante natural de Tie1.** Peptídeos isolados por phage display comumente mimetizam ligantes naturais de seus alvos biológicos. Assim, utilizamos o peptídeo obtido no objetivo específico 1 para identificar possíveis ligantes de Tie1.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E CÉLULAS

Todos os receptores tirosina quinase foram obtidos comercialmente da empresa R&D Systems (Minneapolis, Estados Unidos): Tie1 recombinante humano (619-TI), Tie2 recombinante humano (313-TI), VEGFR1 recombinante murino (417-F1), VEGFR2 recombinante murino (443-KD/CF) e humano (357-KD-050/CF), VEGFR3 recombinante humano (349-F4), Neuropilina 1 (3870-N1-025) e Neuropilina 2 (567-N2) recombinante humano. Os anticorpos primários obtidos comercialmente foram: anti-Tie1 humano (AF619, R&D Systems), anti-β Tubulina (2128, Cell Signalling Technology), anti-bacteriófago fd (B7786, Sigma-Aldrich). O anticorpo Anti-CYRADRFLIC foi produzido pelo Centro de Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Anticorpos secundários: Anti-imunoglobulina de Coelho conjugado com fluoróforo IRDye 680 LT (925-68023, LI-COR, Lincoln, Nebraska USA) e Anti-imunoglobulina de Cabra conjudado com fluoróforo IRDye 680 LT (925-68024, LI-COR). Foram também utilizados IgG de coelho purificada (011-000-003, Jackson Immuno Research) e Isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* ($GS\text{-}IB_4$) conjugada a Alexa FLuor 594 (I21413, Life Technologies). HUVEC imortalizada foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roger Chammas da FM-USP. Células endoteliais de pulmão (LEC) ou de coração derivadas do camundongo *H-2K^b-tsA58* (LANGLEY et al., 2003) foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 10% soro fetal bovino a 33 °C. Células HUVEC (Promocell) foram cultivadas em meio de cultura EBM suplementado com fatores fornecidos pelo fabricante (Promocell).

3.2 SELEÇÃO DE PEPTÍDEO LIGANTE A TIE1 POR PHAGE DISPLAY

Tie1 recombinante humano foi diluído em PBS (tampão fosfato salino) para a concentração de 20 ng/mL e 50 µl desta solução foram adsorvidos em placa de 96 poços a 4°C durante a noite. No dia seguinte, a solução foi removida da placa e os poços foram lavados com 100 µL de PBS 1x e então bloqueados com 350 µL de PBS 3% BSA durante 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida e foram adicionados 10^{10} fagos da biblioteca CX_8C (onde C = cisteína e X representa 8 aminoácidos aleatórios) em 50 µL da mesma solução de bloqueio. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, a solução de fagos foi removida e o poço foi lavado nove vezes com 200 µL de PBS. Os fagos ligantes a Tie1 foram recuperados por infecção de 200 µL de bactéria K91 (densidade ótica de 600 nanômetros em torno de 1,8) durante 30 minutos, posteriormente transferidos para 20 mL de LB (kanamicina 50 µg/mL e tetracilina 20 µg/mL) e incubados durante 20 horas em incubador, sob agitação de 300 RPM (rotações por minuto) a 37ºC. Para controle da infectividade, a bactéria foi infectada em paralelo pelo fago Fd-tet e plaqueada em placa de LB Ágar (kan/tet). No dia seguinte, os fagos foram precipitados (ver abaixo, Precipitação de Fagos) e mais dois ciclos de *phage display* foram realizados. No 2º e 3º ciclo, após a recuperação dos fagos ligantes por infecção à K91, e subsequente transferência para volume de 20 mL, uma alíquota deste último foi plaqueada (pontos de 100, 10 e 1 µL, em triplicata) em placas LB Ágar (kan/tet) para quantificar o número total de fagos ligantes recuperados em cada etapa.

3.3 PRECIPITAÇÃO DE FAGOS

Para a precipitação dos fagos, a cultura saturada durante a noite foi centrifugada a 6.000 x g, durante 30 minutos, 4ºC. O sobrenadante de fagos foi transferido para tubo contendo 3mL de 16,7% PEG/3,3 M NaCl (15% do volume total) e incubado no gelo por 2 horas. Após centrifugação a 6.000 x g, durante 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e os fagos contidos no precipitado foram ressuspendidos em 1 mL de PBS 1x estéril, seguido de incubação no agitador a 250 RPM, 37°C por 15 minutos. Em tubo de 1,5 mL, a solução de PBS e fagos foi centrifugada a 7.000 x g por 15 minutos. A solução foi novamente transferida para tubo com 15% de PEG/NaCl e incubado por 1 hora no gelo, seguida de centrifugação a 20.800 x g (Centrífuga 5417R, Eppendorf) por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo novamente centrifugado por 5 minutos. Por fim, o precipitado de fagos foi ressuspendido em PBS e armazenado na geladeira.

3.4 SEQUENCIAMENTO DE FAGOS

Para sequenciar o DNA dos fagos selecionados, colônias obtidas por plaqueamento no terceiro ciclo foram individualmente diluídas em 100 µL de PBS 5% glicerol e usadas como *template* em PCR. A reação de PCR de fagos padronizada no laboratório inclui Tampão PCR 1x, 2,5 µM de dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$, 20 pmoles dos oligonucleotídeos senso (5'-GCAAGCTGATAAACCGATACAATT-3') e reverso (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3'), 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas), para um volume total de 25 µL (ciclagem de 94ºC, 5 minutos; 94ºC, 15 segundos; 60ºC, 20 segundos, 35 vezes; 72ºC, 7 minutos). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2% e sequenciados com o kit *Big Dye® Cycle*

Sequencing (Applied Biosystems), segundo recomendações do próprio fabricante. Foram utilizados 8 pmoles do oligonucleotídeo reverso e 2 μL do produto de PCR diluído 1:128 em 25 ciclos de reação com 10 segundos de desnaturação a 95ºC, 5 segundos de anelamento dos oligonucleotídeos a 55ºC e 1 minuto de extensão a 60ºC. As reações foram precipitadas pela adição de 1 µL de glicogênio 20 mg/mL, 1 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2, 25 µL de etanol absoluto gelado, seguida de incubação no gelo por 20 minutos. Após centrifugação a 4.000 RPM por 15 minutos a 4ºC (Centrífuga Eppendof 5804, rotor A-4-81), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 50 µL de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação por 20 minutos, descarte do sobrenadante e incubação por 1 minuto a 95ºC. As reações foram encaminhadas ao serviço de sequenciamento do Instituto de Química/USP, que utiliza o sequenciador ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyzer /HITACHI.

3.5 ENSAIO DE LIGAÇÃO DO PEPTÍDEO SELECIONADO CONTRA TIE1

O fago CYRADRFLIC selecionado no *biopanning* contra Tie1 foi validado através de ensaios de ligação com proteínas recombinantes. Tie1 humano, VEGFR-1, VEGFR-2 recombinante de camundongo, Neuropilina-2 de rato, VEGFR-3, Tie2, Neuropilina-1 e VEGFR-2 humanos e BSA foram diluídos a 4 μg/mL e 50 µL de cada receptor foi adicionado em placa poliestireno (96 poços). Cerca de 10^8 fagos (CYRADRFLIC e Fd-tet) foram incubados com as proteínas imobilizadas nas mesmas condições em que o *panning* foi realizado. Após cerca de 1 hora e 30 minutos, a solução de fagos foi removida e os poços foram lavados 10 vezes com 200 µL de PBS. O fagos ligantes foram recuperados por infecção à bactéria K91 (Densidade ótica de 600

nanômetros em torno de 1,8) durante 30 minutos, plaqueados em LB ágar (kanamicina 50 µg/mL e tetraciclina 40 µg/mL) e incubados a 37ºC durante a noite. O número de Unidades Transformantes (TUs) foi obtido a partir do plaqueamento dos fagos recuperados em cada ensaio e da contagem de colônias. Foram realizados pelo menos três experimentos de ligação independentes.

3.6 ENSAIO DE LIGAÇÃO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Foi utilizado o método BRASIL como descrito (GIORDANO et al., 2001). Resumidamente, para a ligação do peptídeo CYRADRFLIC a Tie1 expresso em células endoteliais, 10^9 TUs do fago CYRADRFLIC foram incubados com 10^6 células endoteliais de pulmão (LEC) ou de coração (HEC) na presença de DMEM 1% BSA durante 2 horas no gelo. A mistura de fagos e células foi então centrifugada através da fase orgânica (dibutilftalato e ciclohexano, 9:1 [vol/vol]) durante 10 minutos a 10.000 x g. O fundo do tubo contendo o precipitado de células foi cortado e transferido para um novo tubo. Os fagos ligados às células foram recuperados por infecção a *E. coli* K91 Kan durante 30 minutos à temperatura ambiente, e quantificados por contagem de colônia após plaqueamento em LB contendo tetraciclina (40 µg/ml) e kanamicina (50 µg/mL).

3.7 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO

Foram semeadas 2,5 x 10^4 células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) por poço do sistema *Culture Slides-Chamber* e incubadas por 24 horas a 33°C, seguida de incubação por 24 horas a 37°C. As células foram bloqueadas com DMEM 30% de soro fetal bovino (SFB) por 1 hora a 37°C. Em seguida 10^9 dos fagos

CYRADRFLIC ou Fd-tet diluídos ($5x10^6/\mu L$) em meio DMEM 2% SFB foram adicionados e incubados durante 24 horas. As células foram lavadas cinco vezes com PBS 10% BSA, seguida de cinco lavagens com tampão 50 mM Glicina, 150 mM NaCl, pH 2,8, 2 minutos cada. O excesso do tampão glicina foi removido por três lavagens com PBS. As células foram fixadas por 3 minutos, 4% PFA e novamente lavadas com PBS. Para permeabilizar as células, adicionamos 0,3% Triton X-100 em PBS 1% BSA, durante 5 minutos e novamente lavamos por cinco vezes com PBS, 1 minuto cada lavagem. O bloqueio foi realizado em PBS 1% BSA por 2 horas. Em seguida, o anticorpo primário anti-bacteriofago (Sigma) ou IgG de coelho, utilizado como controle, foram incubados por 1 hora (concentração de 6,6 ng/μL em PBS 1% BSA). Após cinco lavagens de dois minutos cada com PBS 1% BSA, o anticorpo secundário anti-IgG de coelho-Cy3 (Jackson) diluído 1:300 em PBS 1% BSA foi incubado por 1 hora. As células foram lavadas por cinco vezes, fixadas em PBS 4% PFA por 5 minutos e novamente lavadas em PBS. As lâminas foram montadas com meio de montagem e analisadas. Para a quantificação de partículas de fagos internalizadas (DIAS-NETO et al., 2009) por PCR em tempo real, após a incubação dos fagos e lavagem com PBS 10% BSA, as células foram tripsinizadas e lisadas em 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% SDS, fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 20.000 x g. Para a reação, foram utilizados 4 μL de cada sobrenadante resultante do ensaio de internalização, diluído na proporção de 1:100. As reações, feitas em triplicatas para cada alvo, com um volume total de 12 μL continham 1x Sybr Green Master Mix, 500 nM do par de oligonucleotídeos senso (5'-TGAGGTGGTATCGGCAATGA-3') e reverso (5'-GGATGCTGTATTTAGGCCGTT-3') para quantificação de partículas de fagos, e os oligonucleotídeos senso (5'-ACGCGCATGAATGGATGA-3') e reverso (5'-CGTTCCCTTGGCTGTGGTT-3'), para o gene do RNA ribossomal utilizado como controle interno. As reações foram incubadas

de acordo a seguinte ciclagem: 95ºC por 10 minutos; 40 vezes de 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 minuto. Após as reações, os dados foram analisados e o número de partículas de fago internalizados nas células HUVEC foi determinado através da fórmula $2^{CT\ Fago - CT\ DNA\ Ribossomal}$, onde o número de partículas foi normalizado pelo DNA ribossomal.

3.8 ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO CYRADRFLIC SINTÉTICO E O FAGO-CYRADRFLIC PELA LIGAÇÃO A TIE1

Para o ensaio de competição, placas sensibilizadas com Tie1 e bloqueadas com PBS 3% BSA foram incubadas com cerca de $3x10^7$ unidades transformantes do fago-CYRADRFLIC na presença de 100, 30, 10 e 3 µg/ml do peptídeo sintético CYRADRFLIC. Ainda como controle negativo, o respectivo fago foi também incubado na presença de concentrações semelhantes do peptídeo controle CARAC. O restante do experimento foi realizado de acordo as condições descritas anteriormente (Ensaio de ligação do peptídeo selecionado contra Tie1).

3.9 ALANINA *SCANNING* E ENSAIO DE LIGAÇÃO DE FAGOS

Os oligonucleotídeos contendo códons para alanina foram adquiridos da empresa Sigma e clonados no vetor fUSE55. Unidades transdutoras do fago apresentando cada aminoácido original substituído por alanina foram quantificadas e utilizadas em ensaios de ligação com as proteínas recombinantes humanas Tie1, Tie2 ou BSA na presença de 10^8 TUs dos fagos (versões mutadas do fago CYRADRFLIC ou o fago controle Fd-tet). Após a incubação, os poços foram lavados com PBS. Os fagos ligantes foram

recuperados por infecção de K91 e quantificados por contagem de colônias bacterianas selecionadas em placas kan/tet.

3.10 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC, Promocell) foram semeadas em placas de 96 poços ($5x10^3$ células por poço), cultivadas a 37°C com 5% de CO_2 durante 24 horas em meio completo (EBM, Promocell) e em seguida, carenciadas durante 20 horas em meio puro, sem adição de SFB ou fatores de crescimento. As células foram subsequentemente incubadas com diferentes concentrações do peptídeo CYRADRFLIC ou do peptídeo controle CAPAC (150 e 300 μg/ml), na presença ou ausência de 250 ng/mL de Ang1 ou de Ang2 durante 48 horas a 37˚C. O reagente de proliferação celular WST-1 foi adicionado e a incubação foi continuada durante um período adicional de 4 horas. A absorvância foi medida utilizando um leitor de microplacas a A440 (CLARIOstar, Labtech BMG).

3.11 MODELO ANIMAL DA RETINOPATIA INDUZIDA POR OXIGÊNIO

Os procedimentos foram realizados como descrito por Smith e colaboradores (1995) e detalhados em Connor e colaboradores (2009). Brevemente, filhotes de camundongos C57BL/6 com 7 dias de vida (P7) foram transferidos para uma câmara de hiperóxia e expostos a atmosfera contendo 75% de oxigênio durante 5 dias. Em P12 os animais foram retirados da câmara e retornaram a concentração de oxigênio ambiente (20,8%); em P15 foram anestesiados com avertina e tratados com 1 μL do peptídeo CYRADRFLIC ou CAPAC (100 μg/μL em dimetilsulfóxido, DMSO) através

de injeções intraoculares realizadas com agulha de 30 gauge (agulha gengival descartável curta, Unoject). O mesmo procedimento foi realizado para o tratamento com o veículo (DMSO). Em P17, os olhos dos animais foram removidos com o auxílio de pinça curva e imediatamente fixados em PBS 4% PFA por 30 minutos. Após a fixação, os olhos foram lavados três vezes em PBS 1x. Com pinças de dissecar, a córnea foi cortada e as retinas isoladas dos outros componentes dos olhos. Em seguida as retinas foram permeabilizadas em PBS Triton X-100 0,5% durante 30 minutos e os vasos foram corados com 10 μg/mL de isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (GS-IB_4) conjugada a Alexa Fluor 594 (Life Technologies, número de catálogo I21413), durante a noite a 4ºC. Com a retina sob uma lupa, foram realizadas quatro incisões distantes entre si por 90 graus, formando 4 quadrantes de tamanho similar unidos pelo centro da retina, região do nervo óptico. As retinas foram montadas com meio de montagem Vectashield® (H-1000, Vector Laboratories) em lâminas de vidro e cobertas com lamínula. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência NIKON Eclipse TE300, objetiva 10X – Ph1 DLL. A quantificação dos vasos angiogênicos foram realizados no Adobe Photoshop como descrito (Connor et al., 2009). Usando a ferramenta “Poligonal Lasso”, o contorno de toda a retina foi selecionado e o número de pixels totais foi obtido no histograma da área. Com a ferramenta “Varinha Mágica” os pixels que formam os vasos de coloração vermelha forte foram selecionados e o número de pixels dos vasos angiogênicos foi obtido. A porcentagem de área de neovascularização (número de pixels dos vasos angiogênicos/número de pixels da área da retina total X 100) foi calculada. Para quantificar o número de bifurcações, foram selecionadas quatro áreas representativas de cada retina, onde as ramificações e bifurcações dos vasos sanguíneos presentes no campo foram contados.

3.12 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CYRADRFLIC

Anticorpos anti-CYRADRFLIC foram gerados em coelhos imunizados à partir do peptídeo CYRADRFLIC conjugado a KLH. A produção de anticorpos anti-CYRADRFLIC foi realizada pelo Centro de Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.13 PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CYRADRFLIC POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Soro total de coelho imunizado (2 mL) com o peptídeo CYRADRFLIC foi utilizado para purificar IgG total em Coluna G Sepharose 4 FastFlow, de acordo instruções do fabricante (GE Healthcare). Primeiramente, para limpar o soro de partículas (como debris de células), o mesmo foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para Coluna de protein G-Sepharose, previamente equilibrada com 20 mM tampão fosfato, pH 7.0. A mistura de soro e proteína G foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a coluna foi lavada com 14 mL de 20 mM tampão fosfato, de maneira a garantir que proteínas que não interagiram com a proteína G fossem eliminadas. Para tal, acompanhamos a absorbância do flow-through. Por fim, o IgG total do soro imune foi eluído com em frações de 1 mL de Glicina 20 mM, NaCl 110 mM, pH 2,2 e imediatamente neutralizado com 100 μL de Tris 1M pH8,0. As frações de IgG eluídas foram incubadas durante a noite a 4ºC com o peptídeo CYRADRFLIC previamente acoplado em *Activated CH Sepharose 4B* (Sigma-Aldrich). O anticorpo foi eluído igual ao procedimento descrito anteriormente.

3.14 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS POR FLISA

O peptídeo CYRADRFLIC foi diluído para 4 ng/mL em tampão carbonato de sódio 100 mM, pH 9,6 e adsorvido em placa de 96 poços, durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, a solução contendo o peptídeo foi removida e cada poço lavado uma vez com 100 µL de PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito por 2 horas à temperatura ambiente com *Odyssey Blocking Buffer*. O anticorpo purificado, IgG purificado de coelho ou o soro pré-imune de coelho foram adicionados aos poços nas concentrações de 10, 3, 1, 0,37, 0,12 e 0,04 µg/mL e incubados durante 2 horas, seguida de lavagem com PBS. Os anticorpos ligados ao peptídeo foram detecatos por incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho conjugado com o fluoróforo IRDye 680 (diluição 1:5000) por 1 hora. Após lavagem, a placa foi analisada no sistema de detecção *Odyssey* (LiCOR).

3.15 EXTRATO TOTAL DE PROTEÍNAS DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Culturas de células confluentes foram lavadas com PBS 1x gelado e incubadas em tampão RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, desoxicolato de sódio a 0,25%, 1% de NP-40, pH 7,5) suplementado com inibidores de protease (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) ou em tampão NP-40 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 1% de BSA, pH 7,4, (suplementado com a mesma mistura de inibidor de protease) durante 30 min em gelo. A solução passou por agulha de 27G três vezes seguida de centrifugação a 20.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. O extrato total foi quantificado com *Pierce BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Fischer Scientific*).

3.16 WESTERN BLOT

Os lisados celulares foram resolvidas em gel NuPAGE® Novex® Bis-Tris a 4-12% (Invitrogen) seguido de transferência para membrana de nitrocelulose (Invitrogen). As membranas foram bloqueadas em PBS 5% de leite (*Blotting Grade Blocker non Fat Dry Milk*, Biorad 170-5016-FDS) durante 1 hora e incubada durante a noite a 4°C com anticorpo anti-CYRADRFLIC (1,4 μg/ml em PBS 1% leite, 0,05% de Tween-20). No dia seguinte, as membranas foram lavadas quatro vezes em PBS 0,05% Tween-20, 5 minutos cada. Anticorpos secundários anti IgG de coelho conjudado a Horseradish Peroxidase-HRP (Invitrogen) foram diluídos 1:2500 em PBS 1% de leite, 0,05% de Tween-20 e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Proteínas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (*Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit*, Invitrogen).

3.17 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Células Panc-1 foram lisadas em tampão NP-40 e o extrato total de proteína foi preparado para resolução em gel 2D usando *2D Clean-Up Kit* (de acordo as instruções do fabricante, GE Healthcare) e solubilizado em *Zoom 2D Protein Solubilizer* Kit (Life Technologies). Para a focalização isoelétrica, as fitas (IPG 7 cm, pH 3-10 L) foram reidratadas durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente ou durante a noite. Condições da eletroforese de primeira dimensão: 200 V durante 20 minutos, 450 V durante 15 minutos, 750 V durante 15 minutos e 2000 V durante 30 minutos. As fitas foram equilibradas em tampão de amostra 1x NuPAGE LDS suplementada com um agente redutor durante 15 minutos sob agitação, seguida de incubação em 125 mM de iodoacetamida diluída em NuPAGE LDS 1x (Solução de alquilação) durante 15 minutos

com agitação. A segunda dimensão foi realizada em gel Bis-Tris 4-12% (*Zoom Protein Gel*, *IPG Well*, *Life technologies*) durante 35 minutos a 200 V. O gel foi corado com *Sypro Ruby* ou transferidos para membrana de nitrocelulose para análise por transferência de *Western blot* com anticorpo anti-CYRADRFLIC.

3.18 ESPECTROSCOPIA DE MASSAS

Primeiramente localizamos as proteínas reconhecidas por anti-CYRADRFLIC no gel corado com *Sypro Ruby* através da superposição das imagens obtidas através de ambos os métodos de detecção de proteínas. Os *spots* que puderam ser visualizados nas duas técnicas foram selecionados, cortados do gel corado com *Sypro Ruby* sob visualização em transluminador de luz UV e enviados para análises de espectroscopia de massas no MD Anderson, Texas.

3.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, a significância estatística foi determinada por ANOVA *Tukeys multiple comparison test* ou teste Student's t. Para experimentos *in vivo* com o peptídeo CYRADRFLIC, as comparações entre os grupos de estudo foram avaliados por análises de variâncias, usando o programa Prism GraphPad e a significância estatística foi configurada para um p *value* menor que 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 TIE1 RECOMBINANTE COMO ALVO PARA A SELEÇÃO DE PEPTIDEOS

A técnica de *phage display* utiliza bibliotecas combinatoriais de peptídeos ou proteínas para selecionar ligantes que possuem afinidade a alvos de interesse. Neste trabalho, propomos estudar o mecanismo de ação do receptor Tie1 e identificar novos ligantes desta proteína. Para isso, utilizaremos a técnica de *phage display*, tendo como alvo o domínio extracelular do receptor Tie1 recombinante humano produzido na linhagem celular de mieloma de camundongo e obtida comercialmente (Figura 10). Utilizar a proteína puririficada como alvo facilita a seleção de fagos ligantes por *phage display*, que pode ocorrer de maneira mais simples, rápida e direta, como discutido abaixo.

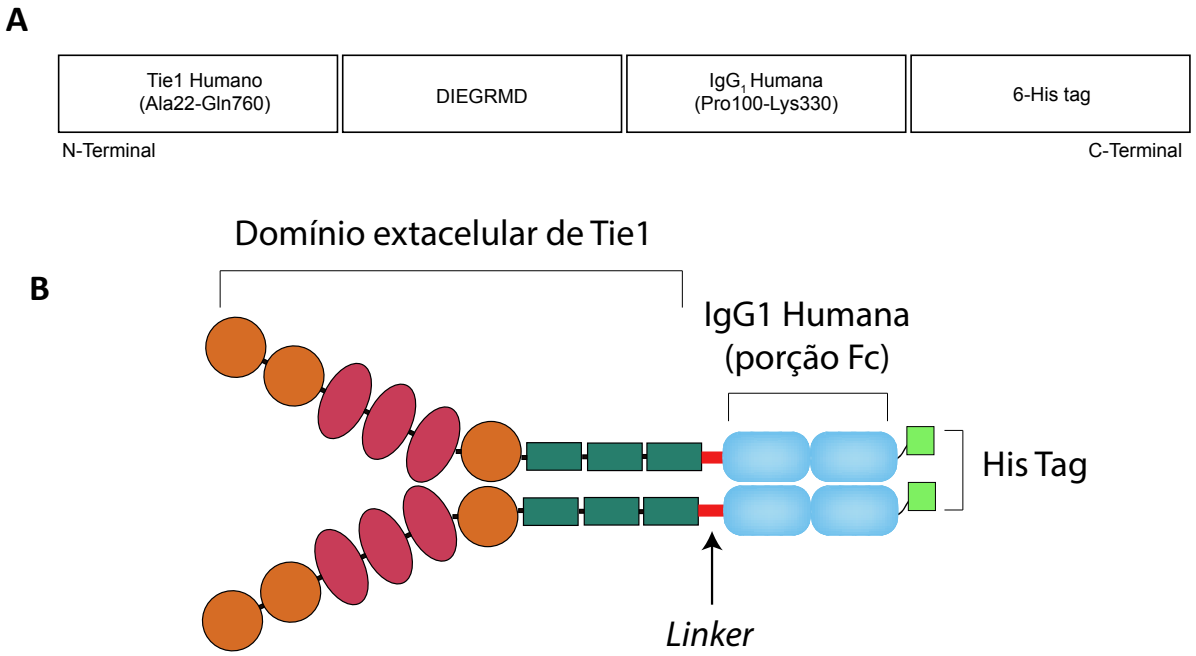

Figura 10. Tie1 recombinante. Representação esquemática do receptor Tie1 utilizado neste trabalho. **(A)** A proteína é composta pelo domínio extracelular de Tie1 (resíduos 22 a 760), seguidos da sequência conectora DIEGRMD, fusionadas ao domínio Fc da IgG1 humana (resíduso 100 a 330). A cauda de histinia (6-His Tag) auxilia na purificação da proteína de fusão. (B) Representação do receptor recombinante na forma de homodímero, formado à partir de pontes dissulfeto entre as porções Fc. Esse receptor foi produzido em célula de mieloma de camundongo pela empresa *R&D System*.

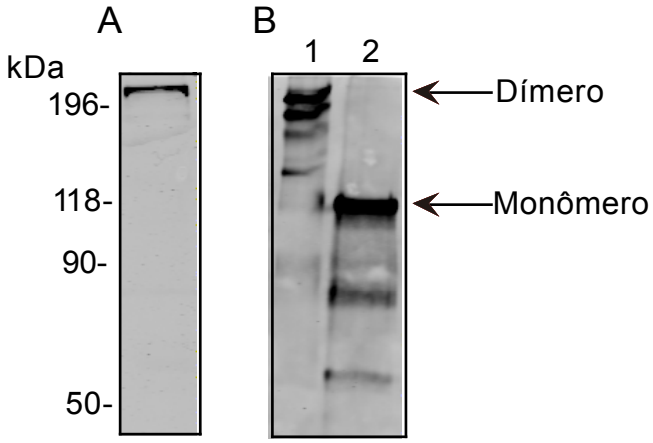

Figura 11. Tie1 é um homodímero unido por pontes dissulfeto. (A) Tie1 recombinante humano foi analisado por SDS-PAGE e corado com coomassie. **(B)** Imunoreatividade de anticorpo comercial anti-Tie1 com a proteína recombinante em condições não redutoras (1) e redutoras (2).

Para verificarmos a integridade e pureza da proteína obtida comercialmente, a mesma foi analisada por SDS-PAGE e por *Western blot*. Observamos que a proteína apresenta um peso molecular aparente de ~200 kDa, condizente com a massa molecular esperada (Figura 11A). Finalmente, esta proteína foi reconhecida em *Western blot* por anticorpo imunoespecífico para Tie1 (Figura 11B). Estes resultados estão de acordo com o grau de pureza (>90%) e massa molecular especificadas pelo fornecedor. É importante observar que a proteína recombinante é um homodímero ligado por pontes de dissulfeto entre os domínios IgG1 de cada cadeia. Deste forma, observamos que a proteína apresenta massa molecular de ~200 kDa quando analisada em condições não redutoras, e massa molecular de ~120 kDa, quando analisada em condições redutoras (Figura 11B). Observamos ainda a presença de fragmentos proteicos menores que também foram reconhecidos pelo anticorpo contra Tie1, sugerindo a presença de fragmentos do receptor. Não sabemos a origem destes fragmentos, se são produtos de degradação gerados durante a purificação, ou formas truncadas da molécula. Em conclusão, a proteína obtida é adequada o que viabiliza a sua utilização como alvo nos ensaios de *phage display.*

4.2 SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES DE TIE1

Uma vez confirmada a viabilidade do receptor Tie1 comercial, o próximo passo foi identificar peptídeos ligantes deste receptor pela tecnologia do *phage display*. Para isto, utilizamos uma biblioteca de *phage display* de peptídeos do tipo CX8C (onde C representa o aminoácido cisteína e X, qualquer aminoácido aleatório). Este biblioteca foi gerada em nosso laboratório.

Para selecionar fagos apresentando peptídeos ligantes de Tie1, esta proteína foi imobilizada em placas de poliestireno e incubada com a biblioteca de *phage display*. Os fagos com afinidade pelo receptor de interesse foram recuperados por infecção com bactéria, amplificados e utilizados em dois ciclos consecutivos de seleção. A partir da quantificação dos fagos recuperados, observamos um alto número de ligantes no 2º e 3º *ciclo* (Figura 12).

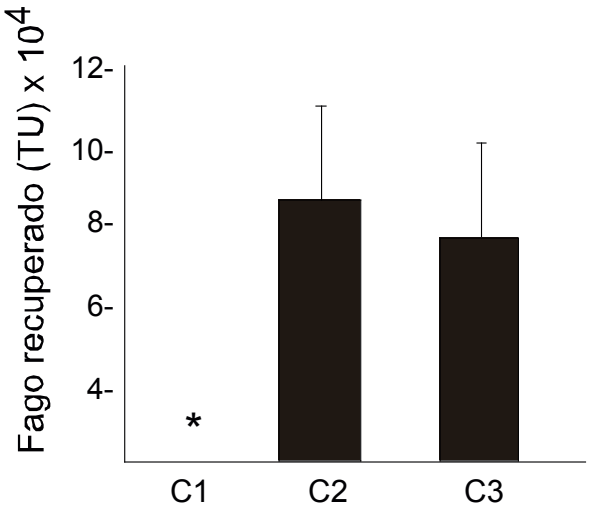

Figura 12. Isolamento de peptídeos ligantes de Tie1. A biblioteca de *phage display* CX8C foi incubada com Tie1 imobilizado em placa e os fagos ligantes recuperados por infecção bacteriana. O gráfico indica o número de fagos ligantes recuperados em cada ciclo de seleção (C2 e C3) em unidades transdutoras (TU). O primeiro ciclo (C1) não foi quantificado para evitar a perda de peptídeos únicos. Barras representam desvio padrão do plaqueamento feito em triplicata.

Como durante o primeiro ciclo de seleção muitos dos peptídeos adicionados são únicos, nós não quantificamos o número de fagos ligantes para evitar a perda destes peptídeos. Mas, a partir do segundo e terceito ciclo de seleção, os peptídeos foram amplificados e adicionados em múltiplas cópias, o que permitiu a quantificação sem perda de diversidade. De fato, observamos um número significativo de fagos ligantes de Tie1 nos dois ciclos quantificados, algo entre 6 e 7 x 10^4 Unidades Transdutoras (TU - *Transducing Units*). Assim, o número de fagos recuperados nos ciclos quantificados nos sugere que houve um seleção positiva de peptídeos ligantes de Tie1.

Para identificar as sequências dos peptídeos selecionadas ao longo do *panning*, selecionamos algumas colônias aleatórias do terceiro ciclo e sequenciamos o genoma dos fagos na região contendo o inserto exógeno codificante para o peptídeo. Observamos que das 16 sequências identificadas, a sequência CYRADRFLIC foi a mais abundante, estando presente em 43,75% da amostra analisada (Figura 13A). Os demais peptídeos apresentaram-se apenas uma vez dentre os 16 sequenciados. É interessante observar que entre os peptídeos identificados, alguns apresentam similaridade entre si, tais como os pares de peptídeos CYSADVYHVC e CYWADVYHVC, e CWIAGPYVVC e CWVAGGYVVC. Além disso, através do alinhamento por simililaridade desses peptídeos notamos que os mesmos compartilham o motivo [Ar]-X-A-[G/D]-X-[Y/F]-X-[V/I] conservado, onde Ar = aromático e X = qualquer aminoácido (Figura 13B). Não observamos motivos conservados entre os demais peptídeos selecionados.

A

Peptídeo	Frequência (%)
CYRADRFLIC	43,75
CYWADVYHVC	6,25
CYSADVYWVC	6,25
CWIAGPYVVC	6,25
CWVAGGYVVC	6,25
CKVMGMYLVC	6,25
CFFVYPYRIC	6,25
CDYYDKMYRC	6,25
CIKYFNSLYC	6,25
CILGVVSTVC	6,25

B

```
WIAGPYVV  (1)
WVAGGYVV  (1)
YRADRFLI  (7)
YWADVYHV  (1)
YSADVYWV  (1)
FFVYPYRI  (1)
DYYDKMYR  (1)
KVMGMYLV  (1)
ILGVVSTV  (1)
IKYFNSLY  (1)
```

Figura 13. Peptídeos selecionados por phage display. (**A**) Os peptídeos exógenos dos 16 fagos sequenciados foram agrupados e a frequência de cada peptídeo determinada. (**B**) Os peptídeos foram alinhados de acordo a similaridade de sequência por *Clustal Omega multiple sequence aligment*. As cores destacam o motivo [Ar]-X-A-[G/D]-X-[Y/F]-X-[V/I] conservado entre os peptídeos.

Como sequenciamos apenas 16 clones é possível que a frequência dos peptídeos únicos se altere, e que outros peptídeos sejam identificados. Porém, dada a representatividade do peptídeo CYRADRFLIC, o mesmo pareceu ser um candidato interessante para as posteriores validações de ligação e especificidade ao receptor alvo, e foi, portanto, selecionado para estes estudos.

4.3 O PEPTÍDEO CYRADRFLIC INTERAGE ESPECIFICAMENTE COM TIE1 *IN VITRO*

Para confirmar a interação do fago CYRADRFLIC com o receptor Tie1, o mesmo foi produzido em larga escala e utilizado em ensaios de ligaçãos de fagos. Como controle utilizamos o fago Fd-tet que não apresenta nenhum peptídeo exógeno. Realizamos também, ensaios de ligação contra o receptor Tie2, parceiro de Tie1 dentro desta família de receptores. Incluímos ainda, vários receptores e correceptores envolvidos em angiogênese, tais como os receptores da família do VEGF (VEGFR1, 2 e 3) e seus correceptores (NRP1 e 2).

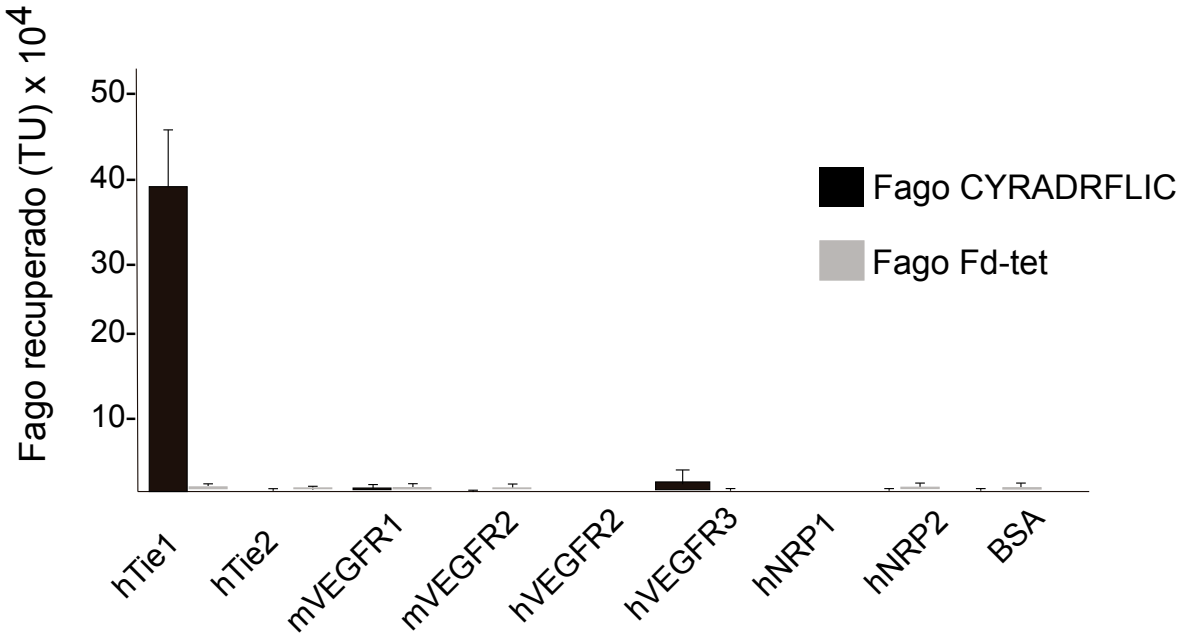

Figura 14. O Fago apresentando o peptídeo CYRADRFLI se liga especificamente ao Tie1 recombinante humano. O peptídeo não se liga aos outros receptores e coreceptores testados, Tie2 humano (hTie2), VEGFR1 murino (mVEGFR1), VEGFR2 murino ou humano (mVEGFR2 ou hVEGFR2), VEGFR3 humano (hVEGFR3) e Neuropilinas (NRP)-1 or 2. O BSA foi utilizado como controle negativo de ligação. As proteínas recombinantes foram adsorvidas em placa de multipoços a 10 μg/mL e incubadas com o fago CYRADRFLIC ou o fago sem peptídeo exógeno, Fd-tet. O *input* foi de 10^8 TUs. Barras representam desvio padrão de três a cinco experimentos independentes.

Os ensaios mostram que o fago CYRADRFLIC liga-se fortemente ao receptor Tie1, e não interage com Tie2 (Figura 14). Isto indica que o nosso peptídeo é específico para o receptor desejado (Tie1) e não apresenta ligação cruzada com o outro membro da família (Tie2). Além disso, o peptídeo também não interage com todos os demais fatores angiogênicos testados *in vitro* (Figura 14). Isso mostra que selecionamos, a partir de uma biblioteca de *phage display*, um fago que expressa um peptídeo específico para Tie1.

Para avaliar se esta interação é mediada pelo peptídeo exógeno, realizamos um ensaio de ligação do fago CYRADRFLIC na presença do peptídeo sintético. Observamos que a interação do fago CYRADRFLIC ao receptor Tie1 é inibida pelo peptídeo cognato (Figura 15). Um peptídeo sintético não relacionado não teve efeito

na ligação do fago CYRADRFLIC ao receptor Tie1. Vale ainda ressaltar que essa competição ocorreu de maneira dose dependente, com um IC_{50} de ~10 µg/ml (concentração inibitória de 50%), o que sugere uma afinidade razoável entre o peptídeo e o receptor Tie1, na faixa de 8 µM.

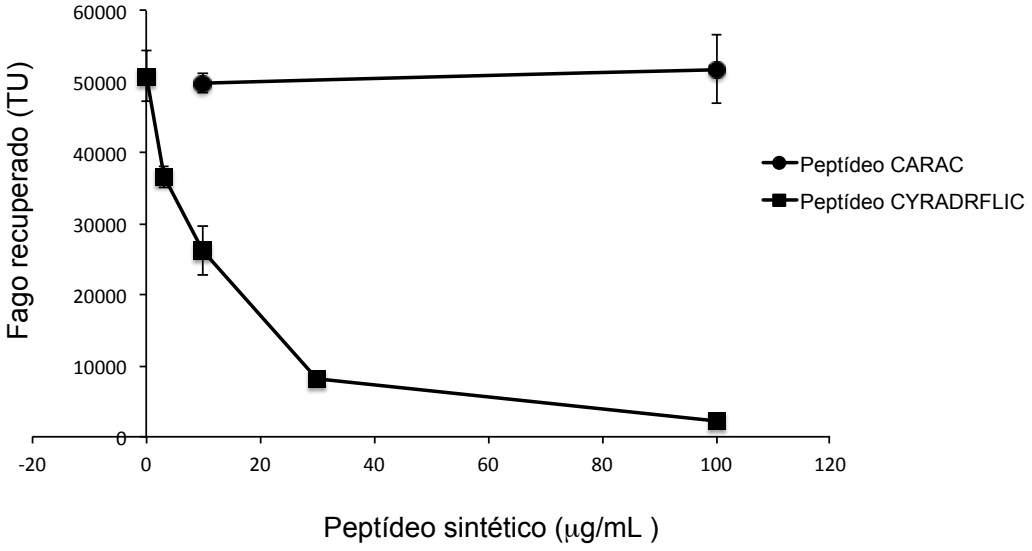

Figura 15. A ligação do fago CYRADRFLIC a Tie1 é inibida de maneira dose dependente pelo peptídeo sintético cognato. O fago CYRADRFLIC (10^7 TU) foi incubado com Tie1 imobilizado, na presença ou ausência do peptídeo sintético CYRADRFLIC ou do peptídeo controle CARAC. O mesmo foi realizado com o fago selvagem Fd-tet, utilizado como controle negativo. Barras representam desvio padrão do plaqueamento em triplicata.

4.4 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO PEPTÍDEO CYRADRFLIC

Para identificar os resíduos de aminoácidos essenciais para a interação entre o peptídeo CYRADRFLIC e Tie1, realizamos experimentos de alanina *scanning*. Este experimento consiste em substituir cada aminoácido da sequência do peptídeo por alanina, uma resíduo por vez, e testar a ligação ao receptor. Além de avaliar a importância de cada aminoácido individualmente, nós também questionamos se é importante que o peptídeo seja cíclico, ou seja, se as cisteínas que flanqueiam o

peptídeo são importantes na interação do fago CYRADRFLIC com Tie1. Para responder essa questão, as cisteínas foram substituídas por serinas. A serina foi utilizada devido a semelhança estrutural e química com a cisteína. Portanto, a partir da sequência peptídica do fago CYRADRFLIC, geramos diferentes fagos, cada um apresentando uma mutação num resíduo de aminoácido diferente, conforme listado na tabela da Figura 16.

A

Peptídeo original	Peptídeo mutado	Mutação
CYRADRFLIC	SYRADRFLIS	Cys1/10 ➔ Ser
	CARADRFLIC	Tyr2 ➔ Ala
	CYAADRFLIC	Arg3 ➔ Ala
	CYRGDRFLIC	Ala4 ➔ Gly
	CYRAARFLIC	Asp5 ➔ Ala
	CYRADAFLIC	Arg6 ➔ Ala
	CYRADRALIC	Phe7 ➔ Ala
	CYRADRFAIC	Leu8 ➔ Ala
	CYRADRFLAC	Ile9 ➔ Ala

B

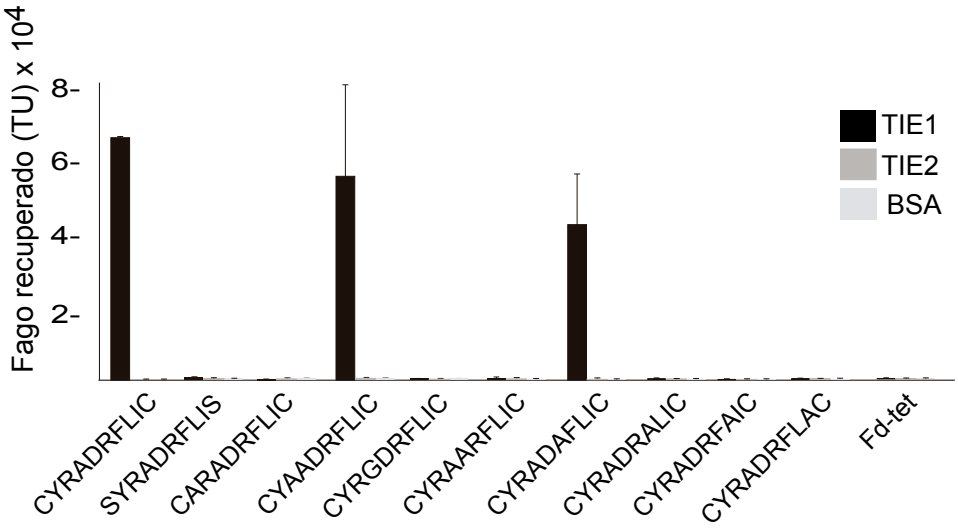

Figura 16. Identificação dos resíduos importantes para a interação do peptídeo CYRADRFLIC com Tie1. (A) Versões mutadas do fago apresentando o peptídeo CYRADRFLIC foram geradas através de mutação sítio dirigida na sequência de DNA que codifica para este peptídeo **(B)** O fago CYRADRFLIC, assim como os demais fagos contendo as mutações, foram incubados com Tie1, Tie2 ou BSA, imobilizados em placa. Após lavagem, os fagos ligados aos receptores foram quantificados por infecção bacteriana. O fago Fd-tet foi usado como controle negativo para o ligante, e Tie2 ou BSA foram usados como controles da proteína. O *input* de fagos foi de 10^8 per *well*. O gráfico mostra a média de três experimentos independentes. Barras representam desvio padrão de experimentos independentes feitos em triplicata.

Enquanto que a maioria dos aminoácidos do peptídeo CYRADRFLIC são essenciais para a interação com Tie1, a substituição das argininas por alaninas foram as únicas que não aboliram a ligação do fago ao receptor (Figura 16B). Além disso, nossos resultados sugerem que o peptídeo é realmente cíclico, uma vez que a interação também foi perdida quando as cisteínas foram substituídas por serinas. Estes dados se correlacionam bem com o fato de que as argininas presentes no peptídeo CYRADRFLIC não são conservadas no motivo [Ar]-X-A-[G/D]-X-[Y/F]-X-[V/I] compartilhado com os demais peptídeos selecionados, como mostrado anteriormente através do alinhamento em *Clustal Omega* (Figura 13B).

4.5 O FAGO CYRADRFLIC SE LIGA A CÉLULAS ENDOTELIAIS

Uma vez validada a interação do peptídeo CYRADRFLIC com o receptor Tie1 recombinante humano, o próximo passo foi avaliar a ligação em células endoteliais que expressam Tie1. Embora isolamos um peptídeo que se liga a Tie1 humano, Tie1 murino compartilha alta similaridade de sequência com o cognato humano (92% de identidade e 95% de similaridade). Por isso, utilizamos células endoteliais murinas de coração (*Heart Endothelial Cells* - HEC) e de pulmão (*Lung Endothelial Cells* - LEC), disponíveis no laboratório. Além disto, peptídeos isolados por *phage display* comumente ligam-se a sítios evolutivamente conservados nas proteínas. Conforme relatado na literatura, o receptor Tie1 maduro tem uma tamanho predito de 125 kDa, na forma de monônero em células endoteliais. De fato, confirmamos a expressão de Tie1 por *Western blot* nas células endoteliais de camundongo utilizadas neste ensaio (Figura 17).

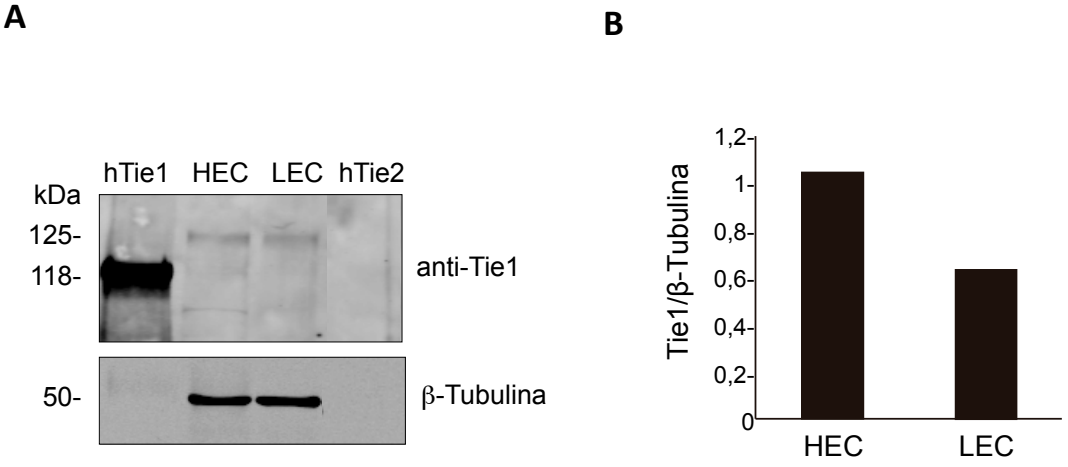

Figura 17. Células endoteliais murinas expressam Tie1. (A) Reatividade em *Western blot* de anticorpos anti-Tie1 (acima) ou anti- β-tubulina (abaixo) contra extrato total de células endoteliais murinas derivadas do coração (HEC) ou pulmão (LEC). Como controles, foram adicionas as proteínas recombinantes Tie1 e Tie2. **(B)** Quantificação de *pixels* da área positiva para Tie1 normalizada pela área positiva para β-Tubulina por Image J.

É importante notar que não houve reação cruzada com Tie2 recombinante, indicando que o anticorpo reconhece especificamente Tie1 nas células endoteliais e que HEC apresentou expressão ligeiramente maior de Tie1 comparado a LEC. Portanto, escolhemos analisar a ligação de CYRADRFLIC nessas células positivas para Tie1.

Para avaliar a ligação do fago CYRADRFLIC à células endoteliais, utilizamos o método BRASIL (*biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands*), pois é um método que permite a separação de fagos ligantes e não ligantes de uma maneira rápida e eficiente baseado em uma única centrifugação diferencial (GIORDANO et al., 2001).

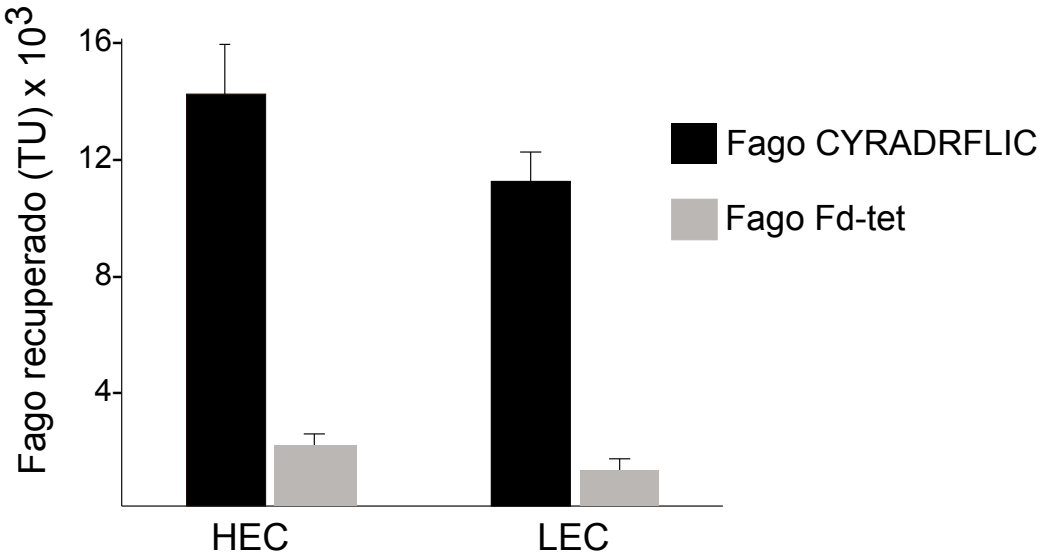

Figura 18. O Fago CYRADRFLIC liga-se a células endoteliais murinas. HEC ou LEC foram incubadas com o fago CYRADRFLIC e os fagos ligantes separados por BRASIL, recuperados por infecção e quantificados por contagem de colônia. Fd-tet foi usado como controle negativo. Barras representam desvio padrão de plaqueamento feitos em triplicata.

Consistentemente, mostramos com este ensaio que o fago CYRADRFLIC se liga às duas linhagens de células endoteliais de camundongo testadas (Figura 18). O fago CYRADRFLIC apresentou ligação ligeiramente maior em HEC, comparado a LEC. Este resultado pode estar relacionado à maior expressão do receptor Tie1 em HEC, conforme mostramos anteriormente (Figura 17B). Não observamos interação entre o fago controle Fd-tet e as células testadas. Estes resultados sugerem que a ligação é mediada pelo peptídeo CYRADRFLIC e que o mesmo liga-se a Tie1 recombinante e também a Tie1 nativo, expresso na superfície de células endoteliais.

4.6 O FAGO CYRADRFLIC É INTERNALIZADO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Vários receptores tirosina quinase são internalizados após a interação com o ligante na superfície da célula. De fato, isto parace ser um mecanismo importante para a atividade e sinalização destes receptores (MUKHERJEE et al., 2006; LEMMON e

SCHLESSINGER, 2010; GOH e SORKIN, 2013). Por isso, nos questionamos se o fago apresentando o peptídeo CYRADRFLIC seria internalizado por Tie1 expresso em células endoteliais. Células HUVEC imortalizadas (*human umbilical vein endothelial cells*) foram incubadas com o fago CYRADRFLIC, ou com o fago Fd-tet (controle negativo) durante 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas, fixadas e os fagos internalizados foram então visualizados por imunofluorescência utilizando anticorpo anti-bacteriófago. Para diferenciar fagos ligados à superfície das células, dos fagos internalizados, as células foram permeabilizadas ou não, antes da detecção com anticorpo anti-bacteriófago. Com a permeabilização, o anticorpo anti-bacteriófago consegue acessar o interior da célula e marcar os fagos internalizados apropriadamente. Nossos resultados mostram uma marcação mais forte de fagos nas células permeabilizadas comparado com as células não permeabilizadas, indicando que o fago é internalizado.

A internalização também foi confirmada por outra técnica. Após incubação com os fagos, as células foram tripsinizadas e lavadas extensivamente para remover qualquer fago ligado à superfície da célula endotelial. Para quantificar se os fagos foram internalizados, o DNA total foi extraído e quantificado por PCR em tempo real (Figura 19B) utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o DNA do bacteriófago (DIAS-NETO et al., 2009) e para o DNA que codifica para o RNA ribossômico em células eucarióticas. As quantificações de partículas de DNA de fago e de células eucarióticas mostram uma diferença significativa entre os fagos CYRADRFLIC e Fd-tet nos períodos de incubação de 5 minutos e 24 horas, reforçando os dados de imunofluorescência que indicam que o fago CYRADRFLIC é internalizado pelas células endoteliais e indicando que tal internalização já ocorre mesmo num curto intervalo de tempo.

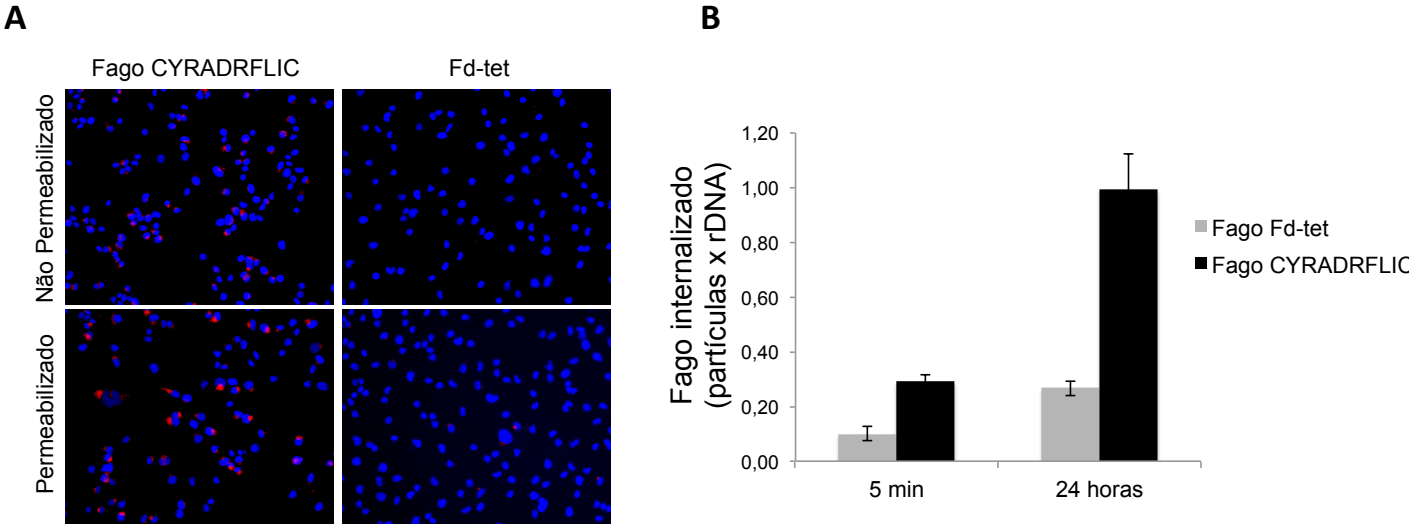

Figura 19. Fago CYRADRFLIC é internalizado por células endoteliais. Células HUVEC foram incubadas com os fagos CYRADRFLIC e Fd-tet (10^9 TUs) por 5 minutos ou 24 horas. (**A**) Os fagos internalizados foram detectados por anticorpo anti-bacteriófago nas condições de permeabilizado e não permeabilizado. Os fagos são visualizados em vermelho e o núcleo da célula em azul. (**B**) Os fagos internalizados foram também quantificados por PCR em tempo real. A quantificação de rDNA da célula eucariótica foi utilizada como fator normalizador. Barras representam desvio padrão de quantificação feita em triplicata.

4.7 O PEPTÍDEO CYRADRFLIC INIBE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Embora Tie1 não tenha um ligante natural identificado, sabemos que angiopoietinas induzem a formação de heterodímeros de Tie1 e Tie2 na membrana e estas interações são importantes para a resposta angiogênica (SAHARINEN et al., 2005; SEEGAR et al., 2010). Portanto, decidimos avaliar se o peptídeo CYRADRFLIC afeta a proliferação de células endoteliais estimuladas com angiopoietina. É descrito na literatura que Ang1 induz a proliferação de células endoteliais (KOBLIZEK et al., 1998), enquanto Ang2 não tem o mesmo efeito. Sabe-se também, que Ang1 promove a heterodimerização de Tie1 e Tie2 (SAHARINEN et al., 2005). Por isso, decidimos avaliar o efeito de CYRADRFLIC na proliferação celular induzida por Ang1 e Ang2.

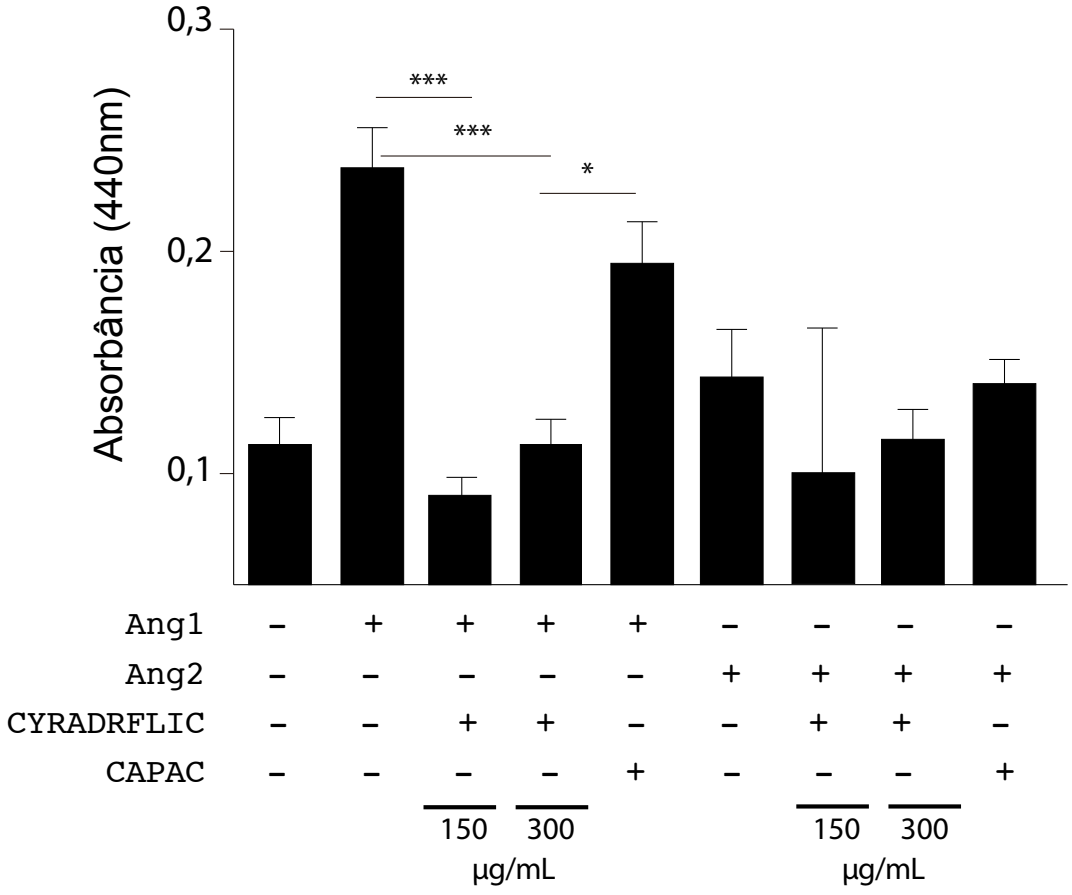

Figura 20. O peptído CYRADRFLIC inibe a proliferação de células endoteliais induzida por Angipoietina-1. HUVEC foram incubadas com o peptídeo CYRADRFLIC na concentração de 150 ou 300 µg/mL na presença ou ausência de Angiopoietinas 1 ou 2 recombinantes (250ng/mL) por 48 horas. O peptídeo CAPAC foi utilizado nas mesmas condições como controle. A proliferação celular foi determinada por absorbância óptica usando o reagente de detecção de proliferação WST-1. Barras representam desvio médio do erro da quantificação de dois experimentos independentes. Análises estatística ANOVA *Tukeys multiple comparison test* (*p<0,05; ***p<0,001).

Conforme esperado, células HUVEC proliferam na presença de Ang1 (Figura 20). Porém, quando as células são incubadas com Ang1 na presença de CYRADRFLIC, a proliferação é reduzida aos níveis basais nas duas concentrações de peptídeo utilizadas (Figura 20). Células HUVEC incubadas com Ang1 na presença do peptídeo controle (CAPAC) proliferam normalmente, confirmando o efeito específico do peptídeo CYRADRFLIC. Da mesma forma, Ang2 na presença ou ausência de CYRADRFLIC não altera a proliferação celular. Estes resultados indicam que o peptídeo CYRADRFLIC

afeta proliferação de células endotelias, modulando o efeito de Ang1 pelos receptores Tie.

4.8 EFEITO DO PEPTÍDEO CYRADRFLIC NA ANGIOGÊNESE *IN VIVO*

Os modelos de angiogênese *in vitro* são úteis para estudar aspectos específicos da neovascularização. Porém, eles não recapitulam todos os eventos associados a formação de vasos *in vivo*. Os vasos crescem dentro do tecido, interagindo com células do parênquima e do sistema hematopoiético. Sendo assim, modelos *in vivo* são essenciais para se avaliar de forma mais definitiva o efeito de um determinado composto na angiogênese. A retina é um excelente tecido para se estudar angiogênese. Por ser transparente, os vasos podem ser facilmente visualizados. Além disto, é um tecido de fácil acesso e manipulação. Por isso, empregamos neste trabalho o modelo da retinopatia induzida por oxigênio (OIR) (SMITH et al., 1994; PIERCE et al., 1995).

Neste modelo, camundongos recém-nascidos são colocados numa câmara e mantidos em condições de hiperóxia por 5 dias. Como mencionado anteriormente, os altos níveis de oxigênio inibem a produção de VEGF, fator necessário para o desenvolvimento normal da vasculatura da retina do camundongo. Ou seja, há uma redução na angiogênese fisiológica e até mesmo a obliteração dos vasos centrais já formados. Quando os animais saem da câmara, e retornam aos níveis atmosféricos de oxigênio, a produção de VEGF aumenta novamente, agora a níveis muitos mais altos que os fisiológicos, exacerbando a produção de vasos sanguíneos. Ou seja, induzindo uma angiogênese patológica e, consequentemente, a retinopatia (SMITH et al, 1994; PIERCE et al., 1995).

Para avaliar o efeito do peptídeo CYRADRFLIC na angiogênese, animais OIR foram tratados em P15 com uma única dose do peptídeo sintético (100 µg), administrado por injeção intraocular. Observamos uma redução discreta na área total de neovascularização na retina dos animais tratados com peptídeo CYRADRFLIC, que apresentaram neovascularização média de 16% menor (Figura 21A e B). Este efeito é observado quando quantificamos a vasculatura na retina através da seleção de áreas fluorescentes nas áreas de tufo, que são regiões altamente vascularizadas da retina. Entretanto, a diferença na vascularização dos animais tratados com o peptídeo CYRADRFLIC e os controles, não é observada por análises apenas qualitativas das imagens obidas (Figura 21A). Por outro lado, a inibição da angiogênese fica mais evidente quando avaliamos o número de bifurcações e brotamentos de novos vasos, uma marca característica da angiogênese. Ou seja, o peptídeo CYRADRFLIC inibiu significativamente as bifurcações dos vasos da retina de animais OIR, com redução média de 24% do número de bifurcações comparado aos demais grupos (Figura 21C e D). Não foi observado efeito significativo na neovascularização da retina dos animais OIR tratados apenas com veículo (DMSO) ou com o peptídeo controle (Figura 21A-D). Em conjunto, esses dados sugerem que o peptídeo CYRADRFLIC inibe a angiogênese patológica da retina num modelo animal importante que recapitula vários aspectos de doenças humanas importantes, como retinopatia diabética e da prematuridade. Sugerem ainda, que o domínio extracelular de Tie1 participa de forma ativa da neovascularização.

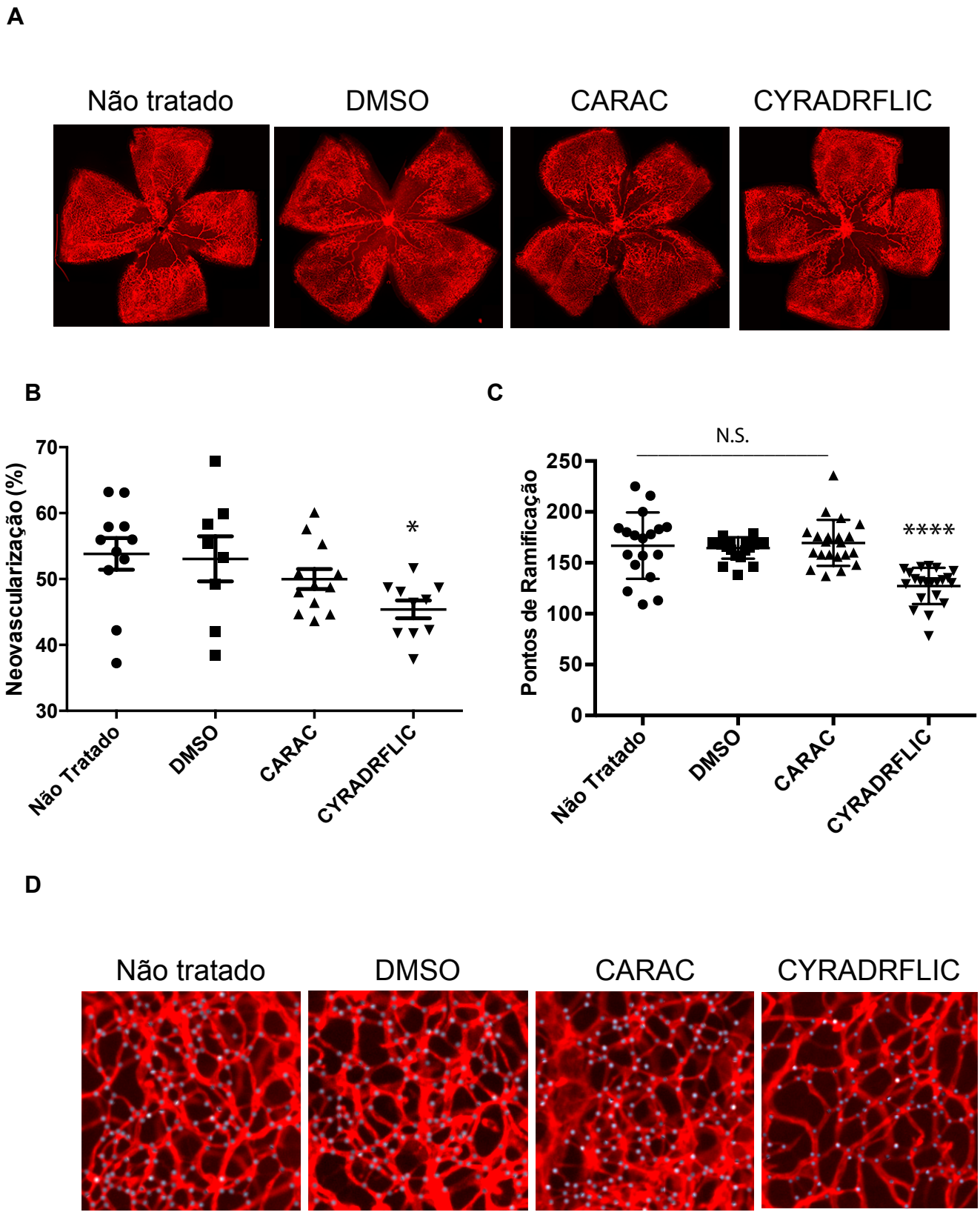

Figura 21. O peptídeo CYRADRFLIC reduz a angiogênese *in vivo*. Camundongos C57Bl/6 do modelo OIR em P15 foram tratados com uma única injeção intraocular (1 µl) de DMSO (Veículo), peptídeo controle CARAC (100 µg) ou com o peptídeo CYRADRFLIC (100 µg). As retinas foram coradas com isolectina-B4 conjugada a Alexa-594. (**A** e **D**) Imagens de imunofluorescência representativas das retinas de camundongos C57Bl/6 em P17. (**B**) Quantificação da neovascularização total ou (**C**) por contagem de pontos de ramificação dos vasos das retinas. (**D**) Pontos brancos indicam bifucarcações de vasos sanguíneos. Análises estatística ANOVA *Tukeys multiple comparison test* (*p<0,05; ***p<0,001).

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS LIGANTES NATURAIS DE TIE1

Uma das características importantes do *phage display* é a capacidade de identificar peptídeos funcionais, muitas vezes miméticos de ligantes naturais dos seus alvos. Por exemplo, peptídeos ligantes de VEGFR1 e NRP1 mimetizam o ligante natural destes receptores, o VEGFB (GIORDANO et al., 2001). Um outro peptídeo identificado por *phage display* e que se liga a vasos sanguíneos tumorais apresenta similaridade de sequência com a Interleucina-11 e interage com o seu receptor, o receptor IL-11α (ARAP et al., 2002). Esta similaridade pode se estender para estruturas também, pois mesmo peptídeos que não apresentam similaridade de sequência com seus alvos, ainda assim compartilham elementros estruturais. Por exemplo, anticorpos contra peptídeos ligantes da integina αv, apresentam reatividade cruzada com anexina-V, ligante natural desta integrina (CARDÓ-VILA et al., 2003).

Como o peptídeo CYRADRFLIC é um ligante específico de Tie1 e inibe a proliferação de células endoteliais e a angiogênese *in vivo*, questionamos se o peptídeo CYRADRFLIC mimetiza alguma proteína que interaja com Tie1, uma vez que ainda não foi identificado nenhum ligante para esse receptor. Inicialmente, realizamos pesquisas em bancos de dados, buscando proteínas com similaridade de sequência com o peptídeo CYRADRFLIC. Esta abordagem resultou numa lista de proteínas que apresentavam algum grau de similaridade com o peptídeo estudado. Entre tais proteínas mostramos que a Mucina4 possui 6 dos 8 aminoácidos presentes no peptídeo de estudo (Figura 22). Assim, baseado nesta similaridade de sequência, selecionamos uma proteína chamada de Mucina4 para avaliar a interação com o receptor Tie1. Entretanto, após diferentes abordagens

metodológicas, não fomos capazes de validar a interação entre essas duas proteínas.

mucin-4 isoform f precursor [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_001309397.1| **Length:** 7418 **Number of Matches:** 1

Range 1: 6535 to 6541 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
23.5 bits(48)	6.1	6/7(86%)	6/7(85%)	0/7(0%)

```
Query  1     YRADRFL  7
             YR DRFL
Sbjct  6535  YRPDRFL  6541
```

Figura 22. A proteína Mucina4 compartilha similaridades de sequência com o peptídeo CYRADRFLIC. Análises no banco de dados de proteínas humanas no NCBI (National Center for Biotechnology) mostra que o peptídeo YRADRFLI (*query*) apresenta aminoácidos idênticos a uma sequência da proteína Mucina4 (*sbjct*). Observe que as cisteínas que flanqueiam o peptídeo foram omitidas na pesquisa.

Partimos então para avaliar se miméticos estruturais do peptídeo CYRADRFLIC são possíveis ligantes de Tie1. Para isto, nossa primeira providência foi gerar anticorpos policlonais anti-CYRADRFLIC. A expectativa é que tais anticorpos, além de reconhecerem o peptídeo CYRADRFLIC, apresentem reação cruzada com proteínas miméticas do peptídeo CYRADRFLIC. Coelhos foram imunizados com o peptídeo CYRADRFLIC e a especificidade dos anticorpos anti-CYRADRFLIC produzidos foi confirmada por FLISA (*Fluorophore-Linked Immunosorbent Assay*). Este ensaio, cujo princípio é o mesmo que o ELISA, diferencia-se por apresentar detecção com fluoróforos infra-vermelhos, que tem como vantagens a alta sensibilidade e o baixo *background*. Nossos resultados indicam que anticorpos anti-CYRADRFLIC reconhecem especificamente o peptídeo CYRADRFLIC imobilizado em placas de poliestireno (Figua 23A). Não observamos reatividade quando IgG controle purificado de coelho ou o soro pré-imune foram utilizados no ensaio. A reatividade com o peptídeo CYRADRFLIC foi dose dependente na faixa de 0,4 a 10 µg/ml de IgG (Figura 23B).

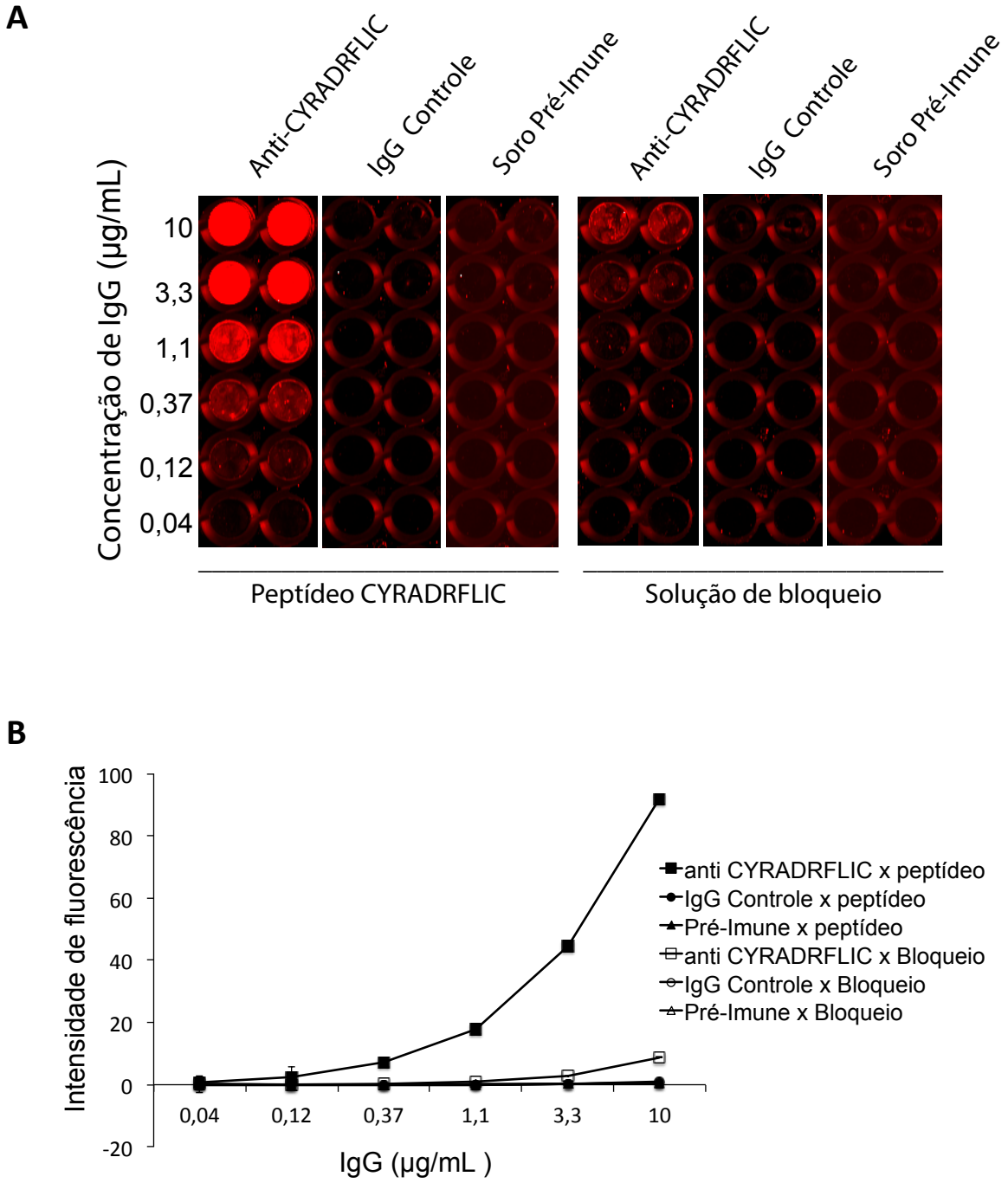

Figura 23. Anticorpos anti-CYRADRFLIC reconhece o peptídeo sintético. (**A**) Reatividade e dose dependência dos diferentes anticorpos testados contra o peptídeo CYRADRFLIC imobilizado em placa avaliado por FLISA. (**B**) Análise quantitativa dos resultados obtidos em A. IgG controle refere-se a IgG total de coelho purificado comercial. Barras representam desvio padrão de quantificação obtida em duplicata.

Uma vez obtido o soro anti-CYRADRFLIC, partimos então para a identificação de proteínas celulares reconhecidas pelo mesmo. Para isto, selecionamos um painel composto por diferentes linhagens celulares e analisamos o perfil de reatividade do nosso anti-soro. Foram selecionadas linhagens tumorais e não-tumorais de diferentes tecidos: A549 (pulmão), B16F10 (pele), Capan-1 (pâncreas), HCT-15 (cólon), HUVEC (endotélio venoso) e Panc-1 (pâncreas). Proteínas com pesos moleculares de 28, 58 e 80 kDa foram identificadas consistentemente, em quase todas as células analisadas (Figura 24A). Nenhuma proteína foi reconhecida pelo soro pré-imune, sugerindo a especifidade do nosso soro anti-CYRADRFLIC (Figura 24B). Porém, eletroforese 1D não é suficiente para resolver e separar as proteínas identificadas.

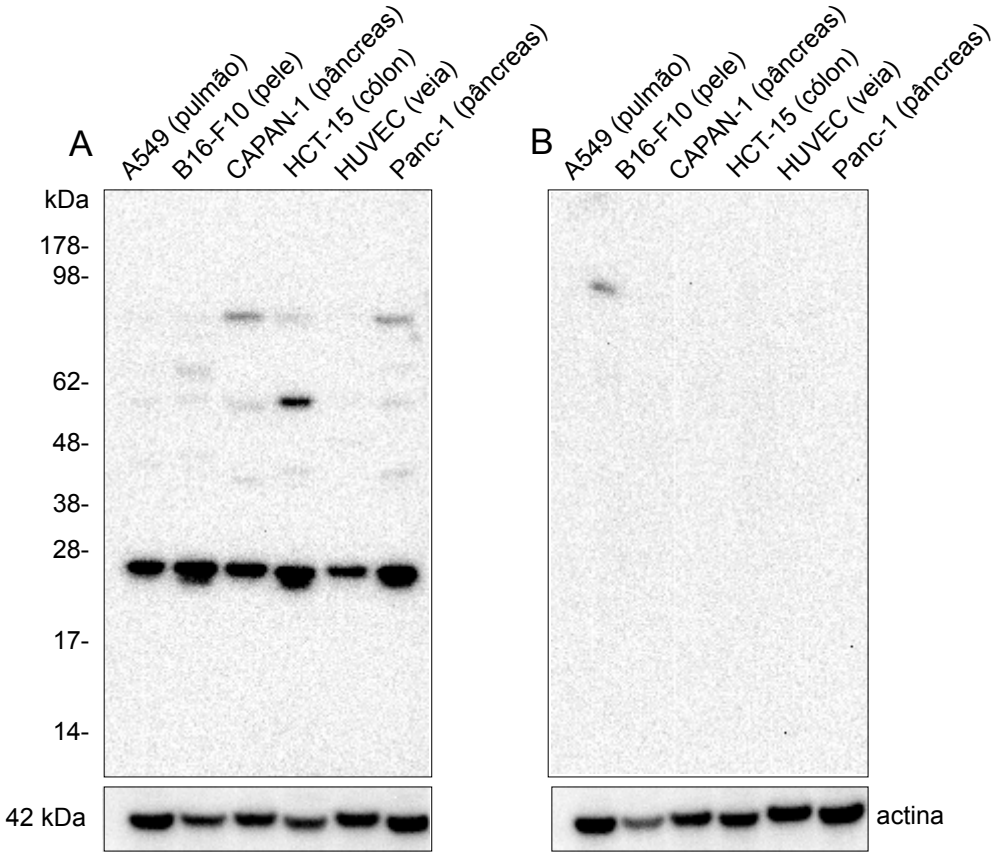

Figure 24. **Anticorpos anti-CYRADRFLIC reconhecem proteínas do extrato total de diferentes linhagens celulares**. Extrato protéico total de A549, B16F10, Capan-1, HCT-15, HUVEC (CE de célula endotelial) e Panc-1 foi analisado com o anticorpo policlonal anti CYRADRFLIC (**A**) ou com o soro de coelho não imunizado (**B**). Anticorpo anti-actina foi utilizado como controle.

Para isso, utilizamos eletroforese bidimensional combinada com *Western blot* e coloração por *Sypro Ruby*. Assim, como mostrado anteriomente (Figura 24), os anticorpos anti-CYRADRFLIC reconhecem proteínas distribuídas ao longo da membrana de nitrocelulose, dentro da faixa de peso molecular esperada (Figura 25).

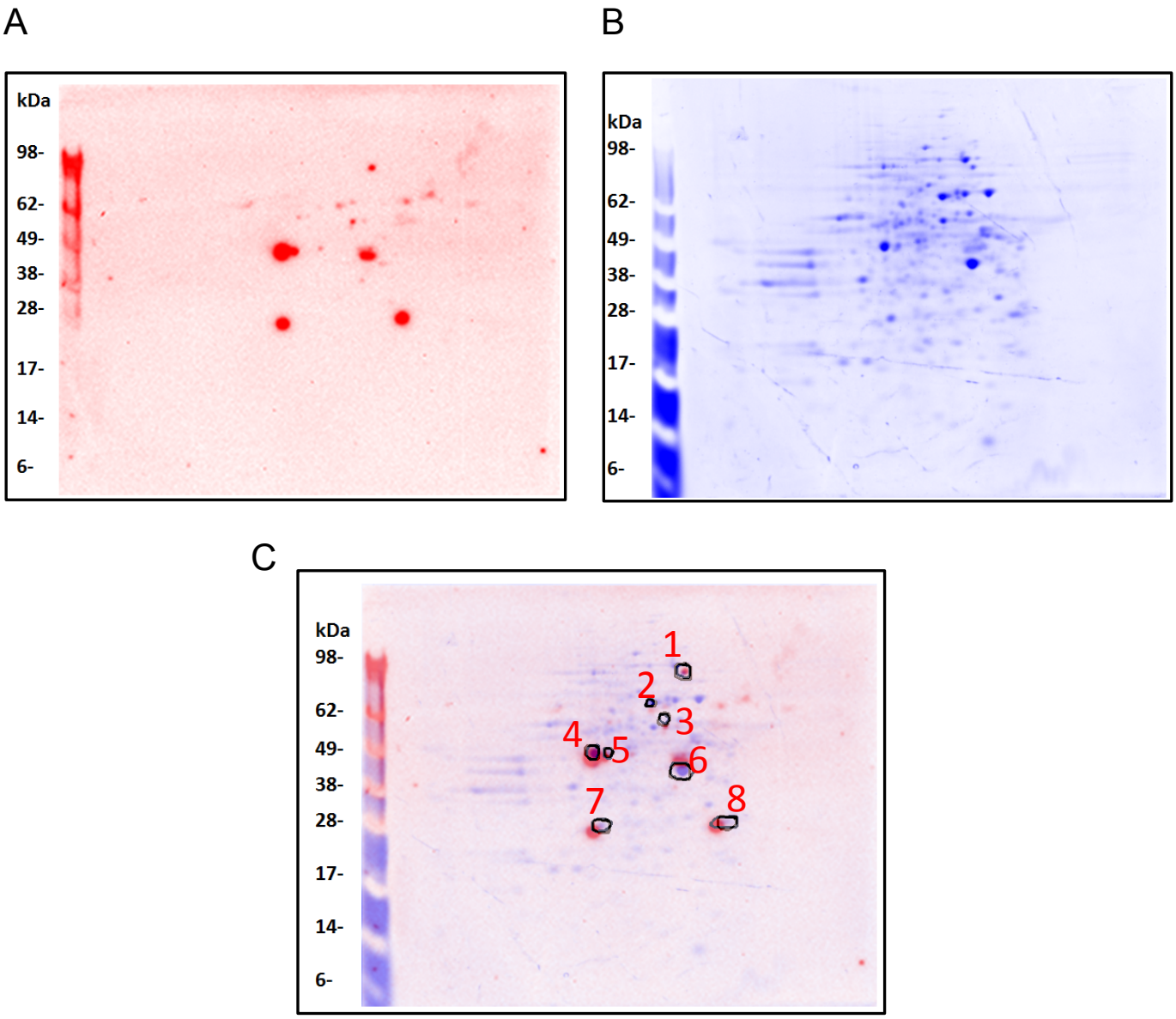

Figura 25. Análises de eletroforese bidimensional de extrato total de Panc-1. Proteínas de extrato total de Panc-1 foram separados por electroforese em gel 2D (primeira dimensão, 7 centímetros, pH 3-10L IPG Strips; segunda dimensão, 4-12% Bis-Tris gel) e visualizados por *Western Blot* **(A)** ou *Sypro Ruby* **(B)**. As imagens foram sobrepostas em Photoshop **(C)** para identificar as proteínas equivalentes em ambas as análises. Input de proteína: 20 μg.

Combinando coloração com Sypro Ruby e *Western blot*, utilizando o soro anti-CYRADRFLIC, e sobrepondo os géis, pudemos identificar os *spots* correspondentes a cada uma das proteínas reconhecidas pelo nosso anti-soro. Apenas proteínas que puderam ser detectadas pelas duas metodologias foram selecionadas para análise. Estas proteínas foram eluídas do gel e analisadas por espectroscopia de massa. As proteínas identificadas estão listadas na Tabela 1.

Com os resultados de espectroscopia de massa, observamos que as proteínas identificadas são em sua maioria proteínas intracelulares envolvidas em formação do retículo endoplasmático (*Transitional endoplasmic reticulum ATPase*), ancoramento de microtúbulos (*Cytoskeleton-associated protein*, *Actin*), enovelamento de proteínas (*T-complex protein 1 subunit epsilon*), tradução de proteínas mitocondriais (*Elogation factor Tu, mitochondrial*), glicólise (*Triosephospate isomerase* e α-Enolase) e sinalização de proteínas (*14-3-3 protein zeta/delta*). Além disso, também notamos que entre as análises realizadas, foram identificadas diferentes isoformas da proteína 14-3-3 presentes no *spot* 8. Os ensaios de validação de interação entre Tie1 e as proteínas que apresentaram epitopo cruzado com o peptídeo CYRADRFLIC, identificado no presente trabalho, ainda não foram realizados. Entretanto, os resultados obtidos por espectroscopia de massas devem ser cuidadosamente analisados com o intuito de selecionar entre as proteínas identificadas, os potenciais candidatos à interação com o receptor tirosina quinase Tie1.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Tie1 é um receptor importante para a manutenção da integridade vascular, participando da angiogênese fisiológica e patológica. Embora tenha sido identificado há cerca de 25 anos, a ausência de um ligante natural conhecido tem sido um empecilho importante para melhor compreender as bases moleculares deste receptor na neovascularização. Por isso, os estudos apresentados nesta tese, são um passo importante nesta direção e poderão contribuir para uma melhor compreensão da participação desta molécula, e em particular, a participação do domínio extracelular do mesmo, na formação de vasos sanguíneos.

Nossos estudos estão centrados na premissa de que peptídeos ligantes deste receptor podem ser utilizados como ferramentas para identificar ligantes naturais para Tie1. Para selecionar peptídeos ligantes da porção extracelular de Tie1, optamos pela tecnologia do *phage display*, por ser uma técnica versátil e que dominamos em nosso laboratório. A proteína recombinante contendo apenas o domínio extracelular de Tie1 é disponível comercialmente, e foi empregada neste estudo para facilitar o isolamento dos peptídeos. O risco desta estratégia é que peptídeos isolados *in vitro*, podem eventualmente, não se ligar ao alvo nas condições nativas de uma célula ou organismo. Porém, nossos resultados sugerem que o peptídeo isolado e estudado neste trabalho não apresentou este problema, pois mostrou-se ativo em ensaios *in vitro* e *in vivo*. De fato, identificamos e caracterizamos o peptídeo CYRADRFLIC como sendo um ligante específico do domínio extracelular de Tie1.

Um aspecto importante é a especificidade da ligação do peptídeo isolado. Por isso, nossos estudos demonstrando que o peptídeo CYRADRFLIC não se liga a Tie2 (o único membro restante desta pequena família de receptores tirosina quinase), e a nenhum outro receptor da família do VEGF (todos envolvidos em angiogênese), sugere que existem sítios de ligação únicos para Tie1. Mostramos também, que o peptídeo CYRADRFLIC, liga-se à células endoteliais, o que sugere que apesar do peptídeo ter sido obtido por *phage display in vitro*, ainda assim, ele reconhece Tie1 nativo, expresso na membrana de uma célula. Finalmente, confirmando estes dados, CYRADRFLIC é internalizado por células endoteliais, inibe proliferação induzida por Ang1 e modula o crescimento de vasos na retina em modelo animal. Em resumo, o peptídeo CYRADRFLIC é um ligante específico de Tie1 que pode ser utilizado em diversos contextos biológicos.

Com relação a estrutura e função do peptídeo isolado, observamos que nem todos os resíduos de aminoácidos são necessários para interação com Tie1. Mais especificamente, os dois aminoácidos básicos carregados positivamente (argininas), não participam da ligação ao receptor. Corroborando esta observação, dos 10 peptídeos selecionados durante o *biopanning* em Tie1, seis compartilham o motivo [Ar]-X-A-[G/D]-X-[Y/F]-X-[V/I] (onde Ar = aromático e X = qualquer amino ácido). Notem que as argininas realmente não fazem parte deste motivo compartilhado. Porém, para entedermos melhor a interação com Tie1, ainda precisamos investigar em qual domínio deste receptor o peptídeo CYRADRFLIC se liga. A porção extracelular de Tie1 contém três domínios do tipo Ig, três do tipo EGF, e três do tipo FNIII. Estudos em andamento no laboratório visam identificar em qual(ais) deste(s) domínio(s) o peptídeo

CYRADRFLIC se liga. Sabe-se que Ang1 liga-se ao segundo domínio Ig de Tie2 com a participação dos domínios do tipo EGF (MACDONALD et al., 2006). Como CYRADRFLIC inibe a proliferação de células endoteliais na presença de Ang1, talvez o peptídeo se ligue aos domínios equivalentes em Tie1. Outro aspecto com relação a estrutura e função é a afinidade de CYRADRFLIC por Tie1. Apesar de não termos determinado o Kd do peptídeo pelo receptor, nosso dados permitem estimar indiretamente a sua afinidade por Tie1. Por exemplo, o peptídeo apresenta um IC_{50} (concentração inibitória 50%) de aproximadamente 10 μM nos ensaios de competição com fago. Nos ensaios de angiogênese *in vitro*, observamos que o peptídeo CYRADRFLIC inibe a proliferação celular induzida por Ang1, nas concentração de aproximadamente 120 e 240 μM. Coletivamente, estes resultados sugerem que o peptídeo CYRADRFLIC interaja com Tie1 na faixa micromolar de afinidade.

Condizente com a capacidade de ligação ao receptor *in vitro* e a inibição da proliferação celular induzida por Ang1, o fago CYRADRFLIC é também internalizado em células endoteliais. De fato, a endocitose de receptores tirosina quinase é um processo importante de regulação da sinalização e atividade de receptores desta família. Por exemplo, a internalização de VEGFR2 após a ligação de VEGF é necessária para a ativação e sinalização do receptor em um mecanismo dependente de Efrina-B2, que tem como um dos efeitos, a formação de filopoidias em *tip cells* durante a angiogênese (MUKHERJEE et al., 2006; LEMMON e SCHLESSINGER, 2010; PITULESCU e ADAMS, 2010; SIMONS, 2014). Embora já foi demonstrado que Tie1 é fracamente internalizado após a clivagem do seu ectodomínio (MARRON et al., 2007), não existem dados sobre a internalização deste receptor mediada por um ligante. Por isso, nossos dados mostrando que o fago

CYRADRFLIC é internalizado por células endoteliais, possivelmente, medidada por Tie1, sugerem que este receptor tem capacidade de internalização. Se este fenômeno é importante para a atividade de Tie1 e para o processo de angiogênese, ainda merece mais atenção.

Trabalhos anteriores demostraram que Ang1 é capaz de promover a proliferação de células endoteliais e a fosforilação de Tie1 (SAHARINEN et al., 2005; YUAN et al., 2007; SAVANT et al., 2015). Porém, nunca foi mostrado a interação direta entre ambas as moléculas. Acredita-se que Tie1 liga-se ao complexo Tie2-Ang1, e module a atividade do mesmo. É intrigante, portanto, que nosso peptídeo seja capaz de inibir a proliferação de células endoteliais ativadas por Ang1. Uma possível explicação para estes resultados seria a de que o peptídeo CYRADRFLIC liga-se ao domínio de interação de Tie1 com Tie2, inibindo a formação do complexo Tie2-Ang1-Tie1. Sabe-se também, que Tie1 é um fator de sobrevivência endotelial que inibe a apoptose celular através da inibição das vias de caspases (KONTOS et al., 2002; D'AMICO et al., 2014 SAVANT et al., 2015). Porém, mais estudos são necessários para compreendermos os mecanismos moleculares da ação do peptídeo CYRADRFLIC.

Nossos resultados com o modelo de angiogênse *in vivo* demonstra que o peptídeo CYRADRFLIC é capaz de inibir a neovascularização da retina de camundongos, num modelo da retinopatia muito bem aceito para o estudo de várias doenças humanas. Este modelo recapitula vários aspectos da retinopatia da prematuridade e, até mesmo, da retinopatia diabética e da doença macular relacionada à idade. Estes resultados, que foram obtidos com uma única administração do peptídeo por via intraocular, sem

nenhuma otimização de dose ou farmacocinética, são, portanto, resultados bastante promissores, e reforçam a idéia de que o domínio extracelular de Tie1 tem um papel importante na angiogênese.

Receptores tirosina quinase estão envolvidos em processos celulares chaves, tais como proliferação, migração e sobrevivência celular (REF). E, em particular deste estudo, na formação de vasos, tornando-os alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos direcionados ao tratamento de doenças com um componente angiogênico. Pequenas moléculas inibidoras de receptores tirosina quinase utilizados na clínica atualmente são direcionadas ao sítio de atividade quinase encontrado na porção intracelular, comum a todos os receptores desta família. Por isso, este domínio é altamente conservado, e assim, este inibidores são muitas vezes pouco seletivos, inibindo a atividade de diferentes membros desta família de receptores (LEMMON e SCHESSINGER, 2010; DAVIS et al., 2011; NORMAM et al., 2012). Embora o efeito de amplo espectro de tais inibidores pode ser desejável em contextos específicos (terapia oncológica por exemplo, dada a natureza heterogênea de células cancerosas), o surgimento de efeitos colaterais indesejados ou o desenvolvimento de resistência aos medicamentos devido a mutações são possíveis consequências deste tipo de composto (NORMAM et al., 2012). Por exemplo, sunitinib é um inibidor dos receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), agindo no domínio quinase dos mesmos. Porém, ele também inibe os receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Desta forma, além de inibir a angiogênese, o sunitinib inibuz a perda de pericitos nos capilares do coração, resultando em cardiotoxicidade para os pacientes (CHINTALGATTU et al., 2013).

Por outro lado, a porção extracelular de receptores tirosina quinase é uma alternativa interessante para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos, pois é uma região menos conservada entre os membros dessa família de receptores (LEMMON e SCHESSINGER, 2010; GIORDANO et al., 2010); por exemplo, os receptores da família Tie compartilham 76% de identidade de aminoácidos na porção intracelular, enquanto que na porção extracelular apenas 30% dos aminoácidos são idênticos (PARTANEN et al., 1992; SATO et al., 1993). De fato, diversos anticorpos monoclonais direcionados contra o domínio extracelular de receptores tirosina quinase tem sido aprovados para utilização clínica, incluindo o tratamento de doenças angiogênicas (JAIN, 2014; FERRARA e ADAMIS, 2015). Características como a sua alta afinidade e especificidade de ligação ao alvo, bem como uma meia-vida longa tornam os anticorpos ferramentas interessantes para uso em terapias e diagnóstico das mais diversas doenças. Anticorpos são estáveis, possuem um peso molecular que previne a sua eliminação através da depuração renal e a sua porção Fc interage com vários receptores em diferentes tipos celulares, o que aumenta a sua biodisponibilidade na circulação sanguínea (CHAMES et al., 2009). Embora os anticorpos monoclonais sejam moléculas que apresentam características interessantes para o desenvolvimento de fármacos, quando os comparamos com peptídeos observamos uma série de limitações e desvantagens que incluem maior custo e tempo de produção e menor permeabilidade tecidual, além de que os anticorpos já em uso na clínica devem ser administrados aos pacientes em hospitais. Portanto, é importante identificar novas alternativas para o desenvolvimento de inibidores de tirosina quinase que combinem as vantagens de biodisponibilidade e permeabilidade celular de moléculas pequenas com a vantagem dos anticorpos monoclonais de especificidade de direcionamento para o domínio

extracelular de interação com ligantes de receptores tirosina quinase (GIORDANO et al., 2010; BONO et al., 2013; SIDMAN et al., 2015).

Peptídeos são compostos interessantes para o desenvolvimento de fármacos por apresentarem uma série de vantagens comparados à outras alternativas terapêuticas, como fácil obtenção por síntese química em laboratório, apresentam alta especificidade e baixa toxicidade. Por exemplo, enquanto anticorpos monoclonais necessitam de um tempo e esforços grandes para serem produzidos, peptídeos podem ser produzidos em larga escala num curto intervalo de tempo e com baixo custo (OTVOS e WADE, 2014). Juntamente com o aumento da taxa de sucesso em testes clínicos, os custos associados tornam o desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos particularmente atraentes (KASPAR e REICHERT, 2013; OTVOS e WADE, 2014). A alta especificidade dos peptídeos pelos seus alvos, fazem com que as terapias sejam mais seletivas através da inibição específica de um dado receptor. Em trabalhos anteriores mostramos que um pequeno peptídeo específico do domínio extracelular de ligação do ligante de VEGFR1 e de NRP1 (GIORDANO et al., 2001; GIORDANO et al., 2005) inibiu a neovascularização da retina (GIORDANO et al., 2010). Este peptídeo, que pode ser aplicado topicamente ao olho, combina a seletividade de um anticorpo monoclonal com as vantagens de uma pequena molécula, enfatizando o potencial para o direcionamento do domínio extracelular de receptores transmembrana envolvidos na angiogênese (GIORDANO et al., 2010; SIDMAN et al., 2015).

O peptídeo CYRADRFLIC é, até onde conhecemos, o primeiro ligante do domínio extracelular de Tie1 já descrito na literatura e que inibe a angiogênese. Há apenas um

relato na literatura (resumo em congresso), mencionando anticorpos monoclonais que sugerem Tie1 como alternativa para o tratamento anti-angiogênico de tumores. Porém, como trata-se de um resumo em congresso, não tivemos acesso aos dados deste trabalho (LAAKONEN et al., 2008). Em resumo, o peptídeo CYRADRFLIC poderá servir como modelo para o desenvolvimento racional de novos inibodores da angiogênese direcionadas contra o Tie1.

Um dos objetivos desta tese é a identificação de possíveis ligantes para Tie1, receptor considerado órfão até o presente momento. Utilizando a metodologia do phage display, identificamos um peptídeo ligante do domínio extracelular deste receptor que, como mencionado, liga-se especificamente e exclusivamente a esta molécula. O peptídeo CYRADRFLIC mapeia um sítio único presente em Tie1 mas não em Tie2, que é, portanto, um alvo interessante para iniciarmos esta busca por um ligante natural desta molécula. As análises por bioinformática mostram que este peptídeo apresenta similaridade com várias proteínas presentes em bancos de dados. Uma delas, a Mucina-4, foi considerada a melhor candidata para estudos. Esta glicoproteína é expressa na membrana de células endoteliais e epiteliais. O peptídeo CYRADRFLIC apresenta similaridade com uma sequência presente no domínio de nidogênio (NIDO domain). Porém, todos os ensaios que realizamos para validar a possível interação entre Tie1 e Mucina-4 falharam (dados não apresentados nesta tese). Por isso, focamos nossos estudos num possível mimetopo estrutural compartilhado entre o peptídeo CYRADRFLIC e proteínas endógenas de células mamíferas. De fato, observamos reação cruzada entre anticorpos anti-CYRADRFLIC e várias proteínas presentes em extratos de diferentes linhagens celulares. Utilizando técnicas de

proteômica fomos capazes de identificar várias destas proteínas, conforme apresentado na seção de resultados. Utilizando como critério a presença da proteína na superfície celular e envolvimento em angiogênese, acreditamos que entre as proteínas identificadas por proteômica, a α-Enolase (Eno-1) e a 14-3-3 são as proteínas candidatas mais interessantes para serem estudadas com mais atenção como potenciais ligantes de Tie1. A α-Enolase 1 é particularmente interessante, pois é uma enzima da via glicolítica importante no metabolismo anaeróbico sob condições de hipóxia, mas que também é encontrada no meio extracelular e que pode atuar como receptor de plasminogênio na superfície celular (MILES et al., 1991; DIAZ-RAMO et al., 2012). A 14-3-3 também é uma candidata interessante, pois pertence a uma família de moléculas que são expressas em todas as células eucarióticas e possui capacidade de ligação a diversas proteínas de sinalização (quinases, fosfatases). Assim como a Eno-1, sua presença no meio extracelular ligada a receptores de membrana já foi descrita (AGHAZADEH e PAPADOPOULOS, 2016). Infelizmente, por razões técnicas e pela já conhecida dificuldade de obtenção de reagentes num prazo de tempo razoável, não pudemos avançar significativamente na validação destas moléculas como ligantes de Tie1. Estes estudos estão em andamento e esperamos num futuro breve poder responder a esta questão.

Em resumo, no presente trabalho, demostramos que o domínio extracelular de Tie1 é importante em angiogênese e que essa atividade pode ser modulada pelo peptídeo CYRADRFLIC, identificado aqui através da metodologia de *phage display*. Este peptídeo poderá servir de modelo para o desenvolvimento de novas terapias anti-angiogênicas para as diversas doenças com um componente vascular importante.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Utilizando a tecnologia do *phage display*, identificamos e caracterizamos o peptídeo CYRADRFLIC como um ligante específico e seletivo do domínio extracelular do receptor do tipo tirosina quinase Tie1.

- Mesmo tendo sido obtido por phage display *in vitro*, o peptídeo CYRADRFLIC liga-se a células endoteliais e inibe sua proliferação induzida por fator angiogênico relacionado a Tie1, sugerindo sua interação com esta proteína em condições nativas.

- O peptídeo CYRADRFLIC é internalizado por céluals endoteliais, sugerindo que o receptor Tie1 também seja internalizado. Este processo pode ser importante para sua função e atividade na angiogênese.

- Estudos de estrutura e função indicam que o peptídeo CYRADRFLIC precisa ser cíclico para interagir com Tie1. As duas argininas, porém, são dispensáveis para esta interação.

- Estudos com modelos de proliferação celular e de angiogênese *in vivo*, indicam que o peptídeo CYRADRFLIC inibe a formação de vasos sanguíneos.

- O anticorpo policlonal anti-CYRADRFLIC, gerado no presente trabalho, reconheceu algumas proteínas no extrato no extrato total de diferentes linhagens celulares que foram posteriomente identificadas por espectroscopia de massas.

Tais proteínas poderão ser futuramente avaliadas quanto a capacidade de interação com Tie1.

- Em resumo, o peptídeo CYRADRFLIC pode ser utilizado em diferentes aplicações para melhor entender aspectos bioquímicos do receptor Tie1, e pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-angiogênicos, com importantes implicações para várias doenças humanas.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Abdel-Malak, N.A.; Srikant, C.B.; Kristof, A.S.; Magder, S.A.; Di Battista, J.A.; Hussain, S.N.A. (2008) Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1–dependent autocrine production of interleukin-8. Blood, 111(8): 4145-54

Aghazadeh, Y.; Papadopoulos, V. (2016) The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. Drug Discov Today. Feb;21(2):278-87.

Alon, T.; Hemo, I.;Itin, A.;Pe'er, J.; Stone, J.;Keshet, E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. Nat. Med. 1, 1024-1028.

Arap, W.; Kolonin, M.G.; Trepel, M.; Lahdenranta, J.; Cardó-Vila, M. Giordano, R.J.; Mintz, P.J.; Ardelt, P.U.; Yao, V.J.; Vidal, C.I.; Chen, L.; Flamm, A.; Valtanen, H.; Weavind, L.M.; Hicks, M. E.; Pollock, R.E.; Botz, G.H.; Bucana, C.D.; Koivunen, E.; Cahill, D.; Troncoso, P.; Baggerly, K. A.; Pentz, R.D.; Do, K. A.; Logothetis, C.J.; Pasqualini, R. (2002) Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat. Med*., **8**:21-127.

Augustin, H.G.; Koh, G.Y.; Thurston, G.; Alitalo, K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.10(3):165-77.

Batard, P.; Sansilvestri, P.; Scheinecker, C.; Knapp, W.; Debili, N.; Vainchenker, W.; Bühring, H.J.; Monier, M.N.; Kukk, E. Partanen, J.; Matikainen, M.T.; Alitalo, R. Hatzfeld, J. Alitalo K. (1996) The Tie receptor tyrosine kinase is expressed by human hematopoietic progenitor cells and by a subset of megakaryocytic cells. Blood. 87(6):2212-20.

Bono, F.; De Smet, F.; Herbert, C.; De Bock, K.; Georgiadou, M.; Fons, P.; Tjwa, M.; Alcouffe, C.; Ny, A.; Bianciotto, M.; Jonckx, B.; Murakami, M.; Lanahan, A.A.; Michielsen, C.; Sibrac, D.; Dol-Gleizes, F.; Mazzone, M.; Zacchigna, S.; Herault,J.P.; Fischer,C.; Rigon, P.; Ruiz de Almodovar, C.; Claes, F.; Blanc, I.; Poesen, K.; Zhang, J.; I. Segura, G. Gueguen, M.F. Bordes, D. Lambrechts, R. Broussy, M. van de Wouwer, C. Michaux, T. Shimada, I. Jean, S. Blacher, A. Noel, P. Motte, E. Rom, J.M. Rakic, S. Katsuma, P. Schaeffer, A. Yayon, A. Van Schepdael, H. Schwalbe, F.L. Gervasio, G. Carmeliet, J. Rozensky, M. Dewerchin, M. Simons, A. Christopoulos, J.M. Herbert, P. (2013) Carmeliet, Inhibition of tumor angiogenesis and growth by a small-molecule multi-FGF receptor blocker with allosteric properties. Cancer Cell 23:477-88.

Brindle, N.P.; Saharinen, P.; Alitalo, K. (2006) Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. Circ Res. 98(8):1014-23.

Cance WG, Craven RJ, Weiner TM, Liu ET. (1993) Novel protein kinases expressed in human breast cancer. Int J Cancer.54(4):571-7.

Connor, K.M.; Krah, N.M.; Dennison, R.J.; Aderman, C.M.; Chen, J.; Guerin, K.I.; Sapieha, P.; Stahl, A.; Willett, K.L.; Smith, L.E. (2009) Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis Nat Protoc. 4(11):1565-73

Cardó-Vila, M.;, Arap, W.; Pasqualini, R. (2003) Alpha v beta 5 integrin-dependent programmed cell death triggered by a peptide mimic of annexin V. Mol Cell. 11(5):1151-62.

Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. **9**:653-60.

Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**: 932-936.

Carmeliet, P.; Jain, R.K. (2011) Molecular mechanisms and clinicalapplications of angiogenesis.*Nature Review* **473**:298-307

Chames, P.; Regenmortel, M.V.; Weiss, E.; Baty, D. (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future Br J Pharmacol. 157(2): 220–233.

Chen, J.; Smith, L. E. H. (2007) Retinopathy of prematurity.*Angiogenesis*, **10**:133-140.

Chintalgattu, V.; Rees, M.L.; Culver, J.C.; Goel, A.; Jiffar, T.; Zhang, J.; Dunner, K.; Pati, S.; Bankson, J.A.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Bryan, N.S.; Taegtmeyer, H.; Langley, R.R.; Yao, H.; Kupferman, M.E.; Entman, M.L.; Dickinson, M.E.; Khakoo, A.Y. (2013) Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. Sci Transl Med. 2013 May 29;5(187):187

Chung, A. S.; Ferrara, N. (2011) Developmental and Pathological Angiogenesis.*Annu Rev Cell Dev Biol.* **27**:563-84.

Cho, C.H.; Kammerer, R.A.; Lee, H.J.; Steinmetz, M.O.; Ryu, Y.S.; Lee, S.H.; Yasunaga, K.; Kim, K.T.; Kim, I.; Choi, H.H.; Kim, W.; Kim, S.H.; Park, S.K.; Lee, G.M.; Koh, G.Y. (2004) COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(15):5547-52.

Daly, C.; Wong, V.; Burova, E.; Wei, Y.; Zabski, S.; Griffiths, J.; Lai, K.M.; Lin, H.C.; Ioffe, E.; Yancopoulos, G.D.; Rudge, J.S. (2004) Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). Genes Dev.18(9):1060-71.

Daly, C.; Pasnikowski, E.; Burova, E.; Wong, V.; Aldrich, T.H.; Griffiths, J.; Ioffe, E.; Daly, T.J.; Fandl, J.P.; Papadopoulos, N.; McDonald, D.M.; Thurston, G.; Yancopoulos, G.D.; Rudge, J.S. (2006). Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. Proc. NatlAcad. Sci. USA 103, 15491–15496

D'Amico, G.; Korhonen, E.A.; Anisimov, A.; Zarkada, G.; Holopainen, T.; Hägerling, R.; Kiefer, F.; Eklund, L.; Sormunen,R.; Elamaa, H.; Brekken, R.A.; Adams, R.H.; Koh, G,Y.; Saharinen, P.; Alitalo, K. (2014) Tie1 deletion inhibits tumor growth and Improves angiopoietin antagonist therapy. The Journal of Clinical Investigation Volume 124 Number 2.

Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan,T. E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. C. et al. (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.

Davis, M.I.; Hunt, J.P.; Herrgard, S.; Ciceri, P.; Wodicka, L.M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D.K.; Zarrinkar, P.P. (2011). Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat. Biotechnol. 29:1046-51

Dias-Neto, E.; Nunes, D.N.; Giordano, R.J.; Sun, J.; Botz, G.H.; Yang, K.; Setubal, J.C.; Pasqualini, R.; Arap, W. (2009) Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis. PLoS One. 4(12)

Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Alemany R. (2012) α-Enolase, amultifunctional protein: its role onpathophysiological situations. J Biomed Biotechnol. 2012:156795

Dorrell, M. I.; Friedlander, M. (2006) Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25:277–295.

Dumont, D.J.; Yamaguchi, T.P.; Conlon, R.A.; Rossant, J.; Breitman, M.L. (1992).*Tek*, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressedin endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7, 1471-1480.

Ellis, L. M.; Hicklin, D. J. (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* **8**:579-91

Ferrara, N.; Adamis, A.P. (2015) Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. Nat. Rev. Drug Discov. in press.

Fiedler, U.; Augustin, H.G. (2006) Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. Trends Immunol. 27(12):552-8.

Fischer, C.; Mazzone, M.; Jonckx, B.; Carmeliet, P. (2008) FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* **12**:942-56.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. New England of Journal Medicine, v.285, 1971.

Folkman, J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 273-286.

Fosgerau, K.; Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. Drug Discovery Today, (20): 122-128

Fruttiger, M. (2007) Development of the retinal vasculature. Angiogenesis 10, 77-88.

Gariano, R. F. (2010) Special features of human retinal angiogenesis.*Nature Eye*,**24**: 401–407.

Giordano, R. .J.; Cardo-Vila, M.; Lahdenranta, J.; Pasqualini, R.; Arap, W. (2001) Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands.*Nat. Med*., **7**: 1249-1253.

Giordano RJ, Anobom CD, Cardó-Vila M, Kalil J, Valente AP, Pasqualini R, Almeida FC, Arap W. (2005) Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. Chem Biol. 12: 1075-83.

Giordano R.J., Cardó-Vila, M., Salameh, A., Anobom, C.D., Zeitlin, B.D., Hawke, D.H., Valente, A.P., Almeida, F.C., Nör, J.E., Sidman, R.L., Pasqualini, R. and Arap, W. (2010) From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. ProcNatlAcadSci U S A. 107, 5112-7.

Goh, LK.; Sorkin, A.; (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 5(5):a017459

Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, Jääskeläinen J, Paetau A, Haltia M, Alitalo K. (1995) Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. Am J Pathol. 146(2):368-78.

Jain, R.K. (2014) Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. Cancer Cell. 26(5):605-22.

Kaipainen A, Vlaykova T, Hatva E, Böhling T, Jekunen A, Pyrhönen S, Alitalo K. (1994) Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase mesenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas. Cancer Res.54(24):6571-7.

Kaspar AA, Reichert JM. (2013) Future directions for peptide therapeutics development. Drug Discov Today. 18(17-18):807-17.

Kim, J.; Kim, J.H; Moon, S.O.; Kwak, H.J.; Kim, N.G.; Koh, G.Y. (2000) Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Oncogene, vol. 19, 39: 4549-4552.

Kim, K.L.; Shin, I.S.; Kim, J.M.; Choi, J.H.; Byun, J.; Jeon, E.S.; Suh, W.; Kim, D.K. (2006) Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells. Cardiovasc Res. 72(3):394-402.

Koblizek, T.I., C. Weiss, G.D. Yancopoulos, U. Deutsch, and W. Risau. (1998) Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. Curr. Biol. 8:529–532.

Kontos, C.D.; Cha, E.H.; York, J.D.; Peters, K.G. (2002) The endothelial receptor tyrosine kinase Tie1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to inhibit apoptosis. Mol Cell Biol. 22(6):1704-13.

Korhonen, J.; Partanen, J.; Armstrong, E.; Vaahtokari, A.; Elenius, K.; Jalkanen, M.; Alitalo, K. (1992) Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. Blood. 80(10):2548-55.

Laakkonen, P.; Dransfield, D.; Saharinen, P.; Kubo, H.; Koh, G.Y.; Jain, R.; Wood, C.; Alitalo, A. (2008) Antibody targeting of endothelial Tie1 receptor as an anti-angiogenic sensitizer in tumor therapy. AACR Annual Meeting-- Apr 12-16, San Diego, CA

Langley RR, Ramirez KM, Tsan RZ, Van Arsdall M, Nilsson MB, Fidler IJ. (2003) Tissue-specific microvascular endothelial cell lines from H-2K(b)-tsA58 mice for studies of angiogenesis and metastasis. Cancer Res.63(11):2971-6.

Latham, P.W. (1999) Therapeutic peptides revisited Nature Biotechnology, (17): 755-757

Lemmon, M.A.; Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 141: 1117–1134.

Lin WC, Li AF, Chi CW, Chung WW, Huang CL, Lui WY, Kung HJ, Wu CW. (1999) Tie-1 protein tyrosine kinase: a novel independent prognostic marker for gastric cancer. Clin Cancer Res. (7):1745-51.

Macdonald, P.R.; Progias, P.; Ciani, B.; Patel, S.; Mayer, U.; Steinmetz, M.O.; Kammerer, R.A.; (2006) Structure of the extracellular domain of Tie receptor tyrosine kinases and localization of the angiopoietin-binding epitope. J Biol Chem. 281(38):28408-14. Epub 2006 Jul 18

Maisonpierre, P.C.; Suri, C.; Jones, P.F.; Bartunkova, S.; Wiegand, S. J.; Radziejewski, C.; Compton, D.; McClain, J.; Aldrich, T.H.; Papadopoulos, N. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivoangiogenesis. *Science* 277, 55-60.

Magalhães, L.S., Teixeira, A.R.A., Carneiro, J.L.V., Nunes, D.N., Dias-Neto, E., Giordano, R.J. Phage display: aspectos básicos e perspectivas atuais . Biotecnologia Aplicada à Saúde - Vol. 3 Bluncher S/A (ed.). 2015.

Marron, M.B.; Singh, H.; Tahir, T.A.; Kavumkal, J.; Kim, H.Z.; Koh, G.Y.;, Brindle, N.P.(2007)Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor-tyrosine kinase Tie2.J BiolChem. 19;282(42):30509-17.

McCarthy, M.J.; Burrows, R.; Bell, S.C.; Christie, G.; Bell, P.R.; Brindle, N.P. (1999) Potential roles of metalloprotease mediated ectodomain cleavage in signaling by the endothelial receptor tyrosine kinase Tie-1. Lab Invest. 79(7):889-95.

Medinger, M.; Mross, C. (2010) Clinical trials with anti-angiogenic agents in hematological malignancies. *Journal of Angiogenesis Research* **2**:10

Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of α-enolase as a candidate plasminogen receptor.Biochemistry. 30:1682–1691.

Mukherjee, S.; Tessema, M.; Wandinger-Ness, A. (2006) Vesicular Trafficking of Tyrosine Kinase Receptors and Associated Proteins in the Regulation of Signaling and Vascular Function. Circ Res. 98(6):743-56.

Nishimura, M.; Miki, T.; Yashima, R.; Yokoi, N.; Yano, H.; Sato, Y.; Seino, S. (1999) Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. FEBS Letters. 448: 254-256

Norman, R.A.; Toader, D.; Ferguson, A.D. (2012) Structural approaches to obtain kinase selectivity. Trends Pharmacol. Sci .33:273-8

Okamoto, N., Tobe, T., Hackett, S.F., Ozaki, H., Vinores, M.A., LaRochelle, W., Zack, D.J..Campochiaro, P.A. (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 151 : 281-291.

Otvos, L.; Wade, J.D. (2014) Current challenges in peptide-based drug discovery. Front Chem. 2: 62.

Papapetropoulos, A.; Fulton, D.; Mahboubi, K.; Kalb, R.G.; O'Connor, D.S.; Li, F.; Altieri, D.C.; Sessa, W.C. (2000) Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. J Biol Chem.;275(13):9102-5.

Partanen, J.; Armstrong, E.; Makela,T.P.; Korhonen, M.S,; Renkonen, R.;Knuutica, S.; Alitalo, K.(1992). A Novel Endothelial Cell Surface Receptor Tyrosine Kinase with Extracellular Epidermal Growth Factor Homology Domains. Mol Cell Biol., 12(4):1698-707.

Pierce, E.A.; Avery, R. L.; Foley, E. D.; Aiello, L. P.; Smith, L. E. (1995) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:905-909.

Pitulescu, M.E.; Adams, R.H. (2010) Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. Genes Dev. 24(22):2480-92

Puri, M. C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., & Partanen, J. (1995). The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. The EMBO Journal, 14(23), 5884–5891.

Rees, K.A.; Singh, H.; Brindle, N.P. (2007) The receptor tyrosine kinase Tie1 is expressed and activated in epithelial tumour cell lines. Int J Oncol. 31(4):893-7.

Saharinen, P.; Eklund, L.; Pulkki, K.; Bono, P.; Alitalo, K. (2011) VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. Trends in Mol. Med. 17 (7): 347-362

Saharinen, P.; Kerkelä, K.; Ekman, N.; Marron, M.; Brindle, N.; Lee, G.M.; Augustin, H.; Koh, G.Y.; Alitalo K. (2005) Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. J Cell Biol. 169(2):239-43.

Sato, T.N.; Qin, Y.; Kozak, C.A.; Audus, K.L. (1993) Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. PNAS 90(20): 9355–9358.

Sato, T.N.; Tozawa, Y.; Deutsch, U.; Wolburg-Buchholz, K.; Fujiwara, Y.; Gendron-Maguire, M.; Gridley, T.; Wolburg, H.; Risau, W.; Qin, Y.(1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.Nature. 6;376(6535):70-4.

Savant, S.; La Porta, S.; Budnik, A.; Busch, K.; Hu, J.; Tisch, N.; Korn, C.; Valls, A.F.; Benest, A.V.; Terhardt, D.; Qu, X.; Adams, R.H.; Baldwin, H.S.; Ruiz de Almodóvar, C. Rodewald, H.R.; Augustin, H.G. (2015) The Orphan Receptor Tie1 Controls Angiogenesis and Vascular Remodeling by Differentially Regulating Tie2 in Tip and Stalk Cells. Cell Rep. 12(11):1761-73.

Scott, J. K.; Smith,G. P.(1990) Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science* 249

Seegar, T.C.; Eller, B.; Tzvetkova-Robev, D.; Kolev, M.V.; Henderson, S.C.; Nikolov, D.B.; Barton, W.A. (2010) Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands. Mol Cell. 37(5):643-55.

Sidman, R.L.; Li, J.; Lawrence, M.; Hu, W.; Musso, G.F.; Giordano, R.J.; Cardó-Vila, M.; Pasqualini, R.; Arap, W. (2015) The peptidomimetic Vasotide targets two retinal VEGF receptors and reduces pathological angiogenesis in murine and nonhuman primate models of retinal disease. Sci. Transl. Med. 7:309ra165

Simons, M. (2012) An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling. Physiology (Bethesda). 27(4):213-22.

Smith, G. P.; Scott, J. K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage. *Methods Enzimol*.,**217**:228-57.

Smith, L. E.; Wesolowski, E.; McLellan, A.; Kostyk, S. K.; D'Amato, R.; Sullivan, R.; D'Amore, P. A. (1994) Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,***35**:101-111.

Smothers, J. F.; Henikoff, S.; Carter, P. (2002) Affinity Selection from Biological Libraries.*Science,* **298**:621-622.

Suri, C.; Jones, P.F.; Patan, S.; Bartunkova, S.; Maisonpierre, P.C.; Davis, S.; Sato, T.N.; Yancopoulos, G.D. (1996) Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. Cell, 87(7): 1171-1180

Teichert-Kuliszewsk, K.; Maisonpierre, P.C.; Jones, N.; Campbell, A.I.; Master, Z.; Bendeck, M.P.; Alitalo, K.; Dumont, D.J.; Yancopoulos, G.D.; Stewart, D.J. (2001)

Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. Cardiovasc Res. 16;49(3):659-70

Veronese, F.M.; Pasut, G. (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. Drug Discov Today, 10(21):1451-8.

Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today, (15): ½

Yabkowitz, R.; Meyer, S.; Yanagihara, D.; Brankow, D.; Staley, T.; Elliott, G.; Hu, S.; Ratzkin, B. (1997) Regulation of tie receptor expression on human endothelial cells by protein kinase C-mediated release of soluble tie. Blood. 90(2):706-15

Yang, X.H.; Hand, R.A.; Livasy, C.A.; Cance, W.G.; Craven, R.J. (2003) Overexpression of the receptor tyrosine kinase Tie-1 intracellular domain in breast cancer. Tumour Biol. 24(2):61-9.

Yuan, H.T,; Venkatesha, S.; Chan, B.; Deutsch, U.; Mammoto, T.; Sukhatme, V.P.; Woolf, A.S.; Karumanchi, S.A. (2007) Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. FASEB J. 21, 3171–3183.

Whittaker, S.; Marais, R.; Zhu A. X. (2010) The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Nature Oncogene,* 1-17.

Zhong, H.; Bowen, J. P. (2006) Antiangiogenesis Drug Design: Multiple Pathways Targeting Tumor Vasculature. *Current Medicinal Chemistry*, **13**:849-862.

ANEXO

8. ANEXO

ANEXO I – SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Leila da Silva Magalhães
Data de nascimento: 18 de março de 1984
Naturalidade: Nanuque, Minhas Gerais

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2010-2016 Doutorado em Ciências (Bioquímica)
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese.
Orientador: Dr. Ricardo José Giordano
Bolsita da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

2014/2015: Estágio de Pesquisa no Exterior
University of New Mexico, UNM, Novo México, Estados Unidos
Bolsista FAPESP

2003-2008: Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Bahia, Brasil

PRÊMIOS

2008: Honorable mention award. 54th Brazilian Congress of Genetics.

PUBLICAÇÕES

- **ARTIGOS**

-Michaloski, J.S., Redondo, A.R., Magalhães, L.S., Cambui, C.C., Giordano, R.J. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domain of the VEGF receptors (Under review - Science Advances). 2016.

-Magalhães, L.S., Michaloski, J.S., Giordano, R.J. Peptide targeting Tie1 extracellular domain inhibits angiogenesis. *Manuscrito em preparação*.

- **CAPÍTULO DE LIVRO**

- Magalhães, L.S., Teixeira, A.R.A., Carneiro, J.L.V., Nunes, D.N., Dias-Neto, E., Giordano, R.J. Phage display: aspectos básicos e perspectivas atuais . Biotecnologia Aplicada à Saúde - Vol. 3 Bluncher S/A (ed.). 2015.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. Magalhães, L.S., Michaloski, J.S., Staquicini, D.I.,Staquicini, F.I., Dobroff, A.S., Cardó-Vila, M.,Arap, W.,Pasqualini, R.,Giordano, R.J. Assessing the importance of Tie1 extracellular domain in angiogenesis. In: Annual Meeting of American Society for Cell Biology. San Diego, 2015.

2. Magalhães, L.S., Michaloski, J.S., Staquicini, D.I.,Staquicini, F.I.,Dobroff, A.S., Cardó-Vila, M., Arap, W., Pasqualini, R., Giordano, R.J. Identification of a Tie1 Ligand Peptide, an Orphan Receptor Important In Angiogeneis. In: 23 rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq. Foz do Iguaçu, 2015.

3. Magalhães, L.S., Nery, A.A., Ulrich. A.H., Giordano, R.J. Selection of VEGFR-1 Aptamers. In: XLII Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu, 2013.

4. Gomes, C.H.R., Magalhães, L.S., Giordano, R.J. Development of an Antibodies Phage Display System for Studying Angiogenesis. In: XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu, 2012.

5. Magalhães, L.S., Michaloski, J.S., Giordano, R.J. Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms: Cloning and Expression in Eukaryotic and Procaryotic Platforms. In: XL

Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu, 2011.

6. Magalhães, L.S., Neves, T.A., Coswosk, E.D. Population Level of Knowledge of Helvetia/BA about Sickle Cell Anaemia and Prevalence of hemoglobin S in individuals between 7 and 14 Years: A Correlation. In: 54th Brazilian Congress of Genetics. Salvador, 2008.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. VIII Curso de Inversno – Tópicos avançados em Bioquímica e Biologia Molecular. 2013. Universidade de São Paulo.

2. VII Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular . 2012. Universidde de São Paulo.

3. I Encontro interinstitucional sobre o Meio Ambiente: Propostas e perspectivas para o Sul da Bahia. 2006. Universidade do Estado da Bahia.

MONITORIA EM DISCIPLINAS DE GRADUAÇÃO

1. Biologia Molecular. 2013. Supervisão: Profa. Dra. Carla Columbano. Instituto de Química/USP, São Paulo.

2. Bioquímica Metabólica. 2013 Supervisão: Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher Instituto de Química/USP, São Paulo.

3. Bioquímica Experimental. 2011. Supervisão: Prof. Dr. Ricardo José Giordano. Course: Experimental Biochemistry. Supervision: PhD Ricardo José Giordano. Instituto de Química/USP, São Paulo.

ANEXO II – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

Tabela 1. Identificação de proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-CYRADRFLIC. As proteínas dos *spots* isolados à partir da eletroforese bidimensional foram identificadas por spectrometria de massas. Aqui estão listadas as quatro proteínas de maiores *score* para cada *spot*.

Spot ID	Proteína	Uniprot #	*Score*	No. de peptídeos identificados	Teórico	
					MW (Da)	pI
1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	1152	33	89266	5,14
	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	481	12	65999	8,15
	Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	323	9	58792	5,13
	Ras GTPase-activating-like protein	P46940	317	10	189136	6,08
2	Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065	474	15	65983	5,63
	Switch-associated protein 70	Q9UH65	436	15	68954	5,66
	Serum albumin	P02768	408	12	69321	5,92
	Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	293	6	58792	5,13
3	T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	1136	31	59633	5,44
	T-complex protein 1 subunit theta	P50990	481	11	59583	5,41
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	204	4	61016	5,7
	Copine-1 OS	Q99829	131	3	59022	5,52
4	Alpha-enolase	P06733	1201	37	47139	7,01
	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	P52209	267	5	53106	6,8
	Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	247	5	62027	5,14
	Gamma-enolase	P09104	212	5	47239	4,91

5	Elongation factor Tu, mitochondrial	P49411	670	22	49510	7,26
	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	654	20	46630	6,53
	Alpha-enolase	P06733	630	27	47139	7,01
	Multifunctional protein ADE2	P22234	76	3	47049	6,94
6	Actin, cytoplasmic 1	P60709	1211	48	41710	5,29
	Actin, cytoplasmic 2	P63261	1211	48	41766	5,31
	Nuclear migration protein nudC	Q9Y266	279	7	38219	5,27
	Cathepsin D	P07339	213	7	44524	6,1
7	Triosephosphate isomerase	P60174	1105	23	30772	5,65
	Phosphoglycerate mutase 1	P18669	412	10	28786	6,67
	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	Q9WTV5	109	2	24667	6,4
	Proteasome subunit alpha type-6	P60900	84	2	27382	6,34
8	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	606	18	27728	4,73
	14-3-3 protein gamma	P61981	591	16	28285	4,8
	14-3-3 protein theta	P27348	534	14	27747	4,68
	14-3-3 protein eta	Q04917	503	16	28201	4,76