GEORGIA SABIO PORTO MUNDIN

**Identificação de marcadores moleculares para células
T reguladoras humanas com perfil CD4⁺CD25⁺ por
*phage display***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título Doutor em Ciências

Área de Concentração: Alergia e
Imunopatologia

Orientadora: Dra. Verônica Porto Carreiro
de Vasconcellos Coelho

São Paulo

2007

Tese preparada no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, durante o curso de Pós Graduação em Alergia e Imunopatologia e apresentada à Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção de título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra Verônica Coelho

A chave de todo ser humano é seu pensamento. Resistente e desafiante aos olhares, tem oculto um estandarte que obedece, que é a idéia ante a qual todos os seus fatos são interpretados. O ser humano pode, somente, ser reformado mostrando-lhe uma idéia nova que supere a antiga e traga comandos próprios.

Ralph Waldo Emerson

A História de uma Tese

Como escreveu Fernando Pessoa, “ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos”, nem de expressá-los.

Foi a 4 anos que comecei algo... algo que agora apresento a vocês. Nesses 4 anos senti que brinquei com minha imaginação, meu conhecimento, minha capacidade... arrisquei-me em uma nova cidade, um novo trabalho, a novos amigos. Não sei se o que sinto hoje é diferente de antes... Continuo assombrada pelo medo do novo, mas gostei... e muito! Gostei até de aprender que a pesquisa é difícil, mas surpreendente, e, principalmente, que o esforço vale a pena! Sim, hoje eu sei!

Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências, de toda ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em esperança, cuja base é a busca de saberes.

Considero que a elaboração de uma tese de doutorado seja um produto coletivo, embora sua redação, responsabilidade e *stress* seja, predominantemente, individual e talvez esta tese seja o resultado mais visível desse processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma, dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Bem sei que corro o risco de não dar conta desse ‘muitíssimo obrigado’ como é merecido, porque será difícil exprimir a beleza que foi esse movimento de energias e impulsos que foram chegando a mim. Por tudo

isso se destaca também, para além da mera formalidade, um sentido: o da formação de uma verdadeira rede de solidariedade e de muito, MUITO afeto.

À minha orientadora, Dra. Verônica Coelho (ou simplesmente Vê), por compartilhar comigo o seu tema de pesquisa e o bolo de rolo, sendo uma interlocutora disposta a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiram durante o processo de reflexão. Por ser uma interlocutora paciente e generosa e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntas. Pela sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos. À Verônica meus irrestritos agradecimentos.

Ao Professor Doutor Jorge Kalil, patrimônio das Ciências brasileira, que contribuiu de forma intensa na minha formação e de outras dezenas de cientistas neste país. Pelo seu exemplo profissional, que indica o que deve ser um cientista num país como o Brasil. Pela sua produção científica e pelo seu exemplo de vida, meu eterno agradecimento.

À Professora Doutora Anna Carla Goldberg pela amizade criada nestes anos e pelas suas reflexões criativas sobre o nosso objeto de estudo, as quais muito nos ajudaram a compreendê-lo e a realizar uma análise crítica sobre o mesmo. Sempre dispostas a me ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Ao Edécio e à Luiza, que foram importantes colaboradores neste projeto.

A todos os meus verdadeiros amigos, por tornarem a vida mais suave, mais prazerosa, mais fácil de ser vivida. Obrigado por fazerem parte do meu projeto de vida, sem vocês tudo seria mais difícil. A todo o pessoal do laboratório... não vou me arriscar listar um a um, mas agradeço a todos pela amizade.

À Sandra Maria, Sandra Emiko, Malú e Selma pela amizade sincera e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Pela risada solta e descontraída nos momentos mais importantes desta tese.

À Cristina, Ernesto, Mônica e Idânia pelo exemplo e amizade criadas ao longo desta trajetória, meu muitíssimo obrigado.

Aos amigos do grupo de transplante: Adalberto, Gabriel, Lin, Maísa, Pedro, Débora, Evelyn, Fernanda, Francine e Aninha.

Ao amigos Simone Corrêa, Kellen, Rajen, Simone Fonseca, Bia Stolf e Angelina, pelo apoio constante e amizade.

À Susan, obrigada por ser a pessoa que você é. Tua amizade e carinho foram descobertas para mim, muito obrigada pela amizade e carinho.

Em especial, a minha amiga Carol Luque. Em verdade, tive sorte, de tê-la, por perto, estes tempos. Fico aqui pensando... de repente me pego sorrindo relembrando de uma passagem (“fricks” de certo)... meu pensamento continua viajando... meus olhos ficam marejados... outra lembrança, outra emoção... Pela amiga que é, e como é, tentando sempre rasurar minhas pontinhas de desânimo ou de tristeza com um sorriso solto ou uma piada despreziosa... meu carinho e meu muitíssimo obrigado!

Aos administradores e secretárias: Jair Martins, Neuzeti Santos, Andréia Verdille e Tânia Mota. Todos me deram muito suporte em toda a minha caminhada durante o doutorado. Agradeço a amizade e convívio.

Gostaria de agradecer à minha mãe por ser a pessoa mais importante da minha vida, que sempre cuidou de mim. Sou consciente de todo seu esforço e dedicação, eu te amo muito. Agradeço a meu pai por ser de fato o meu pai em todos os sentidos que a palavra carrega. Admiro-o muito e o repito em diversos momentos, te amo. Agradeço minha irmã por ter me agüentado todos estes 20 e poucos anos (!?!). Também te amo muito.

À minha avó “Dona Celica” que sempre fala – com seu ‘saber da sabedoria’ – que “a roda do tempo não volta para trás”, ensinando-me a coragem de prosseguir, fazendo o melhor possível.

Aos tios, tias e primos que compõem minha família. Saibam que todos são importantes para mim.

À Patrícia, minha querida analista que também contribuiu para este trabalho me deixando em condições psíquicas para enfrentar os desafios da vida e desta tese, meus sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a todos que aceitaram participar deste estudo, pessoas fundamentais para a realização dessa pesquisa. Obrigado.

À Fapesp pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Sumário	iii
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	12
Resumo.....	13
Summary	15
1 Introdução	17
2 Objetivos.....	42
3 Material e Métodos.....	43
3.1 Estratégia Experimental.....	43
3.2 Desenho Experimental.....	45
3.3 Sujeitos de Pesquisa	46
3.4 Separação de Células.....	46
3.5 Phage display	49
3.6 PCR dos fagos selecionados	56
3.7 Seqüenciamento	57
3.8 Preparo do gel de seqüenciamento	58
3.9 Identificação do DNA inserido na pIII dos fagos e tradução para peptídeo.....	59
3.10 Análise da similaridade molecular entre os peptídeos do fago e proteínas depositadas no banco de dados	60
3.11 Preparação em larga escala dos fagos.....	61
3.12 Ensaio de Validação Molecular	62
4 Resultados.....	67
4.1 Separação de Timócitos e Fragmento do Timo	67

4.2	Seleção de fagos ligantes.....	69
4.3	Análise das seqüências e identificação dos peptídeos.....	75
4.4	Perfil molecular comparativo dos peptídeos selecionados frente ao tecido tímico, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+	78
4.5	Análise da similaridade molecular entre os peptídeos e proteínas depositadas no banco de dados.....	79
4.6	Alinhamento específico entre o fago e o possível ligante identificado	82
4.7	Ensaio para Validação Molecular.....	84
4.8	Ensaio de ligação do fago selecionado utilizando as possíveis proteínas ligantes.	88
4.9	Ensaio de Validação Funcional.....	97
5	Discussão	99
6	Conclusões.....	121
7	Referências Bibliográficas.....	122
	Anexo I.....	133
	Anexo II.....	134
	Anexo III.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Partícula de fago mostrando as proteínas do capsídeo pIII e pVIII onde os peptídeos exógenos podem ser inseridos.....	39
Figura 2 : Representação esquemática da técnica BRASIL.	51
Figura 3: Etapas técnicas para a seleção de fagos ligantes por BRASIL	52
Figura 4 Representação esquemática das etapas técnicas para a seleção de fagos ligantes de tecido	56
Figura 5 Localização do inserto no gene da pIII do fago e tradução para peptídeo.....	60
Figura 6 Imunofenotipagem das células que foram separadas por FACS <i>Sorting</i>	69
Figura 7 Avaliação do enriquecimento dos fagos obtidos no <i>biopanning</i> frente ao fragmento do tecido tímico..	71
Figura 8: Avaliação do enriquecimento dos fagos obtidos no <i>biopanning</i> frente aos timócitos totais.	73
Figura 9: Avaliação do enriquecimento dos fagos obtidos no <i>biopanning</i> com timócitos CD4+CD25+	75
Figura 10: Seqüência de aminoácidos e alinhamento dos peptídeos obtidos na seleção de fagos ligantes de tecido, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+ sem as cisteínas flanqueadoras	77
Figura 11: Alinhamento da seqüência total do receptor de Vitamina D.....	83
Figura 12: Modelo estrutural do Receptor de Vitamina D associado ao ligante (Vitamina D ₃).	84
Figura 13: Ensaio de ligação dos fagos selecionados para validação frente ao tecido tímico.....	86
Figura 14: Ensaio de ligação dos fagos selecionados para validação a timócitos.....	87
Figura 15: Ensaio de ligação do fago R2A selecionado para validação da ligação frente a timócitos CD4+CD25+.....	88

Figura 16: Ensaio de ligação do fagos M2C e R2A selecionados para validação à Vitamina D imobilizada em placa e revelado por infecção bacteriana	90
Figura 17: Ensaio de ligação dos fagos M2C e R2A selecionados para validação com a Vitamina D ₃ imobilizada em membrana de nitrocelulose por <i>Dot Blot</i>	91
Figura 18: Ensaio de ligação dos fagos selecionados (M2C e R2A) para validação com a Vitamina D imobilizada em placa por ELISA.....	93
Figura 19: Índice de ligação do fago M2C e R2A e à Vitamina D.	94
Figura 20: Índice de ligação do fago R2A ao Receptor de Vitamina D.	95
Figura 21: Índice de ligação do fago T1A e R3D.....	96
Figura 22: Imunofenotipagem por FACS.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subtipos de células reguladoras	23
Tabela 2: Número de células e porcentagem de pureza das células obtidas em cada ciclo de separação por FACS Sorting.	68
Tabela 3 : Número de fagos obtidos em cada ciclo de seleção para fagos ligantes de tecido tímico.	70
Tabela 4 Número de fagos obtidos em cada ciclo de seleção para fagos ligantes de timócitos totais.....	72
Tabela 5 Número de fagos obtidos em cada ciclo de seleção para fagos ligantes de timócitos CD4+CD25+.	74
Tabela 6: Alinhamento dos peptídeos obtidos na seleção de fagos ligantes de tecido, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+ e correspondência com proteínas similares depositadas no banco de dados.	81

RESUMO

Porto, G. Identificação de marcadores moleculares para células T reguladoras humanas com perfil CD4⁺CD25⁺, por *phage display* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 103p

Há dados na literatura indicando que as células que saem do timo com o fenótipo CD4⁺CD25⁺ são desenvolvidas continuamente como uma linhagem independente e possuem um papel importante no processo de regulação da resposta imune. Essas células são chamadas células T reguladoras naturais. Várias questões sobre estas células permanecem em aberto, como por exemplo, como elas são geradas, o que é determinante na sua atividade reguladora e que marcadores específicos podem ser usados para identificá-las? Dentro deste contexto, o nosso objetivo neste trabalho foi identificar no timo e em timócitos CD4⁺/CD25⁺ humanos, novas moléculas potencialmente importantes no desenvolvimento e/ou na atividade supressora das células T reguladoras naturais. Para este objetivo, utilizamos a abordagem de *phage display*, com uma biblioteca de fagos de peptídeos, e timos humanos obtidos de pacientes portadores de cardiopatias congênitas, submetidos a cirurgias cardíacas realizadas no InCor. A busca dessas moléculas foi feita, separadamente, em 3 tipos de material biológico: timócitos totais, fragmento do tecido tímico e timócitos CD4⁺/CD25⁺. Antes da incubação da biblioteca de fagos com os timócitos totais e timócitos CD4⁺/CD25⁺ (separação em FACS), foi realizada uma etapa de *pre-clearing*, incubando-se a biblioteca de fagos com um *pool* de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ou timócitos CD4⁺/CD25⁻, respectivamente. Os fagos não ligantes, recuperados desta etapa, foram então incubados com as células de interesse. Para o tecido tímico não foi feita etapa de *pre-clearing*. Os fagos obtidos com os diferentes materiais biológicos foram recuperados em cultura de bactérias e usados em ciclos

posteriores de seleção. Após três ciclos de seleção, os fagos foram seqüenciados e identificados quanto à expressão de peptídeos ligantes para timócitos totais, timo e timócitos CD4+/CD25+, e analisados em bancos de dados no BLAST. Os fagos selecionados para validação – um ligante de tecido tímico: M2C e um ligante de timócitos CD4+/CD25+: R2A – fazem similaridade a duas proteínas associadas ao metabolismo da Vitamina D₃, molécula envolvida em imunorregulação e indução de tolerância, em diversos modelos experimentais. Porém, não há dados na literatura a respeito do seu papel em células T reg naturais. Na validação molecular desses fagos, apesar de certa variabilidade entre os diferentes ensaios, verificamos, por ELISA, que os fagos se ligam preferencialmente a 1,25 diidroxivitamina D₃, forma ativa da Vitamina D₃. Entretanto, nos ensaios de validação funcional, a influência da vitamina D na diferenciação dessas células não foi confirmada de forma consistente, uma vez que só tivemos aumento no número de células CD4+/CD25+, em cultura com Vitamina D, em poucos experimentos. As moléculas identificadas no presente estudo podem ter implicações relevantes no processo de diferenciação e na atividade de células T CD4+CD25+ reguladoras e serão mais investigadas na continuidade deste trabalho.

Descritores: Linfócitos T reguladores, imunorregulação, timo, biblioteca de peptídeos, marcadores biológicos, receptores de calcitriol, Vitamina D₃.

SUMMARY

Porto, G. Peptide phage display for the identification of novel molecular markers on human thymic regulatory CD4+CD25+ T cells [thesis]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 103p

There are consistent data in literature indicating that thymic CD4+CD25+ cells play an important role in immune regulation and are continuously developed as an independent lineage in the thymus. These cells are known as natural regulatory T cells. Several questions about these cells remain unanswered, such as how they are generated, what is determinant in their regulatory function and which specific molecular markers can be used to identify them. Taking this into consideration, our aim was to identify new potentially important molecules in the development and/or suppressive function of natural regulatory T cells, both in the thymus and in CD4+CD25+ thymocytes. For this, the phage display technique was employed, with a peptide phage library and thymic specimens obtained from children who underwent corrective cardiac surgery at the Heart Institute (InCor), in São Paulo. The search for these molecules was separately performed in 3 types of biological material: thymic tissue, thymocytes and CD4+CD25+ thymic cells. In the first stage, the phage peptide-library was incubated with a pool of PBMC (peripheral blood mononuclear cells). After the incubation, phages bound to PBMC were discarded (*pre-clearing*). In the second stage, unbound phages were incubated with either total thymocytes or CD4+CD25+ thymic cells. The *pre-clearing* stage was not performed in the thymic tissue. The phages obtained with after incubation with the different biological materials were recovered in *E. coli* culture and used in additional cycles of selection. After three rounds of selection, the recovered phages from the total thymocytes, from thymic tissue and thymocytes CD4+CD25+ were sequenced and their ligands identified. Among the phages selected for validation – one ligand of thymic tissue: M2C and one ligand of CD4+CD25+ thymocytes: R2A – present similarity to two proteins associated to the

metabolism of Vitamin D₃, a molecule involved in immunoregulation and tolerance induction in several experimental models. However, there are no data in the literature concerning the possible role of this molecule in natural regulatory T cells. In the molecular validation of these phages, although some variability between the different assays we have verified by ELISA, that the phages present preferential binding to the 1,25 dihydroxyvitamin D₃, the active form of Vitamin D₃. However, in the functional validation assays, the influence of the Vitamin D₃ in the differentiation of these cells could not be consistently confirmed since we could observe an increase in the number of CD4⁺CD25⁺ cells cultured with vitamin D in only a few experiments. The ligand-receptor molecules we have defined in this study may have relevant implications in the development of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the thymus.

Descriptors: Regulatory T lymphocytes, immunoregulation, thymus gland, peptide library, biological markers, calcitriol receptors, Vitamin D₃.

1 INTRODUÇÃO

O timo é a principal fonte das células T circulantes no organismo. É o local onde células precursoras dos linfócitos T, provenientes da medula óssea, se diferenciam e amadurecem em células T. O repertório de células T funcionais é determinado pelos processos tímicos de seleção positiva e negativa. Os timócitos amadurecem e, quando são selecionados positivamente por eventos que garantem a sua sobrevivência, se expandem e se diferenciam. A seleção do repertório de linfócitos no timo inicia-se na fase embrionária e ocorre, predominantemente, até o final de infância (Aliahmad, P. 2006). Sabe-se que, apesar da involução do timo, que ocorre até a puberdade, células T continuam a se desenvolver no timo e a migrar para a periferia por toda a vida (Goldschneider, I. 2006).

A diferenciação dos linfócitos T também depende da íntima comunicação intercelular entre os timócitos e as células do estroma tímico. Os timócitos em desenvolvimento interagem, seqüencialmente, com vários tipos de células mesenquimais, epiteliais e células derivadas da medula óssea que compõem o microambiente do estroma do timo. Cada interação linfócito-estroma resulta em proliferação, diferenciação e seleção de timócitos, permitindo a geração de um repertório diverso de células T maduras (Anderson, G. 2006). A diversidade imunológica dos receptores antigênicos das células T origina-se de pouco mais de 400 genes. Esse feito é atingido por um processo único de recombinação gênica mediado pelas enzimas RAG-1 e RAG-2 (do inglês, *Recombination-Activating Genes* 1 e 2),

no qual ocorre o corte e o processamento dos diferentes genes das cadeias V (variável), D (diversa), J (juncional) e C (constante), de tal forma que há a junção de 1 V, 1 D, 1 J e 1 C, compondo a cadeia variável do receptor de células T (TCR, do inglês, *T cell receptor*). Os receptores são expressos constitutivamente na membrana plasmática dos linfócitos, tornando estas células capazes de reconhecer os antígenos, apresentado pelas moléculas de MHC, e de se ativar (Delves, P.J. 2000).

Os timócitos que circulam no timo durante a diferenciação são capazes de modificar o microambiente através da expressão de citocinas, quimiocinas, integrinas e metaloproteases, promovendo a formação da estrutura do epitélio que circunda os timócitos em desenvolvimento (Takahama, Y. 2006). As interações entre os timócitos e as células que compõem o estroma tímico são importantes tanto para a diferenciação dos timócitos quanto para a manutenção da arquitetura tímica, porém a base molecular destes sinais permanece ainda pouco conhecida (van Ewijk, 1995, revisado por (Anderson, G. 2006).

As células do estroma tímico, onde se incluem as células progenitoras das células epiteliais tímicas (pTEC), expressam mediadores, como PSGL-1 (do inglês, *P-selectin glycoprotein ligand -1*), por exemplo, que atraem as células progenitoras das células T que chegam ao timo para a periferia do córtex tímico, onde passam a expressar o receptor de célula T (Takahama, Y. 2006). Estas células duplamente negativas para CD4 e CD8 geram sinais, principalmente via quimiocinas CXCR4 e CCR7, que induzem a diferenciação das células progenitoras do epitélio tímico em células epiteliais

do córtex (cTEC). Estas células irão compor o microambiente cortical, importante para a geração das células duplamente positivas e para a seleção positiva dos timócitos. A diferenciação em células unipositivas, assim como os eventos moleculares que ocorrem na seleção positiva de timócitos, geram sinais importantes que levam à diferenciação das células progenitoras epiteliais tímicas (pTEC) em células epiteliais da medula tímica (mTEC), células que irão compor o microambiente medular necessário para a maturação, a seleção e a exportação das células T para periferia. Durante a seleção tímica, cerca de 95% das células sofrem apoptose, por seleção positiva. Os timócitos que expressam um TCR que interage fracamente com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, **Major Histocompatibility Complex**) próprias, são, provavelmente, também selecionados negativamente por não serem capazes de sinalizar via TCR e iniciar sinais de ativação (von Boehmer, H. 2006).

No processo de seleção positiva, tanto os peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC quanto o tecido tímico são importantes para a seleção do repertório de células T (Aliahmad, P. 2006). Em estudos sobre a arquitetura do microambiente tímico e, mais particularmente, sobre a natureza dos sinais de comunicação na interação entre o estroma tímico e timócitos em desenvolvimento, foi demonstrado que ocorre a expressão de diversos genes tecido-específicos, como o da insulina, do antígeno S retinóico, do GAD67, entre outros, pelas células do epitélio medular do timo (Derbinski, J. 2005). A expressão da maioria destes genes é induzida nas células da medula tímica, especialmente nas células CD80^{high}. Nestas

células, a expressão de genes tecido-específicos parece ser promovida por um fator de transcrição denominado AIRE (do inglês, ***Autoimmune Regulator***), que controla a expressão de transcritos de RNA mensageiro de tecido-específicos, como a proteína transportadora de ácidos graxos e a enzima triptofano hidroxilase, entre outras (Ruan, Q.G. 2007) . Entretanto, o AIRE não parece ser único nesta função, uma vez que vários genes tecido-específicos podem ser expressos pelas células da medula tímica mesmo na ausência do AIRE (Derbinski, J. 2005). A identificação da expressão de antígenos tecido-específicos por células do epitélio tímico traz novas reflexões sobre o processo de seleção tímica e a importância do reconhecimento de uma maior diversidade de auto-antígenos para a seleção do repertório de células T. Como este processo afeta a tolerância central e os mecanismos moleculares desta interação ainda não está bem estabelecido.

Sabe-se, porém, que a deleção na expressão do gene AIRE parece afetar especificamente a tolerância a auto-antígenos, promovendo o desenvolvimento de doenças auto-imunes como a APECED (do inglês, ***Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy***) em camundongos e APS-1 (do inglês, ***Autoimmune Polyglandular Syndrome 1***) em humanos (Pitkanen, J. 2003). Desta forma, sendo a seleção do repertório funcionalmente ativo de células T baseada no reconhecimento de peptídeos próprios também tecido-específicos presentes no timo, a não na expressão de AIRE parece afetar a seleção dos timócitos com esta reatividade,

promovendo o desenvolvimento de doença auto-imune (Liston, A. 2004; Liston, A. 2005).

Em recente trabalho, Aschenbrenner e colaboradores perguntaram se células do estroma medular tímico que expressam AIRE estão envolvidas na geração de células T reguladoras naturais através do reconhecimento de antígenos tecido específicos (Aschenbrenner, K. 2007). Utilizando um modelo experimental com camundongos duplamente transgênicos para AIRE e TCR e nocaute para MHC II, este grupo foi capaz de mostrar que as células T reguladoras, com reatividade a antígenos tecido-específico, desenvolvem-se como consequência de interações, via TCR de alta afinidade, com complexos MHC-peptídeos expressos pelas células que compõem o estroma tímico. Também mostraram que, a despeito da alta avides, não ocorre deleção destas células, bem como ocorre a diferenciação para células T reguladoras. Este trabalho não exclui a possibilidade de tanto as células do estroma medular, bem como as células dendríticas tímicas colaborarem para a geração das células T reguladoras. Entretanto, como a expressão de AIRE afeta o processo de seleção das células T reguladoras naturais e os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão bem estabelecido.

Em situação fisiológica, as células T maduras não desempenham funções efetoras de agressão a tecidos próprios. Esta tolerância ao próprio é, em parte, resultante dos processos de seleção das células T no timo, onde diferentes mecanismos, como deleção clonal e supressão, podem estar envolvidos na eliminação ou regulação dos timócitos fortemente auto-

reativos. Há dados experimentais nos quais foi mostrado que outros mecanismos de regulação na periferia garantem a tolerância ao próprio. Dentre esses mecanismos estão a deleção física de células T, a modulação da expressão de moléculas acessórias co-estimuladoras, o aumento do limiar de ativação de células T, a apoptose e a ação das células T supressoras ou reguladoras (Delves, P.J. 2000).

Células reguladoras e regulação da resposta imune

A resposta imune pode ser regulada por diversos tipos celulares. Estes subtipos celulares têm sido classificados como: células reguladoras naturais, geradas no timo e que emergem dele com esta função; e células reguladoras induzidas na periferia, por diferentes estímulos. As células T reguladoras podem ser CD4+, CD8+, NKT e outros. Alguns tipos de células reguladoras estão mostrados na Tabela 1.

O fenótipo diferencial de cada um destes tipos celulares, ou seja, quais marcadores específicos estão expressos em cada subtipo ainda é pouco conhecido. Entretanto, tais células apresentam algumas características que as distinguem.

As células T reguladoras induzidas na periferia se originam a partir de diferentes tipos de células sob a influência uma variedade de estímulos. Não possuem uma identidade molecular específica, mas possuem algumas características fenotípicas que as distinguem, assim como diferentes

mecanismos de ação. As células que se diferenciam a partir de células T CD4⁺ quando cultivadas com TGF-beta, IL-4, IL-10, and anti-IL-12 são denominadas Th3 (Weiner, H.L. 2001). As células que se diferenciam a partir de células T CD4⁺ na presença de IL-10 e expressam altas doses de IL-10, são denominadas Tr1 (Levings, M.K. 2000). Tanto as células Th3 quanto as células Tr1 são capazes de inibir a proliferação destas células CD4⁺ Th1 por contato célula-célula ou pela secreção de citocinas TGFβ e IL-10.

Tabela 1: Alguns subtipos de linfócitos T reguladores

Tipo	Nomenclatura	Moléculas de superfície	Alvo	Especificidade	Mecanismo	Refs.
Naturais	Células T reguladoras naturais, nTreg	CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , GITR ⁺ , CTLA-4 ⁺ , Foxp3, TGFβ	Linfócitos efetores	Provavelmente auto-antígenos	Inibição da proliferação via célula-célula	(Sakaguchi, S. 1995)
Induzidas	Th3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ , GITR ⁺ , CTLA-4 ⁺ , LAP	Linfócitos efetores	Antígenos próprios e não-próprios	TGF-β, IL-10 (+), contato célula-célula.	(Weiner, H.L. 2001)
	Tr1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ , GITR ⁺ , CTLA-4 ⁺	Linfócitos efetores	Antígenos próprios e não-próprios	IL-10 ++, TGF-β, contato célula-célula.	(Levings, M.K. 2000)
	Células T supressoras	CD8 ⁺ , CD28 ⁻	APC	Restrito a MHC I	Indução de DC tolerogênicas via receptores inibitórios ILT3 e ILT4	(Liu, Z. 1998)

APC, células apresentadoras de antígeno; CTLA-4, antígeno citotóxico 4 associado ao linfócito T; GITR, receptor do fator de necrose tumoral induzido por glucocorticoide; DC, células dendríticas; IL, interleucina; ILT: transcrito semelhante à imunoglobulina; MHC; complexo principal de histocompatibilidade; DN, duplamente negativas para CD4 e CD8; CTL; linfócito T citotóxico; TGF-b: Fator de crescimento tumoral beta;

Um outro tipo de linfócito T capaz de suprimir a ativação de outros tipos celulares que compõem o sistema imune possui o fenótipo CD8⁺CD28⁻(Liu, Z. 1998). Essas células foram descritas após a diferenciação de células mononucleares de sangue periférico, em humanos, cultivadas com peptídeos ou proteínas derivadas de MHC classe I próprias. Foi observado que estas células eram capazes de regular negativamente respostas com

características inflamatórias, inibindo a ativação de DC. Levanta-se como hipótese que os receptores ILT-3 e ILT-4 (do inglês, *Immunoglobulin-Like Transcript*), expressos em células dendríticas, interajam com ligantes ainda desconhecidos das células CD8+CD28-, levando ao desenvolvimento de células dendríticas tolerogênicas. Assim, acredita-se que as células CD8+CD28- não atuem diretamente em células efectoras e sim sobre as células apresentadoras de antígeno, mas parecem não exercer efeito sobre células dendríticas maduras (Scotto, L. 2004).

Bases moleculares do desenvolvimento das células T reguladoras naturais.

Origem e desenvolvimento das células T reguladoras naturais

O fenômeno de supressão por célula T foi primeiramente descrito no final da década de 1970, através de estudos em camundongos timectomizados (Gershon, R.K. 1970). Naquela época, a hipótese era de que as células capazes de suprimir respostas imunes tanto contra antígenos próprios quanto de antígenos de patógenos constituíam uma população transitória de células T ativadas (Taguchi, O. 1980). Neste sentido, as células T supressoras isoladas do timo seriam representantes de células T maduras que circulavam na periferia, porém haviam adquirido atividade supressora após o reconhecimento do antígeno na periferia (Hardin, J.A.

1973; Hodgson, H.J. 1978). Os experimentos realizados por Sakaguchi e seus colaboradores mostraram uma população de células T CD4+, de camundongos com ooforite auto-imune, depletada de células que expressavam a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25), transferidas para camundongos imunodeficientes, induzia ooforite auto-imune, e que a transferência da população CD4+CD25+ inibia a progressão da doença (Sakaguchi, S. 1995). Este modelo colocou as células T supressoras em foco novamente. As células T CD4+CD25+ foram, então, denominadas células T reguladoras (T reg) e, desde então, têm sido intensamente estudadas.

O timo produz, nos primeiros estágios fetais e neonatais do desenvolvimento das células T, as células T CD4+CD25+ reguladoras como uma subpopulação de células T funcionalmente maduras. Essas células expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25), receptor de TGF- β na superfície celular, CTLA-4, o receptor II de TNF (TNFR2), CCR8 e CD62L (L-selectina) (Miyara, M. 2007). Expressam constitutivamente CD5, OX40, 4-1BB, GITR e CD103, porém, nenhum destes marcadores define, especificamente, a população de células T reguladoras, sendo também expressos na população CD4+CD25- após a sua ativação. No timo, as células T reguladoras localizam-se, preferencialmente, na região perivascular do septo fibroso e respondem quimiotacticamente a CCL1/I-309, uma quimiocina produzida por macrófagos da medula tímica e por células endoteliais do septo tímico (Annunziato, F. 2002). Experimentos utilizando células T reguladoras

CD4+CD25+ tímicas, *in vitro*, mostraram que a sua ação principal é inibir a ativação de células efetoras através do contato com estas células (Sakaguchi, S. 2004) Outros experimentos, utilizando transferência passiva de timócitos depletados de células CD25+ para camundongos Rag singenéticos, mostraram que estas células induzem distúrbios auto-imunes nos animais que receberam células CD25-, fenótipo que é revertido pela transferência de células CD4+CD25+. Isto sugere que o timo normal produz continuamente células T CD4 efetoras auto-reativas bem como células T reguladoras, também auto-reativas, capazes de suprimir tais células (Hoffmann, P. 2002; Takahashi, T. 2003).

As bases celular e molecular para a maturação das células T reguladoras, o papel da apresentação de antígenos, a diversidade de TCRs e as interações destas células com o microambiente tímico são, até o momento, pouco conhecidos, e os dados sobre os mecanismos envolvidos no processo de seleção das células T reguladoras naturais ainda são conflitantes e precisam ser melhor esclarecidos.

Foxp3 e atividade reguladora

Um importante passo para a compreensão das bases moleculares do desenvolvimento das células T CD4+CD25+ reguladoras veio da descoberta do Foxp3, uma vez que parece ser uma molécula chave para o desenvolvimento e função das células T reguladoras. O gene Foxp3,

localizado no cromossomo X, codifica uma proteína da família de repressores transcricionais do tipo *forkhead/winged-helix* que é predominantemente expressa em células T reguladoras do timo e da periferia, tanto em camundongos, como em ratos e humanos (Fontenot, J.D. 2003). O dado experimental que mostra a sua importância vem da observação de que camundongos machos hemizigóticos para uma mutação no gene *Foxp3* morrem antes de um mês de vida (Hori, S. 2003). Estes camundongos exibem uma hiperativação de células T CD4⁺ e produções exacerbadas de citocinas pró-inflamatórias, possuem poucas células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras e desenvolvem muitas células T CD25⁺ cronicamente ativadas.

De forma similar ao sistema murino, mutações no gene *Foxp3* em humanos são a causa de uma síndrome associada a doenças auto-imunes, denominada IPEX (Síndrome por imunodesregulação, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X) (Chatila, T.A. 2000). Em 1982, a IPEX foi descrita como uma síndrome de imunodeficiência ligada ao cromossomo X e associada com doenças auto-imunes de múltiplos órgãos, como tireoidite, IBD (do inglês, *Immune Bowel Disease*), dermatite atópica e infecções que levavam os pacientes à morte precocemente (Powell, B.R. 1982). Sabe-se, atualmente, que, em humanos, é uma mutação no gene *Foxp3* leva a IPEX, possivelmente devido a uma falha na geração de células T reguladoras, levando a uma hiperativação de células T reativas a antígenos próprios, a bactérias comensais no intestino, e a substâncias ambientais inócuas, causando, assim, poliendocrinopatia auto-imune, IBD e alergia.

A expressão do fator de transcrição Foxp3 tem sido indicada como crucial para a função reguladora de células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras (Fontenot, J.D. 2003). Já foi demonstrado que a transfecção retroviral do gene Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁻ naive converte estas células em T CD4⁺CD25⁺ com perfil regulador, tanto em camundongos (Hori, S. 2003), quanto em humanos (Walker, M.R. 2003). Entretanto, alguns dados apresentados, recentemente, na literatura indicam que a expressão de Foxp3 em células humanas não está, necessariamente, relacionada com a função reguladora (Morgan, M.E. 2005; Allan, S.E. 2007). Nestes trabalhos, foi observado que clones de linfócitos T derivados de células mononucleares de sangue periférico revelaram que tanto células CD4⁺ quanto células CD8⁺, que expressam CD25^{high}, também expressam Foxp3 após 20 a 24 horas de ativação. Além disso, estes clones que expressavam estes marcadores possuíam capacidade proliferativa e de secreção de IFN γ igual à apresentada pela população CD25^{low} após ativação, além de não apresentarem atividade reguladora (Allan, S.E. 2007). Outros estudos mostraram que células do epitélio tímico também podem expressar Foxp3, porém, os mecanismos moleculares que induzem esta expressão e sua função neste subtipo celular ainda não são conhecidos (Liston, A. 2007).

Os sinais que podem induzir a expressão de Foxp3 nas células T em desenvolvimento no timo, ou na periferia, ainda não são completamente conhecidos. A hipótese mais aceita, atualmente, é a de que a interação entre TCR e MHC no timo possa induzir a expressão de Foxp3, e assim direcionar este tipo celular para a diferenciação em célula reguladora (Hori, S. 2004).

Em um estudo recente, utilizando-se um camundongo duplamente transgênico que expressava hemaglutinina (HA) sob o controle do promotor de um antígeno neural, gerando um neo-auto-antígeno, e para um TCR restrito a uma molécula de MHC classe II específica para o neo-antígeno, foram apontadas observações interessantes. Foi mostrado que a expressão promíscua deste neo-antígeno pelas células do epitélio medular do timo promovia a expressão de Foxp3 ainda nos estágios de células duplamente positivas, e que havia diferenciação de célula T reguladoras que expressavam um TCR específico para o neo-antígeno (Cabarrocas, J. 2006).

Porém, estes estudos estão baseados em experimentos utilizando camundongos que expressam um TCR transgênico, em uma tentativa de simplificar e analisar os eventos associados à interação do TCR com MHC no desenvolvimento destas células, induzindo a expressão de cadeias α e β específicas de um TCR conhecido. Esta abordagem possui limitações, pois cria um camundongo que produz altas quantidades de células T com um TCR com uma especificidade particular, e ainda não se sabe como isto pode afetar a diferenciação das células no ambiente tímico.

Neste sentido, é importante destacar que o desenvolvimento das células T reguladoras, bem como a regulação positiva da expressão de Foxp3 não são, somente, resultado da sinalização do TCR de maior afinidade. Sinais provenientes de citocinas que sinalizam via cadeia gama-comum do receptor para citocinas IL-2, IL-7 e IL-15, por exemplo, e o TGF β , bem como sinais via moléculas coestimuladoras também orquestram o processo de desenvolvimento das células T reguladoras (Zhang, L. 2007). Estudos

utilizando técnicas de *microarray* têm sido utilizados para identificar quais genes são modulados pelo Foxp3. Nestes estudos é sugerido haver um aumento no RNA mensageiro de moléculas coestimuladoras como PD-1 (*Programed Cell Death 1*), ICOS, CD40L, CD28, bem como citocinas e quimiocinas como IL-10, OX40L, CCR1, CCR4, moléculas de superfície como semaforina 4A, neuropilina, CD72, moléculas associadas à cascata de sinalização como Jak2, Zap70, entre outras, além de outros fatores de transcrição (Marson, A. 2007). Entretanto, como estes sinais são ativados e como interagem durante o processo de desenvolvimento das células T CD4+CD25+Foxp3+ reguladoras ainda não foram completamente elucidados. Além disso, o Foxp3 controla a expressão de CD25 em células T reguladoras naturais, mas não em células ativadas em geral (Fontenot, J.D. 2005).

Papel das citocinas na biologia das células T reguladoras

A ontogenia das células T reguladoras no timo é controlada por algumas citocinas que são produzidas por células do epitélio tímico, células do estroma e células dendríticas residentes no tecido, e pelos próprios timócitos em desenvolvimento.

A IL-2 é uma citocina produzida principalmente por células T ativadas, mas não por células T reguladoras. Apesar de estas células expressarem grandes quantidades do receptor α da IL-2 (CD25), a importância do sinal

via IL-2 para o desenvolvimento das células T reguladoras ainda é controverso. Estudos com camundongos com deficiência de IL-2, CD25 ou CD122 (cadeia β do receptor de IL-2) sofrem uma alteração linfoproliferativa grave e distúrbios auto-imunes que podem ser prevenidos com a transferência de células CD4+CD25+ T reguladoras de camundongos selvagens (Almeida, A.R. 2002). É interessante destacar que a transferência de células T CD4+CD25+, geradas em camundongos deficientes de IL-2, mas não deficiente de seu receptor CD25, é capaz de induzir a supressão em diversos modelos de doenças auto-imunes, sugerindo que o sinal via IL-2 seja necessário para a função reguladora destas células, mas não influenciaria na sua geração. Entretanto ainda há controvérsias sobre esta interpretação. Estudos com camundongos que expressam GFP (do inglês, **Green Fluorescein Protein**) sob o promotor de Foxp3 e nocautes para o gene que codifica a IL-2, ou cadeia alfa do receptor (CD25), ou ainda a cadeia gama-comum do receptor de IL-2, mostraram que grandes quantidades de células Foxp3+ podiam ser recuperadas dos camundongos que eram IL-2^{-/-} ou CD25^{-/-}, e estas células recuperadas apresentavam atividade imunossupressora normal (Fontenot, J.D. 2005). Entretanto, nos camundongos que não possuíam a cadeia gama-comum foi abolida totalmente a produção de células Foxp3+ e esses animais apresentavam um fenótipo de distúrbio linfoproliferativo na periferia, sugerindo que os sinais de citocinas que eram dependentes da cadeia gama-comum são importantes para o desenvolvimento das células T reguladoras. Desta forma, podemos concluir que os sinais via IL-2 não são essenciais para a geração de células

Foxp3⁺ reguladoras no timo, entretanto, e sim os sinais via receptor gama-comum, provavelmente induzidas por outras citocinas (Yates, J. 2007).

Há relatos na literatura que apontam o TGF- β 1 como outro fator importante para o desenvolvimento das células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras no timo e na periferia. Sabe-se que há a expressão de TGF- β 1 na membrana destas células e que a função fisiológica de supressão, *in vitro*, pode estar relacionada com o contato célula-célula através desta molécula. Além disso, em estudos recentes indicam que a expressão de Foxp3 possa ser induzida pelo TGF- β 1 (Chen, W. 2003). Em um modelo de camundongo transgênico para TGF- β 1 verificou-se um aumento da frequência de células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras nos órgãos linfóides periféricos e, correlativamente, um decréscimo da frequência destas células na periferia de camundongos com algum defeito na vias de sinalização do TGF- β 1 (Schramm, C. 2004). Entretanto, o desenvolvimento das células T no timo de camundongos com algum defeito na via de sinalização do TGF- β 1 não se encontrava alterado, sugerindo que a ausência de TGF- β 1 poderia ser compensada por outros membros da família do TGF, como BMP-2 e BMP-4 (Marie, J.C. 2005).

A IL-7 foi descrita como uma citocina importante para o desenvolvimento e homeostase das células T tanto no timo e na periferia. O receptor α da IL-7 (CD127) é expresso em timócitos e células *naïve*, porém é regulado negativamente após ativação. O sinal via receptor de IL-7 promove a sobrevivência e proliferação dos timócitos em desenvolvimento e das células T maduras na periferia, porém a sua expressão é suprimida depois

que as células recebem sinal de sobrevivência através de sinais de outras citocinas como IL-2, IL-4, e IL-15 (Yates, J. 2007). Já foi mostrado que as células T reguladoras expressam baixas quantidades de receptor α de IL-7 o que resulta num declínio na habilidade destas células de proliferar (Cozzo C, 2003). Mais recentemente, alguns trabalhos utilizam como marcadores CD127^{low} e o CD25^{high}, para discriminar populações de células T ativadas e células T reguladoras (Banham, A.H. 2006; Liu, W. 2006; Seddiki, N. 2006). Entretanto, células recém ativadas expressam baixas quantidades de CD127 e esta combinação de marcadores parece não discriminar, adequadamente, populações de células T CD4 ativadas e reguladoras.

Em um estudo recente, foi proposto um mecanismo de geração de células T reguladoras em humanos seja mediada pela citocina TSLP, linfopoietina do estroma tímico, TSLP (do inglês, *Thymic Stromal LymphoPoietin*), uma citocina semelhante à IL-7, que é expressa por células dos corpúsculos de Hassal e células dendríticas (Watanabe, N. 2005). O corpúsculo de Hassal é composto por “ilhas” de células epiteliais e dendríticas, localizadas na medula. Essas “ilhas” de células produzem TSLP, TGF β , CD30 ligante, fator 1 derivado de células do estroma tímico e quimiocinas que ativam as células dendríticas CD11c-. Estas células passam a expressar CD80 e CD86, mas não expressam citocinas inflamatórias. Parecem ser capazes de gerar sinais suficientes para geração de células T CD4+CD25+Foxp3+ reguladoras, porém os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação ainda não estão completamente elucidados.

Papel das moléculas coestimuladoras na diferenciação de células T reguladoras naturais

As células T interpretam os sinais derivados da interação com o TCR na presença de um segundo sinal, transduzido pela ligação do receptor de ativação CD28 ou de inibição CTLA-4, aos seus ligantes CD80 (B7-1) e o CD86 (B7-2). Os sinais derivados da interação dos receptores CD80 ou CD86 são de grande importância para a seleção negativa das células T no timo e, também, possuem um papel importante na ontogenia das células T reguladoras (Buhlmann, J.E. 2003). A importância desses sinais para o desenvolvimento de células T reguladoras pôde ser verificada em camundongos CD28^{-/-} e CD80/CD86^{-/-}, uma vez que eles apresentam uma grande redução do número de células T reguladoras T CD4⁺CD25⁺ (Tang, Q. 2003). Outra observação que apóia esta hipótese é que camundongos NOD CD80/CD86^{-/-} e CD28^{-/-} possuem um tipo de diabetes mais exacerbado do que o observado em camundongos NOD controles não deficientes para estes receptores (Salomon, B. 2000; Boden, E. 2003). O efeito parece estar relacionado com a significativa redução da secreção de IL-2 por estes camundongos, levando a uma deficiência na geração de células T reguladoras no timo e a sua manutenção na periferia. Porém, este mecanismo ainda é controverso.

O CTLA-4 é expresso constitutivamente em altos níveis nas células T reguladoras, e pode ter um papel inibidor, suprimindo a ativação de células

efetoras via coestimulação (Takahashi, T. 2000). De forma semelhante ao que acontece em camundongos $\text{Foxp3}^{-/-}$ e em camundongos $\text{TGF-}\beta^{-/-}$, camundongos $\text{CTLA-4}^{-/-}$ desenvolvem uma poliendocrinopatia fatal, linfoproliferativa de origem auto-imune, ressaltando o papel do CTLA-4 na regulação das respostas imune (Waterhouse, P. 1995). Entretanto, este receptor parece não estar associado à geração destas células, pois camundongos nocautes para CTLA-4 desenvolvem células T reguladoras funcionais.

Definição fenotípica para células T reguladoras naturais: Quão específicos são os marcadores CD25, GITR e o Foxp3 para estas células?

O CD25 tem sido um marcador útil para distinguir as células T CD4 que previnem auto-imunidade patológica, de outras células T CD4, incluindo células auto-reativas não ativadas. Entretanto, após a ativação, as células T CD4 passam a expressar CD25, bem como GITR (Miyara, M. 2007). Algumas questões emergem a respeito destes marcadores: o CD25 é apenas um bom marcador para estas células ou é uma molécula importante para a sua função reguladora? Quão específica e estável é a sua expressão? Qual, ou quais, o(s) melhor(es) marcador(es) para definir o fenótipo de regulação? Se o Foxp3 é um fator de regulação importante no

desenvolvimento e função das células T reguladoras naturais, o que controla a expressão de Foxp3 nestas células no timo e na periferia?

A investigação dessas questões nesta subpopulação celular CD4⁺CD25⁺ pode trazer informações importantes sobre a ontogenia destas células e sua participação na regulação do sistema imune. Permanece em aberto o desafio de se buscar novas abordagens para responder várias dessas perguntas. Na tentativa de identificar quais marcadores as células T reguladoras naturais expressam, Huang e cols. publicaram um importante estudo sobre o papel do gene 3 de ativação de linfócito, o LAG-3 (CD223) (do inglês, *Lymphocyte-Activation Gene 3*) no mecanismo de supressão mediado por células T reguladoras induzidas na periferia. Utilizando a tecnologia de *microarray*, foi verificado que a expressão de LAG-3 em células T CD4⁺ reguladoras estava aumentada quando comparado com a expressão em células T CD4⁺ efectoras, em resposta a um estímulo viral. Verificaram que células T CD4⁺LAG3⁺ reguladoras eram capazes de inibir a proliferação de células efectoras e esta propriedade era inibida na presença de anticorpo anti-LAG-3. O LAG-3 é uma molécula homóloga à molécula CD4 e que se liga a MHC classe II, e parece estar presente em células reguladoras induzidas. Porém, sua função e sua influência na ontogenia das células reguladoras no timo ainda é pouco estudada (Huang, C.T. 2004). Da mesma forma Yamaguchi cols. publicaram um importante estudo sobre o papel do receptor 4 de folato, o FR4 (do inglês, *Folate Receptor 4*), (Yamaguchi, T. 2007). Na tentativa de identificar uma molécula capaz de discriminar entre populações de linfócitos reguladores e de linfócitos

ativados, eles encontraram o FR4, constitutivamente expresso nas células T com fenótipo regulador. Através da expressão do FR4 e do CD25, eles foram capazes de discriminar entre as populações de células CD4⁺ ativadas e reguladoras, tanto tímicas quanto periféricas. Estas populações eram diferentes, também, na sua capacidade proliferativa e no perfil de citocinas secretado. A população CD4⁺CD25⁺FR4⁺ foi capaz de suprimir eventos de rejeição em um modelo de alotransplante, bem como a administração de anticorpo bloqueador anti-FR4 reduziu o número de células T reguladoras na periferia, promovendo a remissão de tumores, quando administrado em camundongos adultos. Um outro efeito do anticorpo bloqueador anti-FR4 foi o aparecimento de doenças auto-imunes em camundongos jovens. Entretanto, não se conhece se o FR4 é apenas um marcador para células T reguladoras ou se é uma molécula importante para a sua geração e/ou função reguladora.

Muito conhecimento vem sendo gerado nesta última década sobre o papel regulador das células T CD4⁺CD25⁺ que emergem do timo. Entretanto, diversas questões ainda não foram respondidas sobre a atividade supressora/reguladora destas células. Como estas células são educadas, geradas e mantidas? Quais marcadores podem ser usados para identificar esta subpopulação reguladora? Como estas células executam seu papel supressor? Como funciona a especificidade destas células? Como elas discriminam uma resposta imune produtiva ou protetora de uma resposta deletéria? E, mesmo, se as células reguladoras podem ser reguladas. A investigação dessas questões nesta subpopulação celular

CD4+CD25+ reguladora tímica pode trazer informações importantes sobre a ontogenia destas células e sobre a sua participação na regulação das repostas imunes. Permanece em aberto o desafio para responder várias dessas questões. Neste sentido, considerando as contribuições que o sistema de *phage display* trouxe para a identificação de novas moléculas em outros sistemas, acreditamos que ele possa ser usado como uma ferramenta para responder algumas destas questões.

Phage Display

O *phage display* consiste em um sistema de “pescagem” molecular composto de fagos filamentosos, vírus que infectam bactérias, que apresentam peptídeos exógenos na sua superfície. Este sistema foi demonstrado primeiramente por George Smith em 1985 e, desde então, o *phage display* tem sido amplamente empregado com a finalidade de identificar ligantes através de interações moleculares e obter informações sobre a relação receptor-ligante.

A apresentação do peptídeo pelo fago é possível, pois nesse sistema, seqüências aleatórias de DNA são introduzidas no gene que codifica a proteína do capsídeo do fago (camada externa e protetora). Desta forma, seqüências aleatórias de peptídeos fundidas à proteína do capsídeo (pIII ou pVIII, dependendo do sistema a ser empregado) são geradas durante a produção da partícula viral (Smith, G.P. 1985). No fim do processo, bilhões

de bacteriófagos são gerados, cada um deles apresentando um peptídeo diferente. Esta coleção de partículas virais recebe o nome de biblioteca apresentadora de peptídeos. Estas bibliotecas de peptídeos são, então, incubadas com as moléculas alvo do estudo (receptores purificados, células expressando seus receptores de superfície, anticorpos entre outros). Este processo denominado *biopanning*, ou simplesmente *panning*, permite selecionar os fagos ligantes, expressando peptídeos que mimetizam ligantes naturais destas moléculas (Barbas III, C.F. 2001). Como forma de validar o sistema, alguns grupos relataram a identificação da seqüência RGD em *pannings* com integrinas (Koivunen, E. 1993), enquanto outros identificaram peptídeos que mimetizam substratos naturais em *pannings* com suas correspondentes enzimas proteolíticas (Cloutier, S.M. 2002; Cloutier, S.M. 2004).

Figura 1: Partícula de fago mostrando as proteínas do capsídeo pIII e pVIII onde os peptídeos exógenos podem ser inseridos

No início, o sistema *phage display* foi empregado para a identificação de epítopos de anticorpos (Smith, G.P. 1985). Logo ficou claro que o *phage display* tinha um potencial muito grande e outras aplicações surgiram, como

a identificação de peptídeos ligantes a moléculas de adesão, enzimas proteolíticas entre outras.

Mais recentemente, Pasqualini e colaboradores demonstraram que o *phage display* podia ser utilizado em sistemas *in vivo*. Bibliotecas de peptídeos foram injetadas em camundongos com câncer e após alguns minutos em circulação, foi possível observar uma migração preferencial de fagos expressando diferentes peptídeos por diferentes órgãos. Isto sugere que a vasculatura de diferentes órgãos apresenta marcadores específicos (Pasqualini, R. 1996). O mesmo sistema foi experimentado em um paciente com câncer em estágio terminal. Após alguns minutos de circulação da biblioteca de fagos no sangue, diferentes órgãos foram retirados e os fagos foram recuperados. Neste estudo, eles foram capazes de identificar um marcador para câncer de próstata (Arap, W. 2002; Pasqualini, R. 2002)

Apesar de todo o avanço com *phage display*, *pannings* com células (*in vitro*) ainda são tecnicamente difíceis devido ao elevado número de fagos “inespecíficos” recuperados. Com a finalidade de superar estes inconvenientes, recentemente, Giordano e colaboradores desenvolveram uma metodologia denominada BRASIL (do inglês, ***Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands***) (Giordano, R.J. 2001). Essa abordagem de *phage display* possibilita a separação de fagos ligantes de células daqueles não-ligantes, numa única etapa.

Há estudos que foram realizados com uma biblioteca de anticorpos apresentados por fagos, utilizando células e tecidos do timo, visando na isolar anticorpos que permitissem a detecção de epítomos conservados

expressos em células do compartimento do estroma do timo (Van Ewijk, W. 1997). Os pesquisadores foram capazes de isolar dois fagos capazes de detectar epítomos expressos tanto em células epiteliais quanto em células do estroma derivadas de células mesenquimais. Em outros estudos realizados em timócitos foi verificada a eficiência na detecção de anticorpos reativos a seqüências específicas de DNA. Neste caso, a análise das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos fagos recuperados revelou que o arranjo formado era freqüentemente usado por auto-anticorpos (Tanha, J. 1997).

Em resumo, a tecnologia do *phage display* tem sido empregada com sucesso para identificação de epítomos de anticorpos. Entretanto, o número de trabalhos envolvendo *phage display*, linfócitos T e timócitos é muito pequeno. Provavelmente, pelo fato de as moléculas MHC destas células reconhecerem, de forma dominante, os peptídeos apresentados pelos fagos, formando uma ligação não desejada. Apesar de ser uma dificuldade agravante neste sistema, acredita-se que com a maior sensibilidade que a metodologia BRASIL oferece, este obstáculo possa ser superado.

Neste projeto, buscamos, através do sistema de *phage display* e usando a metodologia BRASIL, identificar moléculas presentes nos timócitos CD4+CD25+ e no timo que possam estar envolvidas na atividade reguladora através das células T reguladoras naturais CD4+CD25+, e moléculas presentes no tecido do timo que sejam potencialmente alvo de reconhecimento por timócitos e que possam ser importantes na diferenciação em células CD4+CD25+ com perfil regulador.

2 OBJETIVOS

1. Identificar marcadores de tecido tímico e timócitos totais que possam ser potenciais alvos de reconhecimento pelos timócitos que se diferenciam em células CD4+CD25+.
2. Identificar novas moléculas presentes em timócitos CD4+CD25+ que sejam potencialmente relevantes para a sua atividade reguladora.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia Experimental

Para a obtenção de fagos que apresentem peptídeos com maior especificidade ao tecido tímico, a biblioteca de fagos foi incubada com fragmentos do timo. Os fagos recuperados foram usados em ciclos posteriores. Após três ciclos de seleção de fagos, colônias individuais foram selecionadas da placa de cultura, e acondicionadas em placas de 96 orifícios para posterior seqüenciamento e identificação das proteínas.

Para a obtenção de fagos que apresentem peptídeos com maior especificidade de ligação com timócitos, a biblioteca foi pré-absorvida com células polimorfonucleares de sangue periférico (PBMC). Esta etapa garante que os fagos que apresentam peptídeos ligantes comuns a timócitos e a PBMC sejam selecionados negativamente, obtendo-se um repertório de fagos com o potencial de reconhecer preferencialmente timócitos totais. Os fagos obtidos no sobrenadante desta etapa foram incubados com timócitos totais separados em cultura. Os fagos recuperados foram usados em ciclos posteriores com timócitos de novos timos. Após três ciclos de seleção de fagos, colônias individuais foram armazenadas em placas de cultura para seqüenciamento e identificação da seqüência do peptídeo apresentado pelo fago.

Para a obtenção de fagos que apresentem peptídeos com maior especificidade de ligação com timócitos, a biblioteca foi pré-absorvida com

timócitos CD4+CD25-, numa etapa denominada *pre-clearing*. Esta etapa garante que os fagos que apresentam peptídeos ligantes comuns a timócitos CD4+CD25- sejam selecionados negativamente, favorecendo a obtenção de um repertório de fagos com o potencial de reconhecer preferencialmente os timócitos T reguladoras CD4+CD25+. Os fagos obtidos no sobrenadante desta etapa foram incubados com timócitos CD4+CD25+ previamente selecionados por FACS sorting. Os fagos recuperados foram usados em ciclos posteriores com timócitos CD4+CD25+, de novos timos. Após três ciclos de seleção de fagos, colônias individuais foram armazenadas em placa de cultura para seqüenciamento e identificação da seqüência do peptídeo apresentado pelo fago.

3.2 Desenho Experimental

3.3 Sujeitos de Pesquisa

Neste trabalho obtivemos amostras de timo de 14 indivíduos, de idades entre 2 meses a 12 anos, portadores de cardiopatias congênitas e sem doenças de base imunológica. Estes indivíduos foram submetidos à cirurgia cardíaca no Instituto do Coração e tiveram os timos retirados durante a cirurgia. A indicação de retirada do timo depende do tipo de cirurgia a ser realizada e da indicação do cirurgião no momento da cirurgia. Estes timos foram enviados ao Laboratório de Imunologia e processados de acordo com protocolos descritos a seguir. A obtenção deste material foi realizada com parecer favorável do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas – FMUSP, segundo Protocolo de Pesquisa número 404/03, e mediante a assinatura do consentimento informado pós-esclarecido dos responsáveis.

Obtivemos, também, amostras de sangue de 5 indivíduos sadios, de idades entre 25 e 50 anos também, com os devidos consentimentos informados pós-esclarecido.

3.4 Separação de Células

3.4.1 Timócitos

O timo foi colocado numa placa de Petri e cortado em fragmentos com o bisturi. Pequenas porções deste tecido foram utilizadas para a seleção de

fagos ligantes de fragmento. Outra porção foi utilizada para a separação de células. Utilizando-se uma seringa e agulha, infundiu-se RPMI (Invitrogen/GIBCO - Carlsbad, California, EUA) nos fragmentos de timo repetidas vezes, e as células foram coletadas com uma pipeta Pasteur, e colocadas em um tubo Falcon. Estas células foram centrifugadas a 300 g por 8 minutos, ressuspensas em meio RPMI e contadas. Parte delas foi congelada e outra parte utilizada para a separação de fagos ligantes de timócitos totais ou foram utilizadas para a separação de células CD4+CD25+ e CD4+CD25-.

3.4.2 Células Mononucleares de Sangue Periférico

Obtivemos amostras de sangue heparinizado (1:10.000) de 5 indivíduos sadios para a obtenção das células mononucleares. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram utilizadas nas etapas de *pre-clearing*. As amostras de sangue foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience – Sunnyvale, CA – EUA). Após centrifugação a 560 g por 30 minutos, o anel de células mononucleares foi retirado, diluído em solução salina e centrifugado a 560 g por 8 minutos. O botão celular foi ressuspenso em solução salina e lavado por duas vezes, centrifugando-se a 560 g por 8 minutos. As células foram ressuspenso em meio RPMI e contadas na câmara de Neubauer (Labex – Bahia, BR).

3.4.3 Congelamento

Para o congelamento, as suspensões de PBMC foram centrifugadas a 560 g por 8 minutos e ressuspensas (5 a 20×10^6 células/ml) em solução de congelamento contendo 50% de soro fetal bovino inativado (SFBi, Imunoquímica, RJ, Brasil), 40% de meio RPMI (Invitrogen – California – EUA) e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma, Missouri, EUA). Alíquotas de 1 ml foram distribuídas em tubos de congelamento (NUNC- Dinamarca) previamente resfriados, que foram, então, transferidos para os tanques de nitrogênio líquido.

3.4.4 Timócitos CD4+CD25+

O isolamento de células CD4+CD25+ reguladoras a partir de timócitos foi feito utilizando-se o *kit* MACS de separação de células por contas magnéticas (*MACS Human CD4+ T Cell Isolation Kit II* – Miltenyi Biotec – Alemanha) e por Citometria de Fluxo utilizando FACSaria (FACSaria, BD Biosciences- Califórnia, EUA, do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein). A separação foi feita em duas etapas. Na primeira etapa de separação, utilizamos o *kit* MACS onde os timócitos totais foram incubados com um coquetel de anticorpos biotinilados e microesferas anti-biotina,

segundo especificações do fabricante. Neste coquetel, há anticorpos que reconhecem a grande maioria das células presentes no timo, exceto as células CD4. Estas células foram, então, selecionadas negativamente quando a suspensão celular foi submetida a uma coluna magnética. Ou seja, as células imobilizadas com as contas magnéticas ficaram retidas no tubo junto à coluna magnética e a população células enriquecidas em CD4 foram recuperadas.

Numa segunda etapa, a suspensão de timócitos enriquecida de células CD4⁺ foi incubada com os anticorpos fluorescentes (BD Biosciences-Califórnia, EUA) anti-CD4FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) e anti-CD25PE (ficoeritrina) ou anti-CD4PE e anti-CD25FITC e separadas por citometria de fluxo de acordo com a presença dos marcadores CD4 e CD25. Os timócitos que apresentavam positividade para os dois marcadores, de acordo com a região de células CD4, foram recuperados em um tubo de policarbonato de 12 ml (Cellstar Greiner Bio-One – Omega Scientific Tarzana, CA). Os timócitos que apresentavam positividade apenas para o CD4 também foram recuperados em tubos de 12 ml.

3.5 *Phage display*

Neste trabalho, utilizamos uma biblioteca apresentadora de peptídeos de *phage display* CX₇C que foi produzida nos laboratórios dos Drs. Wadih Arap e Renata Pasqualini (University of Texas – M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA) e Dr. Erkki Koivunen (Universidade de

Helsinki, Finlândia), gentilmente cedida para este trabalho. A apresentação do peptídeo pelo fago é possível, pois nesse sistema, seqüências aleatórias de DNA são introduzidas no gene que codifica a proteína do capsídeo do fago (camada externa e protetora). Desta forma, seqüências aleatórias de peptídeos fundidas à proteína pIII do capsídeo são geradas durante a produção da partícula viral (Smith, GP, 1985). No fim do processo, bilhões de bacteriófagos são gerados, cada um deles apresentando um peptídeo diferente. Esta coleção de partículas virais recebe o nome de biblioteca apresentadora de peptídeos.

Esta biblioteca de peptídeo foi, então, incubada separadamente com timócitos totais, com o fragmento do tecido tímico e com timócitos CD4+CD25+. Este processo denominado *biopanning*, ou simplesmente *panning*, permite selecionar os fagos ligantes, expressando peptídeos que mimetizam ligantes naturais destas moléculas (Barbas III, & Silverman, GJ, 2001). Além do peptídeo aleatório, foi inserido o gene de resistência à tetraciclina (Tet^R) ao genoma do fago, e esta construção possibilita o crescimento e seleção específica de bactérias infectadas com fago em meio de cultura LB (Luria-Bertani) contendo tetraciclina.

3.5.1 BRASIL (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands)

Essa abordagem de *phage display* possibilita a separação de fagos ligantes de células daqueles não-ligantes, numa única etapa.

Nesse procedimento, a suspensão celular é incubada com os fagos e centrifugada sobre uma fase orgânica (Figura 2 A), denominada óleo BRASIL (9:1 - dimetilsulfóxido:ciclohexano). As células contendo os fagos a elas ligados penetram nesta fase orgânica (Figura 2 B), sendo então separadas dos fagos não ligados que, permanecem na fase aquosa superior (Figura 2 C).

Figura 2 : Representação esquemática da técnica BRASIL. (A) Células e biblioteca de fagos são incubados e adicionados sobre a fase orgânica; (B) Após centrifugação, as células contendo os fagos ligados a elas penetram na fase orgânica; (C) Os fagos não ligados permanecem na fase aquosa superior. O botão de células é removido e os fagos recuperados.

3.5.2 BRASIL para seleção de fagos ligantes.

Neste trabalho, a técnica BRASIL foi aplicada para a seleção de fagos ligantes de células em duas etapas.

Na primeira etapa, a biblioteca de fagos foi incubada com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ou timócitos CD4+CD25-, numa etapa denominada *pre-clearing*, na qual o repertório de peptídeos apresentados pelos fagos ligantes destes tipos celulares é selecionado negativamente. Na segunda etapa, etapa denominada *biopanning*, os fagos não ligantes da primeira etapa são recuperados e incubados com as células do estudo (timócitos totais ou timócitos CD4+CD25+) para a seleção de fagos ligantes. Estas etapas estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3: Etapas técnicas para a seleção de fagos ligantes por BRASIL

Procedimentos e Etapas técnicas

Dia1: *Pre-clearing* e *Biopanning*

Foram separadas ou descongeladas células de PBMC ou de timócitos CD4+CD25- para a etapa de *pre-clearing*, e separados timócitos totais ou timócitos CD4+CD25+, para a etapa de panning.

1º Etapa: *Pre-clearing* – pré-absorção da biblioteca de fagoscom PBMC ou timócitos CD4+CD25-.

A suspensão celular foi centrifugada por 8 minutos a 300 g e o botão celular foi ressuspenso em 100 µl de RPMI-1% BSA (sem antibiótico) em tubos de 1,5ml.

A biblioteca de *phage display* CX7C foi centrifugada por 10 minutos a 16000 g, para eliminar agregados que se formam durante o armazenamento. Após, 2 µl da biblioteca foram adicionados à suspensão de PBMC, homogeneizados e incubados no gelo por 1 hora.

Uma cultura bacteriana de E.coli K91kan foi crescida em 10 ml de TB suplemento/kan em tubo Falcon de 50ml durante a incubação, até a DO600 = 1,0-2,0. O crescimento bacteriano foi monitorado de modo a utilizar as bactérias na fase logarítmica de crescimento, ou seja, fase em que as bactérias expressam o F-pili necessário para a infecção.

Após a incubação, 200 µl do óleo BRASIL foram adicionados em tubos de 400ul (Fisher Scientific – Loughborough, Inglaterra) e sobre ele foi pipetada a mistura células+biblioteca. Após a centrifugação por 10 minutos a 10.000g, a 25°C, o sobrenadante que contém os fagos que não se ligaram às PBMC ou aos timócitos CD4+CD25- foi recolhido.

2º Etapa: *Biopanning* – Seleção dos fagos ligantes específicos.

O sobrenadante contendo fagos que não se ligaram às células da etapa de *pre-clearing* foi recolhido e adicionado ao botão celular de timócitos, homogeneizado e incubado por 2 horas no gelo.

Após a incubação, 200 µl do óleo BRASIL foram adicionados em tubos de 400ul (Fisher Scientific – Loughborough-Inglaterra) e sobre ele foi pipetada a mistura timócitos/fagos. Após centrifugação por 10 minutos a 10.000g, 25°C, o tubo foi congelado por 10 minutos a -70°C. Com auxílio de uma tesoura e um alicate, a parte inferior do tubo contendo o botão celular de células/fagos ligantes foi cortada e seu conteúdo foi transferido para um eppendorf de 1,5 ml. O botão celular foi ressuspenso com 200 µl da cultura bacteriana K91Kan (DO600 = 1-2) e incubado por 20 minutos, para infecção.

Passado o tempo de infecção, a bactéria infectada foi transferida para o erlenmeyer contendo 20 ml de LB *low-tet*. Essa baixa concentração de tetraciclina promove a indução do gene Tet^R dos fagos. As bactérias foram incubadas sob agitação (250 rpm) e temperatura (37°C) constantes por 1 hora. Após esse período, foram adicionados 80ul de tetraciclina a uma concentração final de 20 µg/ml, e manteve-se durante a noite, sob agitação (250 rpm) e temperatura (37°C) constantes.

Dia 2: Precipitação dos fagos

1º Precipitação: A cultura crescida durante a noite foi centrifugada por 10 minutos a 5000 g para a formação do botão de bactérias. O sobrenadante foi recolhido e para cada 10 ml de sobrenadante (SN), foram adicionados 1,5 ml da solução PEG/NaCl. Depois, incubou-se no gelo por 1 hora, centrifugou-se por 25 minutos a 8500 g, a 4°C. Nesta etapa, o sobrenadante

foi descartado e o precipitado foi novamente centrifugado por 2 minutos a 8500 g, a 4°C, para remoção do PEG restante. O sobrenadante restante foi removido e os fagos precipitados foram ressuspensos em 1 ml de PBS.

2° Precipitação: Aos fagos ressuspensos em PBS, foram adicionados 150 µl de PEG/NaCl. Foram mantidos no gelo por 1 hora e, em seguida, centrifugados por 25 minutos a 8500 rpm, a 4°C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se uma nova centrifugação por 2 minutos a 8500 g, 4°C, para a remoção do PEG restante. O sobrenadante restante foi removido e os fagos precipitados foram ressuspensos em 50 µl de PBS e armazenados a 4°C até o uso no 2° ciclo de seleção, onde não se partiu da biblioteca de fagos e sim dos fagos recuperados no 1° ciclo. Foram realizados 3 ciclos de seleção.

Ao final dos três ciclos de seleção foram separadas colônias individuais encaminhadas para seqüenciamento e identificação dos peptídeos apresentados pelos fagos.

3.5.3 Seleção de Fagos Ligantes de Tecido do Timo

A seleção de fagos ligantes do tecido tímico foi feita incubando-se a biblioteca de fagos diretamente com um fragmento de aproximadamente 50 mg de tecido. Primeiramente, foi feito o bloqueio com RPMI-3% BSA por 15 minutos em gelo, sendo, em seguida, feita a incubação por 2 horas com a biblioteca de fagos ($\sim 10^9$ TU) em 100 µl de RPMI-3% BSA. O fragmento foi

cuidadosamente lavado com RPMI e os fagos aderidos foram recuperados por infecção com *E.coli* K91kan, amplificados durante a noite em meio TB contendo tetraciclina (20 µg/ml) e precipitados com PEG/NaCl, como descrito anteriormente. Ao final dos três ciclos de seleção foram separadas colônias individuais e encaminhadas para o seqüenciamento e a identificação dos peptídeos apresentados pelos fagos. A Figura 4 ilustra as etapas de seleção de fagos ligantes de tecido.

Figura 4 Representação esquemática das etapas técnicas para a seleção de fagos ligantes de tecido

3.6 PCR dos fagos selecionados

As reações de amplificação de DNA foram montadas em um volume final de 20 µl. Utilizou-se como DNA “molde” o DNA do fago armazenado em PBS obtidos na etapa de seleção. A quantidade de DNA inicial foi de 2 µl do

fago. Os iniciadores específicos (*primers*) foram utilizados na quantidade de 10 pmol/reação. O sistema continha 1 µM de dNTPs, 0,8 2 mM de cloreto de magnésio, 1 a 2 unidades de Taq DNA polimerase e tampão de Taq DNA polimerase para uma concentração final de 1 vez.

Os ciclos de amplificação foram realizados na máquina Minicycler MJ Research, modelo PTC-150. A amplificação foi executada da seguinte forma: o DNA foi inicialmente desnaturado por 2 minutos a 94°C e submetido a 35 ciclos de desnaturação, novamente a 94°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e elongação a 72°C por 1 minuto. Após a amplificação, 5 a 10 µl da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

O DNA amplificado por PCR foi encaminhado para seqüenciamento.

3.7 Seqüenciamento

Uma vez confirmada a presença do inserto, o produto de PCR foi, então, submetido à reação de seqüenciamento utilizando o kit BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems - Foster City - EUA) e analisado em um seqüenciador automático ABI Prism™ DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Procedimento e Etapas Técnicas

As reações de seqüenciamento foram feitas em tubos de 0,2 ml, próprios para PCR.

Protocolo

BigDye Mix	2 μ l
DNA (produto de PCR de fago)	2 μ l
Primer	1,6 μ mol
Água deionizada	q.s.p.
Volume Total	10 μ l

Após a reação de PCR para BigDye, de acordo com as especificações do fabricante, foram pipetados 40 μ l de isopropanol 75% nos tubos pós-PCR para que o DNA amplificado fosse precipitado e o excesso de nucleotídeos que não reagissem fossem eliminados. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente, por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 600 g, por 25 minutos. O isopropanol foi removido com o auxílio de uma pipeta. Foram adicionados 200 μ L de etanol 70%, homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm. O etanol foi removido com o auxílio de uma pipeta, e as amostras foram secas no bloco de aquecimento, a 97°C. As amostras foram ressuspensas em formamida e aplicadas no gel de seqüenciamento.

3.8 Preparo do gel de seqüenciamento

A análise do DNA inserido no gene da pIII do fago foi realizada em gel de seqüenciamento contendo 6% de poliacrilamida, 8M de uréia e tampão Tris-Borato-EDTA (TBE).

As placas de vidro foram lavadas com detergente não abrasivo (Extran - Indústria Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e enxaguadas com água

corrente e depois com água destilada quente. Para uma solução de 50ml de gel foram pesados 18 g de uréia acrescidos de 24,5 ml de água destilada e 5,2 ml de solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida 19/1 (BioRad, Hercules, CA, EUA). Esta solução foi colocada em agitação leve até a dissolução completa da uréia.

Em seguida, esta solução foi filtrada em filtro de 0,22 μ m contendo em sua parte inferior 5 ml de tampão 10 vezes concentrado de Tris-Borato-EDTA. O volume da solução foi completado para 50 ml com água destilada. Por último, acrescentaram-se 250 μ l de solução de persulfato de amônia 10% e 35 μ l de TEMED (Amresco, Solon, Ohio, EUA). Com o auxílio de uma seringa, o gel foi carregado nas placas de vidro e utilizado após completa polimerização (aproximadamente 1h30min).

3.9 Identificação do DNA inserido na pIII dos fagos e tradução para peptídeo

Para localizarmos a sequência de DNA inserido na pIII dos clones de fagos, procuramos por seqüências flanqueadoras da proteína pIII seguida das cisteínas, onde foi introduzido o inserto durante a construção da biblioteca. Posteriormente, ferramentas específicas de bioinformática, online, como <http://au.expasy.org/tools/dna.html> foram utilizadas para a tradução da seqüência de DNA e identificação do peptídeo apresentado por cada fago.

Na Figura 5 mostramos como foi realizada a análise para a identificação do DNA inserido, bem como a tradução para peptídeo.

Figura 5 Localização do inserto no gene da pIII do fago e tradução para peptídeo.

Em verde – seqüências flanqueadoras do inserto codificando o peptídeo de fago. Em azul – codon das cisteínas presentes nas bibliotecas cíclicas (CX7C). Em vermelho – inserto codificante de um peptídeo de 7 resíduos de aminoácidos

3.10 Análise da similaridade molecular entre os peptídeos do fago e proteínas depositadas no banco de dados

As seqüências dos peptídeos dos fagos foram analisadas considerando-se os seguintes parâmetros que estabelecemos no laboratório, e utilizando-se a ferramenta ClustaW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (on line e gratuito):

I.) o número de vezes que um mesmo peptídeo apareceu (analisando a seqüência de DNA do fago para verificar se são peptídeos provenientes de seqüências gênicas diferentes ou iguais);

II.) determinados motivos ou domínios semelhantes (no mínimo três aminoácidos iguais, seqüenciais ou não);

III.) o padrão e o número de aminoácidos distintos, mas com hidropaticidade compartilhada entre os peptídeos alinhados.

A análise da similaridade foi feita utilizando-se o banco de dados – BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>), critério *Search for short, nearly exact matches* para análises de pequenas seqüências. Foi observada a identidade entre a seqüência do peptídeo e a seqüência no banco de dados, selecionando-se sugestões que apresentaram, no mínimo, 4 aminoácidos conservados (sendo pelo menos 3 idênticos), considerando os hits que incluíam aminoácidos raros mais como importantes do que os hits que incluíam os aminoácidos comuns.

3.11 Preparação em larga escala dos fagos

O processo iniciou-se com a cultura da bactéria E.coli K91kan, como descrito anteriormente. Apenas 1µl do clone selecionado foi suficiente para a infecção. A bactéria uma vez infectada foi cultivada em 150 ml de meio LB/Tet (concentração final 20 µg/ml) por 16-18 horas. Passado esse tempo, a cultura foi centrifugada em garrafas Sorvall de 250ml a 4°C, 6000 g por 10 minutos e o botão celular de bactéria formado desprezado. Ao sobrenadante contendo os fagos secretados foi adicionado PEG/NaCl (15% v:v) para a precipitação dos fagos por um período de 4 horas em gelo. Esse processo de precipitação foi repetido, por períodos mais curtos, de modo a aumentar a pureza dos fagos. Ao final, o pellet de fagos foi ressuspendido em 300 µl de PBS estéril.

3.12 Ensaios de Validação Molecular

3.12.1 Ensaio de Ligação no Fragmento de Tecido, Timócitos Totais ou Timócitos CD4+CD25+.

Para verificar a ligação do fago selecionado às células ou ao tecido com o qual foi selecionado, fizemos ensaios de ligação, baseados na metodologia utilizada para seleção dos fagos.

Para esta etapa, timócitos foram separados e ressuspensos em 100 µl de meio RPMI-1% BSA. Utilizamos os fagos de interesse, previamente amplificados em larga escala e com inserto confirmado por seqüenciamento. Foram adicionados 10⁹ ufc do fago de interesse ao fragmento do tecido ou à suspensão de timócitos ou timócitos CD4+CD25+.

3.12.2 Ensaio de ligação por bactérias com a molécula candidata imobilizada

Para validar a interação entre peptídeos semelhantes a proteínas e seus receptores fizemos ensaios de ligação in vitro dos fagos previamente selecionados e amplificados em larga escala, e os respectivos ligantes candidatos disponíveis comercialmente. No presente estudo, analisamos a capacidade de ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D3.

A Vitamina D3 (Cholecalciferol – Sigma, Missouri, EUA ou 1 α ,25-dihidroxitamina D3 – Fluka Biochemika, St. Gallen, Switzerland) foi imobilizada em placa de 96 orifícios de fundo chato a 4°C por 16-18 horas e PBS-3% BSA. Foram efetuadas duas lavagens com PBS visando à remoção do excesso de Vitamina D. O bloqueio foi feito com 200 μ l PBS-3% BSA por 1-2 horas à temperatura ambiente. Durante esse período, iniciou-se, em paralelo, a cultura da bactéria E.coli K91 kan em 7 ml de meio TB-suplemento, acrescido de 50 μ g/ml de kanamicina.

Em seqüência, 1×10^9 TU do fago expressando o peptídeo de interesse, bem como do fago selvagem controle Fd (sem inserto) foram adicionados em um volume final de 50 μ l PBS-1,5% BSA e incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

Os poços foram lavados 9 vezes com PBS e adicionados com 100 μ l de E.coli K91 kan para a infecção e a recuperação dos fagos. Após o período de infecção, as bactérias foram homogeneizadas e diluídas em meio LB. Diluições seriadas foram, então, plaqueadas em meio LB-ágar-tetraciclina (40 μ g/ml), e incubadas por 16-18 horas em estufa a 37°C. A ligação do fago que possui um peptídeo de interesse foi quantificada por contagem de colônias (ufc – unidades formadoras de colônia). Para ligações específicas do fago/receptor, espera-se obter um maior número de colônias nos poços onde os clones do fago candidato foram adicionados aos ligantes em comparação com os poços controle, ou seja, tanto com adsorção de PBS – 3 % BSA quanto com adição do fago controle Fd, que não contém o inserto, ao receptor imobilizado.

3.12.3 Ensaio de ligação por Dot Blot com a molécula candidata imobilizada

Neste ensaio, imobilizamos a Vitamina D3 em membrana de nitrocelulose (Hybound ECL - Amershan Bioscience – Sunnyvale, CA - EUA) por 15 minutos, ou até secar a membrana. Incubamos durante a noite com PBS-5%BSA para o bloqueio da membrana. No dia seguinte, incubamos com o fago amplificado em larga escala por 1 hora em PBS. Após o período de incubação, incubamos com o anticorpo de coelho (Sigma, Missouri, EUA) específico que reconhece proteínas do fago. Após o período de incubação, revelamos com o anticorpo biotinilado de cabra anti-IgG de coelho (Vector, Michigan, EUA), e a membrana foi revelada com streptoavidina-fosfatase alcalina (Sigma, Missouri, EUA). Os pontos que aparecem no blot indicam ligação.

3.12.4 Ensaio de ligação por ELISA com molécula candidata imobilizada

Neste ensaio, imobilizamos a Vitamina D3 em placa de ELISA e incubamos por 1 hora com o fago amplificado em larga escala. Após o período de incubação, incubamos por 1 hora com um anticorpo de coelho (Sigma, Missouri, EUA) específico que reconhece proteínas do fago. Após o período de incubação, incubamos com um anticorpo de cabra anti-IgG de

coelho biotinilado (Vector, Michigan, EUA), revelamos com streptoavidina-fosfatase alcalina (Sigma, Missouri, EUA). A relação entre a densidade ótica apresentada pela ligação do fago de interesse com seu respectivo ligante, à ligação com BSA indica a especificidade de ligação do fago com seu possível ligante.

3.12.5 Ensaio de ligação por ELISA com receptor de Vitamina D (VDR) imobilizado

O receptor de Vitamina D3 (Fluka Biochemika, St. Gallen, Switzerland) foi imobilizado em placa de 96 orifícios de fundo chato a 37°C por 2 horas, e PBS-3% BSA como controle da especificidade da ligação peptídeo/receptor. Foram efetuadas duas lavagens com PBS visando à remoção do excesso do receptor. Foi feito o bloqueio com 200 µl PBS-3% BSA por 1-2 horas à temperatura ambiente. Adicionamos a Vitamina D3 nos poços que continham o receptor e incubamos por 1-2 horas à temperatura ambiente. Foram efetuadas duas lavagens com PBS visando à remoção do excesso da Vitamina D. Incubamos por 1 hora com os fagos, efetuamos 5 lavagens e incubamos por 1 hora com o anticorpo de coelho (Sigma, Missouri, EUA). Após o período de incubação, incubamos com um anticorpo biotinilado de cabra anti-IgG de coelho (Vector, Michigan, EUA), e revelado com streptoavidina-fosfatase alcalina (Sigma, Missouri, EUA). A relação entre a densidade ótica apresentada pela ligação do fago de interesse com seu

respectivo ligante foi comparada à ligação do fago ao BSA e considerada positiva quando esta relação apresenta índice igual ou superior a 1,5.

3.13 Ensaio de validação funcional: cultura de células com Vitamina D₃

O estudo da resposta celular frente à Vitamina D₃ foi feito nos timócitos obtidos de 7 indivíduos. Após a obtenção das células, e feita à contagem celular, a suspensão celular foi centrifugada por 8 minutos a 300 g, desprezado o sobrenadante e acertada a concentração celular final para 1×10^6 células/ml em meio completo de cultura DMEM acrescido de 2mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 20 µg/ml de pefflacin, 50 µg/ml de gentamicina e 10% soro humano normal inativado, pré-testado para crescimento de timócitos. Foram distribuídas 3 ml/poço em placas de poliestireno estéril de 6 poços com fundo em chato (Costar, Cambridge, EUA). As células foram testadas na presença de diferentes concentrações 1,25 – diidroxivitamina D₃. As concentrações testadas foram: 160, 80, 40, 20 e 10 nM de Vitamina D₃. Todos os experimentos de cultura foram realizados por duplicatas. O controle negativo foram as células cultivadas na ausência de Vitamina D₃. As culturas foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, por 5 dias a 37°C. No 5º dia, as células foram coletadas imunofenotipadas.

4 RESULTADOS

4.1 Separação de Timócitos e Fragmento do Timo

Para a seleção de fagos ligantes de timócitos, do fragmento de timo de timócitos CD4+CD25+, utilizamos células e fragmento de timo humano de 4 indivíduos. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de 5 indivíduos saudáveis, em um pool, utilizadas para o *pre-clearing* nas etapas de seleção com timócitos totais. Utilizamos células CD4+CD25-, obtidas na separação por *FACS Sorting*, para o *pre-clearing* nas etapas de seleção de timócitos CD4+CD25+.

Para a separação de timócitos CD4+CD25+, utilizamos uma população de timócitos previamente enriquecida de CD4 e separamos os timócitos duplamente-positivos utilizando o citômetro de fluxo FACSARIA (IEP-Hospital Albert Einstein).

No primeiro ciclo de separação de células, iniciamos o processo de separação de CD4 com 7×10^8 timócitos totais e obtivemos $1,50 \times 10^8$ células ao final do processo, com 65 % de células duplamente positivas para CD4 e CD8. Estas células foram, então, incubadas com os anticorpos fluorescentes anti-CD4FITC e anti-CD25PE ou anti-CD4PE e anti-CD25FITC e foram separadas por FACSARIA de acordo com a presença dos marcadores CD4 e CD25, para a separação das populações CD4+CD25+, e populações CD4+CD25-. No primeiro experimento, obtivemos 2×10^6 células

enriquecidas em CD4+CD25+ com uma pureza de 44,4%, das quais 1×10^6 células foram utilizadas para *biopanning*, e 4×10^6 de CD4+CD25-, das quais 1×10^6 células foram utilizadas para pré-absorver a biblioteca de fagos. O restante das células foi armazenado em trizol para experimentos posteriores. Para os outros 3 timos utilizados neste trabalho, foi realizado o mesmo processo. As purezas de timócitos CD4+CD25+ para os timos 2, 3 e 4 foram 57,3%, 39,5% e 72,7%, respectivamente. Os detalhes sobre o número de células obtidas em cada etapa encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Número de células e porcentagem de pureza das células obtidas em cada ciclo de separação por FACS Sorting

	Ciclos de Seleção							
	Primeiro		Segundo		Terceiro		Quarto	
	n de cél	% pureza	n de cél	% pureza	n de cél	% pureza	n de cél	% pureza
Início	7×10^8	n.a	$2,5 \times 10^8$	n.a	$3,1 \times 10^8$	n.a	$6,7 \times 10^8$	n.a
CD4	$1,5 \times 10^8$	65	$4,4 \times 10^7$	85,2	1×10^8	70,7	3×10^7	77
CD4+CD25-	4×10^6	100	$5,2 \times 10^6$	100	$5,4 \times 10^6$	100	$5,8 \times 10^6$	100
CD4+CD25+	$2,5 \times 10^6$	44,4	$9,7 \times 10^5$	57,3	$1,4 \times 10^6$	39,5	$1,4 \times 10^6$	72,7

n.a: não se aplica; n de cél: número de células

Avaliamos a pureza da separação por citometria de fluxo, através da presença dos marcadores CD4 e CD25. As porcentagens apresentadas no gráfico indicam a quantidade de células CD4+CD25+ em relação à quantidade total de células. Na Figura 6 mostramos o resultado, por citometria, da pureza das células que foram separadas.

Figura 6 Imunofenotipagem das células que foram separadas por FACS *Sorting*. Eixo X: fluorescência para o CD4 APC. Eixo Y: Fluorescência para o CD25 PE. A: Antes da separação B,C, D e E: Primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclo de separação de células CD4+CD25+

4.2 Seleção de fagos ligantes

4.2.1 Fagos ligantes de Tecido Tímico

Para a seleção de fagos ligantes de tecido, a biblioteca de fagos foi incubada diretamente no fragmento de tecido, sem a etapa de *pre-clearing*. No primeiro ciclo de seleção, iniciamos o processo com 5×10^9 fagos provenientes da biblioteca original em um fragmento de timo de 68 mg e recuperamos $6,38 \times 10^4$ fagos/mg de tecido. No segundo ciclo, iniciamos com $2,5 \times 10^9$ fagos recuperados do primeiro ciclo de seleção em um

fragmento de 46,3 mg, e recuperamos $8,7 \times 10^4$ fagos/mg de tecido. Para o terceiro ciclo, iniciamos o processo com $2,5 \times 10^9$ fagos recuperados do segundo ciclo em um fragmento de 53 mg, e recuperamos $6,71 \times 10^4$ fagos/mg de tecido. Os dados de enriquecimento de fagos obtidos foram calculados pelo número de colônias obtidas em relação ao peso do fragmento e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 :Número de fagos obtidos em cada ciclo de seleção para fagos ligantes de tecido tímico.

Ciclos de seleção			
	Primeiro (68 mg)	Segundo (46,3 mg)	Terceiro (53 mg)
Início	5×10^9	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
Fim	$6,38 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	$6,71 \times 10^4$

O enriquecimento de fagos durante a seleção é uma informação importante, pois é um indicador da quantidade de fagos recuperados em cada ciclo de seleção, que potencialmente apresentam maior eficiência de ligação. Na Figura 7 apresentamos o enriquecimento de fagos durante a seleção de fagos ligantes do fragmento de tecido tímico. Verificamos que para a seleção de fagos ligantes do fragmento do tecido tímico não houve um enriquecimento do número de fagos obtido da seleção de fagos ligantes.

Avaliação do enriquecimento de fagos durante a seleção frente ao fragmento de tecido

Figura 7 Avaliação do enriquecimento dos fagos obtidos no *biopanning* frente ao fragmento do tecido tímico. Os valores no eixo Y mostram as medidas do enriquecimento por unidades formadoras de colônia (ufc). Os números no eixo X mostram o número de ciclos de seleção.

4.2.2 Fagos ligantes de Timócitos Totais

Para a seleção de fagos ligantes de células, em cada ciclo de seleção realizamos uma etapa denominada *pre-clearing* para subtrair da biblioteca total de fagos aqueles que pudessem interagir com moléculas presentes nas células do PBMC (para os timócitos totais) ou das células CD4+CD25- (para os timócitos CD4+CD25+), restando um repertório de fagos com potencial de

reconhecer moléculas presentes nas células do timo, seja nos timócitos totais seja nos timócitos CD4+CD25+.

Para a seleção de fagos frente a timócitos totais, utilizamos 5×10^6 células do *pool* de PBMC para o *pre-clearing* e 5×10^6 timócitos totais para biopanning. Iniciamos o processo com 2×10^9 fagos provenientes da biblioteca original e recuperamos 8×10^4 fagos no primeiro ciclo. No segundo ciclo e no terceiro ciclo, iniciamos com 1×10^9 fagos recuperados dos ciclos das seleções anteriores, e obtivemos no segundo ciclo $3,5 \times 10^4$ fagos, e no terceiro $92,2 \times 10^4$ fagos. Os dados do enriquecimento da seleção estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 Número de fagos obtidos em cada ciclo de seleção para fagos ligantes de timócitos totais

Ciclos de Seleção			
	Primeiro	Segundo	Terceiro
Início	2×10^9	1×10^9	1×10^9
Fim	8×10^4	$3,5 \times 10^4$	$92,2 \times 10^4$

Na Figura 8 apresentamos a medida do enriquecimento do número de fagos obtidos durante os três ciclos de seleção de fagos frente aos timócitos totais. Verificamos que para a seleção de fagos ligantes houve um enriquecimento no número de fagos obtidos da seleção de fagos ligantes a timócitos totais. Podemos verificar que obtivemos um maior número de fagos no terceiro ciclo de seleção de fagos, frente a timócitos totais.

Figura 8: Avaliação do enriquecimento dos fagos obtidos no *biopanning* frente aos timócitos totais. Os valores no eixo Y mostram as medidas do enriquecimento por unidades formadoras de colônia (ufc). Os números no eixo X mostram o número de ciclos de seleção

4.2.3 Fagos ligantes de Timócitos CD4+CD25+

Para a seleção de fagos ligantes de timócitos CD4+CD25+, no primeiro ciclo de separação de fagos ligantes a timócitos CD4+CD25+, utilizamos 1×10^6 timócitos CD4+CD25- para a etapa de *pre-clearing*, e para o *biopanning*, utilizamos 1×10^6 timócitos CD4+CD25+, com 44,4% de pureza. Iniciamos o *pre-clearing* com 2×10^9 fagos e recuperamos, ao final da seleção $3,4 \times 10^4$ fagos. Para o segundo ciclo, utilizamos 1×10^6 timócitos CD4+CD25- para o *pre-clearing* e $9,7 \times 10^5$ timócitos CD4+CD25+, com 57,3% de pureza para o

biopanning. Iniciamos o processo com 1×10^9 fagos e recuperamos, ao final da seleção 5×10^4 fagos. Para o terceiro ciclo, utilizamos 1×10^6 timócitos CD4+CD25- para o *pre-clearing* e 7×10^5 timócitos CD4+CD25+, com 39,5% de pureza para o *biopanning*. Iniciamos o processo com 1×10^9 fagos e recuperamos, ao final da seleção 9×10^4 fagos. E, por fim, no quarto ciclo utilizamos $1,5 \times 10^6$ timócitos CD4+CD25- para o *pre-clearing* e $1,4 \times 10^6$ timócitos CD4+CD25+, com 72,7% de pureza para o *biopanning*. Iniciamos o processo com 1×10^9 fagos e recuperamos, ao final da seleção 2×10^4 fagos. Os dados do enriquecimento da seleção estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 Número de fagos obtidos em cada ciclo de seleção para fagos ligantes de timócitos CD4+CD25+

(pureza de CD4+CD25+)	Ciclos de seleção			
	Primeiro (44,4%)	Segundo (57,3%)	Terceiro (39,5%)	Quarto (72,7%)
Início	2×10^9	1×10^9	1×10^9	1×10^9
Fim	$3,4 \times 10^4$	5×10^4	9×10^4	2×10^4

As porcentagens indicam a pureza da população CD4+CD25+ utilizada para a seleção de fagos.

Na Figura 9 apresentamos a medida do enriquecimento de fagos durante a seleção de fagos frente aos timócitos CD4+CD25+.

Nos três primeiros ciclos de seleção com populações de pureza 44,4%, 57% e 39% (Figura 6) verificamos um enriquecimento no número de fagos recuperados, onde recuperamos no terceiro ciclo duas vezes mais fagos que

o segundo. No quarto ciclo verificamos uma queda na quantidade de fagos recuperados (Figura 9, quarto ciclo). Verificamos que para a seleção de fagos ligantes frente a CD4+CD25+ não houve um enriquecimento de seleção de fagos ligantes.

Figura 9: Avaliação do enriquecimento dos fagos obtidos no *biopanning* com timócitos CD4+CD25+. Os valores no eixo Y mostram as medidas do enriquecimento por unidades formadoras de colônia (ufc). Os números no eixo X mostram o número de ciclos de seleção

4.3 Análise das seqüências e identificação dos peptídeos

Dos clones isolados em cada abordagem, foram feitas 24 reações de PCR para os fagos recuperados da seleção utilizando um fragmento de timo,

24 reações de PCR para os fagos recuperados da seleção utilizando timócitos totais, e 32 reações de PCR para os fagos recuperados da seleção utilizando timócitos CD4+CD25+. Após a confirmação da presença do inserto, o produto de PCR foi então submetido à reação de seqüenciamento e analisado em seqüenciador automático. Dos 80 fagos seqüenciados, apenas 57 fagos apresentaram seqüências confiáveis para análise.

Para analisarmos os peptídeos apresentados presentes nos fagos selecionados, procuramos pelas seqüências flanqueadoras à seqüência do peptídeo codante, seguidos de cisteínas, expressa na proteína pIII onde foi introduzido o inserto durante a construção da biblioteca. O software específico *Translate Tools*, encontrado no site <http://au.expasy.org/tools/dna.html>, *on line* e gratuito, foi utilizado para a tradução da seqüência de DNA e identificação do peptídeo apresentado por cada fago. A Figura 10 ilustra esta análise.

Dos fagos seqüenciados, 12 fagos diferentes podem ser identificados para os fagos obtidos de timócitos, e 9 fagos diferentes obtidos da seleção com o fragmento do timo, totalizando 21 fagos diferentes para os fagos obtidos da seleção frente ao fragmento do timo e frente a timócitos totais. Entretanto, os fagos recuperados da seleção frente a timócitos CD4+CD25+ não apresentaram seqüências semelhantes, tampouco motivos que indicassem o enriquecimento da biblioteca de fagos selecionados.

Tecido	Timócitos Totais	Timócitos CD4+CD25+
M1F -GAAGARN	T1E -VGLRI PA	R1A -----LLGTRWP-
M2G -GAARGRN	T1F -VGLRI PA	R4B -----LLATRVN-
M2B -GGRWGRN	T2E -VGLRI PA	R4G -----LLHFRSP-
M2D -GGRWGRN	T1B -LNFRTGTG	R1E -----LAVGEVL-
M2E -GGRWGRN	T1C -LNFRTGTG	R1G -----MPGWEEVL-
M1G -RGRWGRN	T1G -GAAGAET	R1F -----FVSPVVG-
M2C -TGTMGNR	T3D -LALRAED	R3C -RGDEFVS-----
M2H SSRTYGA-	T3G LQAVAAK-	R2G --RGVLMR---Y-
M2A -SHEGGLR	T2C -GGRWGRN	R3B -----LMRAGPF-
M1H -TLVRGKD	T3A -GGRWGRN	R2H ---RAFVVAS---
M2F -KGISDPS	T3F -GGRWGRN	R3D QSHSAFV-----
M1B -DDVMYAH	T2A -EGRWGRN	R4A --DRALAGR----
	T2B -ESRWGQN	R4D ---LAVAGGH---
	T1D -LGFIADH	R3G -----MASALSP-
	T1A DHGRDAA-	R2A ---QRLVGFA---
	T3C -DHFLSRH	R1C -----FMESVGR-
	T2H -VVKNRSS	R4C -----VGASLYD
	T1H -MISSSST	R3H --DGQWLRI----
		R3F ---ERATGLV---
		R4H -----DTGFTWY-
		R2E -----PGFGLAY--
		R2B -----LQASPNF-
		R4F ---PRFPSYQ---
		R1D -----LTPEFHI--
		R1H -----KRGNSGS-
		R2F -----FLFTFEA--
		R3E -----RVEANDV--

Figura 10: Seqüência de aminoácidos e alinhamento dos peptídeos obtidos na seleção de fagos ligantes de tecido, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+ sem as cisteínas flanqueadoras

M: peptídeos obtidos da seleção de tecido T: peptídeos obtidos da seleção de timócitos; e R: peptídeos obtidos da seleção de timócitos CD4+CD25+ reguladores. Os outros números e letras referem-se à posição do fago na placa

4.4 Perfil molecular comparativo dos peptídeos selecionados frente ao tecido tímico, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+

Dos fagos seqüenciados, 9 fagos com seqüências diferentes puderam ser identificados da seleção com fragmento do timo, sendo todos os peptídeos hidrofílicos e básicos, sendo apenas 2 ácidos. Para os fagos obtidos de timócitos totais, 12 fagos com seqüências diferentes puderam ser identificados, sendo eles distribuídos igualmente quando à hidropaticidade e carga. Dos fagos recuperados da seleção frente à timócitos CD4+CD25+ não pudemos identificar seqüências semelhantes, tampouco motivos que indicassem o enriquecimento da biblioteca de fagos selecionados, o mesmo se reflete para o padrão de hidropaticidade e cargas. A análise bioquímica completa está no Anexo II.

Analizamos o repertório de peptídeos de acordo com a repetição de seqüências e de motivos repetidos em fagos distintos. Os motivos GAA e LNFRGT estiveram presentes 2 vezes no repertório de fagos selecionados frente ao tecido tímico. O motivo GRWGR esteve presente em 8 fagos dos repertórios selecionados frente ao tecido e a timócitos totais, e o motivo VGLRIP esteve presente em 3 vezes no repertório de fagos selecionado frente a timócitos totais.

Dos fagos selecionados para validação molecular, a seqüência do fago M2C (do tecido tímico) está presente 1 vez no repertório de peptídeos analisados. A seqüência do fago M2F está presente 2 vezes no repertório de peptídeos analisados

A sequência do fago T1A (do timócitos totais) está presente 1 vez no repertório de peptídeos analisados. A sequência do fago T1B (do timócitos totais) foi encontrada 2 vezes no repertório de peptídeos analisados. A sequência do fago T1F (do timócitos totais) foi encontrada 3 vezes no repertório de peptídeos analisados. A sequência do fago T2C (do timócitos totais) foi encontrada 9 vezes no repertório de peptídeos analisados.

As sequências dos fagos obtidos da seleção frente a timócitos CD4⁺CD25⁺ não apresentaram repetições de sequência, bem como repetições de motivos.

4.5 Análise da similaridade molecular entre os peptídeos e proteínas depositadas no banco de dados

Para a análise da similaridade molecular entre as sequências dos peptídeos dos fagos selecionados e as proteínas descritas, utilizamos uma ferramenta disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) o *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Esta ferramenta busca regiões de similaridade entre sequências alvo (*query*) e as sequências depositadas no banco de dados. No programa comparam-se estas sequências e sugere-se uma possível identidade (*hit*) para o peptídeo e calcula-se o significado estatístico desta sugestão. O significado estatístico das sugestões encontradas é expresso nos valores de *e-value* e *score*. O *e-value* indica a chance de encontrar ao

acaso a similaridade sugerida pelo alinhamento, e o *score* é a pontuação que aquele alinhamento recebeu.

Todos os fagos seqüenciados foram analisados segundo os critérios de escolha destes fagos para a validação molecular que se basearam na representatividade da seqüência do peptídeo presente no fago e na similaridade com proteínas depositadas no banco de dados. As tabelas completas com todos os peptídeos estão apresentadas no Anexo III

Todos os fagos seqüenciados foram analisados segundo os critérios de escolha destes fagos para a validação molecular que se basearam na representatividade da seqüência do peptídeo presente no fago e na similaridade com proteínas depositadas no banco de dados. As tabelas completas com todos os peptídeos estão apresentadas no Anexo III.

Após a análise de cada um dos peptídeos selecionados, escolhemos os fagos T1A, T1B, T1F, T2C, M2C, M2F, R2A e R3D para prosseguir a validação. A Tabela 6 mostra as sugestões que obtivemos no BLAST para os peptídeos destes fagos, assim como o grau de similaridade com a proteína candidata.

O peptídeo apresentado pelo fago M2C faz similaridade à Proteína Transportadora de Vitamina D em 5 dos 7 aminoácidos aleatórios do peptídeo do fago, sendo que 4 aminoácidos possuem identidade total e 1 aminoácido apresenta identidade de carga com os aminoácidos do receptor.

Tabela 6: Alinhamento dos peptídeos obtidos na seleção de fagos ligantes de tecido, tímócitos totais e tímócitos CD4+CD25+ e correspondência com proteínas similares depositadas no banco de dados. Seqüências encontradas no Blast na busca de proteínas semelhantes aos peptídeos dos fagos selecionados em banco de dados. Os peptídeos obtidos na seleção de fagos ligantes de tímócitos e fragmento de tecido tímico e as similaridades encontrada

Fago	Proteína	Score	e-value	Alinhamento
M2C CTGTMGNRC	Vitamin D-binding protein [Mus musculus]	16.8	9103	CTG TMGNRC TMSNR
M2F CKGISDPSC	Dendritic cell-associated transmembrane protein precursor [Mus musculus]	22.3	165	CKG-----ISDP SC CKG ATPMEACTI ISDPTC
T1A CDHGRDAAC	OX40 [Mus musculus]	20.2	767	CDHGRDAAC CDHTRDTLC
T1B CLNFRGTGC	Interleukin 7 Receptor [Homo sapiens]	21.0	392	CLNFRGTGC CLNFR
T1F CVGLRIPAC	Interleukin-5 [Homo sapiens]	16.3	10122	CVGLRIPAC LRIP
T2C CGGRWGRNC	CD44 [Homo sapiens]	22.3	176	CGGRWGRNC CPGRWGPDC
R2A CQRLVGFA	vitamin D receptor [Homo sapiens]	17.6	7756	CQRLVGFA QKVGFA
R3D CQSHSAFVC	Interleukin-21[Homo sapiens]	19.3	2393	CQSHSAFVC HSAF-C

T: peptídeos obtidos da seleção de tímócitos; M: peptídeos obtidos da seleção de tecido tímico e R: peptídeos obtidos da seleção de tímócitos CD4+CD25+. Os outros números e letras referem-se à posição do fago na placa.

Os fagos T1A, T1B, M2F e R3D foram escolhidos para validação interna do processo de seleção de fagos ligantes de tecido e células. Os fagos T1A e R3D foram escolhidos para validação da ligação com os possíveis receptores devido ao grau de similaridade ao seu possível ligante. O fago T1A apresenta similaridade com a citocina OX40 em 6 dos 9 aminoácidos do peptídeo do fago, sendo todos com identidade total. O fago R3D apresenta similaridade com a citocina IL-21 em 5 dos 9 aminoácidos presentes no peptídeo, sendo todos aminoácidos com identidade total. O peptídeo apresentado pelo fago R2A faz similaridade ao Receptor de Vitamina D e 5 aminoácido dos 9 aminoácidos presentes no peptídeo, sendo 4 com identidade total e consecutivos.

4.6 Alinhamento específico entre o fago e o possível ligante identificado

Para identificar o potencial ligante dos fagos que fazem similaridade com proteínas envolvidas no metabolismo da Vitamina D, alinhamos a sequência total do Receptor de Vitamina D e do fago. Este alinhamento é mostrado na Figura 11. Este alinhamento foi possível, pois a estrutura cristalizada do receptor de Vitamina D está disponível no Banco de Dados. Entretanto, a proteína transportadora de Vitamina D, que o fago M2C faz similaridade, ainda não possui estrutura definida.

A partir do alinhamento obtido entre o Receptor de Vitamina D e a sequência que o fago apresenta, pudemos identificar que o fago R2A alinha-

se a um fragmento da sequência. Quando olhamos o modelo estrutural do receptor, podemos verificar que o alinhamento se dá em uma das alças da alfa hélice que compõe a estrutura do receptor.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

vitamin      MEAMAASTSLPDPGDFDRNVPRICGVCGDRATGFHFNAMTCEGCKGFFRRSMKRKALFTC 60
fago
-----
vitamin      PFNGDCRITKDNRRHCQACRLKRCVDIGMMKEFILTDEEVQKREMIKRRKFEELKDSL 120
fago
-----
                Domínio de Ligação ao DNA
vitamin      RPKLSEEQRIIAILLDAHHKTYDPTYSDFCQFRPPVRVMDGGGSHPSRPNSRHPTPSFSG 180
fago
-----
vitamin      DSSSSCSGDHCITSSDMMDSSTFNSLDLSEEDSDDPSTLELSQLSMLPHLADLVSYSIQK 240
fago
-----
                CQR 3
                *;
vitamin      VIGFAKMIPGFRDLTSEDQIVLLKSSAIEVIMLRSNESFTHDDMSWTCGNQDYKYRVSLV 300
fago
-----
                LVGFA 9
                : ; * * *
vitamin      TKAGHSLLEIPLIKFQVGLKLLHFEFHVLLMAICIVSPDRPGVQDAALIEAIQDRIS 360
fago
-----
                Domínio de ligação ao ligante (Vitamina D3)
vitamin      NTLQTYIRCRHPPPGSHLLYAKMIQKLADLRSLNEENSKQYRCLSFQPECSMKLTPLVLE 420
fago
-----
vitamin      VFGNEIS 427
fago
-----

```

Figura 11: Alinhamento da sequência total do receptor de Vitamina D (vitamin) e o fago R2A“.” – alinhamento com aminoácidos com cargas iguais, “*” – alinhamento total. Vermelho: aminoácidos pequenos e hidrofóbicos; Azul: aminoácidos ácidos; Magenta: aminoácidos básicos; Verde: aminoácidos formados por hidroxila+amina+radical básico; Cinza: outros.

Através do programa RasMol, disponível gratuitamente no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, tivemos acesso à estrutura tridimensional do VDR complexado ao seu ligante natural, ou seja, a Vitamina D₃. Esta análise confirmou que o peptídeo R2A apresenta similaridade com região de alfa-hélices da molécula do VDR. Na Figura 12 mostramos a posição do peptídeo identificado com o fago na estrutura do Receptor de Vitamina D.

Figura 12: Modelo estrutural do Receptor de Vitamina D associado ao ligante (Vitamina D₃). Em verde, estruturas alfa-hélices; em amarelo, estrutura em folha beta e, em azul, alças de integração estrutural.

Para validar a interação entre estes possíveis pares (fago-receptor) é necessário realizar um ensaio de ligação com os fagos correspondentes ao peptídeo selecionado e o material biológico com o qual eles foram selecionados.

4.7 Ensaio para Validação Molecular

4.7.1 Ensaio de ligação às células e ao fragmento de tecido tímico

Na primeira etapa de validação molecular, procuramos verificar a ligação dos fagos candidatos frente ao tipo celular com o qual foi

selecionado. Esta informação é importante para determinarmos quais fagos puderam ser selecionados devido à interação com seu possível ligante. Foram realizados 5 experimentos para o ensaio de ligação utilizando timócitos totais e ao fragmento do tecido tímico, e um ensaio utilizando timócitos CD4+CD25+. Nos gráficos apresentados mostramos a média da quantidade de fagos recuperados, o que indica a eficiência de ligação dos fagos selecionados para validação com timócitos totais. Para os testes de ligação utilizando o fragmento de tecido, utilizamos, um fragmento de tecido tímico para cada fago a ser testado. Sendo assim, no sentido de normalizar os valores obtidos, utilizamos o índice de unidades formadoras de colônias, no qual dividimos o valor obtido em unidades formadoras de colônia pelo peso do fragmento utilizado. Assim, podemos verificar a ligação efetiva do fago ao tecido, independente do tamanho do fragmento utilizado. Para os testes utilizando timócitos totais, utilizamos sempre 1×10^7 timócitos para o teste de ligação de cada fago, não havendo necessário a normalização dos dados pelo número de células.

No Gráfico 13 mostramos a ligação dos fagos selecionados para validação com o fragmento de tecido tímico.

Neste ensaio, verificamos uma ligação preferencial dos fagos M2C e M2F ao tecido tímico quando comparada à ligação do fago controle sem inserto (Fd) e àquela do fago RGD (controle positivo), que expressa um peptídeo que contém um motivo de integrina (RGD) que se liga a componentes da matriz de tecidos.

Ensaio de ligação ao tecido tímico

Figura 13: Ensaio de ligação dos fagos selecionados para validação frente ao tecido tímico.

M: fagos obtidos da seleção com o fragmento de tecido. Os outros números e letras referem-se à posição do fago na placa. Fd: fago sem inserto. iufc: índice de unidades formadoras de colônias (ufc/peso do tecido). RGD: fago controle positivo que apresenta um peptídeo com um motivo RGD de integrina

No Gráfico 14 mostramos a ligação dos fagos selecionados para validação utilizando timócitos totais. Neste ensaio, verificamos uma ligação preferencial dos fagos T1A, T1F e T2C a timócitos totais quando comparada à ligação do fago controle sem inserto (Fd). O fago T1B não apresentou ligação preferencial. A ligação preferencial encontrada com o fago T2C foi mais evidente quando comparada com a ligação do fago Fd e dos outros fagos estudados. Esta ligação preferencial pode ser devido ao fato de este fago carregar um peptídeo bastante representado no repertório de fagos seqüenciados.

Ensaio de ligação a timócitos totais

Figura 14: Ensaio de ligação dos fagos selecionados para validação a timócitos.

T: fagos com peptídeos obtidos da seleção de timócitos; Os outros números e letras referem-se à posição do fago na placa. Fd: fago sem inserto cfu: unidades formadoras de colônias.

No Gráfico 15 mostramos a eficiência de ligação do fago R2A selecionado para validação com os timócitos CD4+CD25+ em relação à ligação com os timócitos CD4-CD25-. Comparamos a ligação do fago à células com a qual foi selecionado e com a qual os fagos foram selecionados negativamente, na etapa de *pré-clearing*. A ligação do fago Fd em ambos os tipos celulares. Porém, a ligação do fago Fd ocorre de forma semelhante nos dois subtipos celulares

Ensaio de ligação do fago R2A à células

Figura 15: Ensaio de ligação do fago R2A selecionado para validação da ligação frente a timócitos CD4+CD25+. Comparação da ligação do fago R2A com as células CD4+CD25+ e CD4+CD25-. ufc: unidades formadoras de colônias

Neste ensaio, verificamos que o fago R2A (de timócitos CD4+CD25+) se liga preferencialmente às células CD4+CD25+ quando comparada com a ligação do fago R2A às células CD4+CD25-, células com as quais a biblioteca foi pré-absorvida. O fago controle sem inserto (Fd) liga-se de forma igual aos dois tipos celulares (dado não mostrado).

4.8 Ensaios de ligação do fago selecionado utilizando as possíveis proteínas ligantes.

Para verificar a ligação dos fagos a seus possíveis ligantes identificados no BLAST, iniciamos os ensaios de validação da interação

específica aos potenciais ligantes imobilizados em placa ou em membrana ou aderida ao seu Receptor, obtidos comercialmente em ensaios de ligação in vitro por bactérias, por Dot Blot e por ELISA.

4.8.1 Ensaio de Ligação com Bactérias

Para verificar a ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D₃, imobilizamos a 1,25 diidroxivitamina D₃ (forma ativa da Vitamina D₃) em placa de ELISA, fundo chato, e incubamos com os fagos a serem testados, amplificados em larga escala e, devidamente, titulados. Após o período de incubação, submetemos à infecção com bactérias. A relação entre o número de colônias verificado na ligação do fago de interesse com seu respectivo ligante e a ligação do fago testado com BSA (proteína não relacionada), bem como a ligação do fago controle Fd (sem inserto) à Vitamina D₃ e ao BSA, indicam a especificidade de ligação do fago com seu possível ligante.

Foram realizados 4 ensaios utilizando a Vitamina D₃ aderida em placa por infecção bacteriana. Dos 4 experimentos válidos, apenas um apresentou positividade para a ligação dos fagos que fazem similaridade para proteínas envolvidas com o metabolismo da Vitamina D₃ (R2A e M2C).

Na Figura 16 mostramos que o fago R2A ligou-se à Vitamina D₃ em 1 dos 4 experimentos realizados utilizando infecção bacteriana

Figura 16: Ensaio de ligação do fagos M2C e R2A selecionados para validação à Vitamina D imobilizada em placa e revelado por infecção bacteriana

Fd: fago sem inserto. ufc: unidades formadoras de colônias

4.8.2 Ensaios de Ligação por Dot Blot

Para verificar a ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D₃, realizamos, também, os ensaios de validação da interação específica utilizando *Dot Blot* e ELISA. Para os experimentos de *Dot Blot*, fizemos 5 ensaios mostrado na Figura 17.

Figura 17: Ensaio de ligação dos fagos M2C e R2A selecionados para validação com a Vitamina D₃ imobilizada em membrana de nitrocelulose por *Dot Blot*.

Em A, (1): controle positivo com streptoavidina imobilizada; (2), (3), (4) e (5): concentrações 5, 10, 100 e 50 µg de Vitamina D₃. Em B, C, D e E: controles positivos: (1) streptoavidina, (2) fago e (3) anti-fago, (4), (5) e (6): concentrações 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM, respectivamente, de Vitamina D₃. Fd – fago sem inserto (controle negativo), M2C e R2A, fagos teste.

No primeiro ensaio, misturamos quantidades equivalentes dos fagos M2C e R2A para testarmos a ligação dos fagos à Vitamina D₃ imobilizada na membrana de nitrocelulose. A seta na Figura 17 A indica a positividade sugerida para a ligação específica dos fagos à Vitamina D₃. Posteriormente, realizamos mais 4 experimentos avaliando a ligação dos fagos separadamente (figuras 17 B, C, D e E). Os ensaios de *Dot Blot* indicam que os fagos, separadamente, não se ligam à Vitamina D₃ imobilizada em membrana. Porém, não podemos determinar precisamente se a Vitamina D₃ se aderiu-se adequadamente à membrana.

4.8.3 Ensaio de Ligação por ELISA

Como uma outra forma de verificar a ligação do fago a Vitamina D₃, realizamos os ensaios de validação da interação específica do par peptídeo-ligante com ensaios de ligação in vitro dos fagos M2C e R2A ao seu potencial ligante, Vitamina D₃ por ELISA. Foram realizados 4 experimentos de ELISA com algumas pequenas diferenças descritas abaixo.

No primeiro experimento realizado, imobilizamos a Vitamina D₃ em placa e incubamos com os dois fagos amplificados em larga escala. Após o período de incubação, incubamos com anticorpo específico que reconhece proteínas do fago e revelamos com streptoavidina-peroxidase. A ligação do fago de interesse à Vitamina D₃ foi comparada com a ligação do fago Fd (controle) à Vitamina D₃ e do fago de interesse a BSA. A relação entre a densidade ótica apresentada pela ligação do fago de interesse com seu respectivo ligante e a densidade ótica apresentada pela ligação do fago Fd (controle) ao ligante, bem como a ligação dos fagos de interesse e do fago controle com BSA indicam a especificidade de ligação do fago com seu possível ligante. Quando esta relação apresenta índice acima de 1,5, indicamos como positiva a ligação entre o fago e o seu possível ligante.

No primeiro ensaio, misturamos quantidades equivalentes dos fagos M2C e R2A para testarmos a ligação dos fagos à Vitamina D₃ imobilizada na placa de ELISA. Na Figura 18 mostramos a ligação específica dos fagos, mesmo que próxima ao limite de detecção.

Ensaio de ligação - fagos M2C e R2A

Figura 18: Ensaio de ligação dos fagos selecionados (M2C e R2A) para validação com a Vitamina D imobilizada em placa por ELISA

CP fago aderido à placa; Strepto: streptoavidina aderida a placa; CN: BSA ☆ indicam positividade acima de linha limite. A linha pontilhada indica o ponto de corte de positividade do teste.

Posteriormente, foram realizados mais 3 ensaios de ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D por ELISA, utilizando os fagos separadamente. Quando avaliamos a relação entre a ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D e a ligação do fago Fd (controle) à Vitamina D (indicado por setas para o fago M2C e por triângulo para o fago R2A) verificamos positividade em 2 dos 3 experimentos realizados para o fago M2C, e positividade nos 3 experimentos para o fago R2A. Quando avaliamos a relação da ligação entre os fagos M2C e R2A e a ligação destes fagos à

BSA, podemos verificar positividade em 2 dos 3 experimentos realizados (indicado por uma estrela para o fago M2C e círculo para o fago R2A).

Figura 19: Índice de ligação do fago M2C e R2A e à Vitamina D. A linha pontilhada indica o ponto de corte de positividade do teste.

Para melhorar eficácia do teste tanto, imobilizamos o Receptor da Vitamina D₃, adquirido comercialmente, na placa de ELISA e depois incubamos com a Vitamina D₃. Como controle negativo, utilizamos BSA, Receptor de Vitamina D3 com os fagos de interesse (M2C e R2A) e com fago Fd (sem inserto).

Podemos verificar na Figura 20 a ligação do fago R2A ao Receptor de Vitamina D (VDR). Quando avaliamos a relação entre a ligação do fago à Vitamina D com o VDR, e do fago Fd nas mesmas condições (indicada pela seta) verificamos positividade (no limite de positividade) de ligação em 1 dos

3 experimentos realizados. Quando avaliamos a relação entre a ligação do fago à Vitamina D3 imobilizada com o receptor e a ligação do fago a BSA (indicada no gráfico por estrela), verificamos positividade em 2 dos 3 experimentos realizados. Quando comparamos a ligação do fago R2A ao receptor, na ausência de Vitamina D, e a ligação do fago Fd nas mesmas condições, verificamos positividade em 2 dos 3 experimentos realizados (indicada pelo triângulo).

Figura 20: Índice de ligação do fago R2A ao Receptor de Vitamina D. A linha pontilhada indica o ponto de corte de positividade do teste.

Alguns outros fagos selecionados frente a timócitos totais e timócitos CD4+CD25+ foram selecionados para validação molecular com o intuito de validarmos, internamente, a técnica de *phage display* para seleção de fagos ligantes de células. Os fagos escolhidos para validação fora o T1A, que

possui similaridade com a proteína OX40, e o fago R3D, que faz similaridade com a Interleucina-21. Ambos foram testados frente a seus respectivos ligantes, ou seja, o OX40 ligante e o Receptor de Interleucina-21. Para avaliarmos a ligação específica dos fagos selecionados, imobilizamos os respectivos receptores, em placa de ELISA, e incubamos com os dois fagos amplificados em larga escala. Após o período de incubação, incubamos com um anticorpo específico que reconhece proteínas do fago e revelamos com streptoavidina-peroxidase. A ligação dos fagos de interesse aos seus respectivos receptores foi comparada com a ligação do fago Fd (controle) aos receptores e dos fagos a BSA. A relação entre a densidade ótica apresentada pela ligação do fago de interesse com seu respectivo ligante e a densidade ótica apresentada pela ligação do fago Fd (controle) ao receptor, bem como a ligação dos fagos de interesse e do fago controle com BSA indicam a especificidade de ligação do fago com seu possível ligante.

Figura 21: Índice de ligação do fago T1A e R3D. A linha pontilhada indica o ponto de corte da positividade do teste

Podemos verificar na Figura 21 a ligação dos fagos T1A e R3D a seus possíveis ligantes identificados no *BLAST*. Quando avaliamos a relação entre a ligação dos fagos a seus possíveis ligantes e do fago Fd nas mesmas condições verificamos positividade dos fagos T1A (OX40) ao seu possível ligante, o Ligante de OX40 (OX40L) imobilizado em placa. Da mesma forma, verificamos ligação do fago R3D (IL-21) ao seu possível ligante, o Receptor de IL-21 (IL21R) imobilizado em placa. Apenas no primeiro experimento não verificamos ligação do fago T1A quando comparado com a ligação do fago Fd ao ligante de OX40.

4.9 Ensaio de Validação Funcional

Para validarmos a influência da Vitamina D₃ sobre a geração ou expansão de células T CD4+CD25 tímicas (células reguladoras naturais), cultivamos timócitos totais com concentrações diferentes de 1,25 diidroxivitamina D₃, forma ativa da Vitamina D₃, e mantivemos em cultura por 5 dias. Terminado o tempo de cultura, avaliamos a expressão dos marcadores CD4 e CD25 nas condições de cultura com e sem Vitamina D₃, como mostra a Figura 21.

Foram realizados 7 ensaios de cultura dos quais, nos experimentos 1 e 2 podemos verificar maior porcentagem de células CD4+CD25+ na concentração de 40 nM quando comparadas com a situação de cultura sem Vitamina D₃. No experimento 1, a porcentagem de células CD4+CD25+ na

cultura sem estímulo com Vitamina D foi de 23% enquanto que em cultura com 40 nM de Vitamina D₃ foi de 65%. No experimento 2, a porcentagem de células na cultura sem estímulo de Vitamina D₃ foi de 12%, enquanto que na cultura com 40 nM de Vitamina D₃ foi de 23%. Nos outros 5 experimentos, não verificamos um aumento de células CD4+CD25+ induzida por Vitamina D₃

Figura 22: Imunofenotipagem por FACS. Eixo X: porcentagem de células CD4+CD25+. Eixo Y: diferentes experimentos

SE: sem estímulo da Vitamina D₃; VitD: 1,25-diidroxivitamina D₃

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nosso objetivo principal foi identificar novas moléculas presentes em células T reguladoras CD4+CD25+ do timo humano, potencialmente importantes para o seu desenvolvimento e sua atividade funcional, utilizando a tecnologia de *phage display*. A principal vantagem nessa abordagem de estudo molecular é a possibilidade de se identificar um grande número de pares proteína-receptor expressos em tipos diferentes de células.

Neste trabalho, grande esforço foi depreendido no isolamento de populações puras de células CD4+CD25+ a partir de timócitos. Utilizamos inicialmente, diversos *kits* para separação por anticorpos ligados a contas magnéticas (Dyna, MACS) que se mostraram inadequados em relação ao rendimento, à viabilidade e à pureza da população de timócitos CD4+CD25+ obtida, a despeito de termos seguido todas as especificações dos fabricantes. Avaliando a literatura mais recente sobre as células T reguladoras, a estratégia que passamos a adotar foi a de separação de células CD4+CD25+ utilizando o citômetro de fluxo de alta pressão, FACSria, que fizemos em colaboração do Prof Dr. Keith Okamoto e Luciana Cavalcanti Marti do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein. Realizamos, então, 4 ciclos de separação de timócitos CD4+CD25+ por citometria de fluxo. Apesar de utilizar um equipamento de alta performance, a pureza obtida não foi ideal; em média 53,3%, sendo a melhor separação de 72,6% de pureza e a pior de 39,8%. Realizamos, então, os 4

ciclos de separação de fagos (*biopannings*) nestas populações enriquecidas, nas quais a população de timócitos CD4+CD25+ foi a população predominante. Considerando que a população de células CD4+CD25+ perfaz 2 a 10% do total de células CD4 (tanto no timo quanto na periferia), utilizamos para o *biopanning* populações em que a fração de células CD4+CD25+ estava majoritariamente representada. A utilização de populações de baixa pureza em *phage display* pode implicar na seleção de fagos que possivelmente se ligaram a outros tipos celulares, contaminantes da população total, e não apenas da população desejada, no nosso caso, timócitos CD4+CD25+. Entretanto, na etapa de *pre-clearing* foram subtraídos da biblioteca inicial os ligantes de outros tipos celulares, reduzindo a possibilidade de seleção de fagos ligantes de outros tipos celulares.

Aplicamos a técnica de *phage display* em três materiais biológicos diferentes: fragmento de tecido tímico, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+. Para selecionar um peptídeo dentre os fagos obtidos das seleções, avaliamos alguns parâmetros de validação interna da técnica de *phage display*. Avaliamos parâmetros como o enriquecimento de seqüências, após o *biopanning*, e a representatividade de cada peptídeo no repertório total de fagos selecionados. O enriquecimento de fagos pode ser verificado pelo aumento da quantidade de fagos recuperados ao longo dos ciclos de seleção, e a representatividade do peptídeo é avaliada pelo número de vezes que o mesmo peptídeo está presente no repertório total de fagos obtidos. Avaliamos, também, a similaridade dos peptídeos com

proteínas depositadas no banco de dados, parâmetro esse que nos sugere que proteína o fago pode ter interagido, além da ligação específica com a célula, ou tecido, com o qual o fago foi selecionado, bem como a interação com seu possível ligante.

No *biopanning* realizado no fragmento de tecido tímico, não verificamos um enriquecimento de fagos selecionados (Figura 7), pois recuperamos quantidades semelhantes de fagos em todos os ciclos de seleção. Entretanto, no seqüenciamento dos 12 fagos seqüenciados, 9 peptídeos estavam presentes, o que mostra um enriquecimento de seqüências, a despeito da quantidade de fagos ter sido igual. Vale ressaltar que nesta abordagem de seleção de fagos não há uma etapa de *pre-clearing* e não há a separação física dos fagos não ligantes, o que pode ser uma das possíveis explicações para o não enriquecimento em número de fagos. No *biopanning* realizado em timócitos totais, verificamos um enriquecimento em número de fagos selecionados, pois recuperamos 10 vezes mais fagos do que nas etapas anteriores (Figura 8). No seqüenciamento, observamos que dos 27 fagos seqüenciados, encontramos 12 peptídeos diferentes, o que significa um enriquecimento na quantidade de fagos recuperados e de seqüência de fagos selecionados. Em nossos resultados com populações enriquecidas para timócitos CD4+CD25+, o enriquecimento para o número de fagos não ocorreu como observado para os timócitos totais, como esperávamos. Nos três primeiros ciclos de seleção com populações de CD4+CD25+ com purezas de 44,4%, 57% e 39% (Figura 6), verificamos um enriquecimento no número de fagos recuperados. Por utilizarmos nestas três primeiras etapas

populações com baixa pureza para CD4+CD25+, optamos por fazer um quarto ciclo de seleção, como o intuito de obter mais fagos direcionados à população enriquecida. No quarto ciclo, utilizamos uma população celular que continha 72,7% de timócitos CD4+CD25+ (Figura 6), a maior pureza conseguida, e verificamos uma queda na quantidade de fagos recuperados (Figura 9, quarto ciclo). A queda na quantidade de fagos recuperados talvez possa ser atribuída ao fato de termos selecionado os fagos do quarto ciclo frente a uma população mais pura de timócitos CD4+CD25+. Deste modo, é possível que os fagos que não eram específicos tenham sido selecionados negativamente nesta nova seleção. Optamos por seqüenciar os fagos deste quarto ciclo, devido à possibilidade de conter fagos com maior especificidade para os timócitos CD4+CD25+. Entretanto, no seqüenciamento não encontramos fagos repetidos. Não há um consenso na literatura sobre o número ciclos de seleção ideal para obter esse enriquecimento. Há outros trabalhos nos quais foi utilizada a técnica de *phage display* para selecionar fagos ligantes de células e tecidos também sem enriquecimento de fagos e/ou seqüências, e, porém, com seleção bem sucedida de peptídeos importantes para a pergunta biológica. Um exemplo são os trabalhos de Arap e colaboradores, nos quais utilizaram a biblioteca de *phage display* para selecionar peptídeos que mapeassem o endotélio vascular humano e murino. Nestes trabalhos, utilizando um único ciclo de seleção para selecionar fagos do endotélio humano (Arap, W. 2002) e 3 ciclos para selecionar fagos no sistema murino (Pasqualini, R. 1995), os pesquisadores foram capazes de selecionar peptídeos capazes de se direcionar para

tecidos como próstata, rins, fígado, pâncreas, retina, intestino, útero e glândula adrenal. Em outros trabalhos, moléculas como GRP78, CD13, IL-11R, HSP90, entre outras, foram alvos selecionados a partir dos peptídeos dos fagos ligantes de tecidos tumorais (Kolonin, M. 2001; Trepel, M. 2002; Arap, M.A. 2004). Estes dados indicam que o enriquecimento da biblioteca é um indício de que foi possível direcionar a biblioteca para fagos de ligantes específicos, entretanto é possível selecionar ligantes importantes para a biologia do tecido a ser estudado, mesmo sem obter enriquecimento de fagos. Sendo assim, acreditamos que no repertório de fagos selecionados frente os três materiais biológicos possam existir fagos direcionados aos timócitos CD4+CD25+, bem como direcionadas às proteínas reconhecidas no timo pelas células CD4+CD25+, durante o desenvolvimento tímico.

Realizamos uma análise molecular do repertório dos peptídeos obtidos nos fagos selecionados para uma comparação entre os três tipos de material biológico. Dos 57 peptídeos selecionados, 12 foram obtidos da seleção frente ao tecido tímico, 18 frente a timócitos totais e 27 frente a timócitos CD4+CD25+. Os peptídeos obtidos da seleção frente ao fragmento de tecido tímico foram peptídeos hidrofílicos e predominantemente básicos, poucos peptídeos ácidos e neutros. Os peptídeos obtidos da seleção frente a timócitos totais e timócitos CD4+CD25+ distribuíram-se igualmente quanto ao perfil de hidropaticidade, ácidos e básicos, com poucos peptídeos neutros. É interessante ressaltar que no repertório de peptídeos selecionados frente a timócitos CD4+CD25+, muitos dos peptídeos possuíam aminoácidos aromáticos em sua composição, muito mais do que

encontrados frente aos outros tipos celulares. Apesar de não sabermos se esta característica pode ter algum significado biológico a respeito das células T CD4+CD25+ reguladoras do timo, podemos levantar algumas questões para discussão. Os aminoácidos aromáticos são relativamente hidrofóbicos e participam, principalmente, das interações lipídeo-proteína, como ocorre na interface transmembrânica de proteínas da superfície celular. Outra função importante dos aminoácidos aromáticos está na propriedade de formar pontes de hidrogênio entre os aminoácidos, propriedade funcionalmente importante para a atividade funcional de algumas enzimas. Entretanto, se estas diferenças encontradas nos repertórios de fagos selecionados se traduzem em diferenças funcionais nestas células são questões a serem investigadas futuramente.

Apesar da limitação de enriquecimento de fagos e seqüências de peptídeos nas células CD4+CD25+, as sugestões obtidas no alinhamento desses peptídeos com moléculas depositadas em banco de dados foram interessantes em relação à nossa pergunta biológica. Vale destacar que a tecnologia do *phage display* tem sido mais empregada com sucesso para identificação de epitopos de anticorpos, entretanto, não são muitos os trabalhos envolvendo *phage display* em linfócitos T ou timócitos. Na maioria dos trabalhos utiliza-se biblioteca de anticorpos *phage display* para identificar moléculas presentes no timo (Van Ewijk, W. 1997).

Em nosso trabalho, visando identificar moléculas ligantes dos nossos fagos, realizamos a análise no *BLAST*, limitando o banco de dados para *Mamalia*. Apesar disso, cada fago gerou, aproximadamente, 1000

possibilidades de similaridade molecular. Analisamos as sugestões de similaridade molecular utilizando os critérios que estabelecemos em nosso laboratório, no sentido de sistematizar a nossa busca. Como critérios de escolha, procuramos nas seqüências do peptídeo do fago, 3 ou mais aminoácidos consecutivos iguais ao da seqüência sugerida pelo banco de dados, e analisamos cada sugestão de similaridade (*hit*), considerando a relevância biológica de cada sugestão em relação à nossa pergunta biológica. Todos os resultados obtidos desta análise estão no Anexo III.

Em uma análise ampla dos resultados obtidos no *BLAST* dos fagos selecionados frente a timócitos e ao fragmento de tecido com o banco de dados, observamos que muitos fagos apresentaram similaridade com fatores de crescimento, como FGF-23, fatores envolvidos na angiogênese (EGF, FELE-1), moléculas acessórias, como o gp130, moléculas HLA, e fatores envolvidos na maturação de células hematopoiéticas, como CD98 e imunoglobulinas. Outras sugestões destes *BLASTs* foram de especial interesse em relação à imunorregulação, como CTLA-4, uma proteína relacionada com a inibição da ativação de células T, e FEX-2, uma nova molécula de adesão celular da superfamília do Fas-1, que pode estar envolvida nas interações celulares, cujo possível mecanismo é a inibição da proliferação e ativação celular. A identificação de fatores de crescimento, moléculas acessórias, fatores que inibem ou estimulam a produção de citocinas, receptores de antígenos não peptídicos, entre outras moléculas possivelmente envolvidas no processo de maturação dos linfócitos T, pode nos ajudar a melhor compreender como é composto o ambiente onde as

células T se desenvolvem. É importante ressaltar que analisamos os peptídeos obtidos da seleção de fagos ligantes a timócitos, assim como do fragmento do timo, tecido onde as células T amadurecem e do qual emergem células efectoras, auxiliares, reguladoras, entre outras; onde estão presentes células dendríticas, monócitos, macrófagos, células do estroma, entre outras. Deste modo, a grande diversidade de peptídeos encontrados e de moléculas que são sugeridas no banco de dados não foi surpreendente.

Da análise no *BLAST* com os fagos obtidos na seleção com timócitos CD4+CD25+, observamos similaridades com proteínas que estão associadas a diversos tipos celulares, a algumas condições patológicas e a vários grupos funcionais de moléculas. Encontramos moléculas associadas a células dendríticas, como, por exemplo, o MEGF5 (homólogo ao slit-1) e outras isoformas, moléculas estas associadas à inibição da migração de células dendríticas e inibição da resposta imune (Guan, H. 2003). Outra molécula foi o DEC205, receptor endocítico encontrado em algumas populações de células dendríticas CD8⁺ (Gliddon, D.R. 2004). Como podemos observar, diversas sugestões de similaridade molecular estão relacionadas a imunorregulação, reforçando a potencial relevância dos fagos selecionados com células CD4+CD25+ reguladoras. Outros fagos apresentaram similaridades com antígenos de outros tecidos, como glucagon, insulina, polipeptídeo pancreático e proteínas da córnea. Estas sugestões são bem interessantes, uma vez que já está descrito na literatura que há a expressão no timo de moléculas tecido específicas e que estes auto-antígenos têm papel na seleção de linfócitos T no timo, inclusive de

células T reguladoras (Rizzi, M. 2006). É importante destacar que o TGF- β , bem como seus diferentes receptores e proteínas associadas com sua atividade apareceram em várias sugestões em diferentes peptídeos selecionados frente a células CD4+CD25+ reguladoras. Já é conhecido na literatura que o TGF- β é capaz de promover a geração de células T reguladoras Foxp3+ através da sinalização via TCR e CD28 (Pyzik, M. 2007). Esta sugestão de similaridade, apesar de trazer uma molécula já sabidamente conhecida na imunorregulação de células T reguladoras CD4+CD25+, tanto tímicas quanto periféricas, mais uma vez reforça a validade interna de nossa abordagem técnica para a identificação de moléculas relevantes para a geração e/ou atividade reguladora das células CD4+CD25+.

Para escolhermos os fagos a serem validados, tanto molecular quanto funcionalmente, utilizamos inicialmente o critério baseado no número de vezes que a seqüência do peptídeo estava presente e na similaridade com proteínas depositadas nos bancos de dados. A seqüência dos fagos T1A, T1B, M2C, R2A e R3D estavam presentes uma vez no repertório de fagos, o fago T1A e M2F estavam presentes duas vezes, o fago T1F estava presente três vezes e o fago T2C estava presente nove vezes no repertório total de peptídeos. Quando avaliamos a ligação dos fagos escolhidos frente ao material biológico com o qual cada fago foi selecionado, os fagos T1A, T2C, M2C, M2F e R2A apresentaram melhor eficiência de ligação quando comparada à ligação com o fago Fd (fago controle sem inserto) (Figuras 13, 14 e 15). Os fagos T1B e T1F (Figura 14) não apresentaram ligação

preferencial em qualquer um dos ensaios, a despeito de apresentarem um peptídeo cuja seqüência esteve presente no repertório de peptídeos selecionados. Assim, prosseguimos a validação molecular com os fagos T1A e R3D, que seria útil como controle interno da técnica, e os fagos M2C e R2A para a validação de moléculas que podem estar envolvidas na diferenciação de células no timo e na atividade funcional das células T reguladoras CD4+CD25+.

É importante ressaltar que como o *phage display* é uma abordagem técnica de alta complexidade, que fornece um grande volume de dados, é necessário escolher, dentre as diversas sugestões, algumas de maior interesse para dar continuidade ao processo de validação. Esta etapa de “escolha” ainda não está sistematizada para o maior aproveitamento informativo do *phage display*, e a escolha é muito baseada nos conhecimentos dos pesquisadores envolvidos, e mesmo na intuição em confronto com a pergunta biológica do projeto. Estamos em discussão com pesquisadores da matemática e bioinformática, na busca da elaboração de algoritmos que possam otimizar as estratégias de escolha das sugestões. No entanto, ainda não temos um produto para uso. Assim, no presente trabalho, fizemos a primeira escolha com base na nossa pergunta biológica, sabendo que poderemos explorar as outras sugestões futuramente. Dentre os fagos selecionados, os fagos escolhidos para a validação foram o M2C, fago que possui um peptídeo com similaridade à Proteína Transportadora de Vitamina D (VDBP, do inglês *Vitamin D Binding Protein*), e o R2A, que possui similaridade ao Receptor de Vitamina D (VDR, do inglês *Vitamin D*

Receptor). O envolvimento da Vitamina D₃ nos processos de tolerância nos motivou a investigar a possível influência da Vitamina D na diferenciação das células reguladoras no timo.

O peptídeo R2A alinha-se ao fragmento 238 a 245 da sequência do Receptor de Vitamina D. Esta região forma, estruturalmente, uma alfa-hélice e localiza-se no exterior do Receptor, como mostra a Figura 12. O Receptor de Vitamina D é um membro da superfamília de receptores nucleares para esteróides. Somente um subtipo de Receptor de Vitamina D foi caracterizado até o momento e somente a 1,25-diidroxivitamina D₃ é capaz de se associar ao VDR e influenciar, diretamente, a regulação transcricional. O VDR é ativado quando seus ligantes interagem com o receptor, promovendo a dimerização destes. A alteração estrutural faz com que o Receptor da Vitamina D, dimerizado com outro Receptor de Vitamina D ou com outro receptor nuclear, migre para o núcleo, onde encontra os elementos responsivos à Vitamina D (VDRE, do inglês, ***Vitamin D Responsive Elements***). Este complexo protéico liga-se ao VDRE, incorpora outros complexos protéicos, alterando a ação transcricional da RNA polimerase II (Jurutka, P.W. 2001). Classicamente, este complexo tem sido associado à regulação transcricional de genes associados à homeostase cálcio-fósforo (Pritchard, J. 2007). Entretanto, a expressão de Receptor de Vitamina D em células mielóides e linfócitos sugerem que a Vitamina D possa ter outras ações metabólicas associadas à imunobiologia e à manutenção da homeostase do sistema imune. Neste sentido, vale destacar que as células dendríticas foram descritas como alvos primários para a atividade imunomoduladora da

1,25-diidroxivitamina D₃. Nestas células, a 1,25-diidroxivitamina D₃ pode inibir a diferenciação e maturação das células dendríticas através da modulação da expressão de citocinas e moléculas co-estimuladoras, moléculas MHC-II e IL-12, além de promover a expressão de IL-10 e a apoptose em células dendríticas (Decallonne, B. 2005). Esta regulação é mediada pela interferência entre o VDR e outros fatores nucleares como NF-AT e NFκB, ou pela interação direta com os elementos responsivos, promovendo a transcrição de diversos genes, tais como IL-2, IL-12, GM-CSF, IFNγ, MHCII, entre outros.

Vários mecanismos têm sido identificados nos quais a 1,25-diidroxivitamina D₃, forma ativa da Vitamina D₃, pode influenciar a resposta imune em órgãos linfóides periféricos e em modelos de doenças auto-imunes (Gregori, S. 2002; Kralova, J. 2002; Adorini, L. 2003; Adorini, L. 2003). Já foi mostrado, em diferentes modelos de doenças auto-imunes, que a 1,25-diidroxivitamina D₃ pode suprimir a encefalomielite experimental, artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, diabetes tipo 1 e IBD em modelos murinos (Gomme, P.T. 2004). O possível mecanismo supressor da Vitamina D está na sua capacidade de estimular a produção de TGFβ-1 e IL-10 em células dendríticas, citocinas capazes de suprimir a ação inflamatória das células T. A 1,25-diidroxivitamina D₃ também é capaz de suprimir a expressão de IL-12, IFNγ, e de regular negativamente a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86 em células dendríticas (Adorini, L. 2003). Em alguns estudos é apontado que uma das funções da 1,25-diidroxivitamina D₃ seria a de modular a ação tolerogênica

das células apresentadoras de antígeno, principalmente das células dendríticas, durante a geração das células T reguladoras na periferia (Adorini, L. 2003). Por outro lado, linfócitos T também são alvos diretos das ações da Vitamina D₃. Cultura de linfócitos T com 1,25-diidroxitamina D₃ reduz a produção e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, TNF α e IFN γ e aumentam a expressão de IL-4 e TGF β (Cantorna, M.T. 1998). Além disso, o cultivo de células T com uma combinação de Vitamina D₃ e dexametasona é capaz de induzir células T CD4+ *naive*, tanto de camundongos quanto de humanos, a se diferenciarem em células T reguladoras produtoras de IL-10 (Ito, T. 2006). *In vivo*, foi observado que o tratamento com 1,25-diidroxitamina D₃ promoveu o aumento da sobrevivência do aloenxerto e supressão da diabetes tipo I, em modelos animais (Overbergh, L. 2000; Gregori, S. 2001). Porém, o uso da 1,25-diidroxitamina D₃ na clínica mostrou ser tóxico devido ao envolvimento da Vitamina D no equilíbrio iônico do cálcio, levando a um aumento na absorção de cálcio e reabsorção óssea, resultando em hipercalcemia, a qual pode levar à deposição de cálcio em muitos órgãos, particularmente as artérias e rins. Cabe o desafio de se encontrar novos produtos que possam atuar da mesma maneira que a Vitamina D, sem provocar os efeitos colaterais, bem como estudar a importância da Vitamina D no desenvolvimento fisiológico das células T reguladoras no timo e a sua influência na sua atividade reguladora de células T reguladoras na periferia.

Esses fagos selecionados com base na similaridade com proteínas associadas ao metabolismo da Vitamina D precisam ser validados molecular

e funcionalmente para sustentar a hipótese levantada. A primeira etapa de validação foi verificar a ligação dos fagos às células T CD4+CD25+ e timo, com os quais eles foram selecionados. Nos ensaios de ligação utilizando células, quando comparamos a ligação do fago R2A com as células CD4+CD25+ e CD4+CD25-, verificamos maior ligação com os timócitos CD4+CD25+ (Figura 15). Nos ensaios de ligação utilizando o fragmento de tecido tímico, quando comparamos a ligação do fago M2C com tecido em relação com a ligação do fago Fd, verificamos maior ligação do fago M2C ao tecido tímico (Figura 13). A partir destes ensaios, podemos concluir que os fagos se ligam ao material biológico que foram selecionados.

Vários testes foram aplicados para avaliar a interação específica do peptídeo apresentado pelos fagos R2A e M2C, escolhidos para validação, com o seu possível ligante. Nos testes em que utilizamos infecção bacteriana para avaliar a interação peptídeo-ligante, em apenas 1 dos 4 testes realizados mostrou positividade (Figura 16). Este tipo de ensaio de ligação por bactérias, geralmente apresenta variabilidade por se tratar de um sistema em que o resultado depende da capacidade de infecção da bactéria no dia do teste. Utilizamos como controle interno da reação a interação do fago de interesse com uma proteína não relacionada, como BSA, por exemplo, e a interação do fago sem inserto (Fd) com o receptor de interesse. A relação entre o número de colônias obtidas na situação teste (fago-receptor candidato) e os controles (fago-BSA e Fd-proteína) indica se a interação entre o peptídeo do fago e o receptor candidato ocorre ou não. Entretanto, quando a interação entre o peptídeo do fago e a proteína

candidata ocorre com alta afinidade, podemos identificar uma diferença significativa na relação da quantidade de colônias recuperadas na situação do fago com a proteína de interesse e seus controles internos. Vale mencionar que não existe um consenso na literatura sobre quanto essa diferença pode ser considerada significativa. Como parâmetro para analisar nossos resultados do ensaio de ligação, avaliamos os recentes trabalhos publicados com *phage display* nos quais utilizam-se as mesmas abordagens técnicas de validação. Em trabalho publicado por Arap e colaboradores avaliou-se a interação do fago selecionado frente aos anticorpos circulantes de pacientes com tumor metastático de próstata (nomeado GRP78 *binding peptides*), que apresentam um peptídeo que se liga ao GRP78, em ensaios semelhantes aos ensaios realizados neste trabalho (Arap, M.A. 2004). Neste trabalho, o peptídeo selecionado a partir da biblioteca de *phage display* apresentou ligação à GRP78 até 9 vezes maior que os controles em três ensaios consecutivos, indicando que o fago se liga especificamente à GRP78 através da interação específica do peptídeo com o receptor. À luz destes trabalhos e de acordo com parâmetros utilizados para validação, podemos concluir que nesses nossos experimentos com bactérias, não verificamos a interação entre o peptídeo do fago e a Vitamina D, pois em apenas um ensaio dos quatro realizados, os fagos apresentaram ligação à Vitamina D imobilizada.

Analisando esses nossos resultados de validação molecular, poderíamos concluir que a ligação dos nossos fagos selecionados não ocorreu de forma específica com a Vitamina D. No entanto, algumas

questões merecem ser consideradas. Além da variabilidade do teste ser dependente da capacidade infectiva das bactérias, outra possibilidade para explicar a variabilidade apresentada pode ser devido às propriedades moleculares da Vitamina D. Por ser uma molécula lipofílica, a adsorção à placa utilizada no teste pode ser comprometida. Uma dificuldade adicional, é não termos um anticorpo anti-vitamina D para verificar se a ligação da Vitamina D ocorreu, de forma adequada, na placa. No sentido de amenizar estes problemas, utilizamos outras duas formas de avaliar a interação do fago com a Vitamina D; *Dot Blot* e ELISA. Estes testes são, frequentemente, utilizados para avaliar a interação entre fago e receptor candidato em sistemas em que se utiliza *phage* de anticorpos, ou quando a interação entre o fago e o possível receptor ocorre com baixa afinidade, e o ensaio de bactérias não possui sensibilidade para detectar estas pequenas diferenças. Realizamos 5 experimentos de *Dot Blot*, dos quais apenas um apresentou positividade (Figura 17) quando utilizamos os fagos M2C e R2A misturados. No ensaio mostrado na Figura 17 A podemos identificar uma diferença no perfil de reatividade para o *blot* dos fagos M2C e R2A com a Vitamina D. Porém, este perfil diferenciado de reatividade não foi confirmado em testes posteriores. Sendo assim, podemos concluir, por estes parâmetros, que a interação dos fagos com a Vitamina D não foi confirmada de forma constante. Entretanto, mais uma vez, lidamos com a possibilidade de a Vitamina D, por ser uma molécula lipofílica, não ter aderido com eficiência na membrana de nitrocelulose, como ocorreu nos ensaios de ligação por bactérias.

Quando avaliamos a interação específica do fago à Vitamina D utilizando ELISA, ainda observamos, uma variabilidade dos diferentes ensaios. Porém, por ser um ensaio mais sensível, pudemos identificar de forma mais confiável a interação entre os pares fago-ligante, mesmo que tenha ocorrido com baixa afinidade. A partir de nossos ensaios de ELISA, podemos concluir que os tanto o fago M2C (selecionado com tecido tímico) quanto o fago R2A (selecionado com timócitos CD4+CD25+) se ligaram à Vitamina D imobilizada em placa de ELISA, tanto nos testes em que imobilizamos a Vitamina D à placa, bem como nos testes em que imobilizamos o Receptor de Vitamina D, adquirido comercialmente e, posteriormente, imobilizados com a Vitamina D. Entretanto, esta interação ocorre de baixa afinidade, e isto pode ser verificado quando comparamos a ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D com a ligação dos fagos à BSA ou a ligação do fago Fd à Vitamina D. Verificamos que esta ligação ocorreu, apenas, 2 a 3 vezes maior para o fago M2C e 1,5 a 2 vezes maior para o fago R2A do que os controles negativos (Figura 19). Utilizamos o Receptor de Vitamina D com o intuito de certificarmos que a Vitamina D estivesse aderida à placa. Quando comparamos a ligação dos fagos M2C e R2A à Vitamina D e receptor com a ligação dos fagos à BSA ou a ligação do fago Fd à Vitamina D e receptor verificamos que ligação do fago R2A ocorreu, apenas, 2 vezes maior para o fago R2A na ligação ao Receptor de Vitamina D sozinho (Figura 20). Por fim, podemos concluir que a ligação específica dos clones de fagos M2C e R2A à Vitamina D ocorreu, quando avaliamos por ELISA.

Vale lembrar que utilizamos um sistema de apresentação de peptídeos expresso em fagos filamentosos. Os nossos fagos fazem similaridade com proteínas relacionadas com o metabolismo da Vitamina D. O fago M2C (selecionado do fragmento de tecido tímico) faz similaridade com Proteína Transportadora de Vitamina D, e o fago R2A (selecionado de células CD4+CD25+ tímicas) faz similaridade com o Receptor de Vitamina D. Assim, acreditamos ser possível que estes fagos tenham encontrado com a Vitamina D, nas células CD4+CD25+, complexada ao seu receptor, durante os ciclos de seleção, e os resultados dos ensaios de ligação com a Vitamina D nos dão apoio para esta interpretação.

Poucos são os trabalhos que avaliam a influência imunomoduladora da Vitamina D em timócitos, sem o auxílio de drogas imunossupressoras. Decallone e colaboradores avaliaram a influência da 1,25-diidroxitamina D₃ na resistência à apoptose dos timócitos em camundongos NOD, como modelo de diabetes (Decallonne, B. 2005). A administração de 1,25-diidroxitamina D₃ nestes animais foi suficiente para restaurar o padrão de apoptose dos timócitos nos animais tratados. Outros trabalhos mostraram que a Vitamina D pode induzir a geração de células reguladoras através da modulação de das células apresentadoras de antígeno, porém este fenômeno não foi avalado para as células do timo (Adorini, L. 2004; Ardalan, M.R. 2007). Deste modo, a hipótese é que a Vitamina D possa ter um papel no desenvolvimento da células T reguladoras CD4+CD25+ e mesmo na sua atividade funcional.

No sentido de avaliar a influência funcional na expansão, diferenciação das células T reguladoras CD4+CD25+ tímicas, cultivamos timócitos totais com diferentes concentrações de 1,25-diidroxitamina D₃ e analisamos, por citometria de fluxo, a expressão dos marcadores CD4+ e CD25+. Dos sete experimentos realizados, apenas dois (experimento 1 e 2 mostrados na Figura 22) apresentaram aumento na quantidade de células CD4+CD25+ na situação de cultura com 20 nM e 40 nM, respectivamente. Podemos concluir que a Vitamina D não influenciou na geração, ou expansão, de células CD4+CD25+ tímicas nessas condições de cultura. Vale lembrar que linfócitos T também são alvos diretos das ações imunossupressoras da Vitamina D₃. Porém, não se sabe, ainda, se a Vitamina D pode induzir o fenótipo regulador nos linfócitos T diretamente, ou se a presença de células dendríticas seja necessário para a geração de células reguladoras.

De maneira interessante e surpreendente, quando avaliamos a interação do fago R2A e o receptor de Vitamina D na ausência da Vitamina D, verificamos que o fago R2A interagem, também, com o próprio receptor, como mostra a Figura 19. A interação entre Receptores de Vitamina D e outros receptores nucleares, como RXR (receptor de Retinóide X), RAR (receptor de ácido retinóico), PPAR (principalmente a isoforma gama) entre outros, ocorre fisiologicamente. Sabendo que os receptores hormonais atuam no núcleo e são funcionais quando dimerizados, podemos levantar como hipótese que o nosso fago possa ter interagido com outro receptor nuclear durante a sua seleção, e não necessariamente com a Vitamina D, como pensamos. Já foi descrito que os receptores nucleares para

esteróides, VDR, RAR, RXR, TR, entre outros, dimerizam para compor o complexo ativo que atua no núcleo (Barsony, J. 2002).

Em recente trabalho, utilizando modelo animal para indução de tolerância oral, Coombes e colaboradores utilizaram o ácido retinóico e verificaram que a administração desta vitamina promovia a remissão da colite através do recrutamento e/ou diferenciação de células reguladoras no sítio da inflamação (Coombes, J.L. 2007). Em outro trabalho, utilizando metabólito da Vitamina A, Mucida e colaboradores foram capazes de induzir células Foxp3⁺ em cultura de linfócitos CD4 com ácido retinóico, bem como foram capazes de induzir tolerância no modelo de colite autoimune, quando administrando com ácido retinóico, fenômeno associado ao aumento da quantidade de células Foxp3 no intestino. Além disso, em experimentos de cultura celular, a adição de ácido retinoico foi suficiente para bloquear a indução de células Th17, mesmo em presença de TGFβ e IL-6 (Mucida, D. 2007). A partir destes dados, acredita-se que o ácido retinóico atue como um co-fator, induzindo a expressão de Foxp3 e induzindo a atividade reguladora (Coombes, J.L. 2007; Mucida, D. 2007).

O ácido retinóico é o metabólito ativo da Vitamina A, que regula a taxa de crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Devido à possibilidade das configurações moleculares *cis-trans* da cadeia lateral, existem vários isômeros do ácido retinóico: *all-trans*-ácido retinóico (tretinoína), *13-cis*-ácido retinóico (isotretinoína) e *9-cis*-ácido retinóico (Husmann, M. 1991). A ação do ácido retinóico é obtida através da ligação com receptores específicos, que fazem parte da superfamília de receptores

nucleares. Existem 2 tipos: o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor de retinóide X (RXR) (Duester, G. 1991). Cada família apresenta os subtipos α , β e γ . RAR e RXR atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, modulando a expressão dos genes responsivos ao ácido retinóico. As concentrações fisiológicas dos retinóides têm sido implicadas com resistência orgânica contra as infecções. Contudo, há apenas duas décadas estudos sistemáticos têm sido conduzidos sobre esse tópico. Nesse contexto, há dados nos quais é discutido que os retinóides modulam a resposta de células fagocitárias, estimulando a fagocitose, a ativação da citotoxicidade mediada por células e o aumento na resposta de timócitos a mitógenos específicos, aparentemente por aumentarem a expressão de receptores de interleucina-2 em suas células precursoras (Felli, M.P. 1991; Lucibello, F.C. 1991; Kang, S.G. 2007). O ácido retinóico proporciona a liberação seletiva de interleucina-1 em monócitos do sangue periférico em seres humanos (Garbe A, Buck J, Hammerling ,1992). A deficiência de vitamina A está associada à redução da atividade de células NK e à habilidade de células esplênicas em produzir interferon após o estímulo de mitógenos.

A partir destes dados, levantamos como hipótese a de que a 1,25-diidroxitamina D junto com o ácido retinóico e a podem ser importantes para a diferenciação de células reguladoras no timo, e que os receptores de Vitamina D e da Vitamina A podem, durante o desenvolvimento tímico, modular diferencialmente a expressão de genes associados à regulação, contribuindo para a diferenciação de células T reguladoras. O estudo da

influência destes dois metabólitos no desenvolvimento e atividade de células T reguladoras no timo será importante para testar esta hipótese.

O estudo das células reguladoras está caminhando para um novo momento de investigação científica, onde a necessidade de se demonstrar a sua existência foi substituída pela necessidade de se entender mais profundamente a sua biologia, bem como compreender os eventos que levam à sua diferenciação durante o desenvolvimento no timo e na periferia. Os resultados obtidos durante esta tese abrem novas questões interessantes a serem investigadas. Além das questões relativas à regulação da resposta imune, questões sobre quais moléculas estão envolvidas diferenciação das células T. A busca por estas respostas poderá trazer uma melhor compreensão dos mecanismos básicos da resposta imune, assim como direcionar, *in vitro* e/ou *in vivo*, esta resposta imune.

6 CONCLUSÕES

- 1) Neste trabalho, a utilização da biblioteca de *phage display* permitiu a identificação de moléculas através de peptídeos selecionados frente ao tecido tímico, timócitos totais e timócitos CD4+CD25+. A validação molecular de dois fagos obtidos confirmou a ligação específica a seus candidatos, indicando que esta abordagem é eficaz para identificar moléculas presentes em timo/timócitos.
- 2) Os peptídeos de dois fagos selecionados com timo (M2C) e timócitos CD4+CD25+ (R2A) apresentaram, no *BLAST*, similaridade com a proteína transportadora de Vitamina D e com o receptor de Vitamina D, respectivamente. Ambos os fagos apresentaram ligação preferencial a Vitamina D, e o fago R2A, também apresentou ligação com o receptor de Vitamina D, imobilizados em placa. Considerando a conhecida atividade imunorreguladora da Vitamina D, nossos dados sugerem que a Vitamina D possa ter um papel importante para a biologia das células T reguladoras CD4+CD25+ do timo.
- 3) A atividade funcional da Vitamina D na geração ou expansão das células CD4+CD25+ reguladoras, *in vitro*, não foi confirmada de forma consistente pelos parâmetros avaliados. Considerando que o rec de vit d pode dimerizar com o de vit a, cuja atividade imunorreguladora foi recentemente descrita, supomos que a Vitamina D, isoladamente, possa não desempenhar um papel diretamente na indução e/ou expansão das células T reguladoras. Por outro lado, é possível que a Vitamina D possa ser um co-fator importante quando associado a outras moléculas, ou mesmo na interação com outras células tímicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adorini, L. (2003). "Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 987: 258-61.
- Adorini, L., N. Giarratana and G. Penna (2004). "Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells." *Semin Immunol* 16(2): 127-34.
- Adorini, L., G. Penna, N. Giarratana, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases." *J Cell Biochem* 88(2): 227-33.
- Aliahmad, P. and J. Kaye (2006). "Commitment issues: linking positive selection signals and lineage diversification in the thymus." *Immunol Rev* 209: 253-73.
- Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, et al. (2007). "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production." *Int Immunol* 19(4): 345-54.
- Almeida, A. R., N. Legrand, M. Papiernik, et al. (2002). "Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers." *J Immunol* 169(9): 4850-60.
- Anderson, G., W. E. Jenkinson, T. Jones, et al. (2006). "Establishment and functioning of intrathymic microenvironments." *Immunol Rev* 209: 10-27.
- Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, et al. (2002). "Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes." *J Exp Med* 196(3): 379-87.
- Arap, M. A., J. Lahdenranta, P. J. Mintz, et al. (2004). "Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands." *Cancer Cell* 6(3): 275-84.

- Arap, W., M. G. Kolonin, M. Trepel, et al. (2002). "Steps toward mapping the human vasculature by phage display." *Nat Med* 8(2): 121-7.
- Ardalan, M. R., H. Maljaei, M. M. Shoja, et al. (2007). "Calcitriol started in the donor, expands the population of CD4+CD25+ T cells in renal transplant recipients." *Transplant Proc* 39(4): 951-3.
- Aschenbrenner, K., L. M. D'Cruz, E. H. Vollmann, et al. (2007). "Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells." *Nat Immunol* 8(4): 351-8.
- Banham, A. H. (2006). "Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells." *Trends Immunol* 27(12): 541-4.
- Barbas III, C. F., D. R. Burton, J. K. Scott, et al. (2001). Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York
Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Barsony, J. and K. Prufer (2002). "Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motion." *Vitam Horm* 65: 345-76.
- Boden, E., Q. Tang, H. Bour-Jordan, et al. (2003). "The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Novartis Found Symp* 252: 55-63; discussion 63-6, 106-14.
- Buhlmann, J. E., S. K. Elkin and A. H. Sharpe (2003). "A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection." *J Immunol* 170(11): 5421-8.
- Cabarrocas, J., C. Cassan, F. Magnusson, et al. (2006). "Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22): 8453-8.
- Cantorna, M. T., C. E. Hayes and H. F. DeLuca (1998). "1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis." *J Nutr* 128(1): 68-72.
- Chatila, T. A., F. Blaeser, N. Ho, et al. (2000). "JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome." *J Clin Invest* 106(12): R75-81.

- Chen, W. and S. M. Wahl (2003). "TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2): 85-9.
- Cloutier, S. M., J. R. Chagas, J. P. Mach, et al. (2002). "Substrate specificity of human kallikrein 2 (hK2) as determined by phage display technology." *Eur J Biochem* 269(11): 2747-54.
- Cloutier, S. M., C. Kundig, L. M. Felber, et al. (2004). "Development of recombinant inhibitors specific to human kallikrein 2 using phage-display selected substrates." *Eur J Biochem* 271(3): 607-13.
- Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, et al. (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." *J Exp Med* 204(8): 1757-64.
- Decallonne, B., E. van Etten, L. Overbergh, et al. (2005). "1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 restores thymocyte apoptosis sensitivity in non-obese diabetic (NOD) mice through dendritic cells." *J Autoimmun* 24(4): 281-9.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. Second of two parts." *N Engl J Med* 343(2): 108-17.
- Derbinski, J., J. Gabler, B. Brors, et al. (2005). "Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels." *J Exp Med* 202(1): 33-45.
- Duester, G., M. L. Shean, M. S. McBride, et al. (1991). "Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis." *Mol Cell Biol* 11(3): 1638-46.
- Felli, M. P., A. Vacca, D. Meco, et al. (1991). "Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-2 promoter via cis-regulatory sequences containing an octamer motif." *Mol Cell Biol* 11(9): 4771-8.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* 4(4): 330-6.

- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, et al. (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." *Nat Immunol* 6(11): 1142-51.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, et al. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." *Immunity* 22(3): 329-41.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* 18(5): 723-37.
- Giordano, R. J., M. Cardo-Vila, J. Lahdenranta, et al. (2001). "Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands." *Nat Med* 7(11): 1249-53.
- Gliddon, D. R., J. C. Hope, G. P. Brooke, et al. (2004). "DEC-205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph." *Immunology* 111(3): 262-72.
- Goldschneider, I. (2006). "Cyclical mobilization and gated importation of thymocyte progenitors in the adult mouse: evidence for a thymus-bone marrow feedback loop." *Immunol Rev* 209: 58-75.
- Gomme, P. T. and J. Bertolini (2004). "Therapeutic potential of vitamin D-binding protein." *Trends Biotechnol* 22(7): 340-5.
- Gregori, S., M. Casorati, S. Amuchastegui, et al. (2001). "Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance." *J Immunol* 167(4): 1945-53.
- Gregori, S., N. Giarratana, S. Smiroldo, et al. (2002). "A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice." *Diabetes* 51(5): 1367-74.
- Guan, H., G. Zu, Y. Xie, et al. (2003). "Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses." *J Immunol* 171(12): 6519-26.
- Hardin, J. A., T. M. Chused and A. D. Steinberg (1973). "Supressor cells in the graft vs host reaction." *J Immunol* 111(2): 650-1.

- Hodgson, H. J., J. R. Wands and K. J. Isselbacher (1978). "Decreased suppressor cell activity in inflammatory bowel disease." *Clin Exp Immunol* 32(3): 451-8.
- Hoffmann, P., J. Ermann, M. Edinger, et al. (2002). "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." *J Exp Med* 196(3): 389-99.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* 299(5609): 1057-61.
- Hori, S. and S. Sakaguchi (2004). "Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells." *Microbes Infect* 6(8): 745-51.
- Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." *Immunity* 21(4): 503-13.
- Husmann, M., J. Lehmann, B. Hoffmann, et al. (1991). "Antagonism between retinoic acid receptors." *Mol Cell Biol* 11(8): 4097-103.
- Ito, T., Y. H. Wang, O. Duramad, et al. (2006). "OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35): 13138-43.
- Jurutka, P. W., G. K. Whitfield, J. C. Hsieh, et al. (2001). "Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression." *Rev Endocr Metab Disord* 2(2): 203-16.
- Kang, S. G., H. W. Lim, O. M. Andrisani, et al. (2007). "Vitamin A Metabolites Induce Gut-Homing FoxP3+ Regulatory T Cells." *J Immunol* 179(6): 3724-33.
- Koivunen, E., D. A. Gay and E. Ruoslahti (1993). "Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library." *J Biol Chem* 268(27): 20205-10.
- Kolonin, M., R. Pasqualini and W. Arap (2001). "Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy." *Curr Opin Chem Biol* 5(3): 308-13.

- Kralova, J., T. Czerny, H. Spanielova, et al. (2002). "Complex regulatory element within the gammaE- and gammaF-crystallin enhancers mediates Pax6 regulation and is required for induction by retinoic acid." *Gene* 286(2): 271-82.
- Levings, M. K. and M. G. Roncarolo (2000). "T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties." *J Allergy Clin Immunol* 106(1 Pt 2): S109-12.
- Liston, A., A. G. Farr, Z. Chen, et al. (2007). "Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium." *J Exp Med* 204(3): 475-80.
- Liston, A. and C. C. Goodnow (2005). "Genetic lesions in thymic T cell clonal deletion and thresholds for autoimmunity." *Novartis Found Symp* 267: 180-92; discussion 192-9.
- Liston, A., D. H. Gray, S. Lesage, et al. (2004). "Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity." *J Exp Med* 200(8): 1015-26.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." *J Exp Med* 203(7): 1701-11.
- Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini, et al. (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." *Int Immunol* 10(6): 775-83.
- Lucibello, F. C., F. Ehler and R. Muller (1991). "Multiple interdependent regulatory sites in the mouse c-fos promoter determine basal level transcription: cell type-specific effects." *Nucleic Acids Res* 19(13): 3583-91.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin, et al. (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Exp Med* 201(7): 1061-7.
- Marson, A., K. Kretschmer, G. M. Frampton, et al. (2007). "Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation." *Nature* 445(7130): 931-5.

- Miyara, M. and S. Sakaguchi (2007). "Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression." *Trends Mol Med* 13(3): 108-16.
- Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, et al. (2005). "Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans." *Hum Immunol* 66(1): 13-20.
- Mucida, D., Y. Park, G. Kim, et al. (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." *Science* 317(5835): 256-60.
- Overbergh, L., B. Decallonne, M. Waer, et al. (2000). "1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543)." *Diabetes* 49(8): 1301-7.
- Pasqualini, R., W. Arap and D. M. McDonald (2002). "Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature." *Trends Mol Med* 8(12): 563-71.
- Pasqualini, R., E. Koivunen and E. Ruoslahti (1995). "A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins." *J Cell Biol* 130(5): 1189-96.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Tissue targeting with phage peptide libraries." *Mol Psychiatry* 1(6): 423.
- Pitkanen, J. and P. Peterson (2003). "Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity." *Genes Immun* 4(1): 12-21.
- Powell, B. R., N. R. Buist and P. Stenzel (1982). "An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy." *J Pediatr* 100(5): 731-7.
- Pritchard, J., A. Makowska, N. A. Gregson, et al. (2007). "Reduced circulating CD4+CD25+ cell populations in Guillain-Barre syndrome." *J Neuroimmunol* 183(1-2): 232-8.
- Pyzik, M. and C. A. Piccirillo (2007). "TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets." *J Leukoc Biol* 82(2): 335-46.

- Rizzi, M., F. Ferrera, G. Filaci, et al. (2006). "Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity." *Autoimmun Rev* 5(2): 145-7.
- Ruan, Q. G., K. Tung, D. Eisenman, et al. (2007). "The autoimmune regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function." *J Immunol* 178(11): 7173-80.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* 22: 531-62.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-64.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* 12(4): 431-40.
- Schramm, C., S. Huber, M. Protschka, et al. (2004). "TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo." *Int Immunol* 16(9): 1241-9.
- Scotto, L., A. J. Naiyer, S. Galluzzo, et al. (2004). "Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells." *Hum Immunol* 65(11): 1297-306.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, et al. (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." *J Exp Med* 203(7): 1693-700.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705): 1315-7.

- Taguchi, O. and Y. Nishizuka (1980). "Autoimmune oophoritis in thymectomized mice: T cell requirement in adoptive cell transfer." *Clin Exp Immunol* 42(2): 324-31.
- Takahama, Y. (2006). "Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection." *Nat Rev Immunol* 6(2): 127-35.
- Takahashi, T. and S. Sakaguchi (2003). "Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease." *Curr Mol Med* 3(8): 693-706.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* 192(2): 303-10.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, et al. (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* 171(7): 3348-52.
- Tanha, J., G. Forsyth, P. Schorr, et al. (1997). "Sequence and structure specific antibodies from phage display libraries." *Mol Immunol* 34(2): 109-13.
- Trepel, M., W. Arap and R. Pasqualini (2002). "In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine." *Curr Opin Chem Biol* 6(3): 399-404.
- Van Ewijk, W., J. de Kruif, W. T. Germeraad, et al. (1997). "Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3903-8.
- von Boehmer, H. and P. Kieselow (2006). "Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur?" *Immunol Rev* 209: 284-9.
- Walker, M. R., D. J. Kaspirowicz, V. H. Gersuk, et al. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." *J Clin Invest* 112(9): 1437-43.

- Watanabe, N., Y. H. Wang, H. K. Lee, et al. (2005). "Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus." *Nature* 436(7054): 1181-5.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." *Science* 270(5238): 985-8.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* 182: 207-14.
- Yamaguchi, T., K. Hirota, K. Nagahama, et al. (2007). "Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor." *Immunity* 27(1): 145-59.
- Yates, J., F. Rovis, P. Mitchell, et al. (2007). "The maintenance of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro." *Int Immunol* 19(6): 785-99.
- Zhang, L. and Y. Zhao (2007). "The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾T cells: multiple pathways on the road." *J Cell Physiol* 211(3): 590-7.

Anexos

ANEXO I

Abreviações dos Aminoácidos

1 letra	3 letras	Nome dos aminoácidos	Estrutura da cadeia lateral
A	Ala	Alanina	- CH ₃
C	Cys	Cisteína	- CH ₂ - SH
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina	- H
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina	- CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - NH ₂
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina	- CH ₂ - CH ₂ - S - CH ₃
N	Asn	Asparagina
P*	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina	- CH ₂ - OH
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

* a cadeia lateral da prolina forma um amino grupo secundário (α -imino ácido).

ANEXO II

Tabela suplementar: Análise bioquímica dos peptídeos selecionados

Tecido	Peptídeo	MW	pI	Classificação	Hdp	Classificação
	DDVMYAH	849.9	4.20	ácido	-0.514	Hidrofílico
	GAAGARN	615.6	9.75	básico	-0.486	Hidrofílico
	GGRWGRN	801.8	12.00	básico	-2.086	Hidrofílico
	TLVRGKD	787.9	8.41	básico	-0.714	Hidrofílico
	SHEGGLR	787.9	8.41	básico	-1.286	Hidrofílico
	TGTMGNR	735.8	9.41	básico	-1.186	Hidrofílico
	KGISDPS	702.7	5.84	ácido	-0.929	Hidrofílico
	GAARGRN	700.7	12.00	básico	-1.386	Hidrofílico
	SSRTYGA	740.7	8.46	básico	-0.957	Hidrofílico
Timócitos	DHGRDAA	740.7	5.21	ácido	-1.643	Hidrofílico
	LNFRGTG	763.8	9.75	básico	-0.414	Hidrofílico
	LGFIADH	771.8	5.08	ácido	0.829	Hidrofóbico
	VGLRIPA	724.9	9.72	básico	1.114	Hidrofóbico
	GAAGAET	575.5	4.00	ácido	0.057	Hidrofóbico
	MISSSST	711.7	5.28	ácido	0.357	Hidrofóbico
	GGRWGRN	801.8	12.00	básico	-2.086	Hidrofílico
	VVKNRSS	788.9	11.00	básico	-0.729	Hidrofílico
	DHFLSRH	910.9	6.92	neutro	-1.229	Hidrofílico
	LALRAED	786.8	4.67	ácido	-0.043	Hidrofílico
	LQAVAAK	699.8	8.75	básico	0.857	Hidrofílico
T CD4+CD25+	LLGTRWP	842.0	9.75	básico	-0.071	Hidrofílico
	FMESVGR	824.9	6.00	neutro	-0.043	Hidrofílico
	LTPEFHI	855.9	5.24	ácido	0.300	Hidrofóbico
	LAVGEVL	699.8	4.00	ácido	1.986	Hidrofóbico
	FVSPVVG	701.8	5.52	ácido	0.971	Hidrofóbico
	MPGWEVL	831.0	4.00	ácido	0.500	Hidrofóbico

Tabela suplementar: Análise bioquímica dos peptídeos selecionados
(Continuação)

T CD4+CD25+	Peptídeo	MW	pI	Classificação	Hdp	Classificação
	QRLVGFA	789.9	9.75	básico	0.600	hidrofóbico
	LQASPNF	775.8	5.52	ácido	-0.143	hidrofilico
	NGSVRSF	765.8	9.75	básico	-0.429	hidrofilico
	PGFGLAY	723.8	5.95	ácido	0.671	hidrofóbico
	FLFTFEA	874.0	4.00	ácido	1.400	hidrofóbico
	RGVLMRY	894.1	10.84	básico	-0.114	hidrofilico
	RAFVVAS	748.8	9.75	básico	1.357	hidrofóbico
	SYETSFW	918.9	4.00	ácido	-0.743	hidrofilico
	LMRAGPF	790.9	9.75	básico	0.543	hidrofóbico
	RGDEFVS	808.8	4.37	ácido	-0.814	hidrofilico
	QSHSAFV	774.8	6.74	neutro	0.071	hidrofóbico
	RVEANDV	801.8	4.37	ácido	-0.686	hidrofilico
	ERATGLV	744.8	6.10	neutro	0.100	hidrofóbico
	MASALSP	675.8	5.28	ácido	0.871	hidrofóbico
	DGQWLRI	887.0	5.84	ácido	-0.643	hidrofilico
	DRALAGRC	860.9	8.25	básico	-0.375	hidrofilico
	LLATRVN	803.0	9.75	básico	1.471	hidrofóbico
	VGASLYD	723.7	4.30	ácido	0.543	hidrofóbico
	LAVAGGH	623.7	6.74	neutro	1.086	hidrofóbico
	PRFPSYQ	894.0	9.18	básico	-1.500	hidrofilico
	LLHFRSP	869.0	9.76	básico	0.043	hidrofóbico
	DTGFTWY	888.9	3.80	ácido	-0.671	hidrofilico

ANEXO III

Resultados – *BLAST*

Timócitos

T1A CDHGRDAAC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
TNF-4/OX40L	21.4	CDHGRDAAC	CDHTRDTLC	Receptor para TNFSF4/OX40L/GP34
LDL-related (CD91)	20.2	CDHGRD	CDHDRD	Rec de LDL, mφ e monócitos
WC1 antigen	19.7	DHGRDA	NHGRDA	Cd4-cd8- gama delta
HLA-B	17.6	GRDAA	GRDAA	Suscet. a SA
laminin alpha 4	17.6	DHGRDA	DHVRDA	Expr. em células mesenquimais
interleukin 17 receptor	17.2	CDHG	CDHG	Maturação, nf-kb, aum. IL-6
integrin alpha	16.8	GRDAAC	GRSAAC	adesão

T1B CLNFRGTGC
T1C CLNFRGTGC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
interleukin 7 receptor (CD127)	21.0	CLNFRGTGC	CLNFR	T cell maturation
FELE-1	19.7	NFRGTGC	NFRGSAC	angiogenesis
T-cell surface glycoprotein CD1d	18.9	LNFRGT	LSFRGT	Expr. em timócitos na região cortical
monocyte and plasmacytoid	18.9	CLNFRG	CLNFSG	Apres de antigenos não peptidicos;

activated molecule				timócitos, dendriticas e LB
transforming growth factor beta 1-induced factor 2	18.5	FRGTG	FRGTG	inhibition of tumor necrosis factor mediated cell death
FGF-23	18.5	CLNFRG	CMDFRG	Fator de cresc. de fibroblasto
MUC19	18.5	FRGTG	FRGTG	O-glicano presente em CD34, CD43 e CD45 (tandem repeat)
CD98	18.0	LNFRGTG	LNFRDSG	Mat.de cels.hematopoiéticas

T1D

CLGFIADHC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
interferon-induced protein 1-8U	22.7	CLGFIA	CLGFIA	Induz interferon
Beta-interferon-induced protein	22.7	CLGFIA	CLGFIA	interferon tipo fibroblasto
fibronectin 1	16.8	CLGFIA	CLGFIA	Invasão de S. pyogenes
Thymopoietin	16.8	CLGFIA	CLGFIA	Maturação de timócitos
Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	16.8	CLGF	CLGF	Molécula inibitória expressa em cels não ativadas ou reg
Metabotropic glutamate receptor type 3 (mGluR3)	16.8	CLGF	CLGF	Assoc. com distúrbios neurodegenerativos. Neurotransmissor de excitação
Interleukin-24	16.8	CLGF	CLGF	induz apop seletiva em cancer de mama (H) e inibe o cres de cancer em cam nude

T1E

CVGLRIPAC

T1F

CVGLRIPAC

T2E

CVGLRIPAC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
EGF-like growth factor	22.7	GLRIPAC	GLRIPAC	Angiogenesis, fator de diferenciação
Defensin	22.7	GLRIPAC	GLRIPAC	Antibacteriana
gp130	16.8	GLRI	GLRI	Receptor de monócito
Thymus specific serine peptidase	16.8	CVGLR	CVGLR	MHClike expresso no córtex do timo
IL-6R-beta	16.8	CVGLR	CV---GLR	Neutraliza auto anticorpo em RA

T1H

CMISSSSTC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Interleukin-2	19.7	CMISSSST	CTITSSST	central role in the activation of NK cells and T-lymphocytes.
interleukin 16	18.0	SSSTC	SSSTC	Quimiotaxia, modulação da ativação (CD4)

T2A CEGRWGRNC

T2B CESRWGQNC

T2C CGGRWGRNC

T3A CGGRWGRNC

T3F CGGRWGRNC

M2B CGGRWGRNC

M2D CGGRWGRNC

M2E CGGRWGRNC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
CHFR	22.7	CGGRWGRNC	CGGRWGRNC	Sinal de mitose
MEGF10	26.5	EGRWGRNC	EGRWGPNC	inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses
FEX-2	19.7	CGGRW	CGGRW	cell adhesion molecule of Fas-1

				superfamily mediates cell-cell interaction
FELE-2	18.0	RWGRN	RWGRN	angiogenese

T2H CVVKNRSSC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
CRL3	22.7	CVVKNRS	CVVKNRS	Citocina tipo 1 soluvel
CD19 antigen	19.3	CVVKNRSS	CGLKNRSS	B cell, Atv. +CD21 e CD81 sinergia com BCR
GCD-10	18.9	VVKNR	VVKNR	
CD45	18.5	VKNRSS	VKNRNS	Sinal mediado por TCR
NK-TR protein	18.0	VK--NRSSC	VKGRDRSSC	The activation of NK cells by IL-2 [?] produced a change in the splicing pattern that resulted in increased production of mRNAs capable of producing the complete NK-TR protein.
Hsp27	17.6	KNRSSC	KGRSSC	chaperonin
cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	16.8	VKNRSS	VTNRSS	was distributed at intercellular boundaries on processes of neuronal cells such as hippocampal pyramidal cells, Purkinje cells, and olfactory neurons.
Interleukin 31RA	16.8	NRSSC	NRASC	novel signaling receptor chain potentially involved in the development and function of monocytes and macrophages. the common receptor subunit for IL6 -type cytokines Oncostatin M receptor and IL31RA form the heterodimeric receptor

				through which IL31 signals is a receptor for a helical cytokine acting on monocytes. upregulated in monocytes and dendritic cells in response to gamma-interferon
Interleukin 1 receptor, type I	19.7	CVVKN	CVVKN	Ck prod Mφ, ↑ mol adesão, inata

T3C CDHFLSRHC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
IL-8 r α (CXCR1)	21.4	FLSRHC	FLARHC	co-localization of CXCR1 and neutrophil elastase member of a family of pro-inflammatory cytokines chemoattraction and activation of neutrophils GPRC
tenascin N	20.2	LSRHC	LSRHC	dependent on p38MAPK and JNK signaling pathways in mammary tumors.
epidermal growth factor receptor	19.7	DHFLS	DHFLS	exogenous calmodulin (CaM) binds to the epidermal growth factor receptor (EGFR) at its cytosolic juxtamembrane region inhibiting its tyrosine kinase activity.
TNF	18.5	CDHF	CDHF	multifunctional proinflammatory cytokine secreted predominantly by monocytes/macrophages that has effects on lipid metabolism,

				coagulation, insulin resistance, and endothelial function.
thrombospondin	18.5	HFLSRH	HLLSRH	Thrombospondin I is a multimodular secreted protein that associates with the extracellular matrix and possesses a variety of biologic functions, including a potent angiogenic activity
NKG2-B	17.2	SRHC	SRHC	killer cell lectin-like receptor subfamily C (CD159A) calcium-dependent (C-type) lectins regulation of NK cell function immune inhibitory receptors HLA-E bound to the CD94/NKG2A, CD94/NKG2B, and CD94/NKG2C NK cell receptors

T3D CLALRAEDC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
anti-thymocyte IgM	22.7	LALRAEDC	LALRSEEC	Inductor de apoptose
toll-like receptor 3	19.3	LALRAED	LALRSEE	CD283 the importance of TLR3 cytoplasmic tyrosine residues in dsRNA signaling

T3G CLQAVAAKC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Interleukin-8-like chemokine	22.7	QAVAAK	QAVAAK	Inflamação IL8 system may be an active component of tubal physiology and

				that aminopeptidase N may limit the systemic effects of epithelial IL8
--	--	--	--	--

Matriz

M1B CDDVMYAH

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Natural killer cell inhibitory receptor	18.0	DVMYAH	DVMFEH	killer cell lectin-like receptor subfamily C (CD159A
NK receptor for HLA-C alleles	18.0	DVMYAH	DVMFEH	killer cell lectin-like receptor subfamily C (CD159A

M1F CGAAGARNC
M1H CTLVRGKDC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Human Leukocyte Elastase	22.3	CTLVRG	CTLVRG	serine proteases that hydrolyze elastin, a fibrous, insoluble protein of connective tissue
Tumor necrosis ligand	17.6	VRGKDC	VPKGDC	multifunctional proinflammatory cytokine secreted predominantly by monocytes/macrophages that has effects on lipid metabolism, coagulation, insulin resistance, and endothelial function.
Aquaporin-3	17.2	TLVRGKDC	TLQRGREC	GIL BLOOD GROUP
IL-6R	16.8	VRGKDC	QRGREC	Sinal de hematopoiese

M2A CSHEGGLRC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
HLA-B	21.8	HEGGLR	HEGGLR	MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX, CLASS I, B; HLA-B
CD5	18.9	GGLRC	GGLRC	Lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1, T1, T-cell surface glycoprotein pan T cell marker, has been known to be expressed on a minor population of B cells, termed B-1 cells proliferative response of activated T cells and in T-cell helper function
CD97 antigen	17.6	EGGLRC	EVGLRC	marker in human thyroid carcinomas present on the surface of most activated leukocytes receptors for secretin, calcitonin and other mammalian and insect peptide hormones receptor involved in both cell adhesion and signaling
CD94/NKG2 ligand	17.6	HEGGLRC	HEATLRC	killer cell lectin-like receptor subfamily C (CD159A) calcium-dependent (C-type) lectins regulation of NK cell function immune inhibitory receptors HLA-E bound to the CD94/NKG2A, CD94/NKG2B, and CD94/NKG2C NK cell receptors

HLA-B61 product [Homo sapiens]

HLA-A26.4 antigen [Homo sapiens]
 HLA-A9HH antigen [Homo sapiens]
 HLA-B4007 [Homo sapiens]
 HLA-B*1518 [Homo sapiens]
 HLA-B*1513 [Homo sapiens]
 HLA-B*1511 [Homo sapiens]
 HLA-B*1502 [Homo sapiens]
 HLA-B*1301 antigen [Homo sapiens]
 HLA-B35 antigen [Homo sapiens]
 HLA-A26 [Homo sapiens]

Query: 3 HEGGLRC 9
 HE LRC
 Sbjct: 209 HEATLRC 215

M1G CRGRWGRNC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Von Willebrand factor	24.8	CRGRWG	CRGRWG	bleeding disorder accompanied by a complex hemostatic defect circulate as a complex in plasma
MEGF10	23.1	GRWGRNC	GRWGPNC	inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses
Toll-like receptor 9	22.3	CRGRW	CRGRW	repressor de GATA)
IL-5R-alpha (CD125)	20.2	CR--GRWG	CRMPGRWG	new member of the hematopoietic growth factor receptor family IL5 and GMCSF share a receptor subunit and partially interfere with each other's binding and have highly overlapping biologic activities on eosinophils
TNFR13B	18.5	CRGRWG	CAGRWG	Transmembrane activator and CAML interactor
BAT2	18.5	CRGRWGR	CRGR-GR	associada HLA-B/MHC classe III similar to other proteins with large proline-rich domains, such as some

				nuclear proteins, collagens, elastin and synapsin
--	--	--	--	---

M2G CGAARGRNC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
megakaryocyte stimulating factor	18.5	ARGRNC	ARGREC	cooperates with FLT3-L thrombocythemia
ICAM5	17.6	AARGR	AARGR	Intercellular adhesion molecule brain segment-specific cell adhesion molecule interacted with lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA1
CD33	17.6	CGAARG	CAAARG	Sialoadesina; reg sinal de cels. meloides
Tropomodulin (RGD like)	17.6	RGRNC	RGRDC	autoantigen in Graves disease
CD5	17.6	AARGR	AARGR	Lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1, T1, T-cell surface glycoprotein pan T cell marker, has been known to be expressed on a minor population of B cells, termed B-1 cells proliferative response of activated T cells and in T-cell helper function
Interleukin-1 receptor antagonist	17.6	AARGR	AARGR	inhibits the binding of IL1-alpha and IL1-beta
IL17Rom	17.6	AARGR	AARGR	The function of the encoded protein has not yet been determined

M2C CTGTMGNRC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Integrin beta 4 protein	19.3	GTMGNRC	GTLANRC	hemidesmosomes, specialized structures

				providing firm mechanical links between basal lamina and the intermediate filament cytoskeleton
Protocadherin 2, 4 e 5	18.9	TGTMG	TGTMG	calcium-dependent cell adhesion and recognition proteins of the cadherin superfamily
Defensin beta 19	17.2	MGNR	MGNR	expression, synergism was observed when IL-1beta was combined with tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma.
MEGF6	17.2	CT--- GTMGNRC	CTCKSGYQGNRC	inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses
P-selectin	17.2	CTGTMGN	CTETIGN	CD62 adhesion molecule, expressed at the surface of activated cells, that mediates the interaction of activated endothelial cells or platelets with leukocytes
Dopamine D4 receptor	17.2	MGNR	MGNR	Dopamine plays an important role in normal attention and in disorders of attention
Vitamin D-binding protein	16.8	TMGNR	TMSNR	Vitamin D transporter through the plasma
Thymopoietin alpha	16.8	TMGN	TMGN	interaction of LAP2-alpha with A-type lamins

M2F CKGISDPSC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIB isoform 1	22.3	CKGISDP	CKGIGDP	ubiquitous serine/threonine protein kinase that has been implicated in diverse effects of hormones and

				neurotransmitters that utilize Ca(2+) as a second messenger
dendritic cell-associated transmembrane protein precursor [Mus musculus]	22.3	CKG----- ---ISDPSC	CKGATPMEACTIII SDPTC	restricted expression in hemopoietic cells, in particular, DCs and B cells, but T cells and monocytes do not express it.
Roundabout	21.0	GISDPS	GISDPS	receptor that is a member of the neural cell adhesion molecule acts as an axon guidance receptor that defines a novel subfamily of immunoglobulin superfamily proteins that is highly conserved from fruit flies to mammals
MUF1	19.3	SDPSC	SDPSC	leucine rich repeat containing 41
Ox19 [Homo sapiens]	19.3	SDPSC	SDPSC	expressed transcript in placenta and adult brain
KDEL receptor 3 isoform b [Homo sapiens]	18.9	CKGIS	CKGIS	ER lumen protein retaining
Down syndrome cell adhesion molecule	18.9	CKGISDPS	CKAVGDPS	formation and maintenance of specific neuronal networks in brain . a member of the immunoglobulin superfamily that represents a new class of neural cell adhesion molecules

M2H CSSRTYGAC

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
G protein coupled receptor 7 [Rattus norvegicus]	20.6	SSRTYGA	SGRTYGA	Chemokine receptor

KL04P [Homo sapiens]	20.6	CSSRTY	CSARTY	enhance the initiation rate of RNA polymerase II-mediated gene transcription hinges on their potential to interact functionally with the general transcription machinery bound at the basal promoter an adaptor in a human cell line
Neuropeptides B/W receptor type 1 (G protein-coupled receptor 7	20.6	SSRTYGA	SGRTYGA	Opioid receptors belong to the family of G protein-coupled receptors and are the primary sites of interaction of the endogenous opioid peptides expression of GPR7 mainly in cerebellum and frontal cortex
matrix metalloproteinase 9	19.7	RTYGAC	RTYSAC	<p>type IV collagenases are members of a group of secreted zinc metalloproteases which, in mammals, degrade the collagens of the extracellular matrix.</p> <p>type IV collagenases are members of a group of secreted zinc metalloproteases which, in mammals, degrade the collagens of the extracellular matrix.</p> <p>activation of neutrophils by IL8 induces the release of MMP9, which is involved in the degradation of extracellular matrix molecules, release might induce stem cell mobilization by cleaving matrix molecules to which stem cells are attached</p>

Timócitos CD4+CD25+

R1A

tgtttggtggggacgaggtggccgtgt

C L L G T R W P C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
toll-like receptor 7 [Homo sapiens]	21.8	LLGTRW-----PC	LLGARWFPKTLPC	Rec. e ativ inata

R1C

tgtttcattggagtctgtcgggcggtgt

C F M E S V G R C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
oncostatin M	21.0	FMESVGR	FMHSVGR	inducing differentiation into hepatocytes
leptin receptor	19.7	FMESVG	FMEGVG	hematopoiesis
MEGF5 (slit homolog 1)	19.7 16.8	MESVGRC CFME	METVVR CFMD	inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses
slit homolog 3	19.7 16.8	MESVGRC CFME	METVVR CFMD	expression was enhanced in tissue from several different types of tumors

R1D

tgtctaacgccggagtttcacatatgt

C L T P E F H I C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
tumor necrosis factor receptor superfamily	21.8	CLTPEFH----- -IC	CVTPEYHCGDPQCKIC	activation response of T lymphocytes.

member 18 isoforma 2 (GITR-D, GITR-C e GITR-B) (Homo sapiens)				role in dominant immunological self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells
Fas (Mus musculus)	21.0	PEFHI	PEFHI	apoptotic reaction
transforming growth factor beta regulator 4 (Homo sapiens)	21.0	PEFHI	PEFHI	cell migration and invasion potential tumor suppressor involved in the regulation of cell adhesion and cell migration
Interleukin-17B receptor (Bos Taurus)	20.2	LTPEFHIC	LTPYFHTC	produced by activated T cells exhibiting proinflammatory activities
steroid/thyroid hormone orphan nuclear receptor [Mus musculus]	19.7	LTPEF	LTPEF	regulation of the actin cytoskeleton.
interleukin 7 receptor alpha chain (CD127)	18.5	EFHIC	EFQIC	transduces non-redundant signals for both T and B-cell Interleukin 7 receptor [?]👉 engagement stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phospholipid turnover, proliferation, and selective differentiation to the CD4 lineage by human fetal thymocytes.
apolipoprotein B precursor	18.5	PEFHI	PDFHI	
PREDICTED: similar to Transcription factor SOX-18	18.5	TPE----FHI	TPEFENSFHI	a transcription factor involved in the induction of angiogenesis

R1E

tgtttggccgttggtgaggtgctttgt

C L A V G E V L C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 [Homo sapiens]	21.0	CLAVGEVLC	CLAVPTVLC	used as a marker for activated T-cells activity is located in the marrow pre T lymphocytes.
slit and trk like 3 protein [Homo sapiens]	19.7	VGEVLC EVLC	VGDVLC EVLC	inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses
selenium binding protein 1 [Homo sapiens]	19.7	CLAVGEVL	CLASGEVM	deficiency of selenium may cause certain neurologic diseases
PREDICTED: heat shock 70kDa protein 9B [Pan troglodytes]	19.7	LAVGEVLC	LAVGAVVC	transforming growth factor-beta (TGF-beta) stimulates the induction anti-tumor immune responses
pancreatic polypeptide receptor 1 [Mus musculus]	19.3	GEVLC	GEVLC	PP1, reduced the IL-2-induced proliferation of human T cells s Src inhibitor
coagulation factor II receptor-like 2 [Homo sapiens]	19.3	GEVLC	GEVLC	high affinity effector of thrombin
interleukin 17C [Mus musculus]	18.9	LAVGEVLC	LAVAELC	inhibits interferon (IFN)-gamma production from developing Th1 cells. key factor in susceptibility to autoimmune diabetes.
transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) [Homo sapiens]	18.9	CLAVGEV	CNAVGEV	cell migration and invasion potential tumor suppressor involved in the regulation of cell adhesion and cell migration

tgtttcgtgtcgccccggttggttgt
C F V S P P V G C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
membrane protein CH1 [Homo sapiens]	19.7	FVSPP---VG	FVSPPDSLVG	
pecanex homolog [Homo sapiens]	19.7	PPVGC	PPVGC	
nucleoporin 205kDa [Homo sapiens]	19.3	CFVSPP	CFTSPP	
interferon regulatory factor 2 binding protein 2 [Homo sapiens]	19.3	FVSPP	FVSPP	transcriptional regulators; family of co- repressor proteins.
connexin [Homo sapiens]	18.5	CFVSPP	CFVSRP	
interleukin 13 [Meriones unguiculatus]	18.5	VSPPV	VSPPV	role in the pathogenesis of bronchial asthma. regulatory agent against TNF-alpha-induced Regulatory effects of IL-13 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis.
HLA-DMA [Homo sapiens]	18.5	CFVS---PP	CFVSNLFPP	critical in the pathway of class II antigen presentation.
Notch homolog 2 N-terminal like protein [Homo sapiens]	18.5	CFVSPP	CFVSRP	cell differentiation
TGF-beta type III receptor [Mus musculus]	18.0	CFVSP	CFISP	cell migration and invasion
Latent transforming growth factor beta-binding protein 2	18.0	CFVSPP	CFCSP	potential tumor suppressor involved in the regulation of cell adhesion and cell migration

precursor (LTBP-2) HUMAN				
-----------------------------	--	--	--	--

R1G

tgtatgccgggttgggaggtgttgtgt

C M P G W E V L C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Notch homolog 4 (Drosophila) [Homo sapiens]	23.5	CMPGW	CMPGW	cell differentiation
p600 [Homo sapiens]	21.0	PGWEV	PGWEV	IL-13: role in the pathogenesis of bronchial asthma. regulatory agent against TNF-alpha-induced Regulatory effects of IL-13on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis.
Clq receptor protein (CD93) [Homo sapiens]	21.0	CMPGWEVL	CLPGW-VL	Enhances phagocytosis of professional phagocytes
Smad ubiquitination regulatory factor 1 isoform 2 [Homo sapiens]	21.0	PGWEV	PGWEV	regulates cell polarity an ubiquitin ligase specific for BMP receptor-regulated Smads,
NOTCH 1 [Homo sapiens]	19.7	CMPGWE-VLC	CMPGYEGVHC	cell differentiation
MEGF10 protein [Homo sapiens]	19.3	CMPGW	CLPGW	inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses
ADAM metallopeptidase domain 19 isoform 1	19.3	CMPGW	CLPGW	disintegrin and metalloproteinase that converts TNF-alpha precursor

preproprotein [Homo sapiens]				into its mature form
------------------------------	--	--	--	----------------------

R1H

tgtaagcgtggcaatagtggttcttgt

C K R G N S G S C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
latent transforming growth factor beta binding protein 2 variant [Homo sapiens]	19.7	RGNSGSC	RGQSGSC	7.1.1.1.1.1 complex that sequesters latent TGF-beta.
mannose receptor, C type 2 [Mus musculus]	18.9	CKRGNS	CKRSNS	play a role in the development or progression of murine osteoarthritis.
semaphorin 5B isoform 2 [Homo sapiens]	18.5	NSGSC	NSGSC	involved in axonal guidance induces expression of at least nine genes related to the host's immune response, including TNF-alpha and IL-8
interleukin 2 receptor, alpha chain [Homo sapiens]	18.0	CKRG---NSGS	CKRGFRRKSGS	CD25 High express in T regulatory cells

R2A

tgtcagcggttggtgggggttcgcgtgt

C Q R L V G F A C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
BCL2-like 10 [Homo sapiens]	20.2	CQRLV	CQRLV	apoptosis facilitator block apoptosis induced by interleukin-3 induction of apoptosis with the CD95 ligand

thyroid hormone receptor-associated protein complex component TRAP240 [Homo sapiens]	18.5	CQRLVG---FA	CQILVGCSMFA	regulate embryonic development.
ferritin	18.5	QRLVG	QRLVG	ferroxidase activity TIM-2 is a receptor for ferritin and has been shown to regulate T cell activation in vitro and T cell-mediated disease in vivo
Toll-like receptor 6 [Mus musculus]	18.0	CQRLVGF	CQRLMTF	Recognizes mycoplasmal macrophage-activating lipopeptide-2 cooperatively with TLR2, and appears to discriminate between the N-terminal lipoylated structures of mycoplasmal macrophage-activating lipopeptide-2 and lipopeptides derived from other bacteria.
nucleoporin 205kDa [Homo sapiens]	18.0	LVGFA	LVGFA	steroid and nuclear hormone receptor superfamily
vitamin D receptor [Homo sapiens]	17.6	QRLVGFA	QKVVGFA	diseases and disorders, including hyperproliferative diseases, immune dysfunction, endocrine disorders, and metabolic bone disease
natural resistance associated macrophage protein 1 [Equus caballus]	17.2	CQRL	CQRL	mutations at this locus cause susceptibility to infectious diseases regulates macrophage activation in infectious and autoimmune diseases.

R2B

tgtctgcaggccagccccaatttttgt

C L Q A S P N F C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
fibroblast growth factor-8 [Homo sapiens]	23.1	CLQA-----SPNF	CLQAQVTVQSSPNF	expressed in increased levels in breast cancer
Notch homolog 2 (Drosophila) [Homo sapiens]	21.4	LQASPN	LQASPN	cell differentiation
E-selectin (ELAM-1) [Homo sapiens]	21.0	CLQASPNF	CLQSSGNF	Endothelial leukocyte adhesion molecule
Integrin (CD29) [Homo sapiens]	18.9	CLQASPN	CIQAGPN	fibronectin receptor
Notch2 protein [Mus musculus]	18.0	LQASP	LQASP	cell differentiation
Forkhead box O3A [Homo sapiens]	18.0	LQASP	LQASP	controls cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP.
laminin, beta 1 [Homo sapiens]	18.0	PNFC	PNFC	extracellular matrix protein. binds heparin and heparin sulfate

R2C

tgtaatggctccgtgaggtccttttgt

C N G S V R S F C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
defensin, beta 108B [Homo sapiens]	18.9	NGSVRSFC	NGSCRDFC	expression, synergism was observed when IL-1beta was combined with tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma.
selectin E (endothelial	18.0	NGSVR	NGSVR	Endothelial leukocyte adhesion

adhesion molecule 1) [Homo sapiens]				molecule
transforming growth factor, beta 2 [Rattus norvegicus]	18.0	GSVRSFC	GSVGSFC	complex that sequesters latent <u>TGF-beta.</u>
laminin, alpha 4 [Mus musculus]	17.6	NGSVRSFC	NGAVRCIC	expressed in basement membranes such as those beneath endothelia
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 3 proprotein [Homo sapiens]	17.2	RSFC	RSFC	disintegrin and metalloproteinase that converts TNF-alpha precursor into its mature form

R2E

tgtcccgggttcggcctcgcctattgt

C P G F G L A Y C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Apoptosis related protein [Homo sapiens]	21.0	PGFGLA	PGFGLA	apoptosis facilitator
LIM-like protein 2G, 2F, 2E, 2D, 2C, 2A [Homo sapiens]	19.7	GLAYC	GLAYC	associate with cancer development
PREDICTED: similar to Forkhead box protein N1 [Pan troglodytes]	19.7	CPGFG	CPGFG	mice and rats disrupt normal hair growth and thymus development, causing nude mice and rats to be immune-deficient
fibrillin 2 precursor [Homo sapiens]	19.3	PGFGLA----YC	PGFVLAPNGRYC	matrix assembly.

latent TGF-beta binding protein-4 [Homo sapiens]	18.5	GFGLAY	GFGLPY	complex that sequesters latent TGF-beta.
interleukin 20 [Mus musculus]	18.5	GFGLAY	GFGLAF	a new effector cytokine in skin inflammation stimulates a signal transduction pathway through STAT3 Both receptor subunits are expressed in skin and are dramatically upregulated in psoriatic skin
interleukin 12 p35 subunit [Sus scrofa]	18.5	PGFGL	PGFGL	natural killer cell stimulatory factor
DEC-205/CD205 protein [Bos taurus]	18.5	PGFGL	PGFGL	putative antigen-uptake receptor and endocytosis receptor on human dendritic cells. DEC-205 can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II
CD276 antigen [Homo sapiens]	17.6	PGFGLA PGFGLA	PGFSLA (56-61) PGFSLA (274-279)	Costimulatory molecule Selective responsiveness to common gamma chain cytokines in peripheral blood-derived cytotoxic T lymphocytes
laminin, alpha 2 [Homo sapiens]	17.2	CPGF	CPGF	Associated with merosin, congenital muscular dystrophy
TNFRSF1B protein [Homo sapiens]	17.2	PGFGLA	PGFGVA	expressed on stimulated T and B lymphocytes they can play a proapoptotic role in TNF signaling
CD22 [Canis familiaris]	17.2	CPGF	CPGF	B-lymphocyte cell adhesion molecule

CD69 antigen [Rattus norvegicus]	17.2	CPGF	CPGF	early T-cell activation antigen
----------------------------------	------	------	------	---------------------------------

R2F

tggtttttgtttaccttcgagggcgtgt

C F L F T F E A C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) [Bos taurus]	21.0	CFLFT	CFLFT	chaperonin,
Glucagon-like peptide 2 receptor [Mus musculus]	20.6	FLFTF	FLFTF	G protein-coupled receptor superfamily member
von Willebrand factor precursor [Homo sapiens]	20.2	TFEAC	TFEAC	bleeding disorder accompanied by a complex hemostatic defect circulate as a complex in plasma
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2 [Mus musculus]	19.7	FTFEA	FTFEA	containing the consensus sequence of a death effector domain of fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein a negative mediator of apoptosis in certain cell types.
IL-17RE [Mus musculus]	18.9	CFLFTFE	CFKFSFE	The function of the encoded protein has not yet been determined
dendritic cell-associated C-type lectin-1; DECTIN-1 [Mus musculus]	18.9	CFLFTF	CYLFSF	C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. is involved in co-stimulation of T cells beta-glucan receptor

				highest expression being in the liver, lung, and thymus pattern-recognition receptor that recognizes a variety of beta-1,3-linked and beta-1,6-linked glucans from fungi and plants Laminarin and glucan phosphate are ligands
CD68 antigen variant [Homo sapiens]	18.0	CFLF	CFLF	highly expressed by human monocytes and tissue macrophages
follicle-stimulating hormone beta subunit [Sus scrofa]	18.0	CFLF	CFLF	enables ovarian folliculogenesis to the antral follicle stage
neutrophil adherence receptor alpha-M subunit[Homo sapiens]	18.0	CFLF	CFLF	CD11b, complement receptor type 3 promote adhesion of granulocytes to each other and to endothelial cell monolayers
glycoprotein Mac-1[Homo sapiens]	18.0	CFLF	CFLF	CD11b, in inflammation plays an essential role in the initiation and progression of atherosclerosis
CD36 antigen [Rattus norvegicus]	18.0	CFLF	CFLF	thrombospondin receptor, collagen type I receptor
MEGF8 [Homo sapiens]	18.0	CFLF	CFLF	Multiple EGF-like-domain protein 4 play a critical role in a number of extracellular events, including cell adhesion and receptor-ligand interactions.
vascular endothelial growth factor and type I collagen inducible protein [Homo sapiens]	18.0	CFLF	CFLF	membrane-bound coreceptor to a tyrosine kinase receptor for both vascular endothelial growth factor (VEGF) and semaphorin family

				members
--	--	--	--	---------

R2G

tgtaggggtgtgctgatgaggtattgt

C R G V L M R Y C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2 isoform 1 preproprotein [Homo sapiens]	20.6	CR-GVLMRYC	CRMEVLSRYC	disintegrin and metalloproteinase that converts TNF-alpha precursor into its mature form
laminin B1 [Homo sapiens]	20.6	VLMRYC	VLMPYC	The major components of basal laminae
von Willebrand factor-cleaving protease precursor [Homo sapiens]	19.7	GVLMRY	GVLLRY	bleeding disorder accompanied by a complex hemostatic defect circulate as a complex in plasma.
ADAMTS13 [Homo sapiens]	19.7	GVLMRY	GVLLRY	disintegrin-like and metalloprotease von Willebrand Factor (VWF)-cleaving proteinase activity in thrombotic thrombocytopenic purpura
semaphorin 5A [Homo sapiens]	19.7	MRYC	MRYC	involved in axonal guidance Enhanced SEMA5A induces expression of at least nine genes related to the host's immune response, including TNF-alpha and IL-8
interleukin 12 receptor beta 1 [Cervus elaphus]	19.7	MRYC	MRYC	T-cell activation
Semaphorin F [Mus musculus]	19.7	MRYC	MRYC	localization in malignant human lung are involved in signaling

				secreted member
laminin, beta 3 [Homo sapiens]	19.3	CRGVL	CRGVL	human keratinocyte extracellular matrix
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 3 proprotein [Homo sapiens]	18.9	VLTRYC	VLARYC	disintegrin and metalloproteinase that converts TNF-alpha precursor into its mature form

R2H

tgtagggcggttcgtggtggcgctcgtgt

C R A F V V A S C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
slit homolog 1 (Drosophila) [Homo sapiens]	21.8	CRAFVVA	CRAFAVA	expression was enhanced in tissue from several different types of tumors
C9 complement protein[Homo sapiens]	20.6	CRAFVVASC	CRSFVAIC	formation of the membrane attack complex (MAC) on the membranes of target cells
Somatotropin [Homo sapiens]	18.9	CRAFVVASC	CRRFVESSC	Growth hormone
platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa [Homo sapiens]	18.0	RAFVVA	RGFVVA	intracellular localization found in brain
Hyaluronoglucosaminidase 2 [Homo sapiens]	18.0	RAFVVA	RPFVVA	glycosaminoglycan present in the extracellular matrix hyaluronidase-2 exhibits very low hyaluronidase activity

R3A

tggttcctacgagacgtctttctggtgt

C S Y E T S F W C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
histamine H3 receptor isoform 4	25.7	YETSFW	YETSFW	G-protein coupled receptor 97 a presynaptic autoreceptor on histamine neurons in the brain and a presynaptic heteroreceptor in nonhistamine-containing neurons in both the central and peripheral nervous systems searching EST databases for novel G protein-coupled receptors (GPCRs) using the alpha-2-adrenergic receptor sequence as a query

R3B

tgtctcatgagggccggcccttttgt
C L M R A G P F C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
Serine/threonine protein kinase MASK	22.3	LMRAGPF	LLRAGPF	have roles in mitogen-activated protein kinase cleaved by caspase-3 in vitro, and overexpression induced apoptosis in a human breast cancer cell line
SOK1	22.3	LMRAGPF	LLRAGPF	Mitogen-activated protein kinase cascades have been conserved throughout evolution. In mammals, these cascades allow responses to complex stimuli such as growth factors and inflammatory cytokines
SOK1	20.2	CLMRAGP	CLARAGP	The WWE domains are thought to mediate some protein-protein

				interaction, and are frequently found in ubiquitin ligases (
adrenergic, beta-1-, receptor	20.2	CLMRAGP	CLARAGP	stimulate adenylate cyclase, although they subserve different physiologic functions.

R3C

tgtcgcggtgatgagttcgtctcctgt
C R G D E F V S C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
APOLIPOPROTEIN E RECEPTOR 2	24.0	CRGDEF	CRGDEF	an extracellular matrix protein, and mammalian disabled a cytosolic protein that activates tyrosine kinases
IL23R protein [Homo sapiens]	23.5	DEFVSC	DEFVSC	Expression of the IL-12R subunits, IL-12Rbeta1 and IL-12Rbeta2, is upregulated in both microglia and splenic macrophages upon stimulation with LPS or IFN-gamma and LPS, whereas the IL-23R subunit is upregulated only in macrophages.
cyclophilin A	21.4	CRGDEF	CRGDDF	Cyclosporin A-binding protein
X-linked TGIF-like protein	21.0	RG-DEFVS	RGTDEFVS	shared region among the sex chromosomes

R3D

tgtcagtcgcactcggcgtttgtttgt
C Q S H S A F V C

PROTEINA	Score	SEQ FAGO	SEQ HOMOLOGA	LITERATURA
DDX42	21.8	QSHSAF	QSHSAF	DEAD-box proteins
mast cell maturation inducible protein 1 [Mus musculus]	19.7	CQSHSAFVC	CTSHSSMVC	to play a role in innate immune function by regulating the production of proinflammatory cytokines.
interleukin-21	19.3C	SAFVC	SAFSC	novel type I cytokine IL21 augments anti-CD3 mediated stimulation of the proliferation of naïve T cells.