

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

**MATHEUS MONTEIRO DA SILVA**

**Implementação de ensaios para o rastreamento de  
novas drogas e prospecção de peptídeos que tenham  
como alvo o receptor do fator de crescimento neural**

**VERSÃO CORRIGIDA DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/11/2022

MATHEUS MONTEIRO DA SILVA

**Implementação de ensaios para o rastreamento de  
novas drogas e prospecção de peptídeos que tenham  
como alvo o receptor do fator de crescimento neural**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Bioquímica)*

*Orientador (a): Prof. (a). Dr (a). Deborah Schechtman*

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M772i Monteiro da Silva, Matheus  
Implementação de ensaios para o rastreamento de novas drogas e prospecção de peptídeos que tenham como alvo o receptor do fator de crescimento neural / Matheus Monteiro da Silva. - São Paulo, 2023. 134 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: Schechtman, Deborah

1. Dor. 2. TrkA. 3. NGF/NGFR. 4. Peptídeos. 5. Phage display. I. T. II. Schechtman, Deborah, orientador.

"Implementação de ensaios para o rastreamento de novas drogas e prospecção de peptídeos que tenham como alvo o receptor do fator de crescimento neural"

## **MATHEUS MONTEIRO DA SILVA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

---

Profa. Dra. Deborah Schechtman  
(Orientadora e Presidente)

**APROVADO(A) POR:**

---

Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho  
IQ - USP

---

Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro  
ICB - USP

---

Prof. Dr. Jörg Kobarg (por videoconferência)  
FCF - UNICAMP

## **AGRADECIMENTO(S)**

Agradeço o apoio e auxílio de todos que estiveram ao meu lado, tanto na vida pessoal quanto no decorrer da minha carreira, tais como meus pais e irmãos, familiares e amigos de dentro e de fora do meio acadêmico. Agradeço a minha orientadora por confiar no meu trabalho e me ajudar nesse percurso que foi de muito trabalho, aprendizado e crescimento. Sou grato aos meus colegas de grupo que foram pacientes e companheiros, e que em muitos momentos souberam me auxiliar e fornecer apoio, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agência fundamental na minha vida pois proveu o apoio financeiro para que eu pudesse durante este período me dedicar exclusivamente ao trabalho acadêmico científico. Sou igualmente grato a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio no início da minha vida acadêmica (durante a Iniciação científica) e durante este período do mestrado, visto que pude usufruir dos recursos fomentados por esta fundação, através dos projetos dirigidos por minha orientadora. Sou muito grato a todos os colaboradores e laboratórios parceiros, em especial ao Professor Dr. Ricardo Giordano e seus alunos que me auxiliaram em pontos fundamentais durante o desenvolvimento deste projeto. Além disso, agradeço ao grupo da Professora Dra. Daniela Basseres e do Professor Dr. Eduardo Reis pela harmonia, respeito e aprendizado obtida durante este período, visto que compartilhamos dos mesmos espaços para o trabalho e convivência. Também sou grato pelo espaço institucional que me foi disponibilizado nesta universidade, especificamente dentro deste instituto, graças ao qual pude ter uma grande liberdade para produzir e realizar meu trabalho.

*“O homem não é apenas como é concebido, mas como ele se concebe a partir da existência. O homem nada é além do que se faz ser”*

*Jean-Paul Sartre - O existencialismo é um humanismo*

## RESUMO

### **Implementação de ensaios para o rastreamento de novas drogas e prospecção de peptídeos que tenham como alvo o receptor do fator de crescimento neural**

O processo de nocicepção pode ser caracterizado como uma sensação que é capturada e transmitida por neurônios periféricos (nociceptores), sensação esta que pode se originar de um estímulo nocivo (térmico ou mecânico) ou de uma condição patológica. As células nervosas responsáveis por capturar o estímulo nocivo são conhecidas como nociceptores e são ativadas por diversos fatores, dentre eles o fator de crescimento neural (NGF - nerve growth factor) secretado por células inflamatórias. O NGF após ser liberado se liga a um receptor de alta afinidade presente na membrana dos nociceptores, a *Tropomyosin-related kinase A* (TrkA), que também possui uma porção intracelular com atividade de tirosina quinase. A ligação do NGF à TrkA leva à ativação de diversas vias de sinalização de ação neurotrófica. Além disso, atividade do NGF se associa a dor por meio da ativação da via da PLC $\gamma$  o que resulta na despolarização dos nociceptores e na transmissão deste sinal para o cérebro onde é compreendido como dor.

Com intuito de monitorar a atividade da TrkA, padronizamos um ensaio de placa capaz de detectar a ativação da TrkA em linhagens celulares estáveis. Utilizando este ensaio demonstramos a ativação da TrkA pelo NGF assim como sua inibição na presença de um inibidor comercial. Em outra frente deste trabalho também conseguimos selecionar por meio da metodologia de Phage display um peptídeo capaz de se ligar a porção receptora da TrkA (NGFR). Este peptídeo se liga especificamente à TrkA de rato e humana, não se ligando à demais quinases da família das Trk's (TrkB e TrkC).

Estudos posteriores determinarão se o peptídeo possui algum efeito no processo de nocicepção.

**Palavras chave:** Dor, TrkA, NGF, NGFR, Ensaio, Peptídeo e Phage display.



## **ABSTRACT**

### **Implementation of assays for screening new drugs and prospecting for peptides that target the neural growth factor receptor**

The nociception process can be characterized as a sensation that is captured and transmitted by peripheral neurons (nociceptors), a sensation that can originate from a noxious stimulus (thermal or mechanical) or from a pathological condition. The nerve cells responsible for capturing the noxious stimulus are known as nociceptors and are activated by several factors, including nerve growth factor (NGF) secreted by inflammatory cells. After NGF is released, it binds to a high-affinity receptor present on the membrane of nociceptors, Tropomyosin-related kinase A (TrkA), which also has an intracellular portion with tyrosine kinase activity. Binding of NGF to TrkA leads to the activation of several signaling pathways of neurotrophic action. Furthermore, NGF activity is associated with pain through the activation of the PLC $\gamma$  pathway which results in the depolarization of nociceptors and the transmission of this signal to the brain where it is understood as pain.

In order to monitor TrkA activity, we standardized a plaque assay capable of detecting TrkA activation in stable cell lines. Using this assay, we demonstrated the activation of TrkA by NGF as well as its inhibition in the presence of a commercial inhibitor. On another front of this work, we were also able to select, through the Phage display methodology, a peptide capable of binding to the receptor portion of TrkA (NGFR). This peptide binds specifically to rat and human TrkA, not binding to other kinases of the Trk family (TrkB and TrkC). Further studies will determine whether the peptide has any effect on the nociception process.

**Key words:** Pain, TrkA, NGF, NGFR, Assay, Peptide and Phage display.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Neurocircuito ascendente da nocicepção.....	15
Figura 2. Vias de sinalização ativadas pelo NGF e seus efeitos celulares.....	23
Figura 3. Modelo esquemático das alterações observadas nas vias do Naked Mole Rat deflagradas pela TrkA e seus efeitos funcionais.....	30
Figura 4. Sequência de etapas da metodologia de <i>Phage Display</i> .....	36
Figura 5. Sequência de etapas do ensaio de atividade in Cell.....	50
Figura 6. Modelo esquemático de bacteriófago filamentosos.....	55
Figura 7. Esquema de titulação de fagos.....	60
Figura 8. Titulação do anti TrkA total em linhagens estáveis de células HEK 293T utilizando o imunoensaio <i>in cell</i> .....	64
Figura 9. Ativação da TrkA por meio da reatividade de anticorpos contra a sua forma fosforilada (TrkA-P) .....	67
Figura 10. Cinética de ativação da TrkA em função do tempo.....	71
Figura 11. Inibição farmacológica da TrkA pelo inibidor comercial GNF5837.....	73
Figura 12. Ensaio <i>in vitro</i> para a formação do complexo NGF-NGFR em gel nativo (Native-PAGE) .....	78
Figura 13 Enriquecimento das bibliotecas peptídicas X6 e CX8C, amplificação dos insertos por PCR de colônia e sequenciamento dos fagos oriundas do terceiro e quarto ciclo do protocolo de <i>phage display</i> .....	80
Figura 14. Ensaio de ligação dos peptídeos selecionados na etapa de <i>phage display</i> frente a TrkA e aos demais controles (IgG humano e BSA) .....	86
Figura 15. Ensaio de ligação do peptídeo CLSAGYPLFC frente as Trk's (TrkA, TrkB e TrkC) e demais controles (IgG humano e BSA) .....	88
Figura 16. Alinhamento dos fagos CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC E LFVALF com o NGF, e seqüências dos receptores (TrkA, TrkB e TrkC) e neurotrofinas (NGF, BDNF, NT3 e NT4) alinhadas.....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ciclo da reação do PCR de colônia.....	55
Tabela 2. Oligonucleotídeos para amplificação das sequências peptídicas selecionadas por phage display.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
TrkA	Tropomiosina quinase A
BSA	Albumina sérica bovina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante completo de Freund
CLSAGYPLFC	Peptídeo obtido por Phage Display
CLQGFGLGRC	Peptídeo obtido por Phage Display
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DEMEM	Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
dNTP's	Trifosfato de desoxinucleotídeos
ERK 1/2	Quinase reguladora de sinal extracelular
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês <i>fibroblast growth factor</i> )
GNF5837	Inibidor comercial da TrkA
GLY-344	Glicina na posição 344
UT's/TU's	Unidade transdutora (do inglês <i>Transduction unity</i> )
HEK 293	Célula de rim embrionário humano 293
HIS-4	Histidina na posição 4
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
Ig1/2	Domínio imunoglobulina 1 e 2
IP3	Inositol trifosfato
LFVALF	Peptídeo obtido por Phage Display
NMR	Rato toupeira pelado (do inglês <i>naked mole Rat</i> )
NSAID	Drogas anti-inflamatórias não esteroides ( do inglês <i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> )
NGF	Fator de crescimento neural
NGFR	Porção receptora de NGF da TrkA
NTRK1	<i>Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1</i>

p85	Subunidade regulatória da PI3K
PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Banco de dados de proteína
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC $\zeta$	Proteína quinase C M $\zeta$
PLC $\gamma$	Fosfolipase C $\gamma$
PHE-303	Fenilalanina na posição 303
p75NTR	Proteína de peso 75 kDa receptora de neurotrofinas (do inglês <i>neurotrophin receptor</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês <i>protein data bank</i> )
PBS	Tampão salino de fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldeído
QYP	Peptídeo fosforilado
RIPA	Tampão de lise
SDS	Dodecyl sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecylsulfate</i> )
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida adiconado de dodecyl sulfato de sódio
SHC	Proteína transformadora SHC
SNC	Sistema Nervoso Central
SER-304	Serina na posição 304
TKD	Domínio quinase
TM	Domínio transmembrana
TrkA	Receptor de Tropomiosina quinase A (do inglês <i>Tropomyosin receptor kinase A</i> )
TrkB	Receptor de Tropomiosina quinase A (do inglês <i>Tropomyosin receptor kinase B</i> )
TrkC	Receptor de Tropomiosina quinase (do inglês <i>Tropomyosin receptor kinase C</i> )
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transiente 1 (do inglês <i>transient receptor potential vanilloid 1</i> )

# Sumário

1. Introdução.....	16
1.1. Dor e nocicepção.....	16
1.2. Neuroquímica da Dor (NGF, TrkA e TRPV1) .....	19
1.3. TrkA como alvo de novos analgésicos.....	24
1.4. Rato toupeira pelado (Naked Mole Rat) .....	27
1.5. Ensaios para validação de alvos e seleção de compostos.....	31
1.6. Prospecção de peptídeos biologicamente ativos e phage display.....	33
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos.....	37
3. Materiais e Métodos.....	38
3.1. Lista de materiais.....	38
3.2. Estabelecimento das linhagens celulares expressando TrkA.....	43
3.2.1 Cultura de células.....	43
3.2.2 Transfecção de células eucarióticas.....	43
3.2.3 Geração de linhagens.....	44
3.3. Detecção da ligação do NGF ao seu receptor (NGFR) e Western Blot em gel nativo (Native-PAGE) .....	45
3.4. imunoensaio <i>in cell</i> para a determinação da atividade da TrkA.....	47
3.5. Prospecção de peptídeos ligantes da NGFR por phage display.....	50
3.5.1 Biblioteca de peptídeos expressos em fagos.....	50
3.5.2 Ensaio de Biopanning.....	52
3.5.3 Sequenciamento dos fagos para a identificação da sequência dos peptídeos selecionados.....	54
3.5.4 Precipitação e purificação dos fagos.....	58
3.5.5 Titulação dos fagos.....	58
3.5.6 Ensaio de ligação dos fagos.....	60
3.5.7 Análise das sequências peptídicas obtidas e mutagênese <i>in silico</i> do NGF.....	62
4. Resultados.....	63
4.1. Padronização de um ensaio <i>in cell</i> para a medida de atividade da TrkA.....	63
4.1.1 Padronização do imunoensaio de atividade <i>in cell</i> .....	63
4.1.2 imunoensaio de atividade <i>in cell</i> detecta a forma ativa da TrkA nas linhagens por meio do reconhecimento de resíduos de tirosina fosforilados no domínio quinase da enzima.....	66
4.1.3 Cinética de ativação em função do tempo demonstra hipoatividade da TrkA de NMR comparada à de Rato.....	69
4.1.4 Ensaio de atividade <i>in cell</i> é capaz de detectar a inibição de atividade da TrkA pelo inibidor comercial pan-Trk GNF5837.....	72
4.2. Rastreamento de bibliotecas de Phage display para peptídeos que se liguem ao receptor de NGF (NGFR).....	76
4.2.1 Formação do complexo NGF/NGFR garante viabilidade de aplicação do receptor comercial (NGFR) em ensaios de seleção <i>in vitro</i> .....	76

4.2.2 Rastreamento das bibliotecas de fagos cíclica (CX8C) e linear (X6) de Phage Display resultou na seleção de fagos que se ligam ao NGFR.....	79
4.2.3 Fago expressando o peptídeo CLSAGYPLFC apresenta maior afinidade de ligação pela porção receptora da TrkA (NGFR) do que os demais fagos selecionados (CLQGFGLGRC e LFVALF) .....	84
4.2.4 Fago expressando o peptídeo CLSAGYPLFC se liga com maior especificidade à porção receptora da TrkA (NGFR) do que à porção receptora das demais Trk's (TrkB e TrkC) .....	87
4.2.5 Análise da estrutura tridimensional do complexo NGF/TrkA e dos peptídeos selecionados por phage display revelam similaridades entre o peptídeo CLSAGYPLFC e a sequência do NGF.....	89
5. Discussão.....	99
5.1 Referente a padronização do ensaio de atividade In Cell.....	99
5.2 Referente ao rastreamento de peptídeos por phage display.....	105
6. Conclusão.....	120
7. Referências bibliográficas.....	121
8. Súmula curricular.....	133

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor e nocicepção.

A dor é um estímulo sensorial que tem um papel primordial para a sobrevivência, visto que é uma sinalização associada a um potencial dano, podendo ser classificada temporalmente em aguda ou crônica. A dor aguda ocorre por um período determinado, sendo decorrente de uma lesão ou doença, já a crônica se repete ou se estende ao longo do tempo sendo considerada uma doença propriamente dita. A dor ainda pode ser classificada, de acordo com sua origem, em nociceptiva, neuropática e psicogênica, (KLAUMANN, P. R. And WOUK, A. F. P. F, 2008; CHENG, J.K. and R.R. Ji, 2008;).

A dor nociceptiva é o principal canal de defesa do organismo sendo classificada em visceral ou somática. A dor visceral é percebida nos órgãos internos, articulações e ossos. A dor somática se dá como um contato mais superficial tendo origem e se propagando ao nível da pele, tecidos intermediários e mucosas (TEIXEIRA, M.J 2001, PEREIRA, W.B 2013).

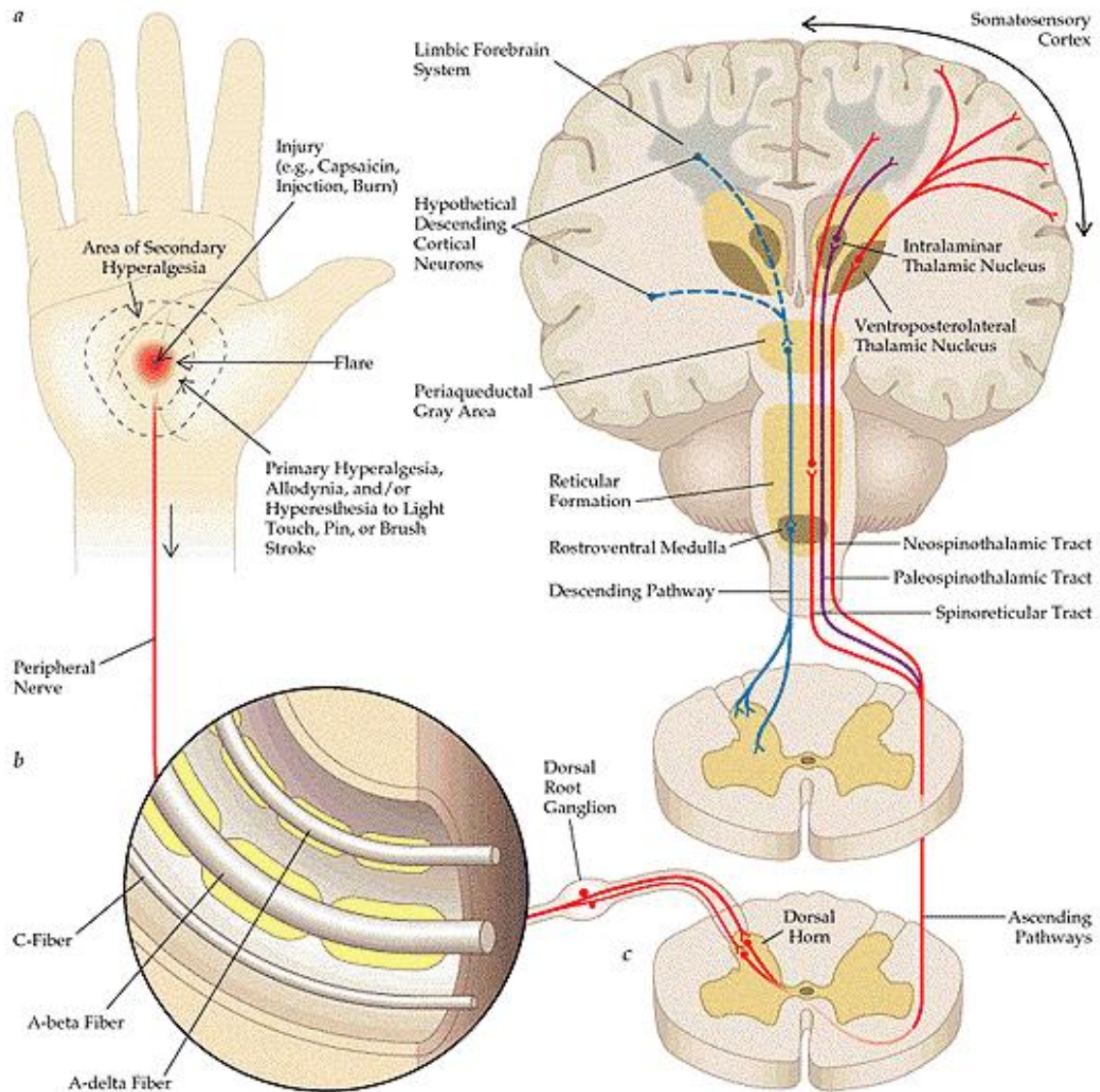
A circuitaria nervosa responsável pela percepção da dor nociceptiva se dá através de neurônios nociceptivos periféricos de primeira ordem, conhecidos como nociceptores. As terminações dessas células nervosas encontram-se dispersas anatomicamente, haja vista a necessidade de se detectar os estímulos lesivos por toda a extensão do corpo (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os nociceptores podem ser ou não mielinizados, sendo ainda classificados em fibras do tipo A $\delta$  ou C. Fibras A $\delta$  são mielinizadas, sendo caracterizadas como fibras que conduzem de forma mais rápida o estímulo elétrico. Já as fibras do tipo C são desmielinizadas e por consequência conduzem o estímulo elétrico de forma



mais lenta. As fibras C ainda se subdividem em duas classes distintas quanto a sua neuroquímica: classe peptidérgica e não peptidérgica. A classe peptidérgica ainda se subdivide no grupo das células que expressa a substância P (peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP)) e no grupo das células que expressam o receptor de alta afinidade para o fator de crescimento neural (NGF). As células da classe não peptidérgica não expressam nenhuma das espécies moleculares da classe peptidérgica, porém são positivas para isolectina B4 (IB4) (SNIDER; MCMAHON, 1998).

Os corpos celulares dos neurônios nociceptores sensoriais, encontram-se em uma estrutura organizada denominada de gânglio da raiz dorsal (DRG). Na medula espinhal, mais precisamente na substância cinza do corno da medula (corno dorsal), são estabelecidas as conexões sinápticas entre os neurônios de primeira ordem vindos da periferia e os neurônios de segunda ordem cujas terminações axonais se projetam, a partir da região medular, para o sistema nervoso central (SNC) em direção ao córtex cerebral. Estímulos elétricos iniciados pelas células nociceptoras são transmitidos para neurônios de segunda ordem e destes para o sistema nervoso central, obtendo-se a nível cortical a sensação de dor. (Figura 1) (PLEUVRY; LAURETTI, 1996).



**Figura. 1 Neurocircuito ascendente da nociceção.** A inervação periférica conduz o sinal lesivo a partir de seu local de origem em direção aos corpos celulares dos neurônios sensitivos (Fibras C e A delta) o corpo desses neurônios encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG). Uma sinapse ocorre entre esse neurônio e um de segunda ordem no corno dorsal da medula. Esse neurônio cruza para o lado oposto do estímulo doloroso e é transferido para o sistema nervoso central (SNC). Por meio de vias ascendentes (tratos) o estímulo segue em direção à região talâmica e posteriormente à região somatossensorial do córtex onde a informação é processada a nível cortical como dor. (Kandel 2003, SCHATZBERG, A. F. and KORN, 2002 (sem adaptações)).

## 1.2 Neuroquímica da dor (NGF, TrkA, TrkB, TrkC e TRPV1).

Os nociceptores peptidérgicos de primeira ordem ainda podem ser analisados em relação a presença de determinadas neurotrofinas: os que dependem do fator de crescimento neural – *do inglês Nerve Growth Factor* (NGF), os que dependem do fator neurotrófico derivado do cérebro – *do inglês Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e os que dependem das neurotrofinas tipo 3 – *do inglês Neurotrophin type 3* (NT-3) e tipo 4 – *do inglês Neurotrophin type 4* (NT-4). Cada uma dessas moléculas se liga respectivamente à tirosina quinase A (TrkA), à tirosina quinase B (TRKB) e à tirosina quinase C (TRKC) (TEIXEIRA, M.J 2001; PEREIRA, W.B 2013; CASTRO LOPEZ, J.M 2003).

O fator de crescimento neural (NGF), foi um dos primeiros fatores neurotróficos a serem identificados, sendo responsável pelo desenvolvimento e manutenção de inervações sensoriais simpáticas. Sua descoberta se deu pelos estudos desenvolvidos pela pesquisadora italiana Rita Levi-Montalcini, nos quais foram observados os efeitos neurogênicos advindos do transplante de sarcomas murinos ectópicos em embriões de galinha (GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004; LEVI-MONTALCINI et al., 1996). Tais descobertas laurearam a pesquisadora com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1986.

Para além de sua atividade neurogênica o NGF se mostrou como um elemento relacionado com a ativação e expressão de canais que fazem a transdução do estímulo mecânico, canais estes que atuam sensibilizando diretamente nociceptores periféricos na vida adulta, sendo o NGF um fator importante para a percepção da dor (ROCHA, A. P. C 2009; KRAYCHETE, D. C 2008; INDO, Y 2018). Camundongos knockout para NGF apresentam redução da atividade sensorial nociceptiva e termoceptiva (Gudasheva, T. A 2015), em

contraponto, modelos de dor inflamatória em roedores apresentarem níveis aumentados de NGF, atestando assim a relevância deste fator como um modulador nociceptivo (Ashraf, S., K. 2016). Os receptores TrkA e p75NTR se mostram como mediadores da ação biológica do NGF e se caracterizam por apresentarem, respectivamente, alta e de baixa afinidade pelo fator. O receptor p75NTR é uma glicoproteína transmembranar chamada receptor de NGF de baixa afinidade (Radeke et al., 1987; Chao, 1992 and Reichardt, 2006). No entanto, ainda não está claro se o modo de ligação de baixa afinidade do NGF ao receptor é capaz de mediar todas as respostas biológicas deflagradas pelo fator. Já a (*Tropomyosin receptor kinase A* (TrkA)) é um receptor constituído de uma porção extracelular que se caracteriza como o receptor de alta afinidade para o NGF, estando essa estrutura receptora (extracelular) acoplada por um domínio transmembranar a uma porção intracelular com atividade de tirosina quinase.

Em aspectos de classificação a TrkA compõe uma família de tirosino quinases de membrana genericamente conhecidas como Trks. Essa família de enzimas é composta por outros dois elementos: a TrkB e a TrkC. Estas se caracterizam estruturalmente de forma muito semelhante (porção receptora, porção transmembranar e porção tirosino quinase) à TrkA (Barbacid., 1994). As neurotrofinas que ativam a TrkB são o BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) e a neurotrofina-4 (NT-4), que permitem a TrkB atuar em múltiplos efeito neurotróficos que incluem diferenciação celular e sobrevivência neuronal. Já a TrkC é ativada pela ligação da neurotrofina-3 (NT-3) a sua porção receptora, tendo como resultado um efeito final semelhante ao observado para a TrkB (diferenciação e sobrevivência). Tal similaridade nas respostas pode se originar no fato do NT-3 ter se revelado ao longo do tempo como uma neurotrofina de ação

promíscua, sendo capaz de agir tanto sobre TrkA quanto sobre a TrkB (Mitsiadis, 2016, Barbacid, 1994).

Retomando a TrkA, a atividade tirosina quinase da enzima ocorre após sua ligação ao NGF. Por meio de diversas autofosforilações que ativam a quinase e a torna-a apta recrutam proteínas, por meio de pontos de ancoragem, vias de sinalização que levam a diferenciação neuronal, sobrevivência celular e a nocicepção são ativadas (HUANG, E. J 2003).

Após uma injúria, células inflamatórias secretam NGF. Dímeros de NGF se ligam à porção receptora de NGF da TrkA que se encontra em uma configuração monomérica. A TrkA ligada ao NGF dimeriza-se, o que leva a autofosforilação das tirosinas Y674 e Y 675 da porção intracelular da quinase e sua consequente ativação. Outros resíduos de tirosina da TrkA são subsequentemente autofosforilados (Y490, Y751 e Y785) e passam a servir como âncoras para a ligação de substratos a nível intracelular, incluindo a proteína adaptadora SHC, o domínio regulatório p85 da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e PLC $\gamma$ . Essas ligações de proteínas à porção intracelular da TrkA levam a ativações das vias das proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e da Fosfolipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) / PKC (OBERMEIER, A 1993).

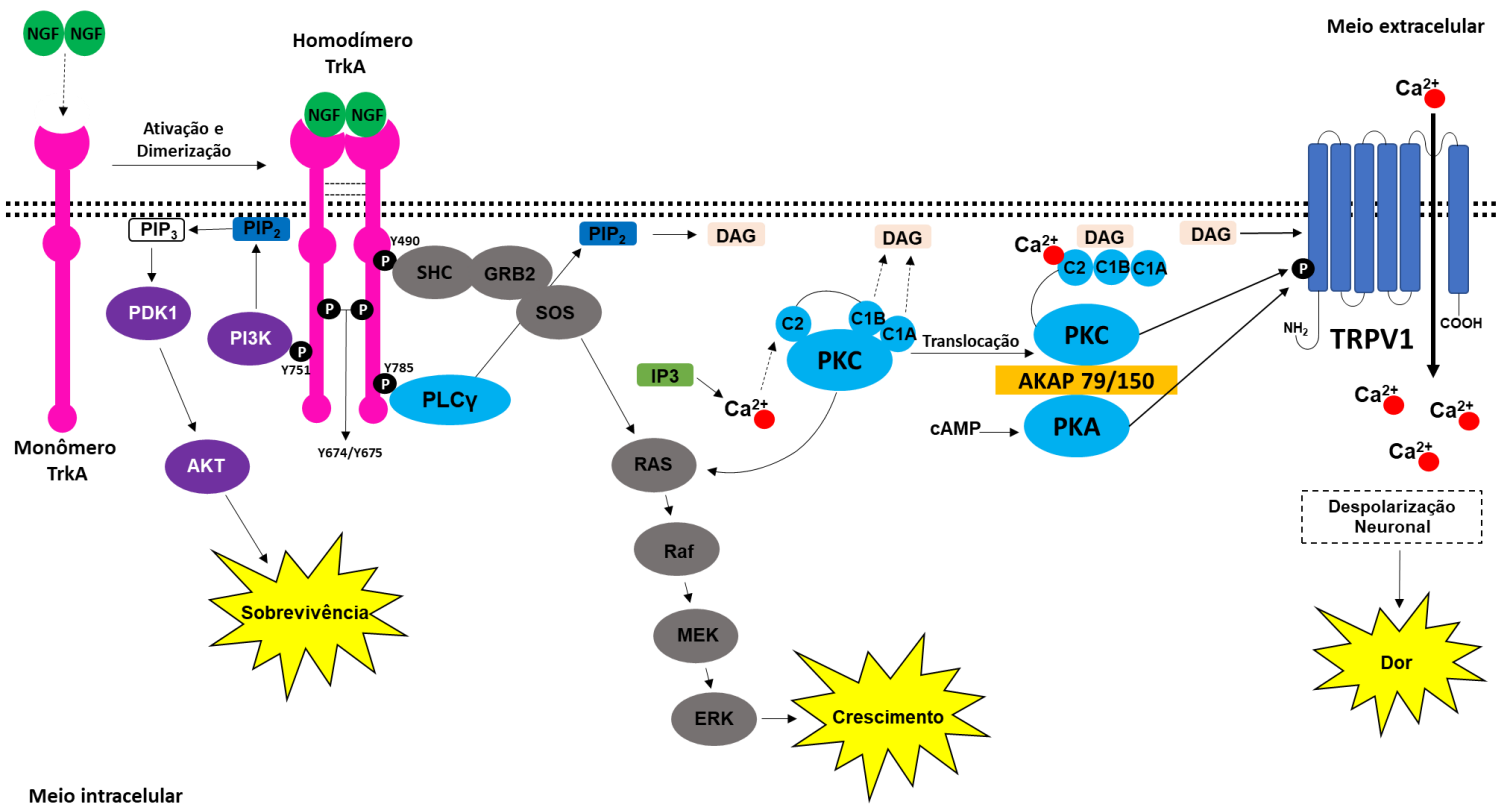
A autofosforilação do resíduo de tirosina na posição 490 leva ao recrutamento da proteína adaptadora SHC, ativando a via da ERK, enquanto a autofosforilação do resíduo Y751 leva a ativação de vias ligadas à proteína PI3K. Já o resíduo Y785 da TrkA quando fosforilado se mostra como um pré-requisito fundamental para o ancoramento e ativação da PLC $\gamma$  (CHOU, T. T 2000 e Moraes et. al 2022).

A PLC $\gamma$  se ancora à tirosina fosforilada da TrkA por meio de um dos substratos da TrkA, o domínio SH2. Após este ancoramento a PLC $\gamma$  é fosforilada em dois sítios distintos e importantes para a sua ativação (Bunney, T.D et. Al 2012). A PLC $\gamma$  ativada hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) nos subprodutos Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) (Chap, H., 2016; Rebecchi, M. J 2000; BAMJI-MIRZA. M 2019).

Os canais iônicos de potencial transitório (TRP's) pertencem a quatro subfamílias: TRPV (vanilóide), TRPM (mucopolipina), TRPA (anquirina), e TRPC (canônico). TRPV e TRPM atuam respectivamente em resposta ao calor e a quimiocepção. O canal TRPA atua em resposta ao frio e o TRPC é um pseudogene em humanos e em ratos atua na liberação de feromônios. A ativação da PLC $\gamma$  pela TrkA e a consequente liberação de subprodutos pela lipase (IP<sub>3</sub> e DAG) leva à ativação alostérica do membro 1 da subfamília V dos canais iônicos de potencial transitório, o TRPV1(CHUANG, H. H 2001).

O TRPV1 também descrito como receptor de capsaicina (composto ativo da pimenta), está bem caracterizado nos terminais dos nervos sensoriais responsáveis pela dor e sua função é a despolarização dos neurônios para a formação e transdução do impulso nervoso, através da entrada de íons bivalentes principalmente do cálcio, nos neurônios sensoriais, levando à despolarização da membrana e consequente propagação do potencial de ação. O TRPV1 pode ser diretamente ativado por ácidos, etanol, nicotina, 2-APB, ATP calor ou ainda por pimenta. Sua fosforilação pela ação das quinases PKC, PKA, PI3K e p38, potencializam a ativação e mantêm o canal aberto (CHUANG, H. H 2001; TÓTH, A. 2005).

A ativação da TrkA via NGF leva ao ancoramento e ativação da PLC $\gamma$  e à translocação do complexo (TrKA/PLC $\gamma$ ) para as proximidades do TRPV1. O acúmulo de DAG (da atividade catalítica da PLC $\gamma$  sobre ao PIP $_2$ ) próximo ao canal e a ativação da proteína quinase C épsilon (PKC $\epsilon$ ) por IP $_3$  levam à ativação do TRPV1 (WANG, H 2005; HEFTI, F.F 2006; ZHANG, H 2007). A ativação do canal possibilita o aumento do influxo de cátions bivalentes (Ca $^{2+}$ ) através do canal e a consequente despolarização da membrana da célula nervosa. O potencial de ação gerado é então propagado ao longo das fibras nervosas nociceptoras de primeira ordem (Peptidérgicas) em direção ao gânglio da raiz dorsal (DRG) e ao corno dorsal da medula, conforme descrito acima (; HEFTI, F.F 2006; CHUANG, H.H 2001). (Figura 2)



**Figura 2. Vias de sinalização ativadas pelo NGF e seus efeitos celulares.** A ativação da TrkA se dá inicialmente pela ligação do dímero de NGF ao monômero da TrkA, esse dímero é estabilizado pela dimerização da quinase e consequente autofosforilação de resíduos que levam à ativação da quinase bem como resíduos que servem para a ancoragem de proteínas sinalizadoras. O resíduo Y751 fosforilado serve de ponto de ancoragem para a PI3K que deflagra vias associadas a sobrevivência celular (via em roxo). O resíduo Y490 fosforilado está relacionado à ancoragem da proteína SHC e ativação terminal de vias associadas ao crescimento celular (via em cinza). A via direta em direção aos canais TRPV1 é iniciada mediante o ancoramento da proteína PLC $\gamma$  ao resíduo Y785 fosforilado da TrkA e culmina com a despolarização da célula nervosa e propagação do estímulo elétrico que posteriormente é processado como dor (via em azul). Os resíduos Y674/Y675 quando fosforilados são os responsáveis pela ativação da TrkA, sendo inclusive importantes marcadores de ativação da quinase.

### 1.3 TrkA como alvo de novos analgésicos.

O tratamento da dor crônica tem sido um desafio, tendo em vista que o tratamento mais eficaz se utilizar de opiáceos e anti-inflamatórios não esteroidais que apresentam muitos efeitos colaterais. Essas drogas agem farmacologicamente em receptores localizados nas membranas das células neuronais. A ação dos opioides para inibir a liberação de neurotransmissores é considerada seu principal efeito no sistema nervoso. A biologia molecular dos receptores de opioides confirma que existem 3 tipos de receptores opioides (m, d e k) todos acoplados a mecanismos intracelulares via proteínas G (Chahl LA, 1996). Estudos farmacológicos demonstraram a endorfina b, interage preferencialmente com os receptores m, as encefalinas com os receptores d e a dinorfina com os receptores k. A morfina tem afinidade consideravelmente maior para os receptores m do que para outros receptores opioides. O antagonista opioide, naloxona, inibe todos os receptores opioides, mas tem a maior afinidade pelos receptores m. Todos os 3 receptores produzem analgesia quando ligados a seu respectivo ligante opioide



(Chahl LA, 1996). A exposição crônica acaba por levar à dessensibilização dos receptores de opioides, ao desenvolvimento de tolerância ao tratamento e à dependência medicamentosa (Koob G.F; Sanna P.P; Bloom F.E, 1998). Um dos reflexos mais alarmantes relacionados ao uso opiáceos foi relatado em 2017, onde o sistema estatístico de vitalidade nacional, dos Estados Unidos, coordenado pelo centro de prevenção e controle doenças (CDC), chegou ao levantamento de 47.600 óbitos ocasionadas pelo uso não prescrito de substâncias opioides. Com base nesses dados, estima-se para o ano analisado cerca de 130 mortes diárias advindas do uso dessas substâncias. Desses óbitos, observou-se que homens e mulheres entre 25 a 34 anos representam 44% desse total (21.299 óbitos) (CDC/NCHS - US Department of Health and Human Services, National Vital Statistics System, CDC; 2017).

Desta forma, existe uma grande necessidade de se buscar novas classes de drogas que tenham capacidade farmacológica e potência analgésica. O NGF e a TrkA são alvos particularmente interessantes dentro deste contexto dado o papel chave que exercem na dor.

A literatura apresenta abordagens de interferência na interação NGF/TrkA visando mitigar a continuidade do processo nociceptivo. Bloqueadores da molécula de NGF, como oligonucleotídeos acoplados a partículas lipossomais e espécies de anticorpos anti NGF (Tanezumab), mostraram-se como estratégias efetivas no bloqueio do processo de alodinia e de dor inflamatória (Kumar and Mahal 2012, Hirose, Kuroda et al. 2016, Kashyap, Roberts et al. 2018). Um modelo contendo a porção receptora de NGF da TrkA fusionada à porção Fc de uma imunoglobulina (IgG) foi produzida com o intuito de ser um elemento de captura do NGF. Nas imediações da superfície celular onde fator atuaria ativando a quinase por se ligar

a sua porção receptora, este elemento quimérico competiria com o receptor endógeno pela ligação ao NGF, reduzindo a capacidade do fator em ativar a via da TrkA. Apesar de se tratar de uma tirosina quinase, abordagens intracelulares unidirecionais focadas no domínio quinase da enzima se mostraram com efeito promíscuo, a título de exemplo têm-se o desenvolvimento de moléculas pouco seletivas competidoras do sítio que liga ATP na TrkA (Angeles, Yang et al. 1998). Inibidores com ação biespecífica ou que atuem como interferentes impedindo o contato proteína/proteína se mostram como mais eficazes na interferência a nível intracelular (de Oliveira, Ferraz et al. 2016).

A ativação da TrkA se dá mediante o deslocamento do loop de ativação (após fosforilação) da região onde se encontra localizado o sítio catalítico da quinase, o que permite que a enzima venha a interagir com os demais elementos componentes da via. Um estudo focado em interferir neste processo em específico desenvolveu um peptídeo mimético do loop de ativação denominado IPTRK3, o mesmo após ligação ao sítio catalítico da TrkA impediu o progresso da via por meio do bloqueio do contato da quinase a seus substratos, além de ter sido eficaz em inibir a dor neuropática e testes em animais (Ma, Murata et al. 2010).

Essas abordagens em alguns casos geram efeitos colaterais. Por exemplo, o anti-NGF usado em ensaios clínicos para osteoartrite teve de ser descontinuado devido ao desenvolvimento de osteonecrose. Esse efeito colateral é provavelmente devido ao fato de todas as vias mediadas pelo NGF estarem bloqueadas com o anti-NGF, e para o remodelamento ósseo é preciso o crescimento de neuritos o que estaria inibido com o anti NGF (Apkarian and Reckziegel 2019; Pezet and McMahon 2006). Dessa forma inibidores farmacológicos ou biológicos que inibem completamente o NGF não seriam ideais

para o tratamento da dor. Tratamentos farmacológicos da dor inflamatória utilizando inibidores peptídicos ou pequenas moléculas sintéticas poderiam ser importantes para prevenir a progressão do quadro da dor.

Tendo por base achados moleculares da via de sinalização da TrkA e empregando uma abordagem de desenho molecular racional, um peptídeo que inibe a interação da TrkA e PLC $\gamma$ , denominado TAT-QYP, foi desenvolvido. O TAT-QYP foi capaz inibir a ativação da PLC $\gamma$  mediada por NGF em células HEK 293 transfectadas com a TrkA e em ensaios comportamentais *in vivo* de dor inflamatória aguda e crônica. O mesmo ainda se mostrou mais eficiente que os inibidores comerciais GNF5837 (inibidor da TrkA) e U73347 (inibidor de PLC) na reversão da sensibilidade dolorosa (Moraes, B.C. et al, 2022). Peptídeos específicos que mimetizam porções estruturais (partes das proteínas) de diferentes elementos das vias de sinalização da TrkA se mostram como potenciais inibidores das vias de sinalização da dor, causando possivelmente menos efeitos colaterais, além de serem ferramentas promissoras para entendermos o papel específico das diferentes vias de sinalização desencadeadas após a ativação da TrkA.

Fármacos que não provoquem o bloqueio completo da sinalização do NGF e atuem de maneira mais direcionada em vias específicas podem ser opções melhores e mais seguras. Como exemplo de inativação parcial da via da TrkA, discutimos a seguir o caso do Rato Toupeira Pelado, que possui uma TrkA hipoativa apresentando como consequência uma maior resistência à dor.

#### **1.4 Rato toupeira pelado (*Naked Mole Rat*).**

O Rato-toupeira-pelado do *inglês Naked Mole Rat (NMR)* (*Heterocephalus glaber*) é um organismo que ao longo da evolução reuniu em sua biologia

características que permitiram a espécie alcançar uma extensa expectativa de vida sem necessariamente desenvolver marcas clássicas (do inglês “Hallmarks”) ligadas ao processo de envelhecimento (Buffenstein 2005, 2008). Esses animais não apresentam sinais de risco aumentados à medida que envelhecem, desafiando de forma precisa a lei de mortalidade gompertziana, a qual propõe que a mortalidade humana se dá por um somatório de componentes idade dependentes e idade independentes (Ruby et al. 2018).

Habitante endêmico do nordeste da África é o roedor mais longevo já descrito, conhecido por uma vida máxima de pelo menos 32 anos (Lewis et al. 2016). Esses animais vivem em grandes grupos familiares eussociais dentro de labirintos subterrâneos, alimentando-se de tubérculos, bulbos e raízes (Jarvis 1981). O NMR exibe muitas adaptações fisiológicas para vida abaixo do solo (Buffenstein 2000), dentre elas tolerância à hipóxia e anoxia (Park et al. 2017), baixa taxa metabólica basal e termolabilidade (capacidade de adaptação da temperatura corporal ao ambiente quando os indivíduos são isolados da colônia (Buffenstein e Yahav 1991). Esses animais não só exibem longevidade de maneira anotomofuncional, mas também apresentam uma mínima diminuição de aspectos fisiológicos e bioquímicos que tipicamente sinalizam o avanço da idade (Buffenstein 2008; Edrey et al. 2011). A título de exemplo, tem-se a função cardiovascular destes animais que se mantém praticamente intacta durante o envelhecimento (Grimes et al. 2014). Ao contrário do que ocorre com outros mamíferos, a homeostase do Rato Toupeira se mantém de forma extensiva, anulando de certa forma os fatores de mortalidade intrínsecos ao envelhecimento (Lewis et al. 2013).

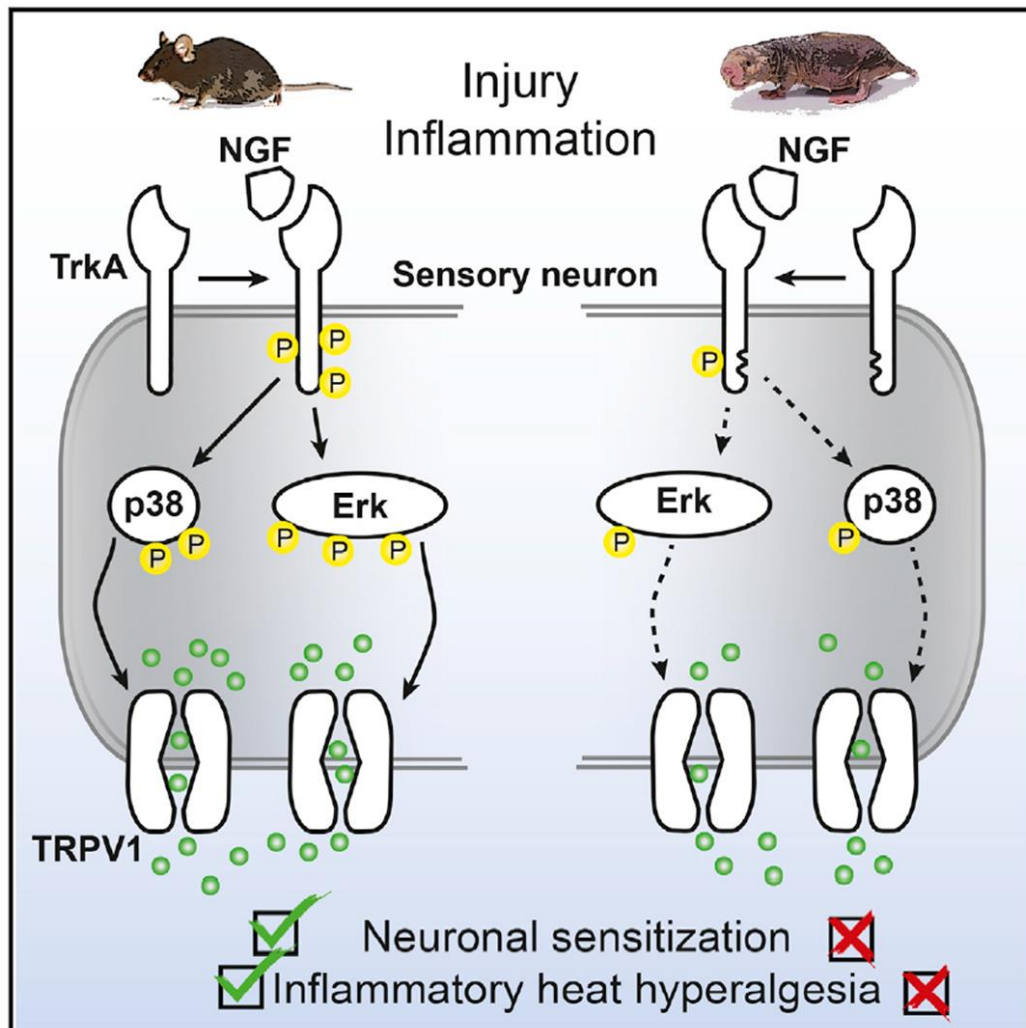
Entretanto, dentre as várias peculiaridades deste animal, nos é pertinente

um outro aspecto de sua biologia que é o fato de apresentarem insensibilidade a dor, aspecto este associado à hipofuncionalidade de sua TrkA (OMERBAŠIĆ et al., 2016). Foi observado que esta espécie não apresenta hiperalgesia comportamental induzida por calor quando este método é utilizado para avaliar o limiar nociceptivo desses animais após serem submetidos a tratamentos com NGF e outros agentes pró-inflamatórios como capsaicina e adjuvante completo de Freund (CFA) (Park et al., 2008).

Apesar da insensibilidade a dor induzida por capsaicina, canais TRPV1 do NMR apresentam aspectos biofísicos e de sensibilidade a capsaicina idênticos a dos canais TRPV1 de seres humano e de camundongos (Smith et al., 2011). Foi observado que a ativação do TRPV1 em neurônios sensitivos do NMR encontra-se reduzida, entretanto quando a proteína TRPV1 desses animais é expressa em neurônios sensitivos de camundongos saudáveis a mesma é ativada normalmente (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

Nesse contexto, suspeita-se que a mutação de uma Cisteína por uma Leucina na posição 774 da TrkA do NMR seria a responsável pela insensibilidade a dor observada nesses animais, sendo possível que esta mutação (Cys774Leu) seja a responsável pela ineficiência da autofosforilação dos resíduos de Tirosina nas posições 751 e 785 da quinase, tendo como resultado final a mitigação das vias deflagradas por intermédio desses resíduos: vias da PI3K e da PLC $\gamma$  (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

Encontrar os mecanismos que levam à resistência à dor nesse animal ou fármacos que não inativassem completamente a TrkA, mas diminuíssem a sua atividade, poderiam ser estratégias para o desenvolvimento de novos analgésicos mais eficientes e com menores efeitos colaterais.



**Figura 3. Modelo esquemático das alterações observadas nas vias do Naked Mole Rat deflagradas pela TrkA e seus efeitos funcionais.** A mutação (Cys774Leu) conduz a TrkA do NMR a uma menor capacidade em ancorar as proteínas que cumprirão papéis fundamentais na propagação do estímulo iniciado pela quinase, visto que a quinase é hipoativa. Conseqüentemente observa-se uma maior resistência a dor apresentada por esses animais. Adaptado (OMERBASIC et al., 2016).

## 1.5 Ensaio para validação de alvos e seleção de compostos

A prospecção de um novo medicamento, de sua ideia original até o lançamento do produto final é um processo que pode levar de 10 a 15 anos e envolver custos altíssimos de milhões de dólares (Hughes et al, 2011). A ideia de um alvo pode vir de uma variedade de fontes, de pesquisas acadêmico-científicas à interesses farmacêuticos e do setor comercial. É possível que se leve anos para constituição de um conjunto de evidências que apoiem a seleção de alvos específicos a serem aplicados em um dispendioso programa de seleção e validação de compostos. Uma vez escolhido o alvo, a indústria farmacêutica e alguns centros acadêmicos nas últimas décadas tem buscado simplificar os vários processos iniciais para identificar moléculas que possuem características adequadas para se produzir medicamentos aceitáveis contra tais alvos estabelecidos (Hughes et al, 2011).

Uma vez identificado o alvo da intervenção, o mesmo ainda precisa ser totalmente validado. As técnicas de validação variam desde ferramentas *in vitro*, até o uso de modelos animais que tenham como sua característica proeminente a presença do alvo de interesse. Embora exista confiabilidade em cada abordagem, a integridade do resultado observado é aumentada por meio de validações múltiplas (Hughes et al, 2011). Após o processo de validação do alvo se dá a fase de identificação de acertos, fase na qual ensaios de triagem de compostos são desenvolvidos com o foco de identificar agentes que apresentem o efeito desejado contra o alvo em questão (Fox et al, 2006).

Existem quatro grandes categorias de ensaios focados em identificar compostos promissores. A primeira, a seleção de alto rendimento (HTS), envolve a triagem de bibliotecas de compostos contra o alvo de interesse isolado, ou de

forma mais complexa, como um ensaio em utilizando linhagens celulares possuidoras do alvo de interesse, porém tal abordagem exige ensaios secundários para confirmar o local de ação dos compostos (Fox et al, 2006). A segunda categoria enquadra a triagem focada ou baseada em conhecimento prévio (“Focused or knowledge-based screening”), envolve a seleção, na biblioteca a ser testada, de subconjuntos de moléculas que provavelmente possam apresentar atividade contra o alvo, com base no conhecimento prévio da proteína alvo presente na literatura, ou de precedentes comerciais, como pedidos de patentes para as classes químicas com maior probabilidade de apresentar atividade contra o alvo de interesse (Fox et al, 2006). Esse tipo de abordagem deu origem, mais recentemente, a estratégias de descobertas utilizando modelagem molecular virtual, as quais buscam selecionar em bancos de dados de compostos moléculas com potencial efeito contra os alvos de interesse (McInnes, 2007). A terceira é classificada como “triagem de fragmentos” e envolve a geração de bibliotecas de baixo peso moléculas as quais são triadas em altas concentrações contra o alvo de interesse, as triagens são acompanhadas da geração (expressão recombinante) dos pontos de contato em que o ligante aderiu a estrutura da proteína alvo, de modo a permitir a progressão do desenvolvimento e aprimoramento do composto contra tal região do alvo de interesse (Law et al., 2009). Por fim, a quarta categoria é uma abordagem de triagem mais focada e especializada, a triagem fisiológica. Esta é uma abordagem baseada em tecido e procura uma resposta mais alinhada com o efeito final desejado *in vivo*, em vez de se direcionar a um componente molecular específico. A tabela 1 (sem adaptações) de Hughes et al, 2011 especifica e sumariza as principais técnicas de triagem de compostos, dentre as apresentadas e outras.



Vislumbrando padronizar uma metodologia de validação de alvos e testagem de compostos, e tendo como base a literatura especializada, vemos como fundamental o desenvolvimento de ensaios bioquímicos para a validação da TrkA como alvo de abordagens de triagem de compostos. Recentemente um ensaio celular de ativação da TrkA foi produzido utilizando a linhagem celular KM12 que expressa a enzima de forma constitutiva. O ensaio mostrou a possibilidade de se observar os efeitos de compostos contra esta quinase em um contexto de seleção de compostos para aplicação oncológica (Pandre et al., 2018).

## 1.6 **Prospecção de peptídeos biologicamente ativos e phage display.**

Peptídeos Bioativos (BP) são definidos como fragmentos polipeptídicos específicos que apresentam um impacto nas funções do corpo por influenciarem o processo de homeostasia (Kitts, D. D., Weiler, 2003). Atualmente, mais de 1500 BP diferentes foram relatados em um banco de dados da literatura chamados de "Biopep". Esses peptídeos desempenham papéis importantes nas funções metabólicas dos organismos vivos e, conseqüentemente, na saúde humana por exibirem atividades hormonais ou atuarem de forma semelhante a drogas (Singh, B. P., Vij, S., Hati, S, 2014).

Peptídeos inibidores mais específicos das diferentes vias de sinalização da TrkA, que competiriam pela interação das proteínas com as diferentes tirosinas fosforiladas da TrkA, podem ser bons inibidores de vias de sinalização da dor podendo ter menos efeitos colaterais do que inibidores que bloqueariam por completo todas as vias da TrkA (Moraes et. al. 2022). Além do desenvolvimento racional de peptídeos, uma das mais bem estabelecidas metodologias para a triagem de peptídeos biologicamente ativos é a de *phage display*. O *phage display* é uma técnica que permite expressar na superfície de partículas virais

(bacteriófagos) peptídeos. Essa metodologia é bastante versátil, permitindo ensaios de seleção de peptídeos contra diferentes alvos em diferentes situações, por exemplo, ensaios de seleção de peptídeos (chamados *biopanning*) podem ser realizados *in vitro* contra: moléculas alvo aderidas em superfícies; células que podem ou não ser estimuladas para alterar a expressão de receptores alvos; tecidos dissecados; e também *in vivo* injetando os fagos na circulação do animal, retirando os órgãos de interesse e selecionando aqueles fagos que expressam peptídeos que interagem com a vasculatura de diferentes órgãos do organismo.

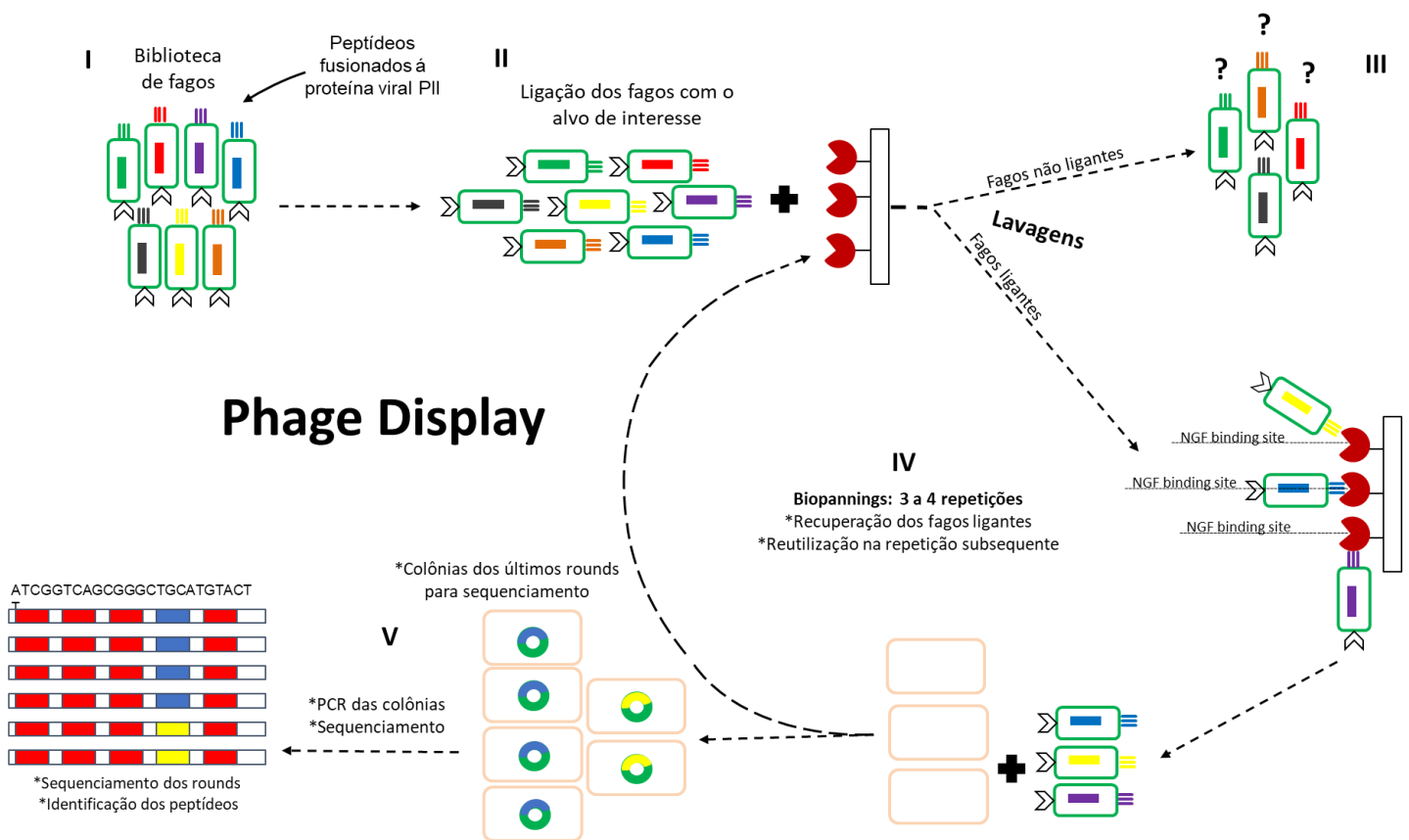
Esta abordagem permite identificar moléculas que potencialmente podem servir para o desenvolvimento de fármacos, vacinas, métodos diagnósticos e de outros insumos (Smith, 1985; Scott e Smith, 1993; Giordano et al., 2009).

A técnica de *phage display* permite expressar pequenos peptídeos com 5 a 15 aminoácidos que são apresentados em uma das proteínas do capsídeo de bacteriófagos (Smith, 1985). Uma biblioteca de *phage display* pode conter mais de  $10^8$  diferentes peptídeos o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico. Uma característica importante do *phage display* é que os peptídeos selecionados frequentemente apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo. Por exemplo, no caso de peptídeos selecionados tendo como alvo enzimas, o peptídeo obtido frequentemente mimetiza o substrato da mesma ou apresenta atividade alostérica (Koivunen et al., 1999; Giordano et al., 2001; Cloutier et al., 2004; Giordano et al., 2005). No caso de receptores de superfície, o peptídeo selecionado pode se assemelhar ao ligante natural do receptor (Koivunen et al., 1993; Giordano et al., 2001) podendo vir a competir pela ativação do mesmo ou ainda pode atuar como um inibidor do receptor. Essa característica do *phage display* permite identificar alvos relevantes aos diversos

processos biológicos e ao mesmo tempo, isolar e caracterizar peptídeos antagonistas ou agonistas dos alvos estudados. Esses peptídeos podem ser então explorados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Portanto, *phage display* é uma técnica que encontra múltiplas aplicações, tais como, desenho racional de fármacos, terapias direcionadas, terapias gênicas, produção de vacinas, métodos diagnósticos, entre outras aplicações (Sergeeva et al., 2006; Giordano et al., 2009)

Em 2001, foi desenvolvida a técnica BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*), que permite o isolamento e caracterização em uma única etapa de ligantes específicos para receptores de superfície celular (Giordano et al., 2001). A técnica tem sido utilizada com sucesso para a identificação de peptídeos ligantes de vários tipos celulares (Lionakis et al., 2005; Kolonin et al., 2006; Chen et al., 2009), na identificação de anticorpos que se ligam a superfície de células tumorais (Kurosawa et al., 2008) e para levar marcadores diagnósticos para próstata (Newton et al., 2006). Um estudo recente de um de nossos colaboradores (Dr. Ricardo Giordano IQ-USP), utilizando a técnica de *phage display*, identificou e validou um peptídeo que compete com o *fator de crescimento do endotélio vascular* (VEGF) inibindo a formação de vasos sanguíneos em um modelo patológico de retina angiogênica (Michaloski, J. S., Giordano, R. J., 2016). Desta forma, utilizar a tecnologia do *phage display* para selecionar peptídeos que atuam na via da dor mediada pelo NGF/TrkA se mostra como uma possibilidade. O fato dessas pequenas moléculas apresentarem tamanho reduzido garantiria sua eliminação em um intervalo de tempo mais reduzido quando comparada a outras classes terapêuticas (*“small molecules”* e anticorpos monoclonais), o que evitaria uma inibição prolongada das várias vias

deflagradas pela ligação NGF/TrkA. Tendo este pano de fundo temático rastrear bibliotecas de fagos em busca de ligantes do receptor do NGF que poderiam competir pela ligação do receptor, se mostra uma estratégia factível e promissora para a descoberta de novos agentes terapêuticos com propriedades analgésicas como alternativa ao uso de anti-inflamatórios não esteroides (NSAID) e opioides.



**Figura 4. Sequência de etapas da metodologia de *Phage Display*.** Fases da metodologia de *phage display* (I) Seleção da biblioteca de fagos expressando peptídeos (II) passando ensaio de contato com o alvo de interesse (III), lavagem e eliminação dos fagos não ligantes (IV), recuperação dos fagos ligantes por infecção bacteriana e reutilização dos mesmos nas repetições subsequentes de modo a enriquecer as populações recuperadas somente com fagos ligantes (V) sequenciamento dos ciclos finais de modo a identificar os peptídeos que se ligaram ao alvo de interesse

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL.

Estabelecer um ensaio de atividade da TrkA e identificar peptídeos que tenham como alvo o receptor de NGF de alta afinidade (NGFR).

### 2.2 Objetivos específicos.

- Estabelecer um ensaio para medir a atividade da TrkA frente ao NGF e a inibidores comerciais.
- Rastrear peptídeos se liguem ao NGFR por *phage display*.
- Caracterizar o(s) peptídeo(s) que se ligam ao NGFR.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Lista de materiais.

-Acrilamida (40%) (Biorad®)

-Água ultrapura (DEPC) (Uniscience)

-Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich®)

-Anticorpo anti FosfoTrkA (Y674/Y675) (Rabbit) (Science Signaling mAb#4621)

-Anticorpo anti FosfoTrkA (Y785) (Rabbit) (Science Signaling mAb#4168)

-Anticorpo anti NGF (Rabbit) (Abcam #ab6199)

-Anticorpo anti TrkA Total (Goat) (R&D System #AF1056)

-Anticorpo anti TrkA Total (Rabbit) (Science Signaling mAb#2510)

-Anticorpo anti  $\alpha$ -Tubulina (Thermo Fisher # A11126)

-Anticorpo IRDye 680RD (donkey anti Rabbit) (Li-cor® #AB2716687)

-Anticorpo IRDye 800CW (donkey anti Goat) (Li-cor® #RRID AB2715510)

-Bactérias *E. coli* K91kan (cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Giordano – IQ USP)

-Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (LabSynth)

-Câmara de Neubauer 0.0025mm<sup>2</sup> (KASVI)

-Cloreto de Sódio (NaCl) (LabSynth)

- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP's)** (2mM) (*Thermo Fischer*)
- DMEM Completo com alta glicose** (Dulbecco's modified Eagle's medium – High Glucose) (*Gibco® by Life Technologies™*)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide solution)** (*Sigma Aldrich©*)
- DNA polimerase (Q5 high fidelity)** (20U/mL) (*New England Biolabs*)
- Estreptomicina 100µg/mL** (*Sigma Aldrich©*)
- Etanol 100%** (*LabSynth*)
- Garrafas de cultivo celular** (*CORNING, Life Science Technologies™*)
- Geneticina 418** (*Thermo Scientific™*)
- Glicogênio** 20 mg/mL (*Thermo Fischer*)
- Kanamicina (100 µg/ml)** (*Sigma Aldrich©*)
- Meio de cultura Luria-Bertani (LB)** (*Prolab™*)
- Membranas de PVDF** (*Immobilon®-P PVDF Membrane*) (*Millipore©*)
- N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED)** (0,06% (v/v)) (*Sigma Aldrich©*)
- NGF** (*Recombinant Human βNGF – PeproTech ®*)
- Opti-MEM™** (*Gibco® da Life Technologies™*)
- PEI - Polietilenoimina** (*Sigma Aldrich©*)

- Penicilina 100µL/mL (*Sigma Aldrich*©)
- Persulfato de amônia (PSA) (0,1% (m/v)) (*Sigma Aldrich*©)
- Piruvato de sódio 1mM (*Gibco*<sup>TM</sup> *Sodium Pyruvate Solution*)
- Placas de 96 poços (*Sigma-Aldrich optical filter MultiScreen*®)
- Placas de cultivo celular 100mm X 20mm (P100) (*Sarstedt*<sup>TM</sup>)
- Polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) (*Sigma Aldrich*©)
- Iniciador anti-senso (5'CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3') (0,5µM)
- Iniciador senso (5'CATGCCCGGGTACCTTTCTATTCTC-3') (0,5µM)
- Receptor recombinante de BDNF (BDNFR) de humano (*R&D System*)
- Receptor recombinante de NGF (NGFR) de humano (*R&D System*)
- Receptor recombinante de NGF (NGFR) de Rato (*R&D System*)
- Receptor recombinante de NT3 (NT3R) de humano (*R&D System*)
- Sistema de aquisição de imagens Odyssey (*Li-cor*®)
- Sistemas de eletroforese e transferência (*Biorad System*®)
- Software BioEdit alignment editor (versão 7.2.5) (*BioEdit*)
- Software GraphPad Prism (versão 8.4) (*GraphPad*)
- Software Image Studio<sup>TM</sup> Lite (*Li-cor*®)



- Software PyMOL (versão 2.5.3) (*PyMOL by Schrödinger*)
- Solução de acetato de sódio** (3M, pH 5.2)
- Solução de bloqueio** (*Intercept® Blocking Buffer Li-cor®*)
- Solução de brometo de etídio** (10 mg/mL)
- Solução de Cloreto de Sódio** (4M)
- Solução de Polietilenoglicol 8000 (PEG 8000)** (40%)
- Solução PEG/NaCl** (*Polietilenoglicol 8000 (20%) e NaCl (2,5M)*)
- Solução salina de fosfato tamponada** (*PBS*)
- Solução salina de Tris tamponada com 0,1% de Tween 20** (*TBS-T*)
- Solução Tris-HCL** (375mM, pH 8,8)
- Soro Fetal Bovino estéril** (*Sterile-FBS*) (*Gibco™*)
- Tampão de amostra 3X** (*Tris 240 mM, pH 6,8, glicerol 40%, azul de bromofenol 400 mg/L*)
- Tampão de amostra 6X** (*New England Biolabs*)
- Tampão Glicina (eluição ácida)** (*Glicina 50mM / NaCl 150mM, pH 2,2*)
- Tampão Tris neutralizante (eluição ácida)** (*Tris-base 1,5M, pH 9,2*)
- Tetraciclina (20 µg/ml)** (*Sigma Aldrich©*)

**-Tripsina 0,05%** (*Sigma- Aldrich*©)

**-Triton X-100** (*Sigma Aldrich*©)

**-Tween-20** (*Sigma Aldrich*©)

## **3.2 Estabelecimento das linhagens celulares expressando TrkA.**

### **3.2.1 Cultura de células.**

A linhagem *Human embryonic kidney* (HEK293T) foi cedida pela Profa. Dra. Bettina Malnic (Instituto de Química / USP). As células, salvo em experimentos específicos, foram mantidas em cultura utilizando-se meio de cultivo celular completo DMEM com alta concentração de glicose (Gibco® by Life Technologies™), NaHCO<sub>3</sub> 3,7 g/L (LabSynth), piruvato de sódio 1 mM (Gibco® by Life Technologies™), penicilina 100µL/mL (Gibco® by Life Technologies™), estreptomicina 100µg/mL (Gibco® by Life Technologies™), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sterile-FBS) (Gibco™). As células foram mantidas em estufa em atmosfera úmida, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Garrafas de cultivo (CORNING, *Life Science Technologies*™) foram utilizadas para a manutenção das células, que foram repicadas na confluência de 90% utilizando-se Tripsina 0,05% (Sigma Aldrich®). Após a tripsinização adicionou-se meio de cultivo completo para se homogeneizar as células agora em suspensão. As diluições celulares de trabalho foram obtidas por meio de contagem em hemocitômetro mecânico (câmara de Neubauer) 0.0025mm<sup>2</sup> (KASVI - improved bright-line). Foram utilizadas células que se apresentassem preferencialmente entre a segunda e a nona passagem de cultivo.

### **3.2.2 Transfecção de células eucarióticas.**

Células HEK293T com 80% de confluência foram plaqueadas em placas de cultivo celular (P100, Sarstedt™), e transfectadas em meio Opti-MEM™ (Gibco® da Life Technologies™ #31985062) usando 3,2 µg/mL PEI e 4µg de DNA, [plasmídeo contendo a TrkA de Rato ou de Naked Mole Rat (NMR)] por placa.

Seis horas após a transfecção, o meio foi trocado por meio de cultura completo, conforme descrito acima. O plasmídeo contendo a parte codificadora do gene da NTRK1 de rato e de uma quimera contendo a porção extracelular (receptor de NGF) de rato e a porção transmembranar e quinase de NMR (OMERBAŠIĆ et al., 2016), em um plasmídeo para expressão em eucariotos (pEXPR IBA 105), com resistência a ampicilina e neomicina. Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gary Lewin (Centro Max Delbruck de Medicina Molecular, Berlim (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

### **3.2.3 Geração de linhagens.**

Passadas 24 horas da transfecção foi iniciado o processo de seleção das células transfectadas com os plasmídeos para a TrkA de rato ou quimera.

O plasmídeo utilizado para transfecção contendo as construções da TrkA (TrkA-Rato e TrkA-quimérica) possuem o mesmo *backbone* - pEXPR-IBA105 (OMERBAŠIĆ et al., 2016), que possui gene de resistência para neomicina. Uma curva de morte das células HEK perante diferentes doses de Geneticina 418 (neomicina) (Thermo Scientific™) foi utilizada para determinarmos a concentração mínima necessária para morte das células transfectadas e obteve-se a concentração de 750 µg/mL.

Desse modo, após o período de 24 horas de transfecção, adicionou-se a essas células e a concentração de G418 padronizada (750 µg/mL). Essa concentração foi mantida o mais próximo possível de um valor constante, sendo necessária a troca de meio com adição de nova diluição de antibiótico diariamente.

As células que não expressaram o DNA exógeno acabaram por morrer e após a obtenção de aproximadamente 80% de confluência das células resistentes nas placas de cultivo as mesmas foram repicadas por tripsinização (Tripsina

0,05%), diluindo-se cinco vezes o volume tripsinizado em meio de cultura completo adicionado do antibiótico de seleção (G418). Após 80% de confluência ter sido atingida novamente as células foram congeladas em meio de cultura completo adicionado de 10% de DMSO (DIMETILSULFÓXIDO) a e armazenadas a -80°C ou em nitrogênio líquido.

### **3.3 Detecção da Ligação do NGF ao seu receptor (NGFR) e Western Blot em gel nativo (Native-PAGE).**

Determinou-se a capacidade do receptor recombinante de NGF, em sua forma homodimérica [TrkA NGFR 138kDa (R&D System #1056-TK)], de se ligar *in vitro* ao homodímero de NGF [*Recombinant Human  $\beta$ NGF* 27kDa (PeproTech® #450-01)] de modo a se verificar a formação do complexo NGF/TrkA por um gel nativo. Foram incubados 92,8 ng (7.14 pmol) de NGF com 1  $\mu$ g (7,14 pmol) da porção receptora da TrkA NGFR num volume final de 20 $\mu$ L completando-se o volume com solução de salina de fosfato tamponada (PBS). O complexo NGF/NGFR foi mantido por 40 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se então 10 $\mu$ L de tampão de amostra 3X (Tris 240 mM, pH 6,8, glicerol 40%, azul de bromofenol 400 mg/L) mantendo as amostras à temperatura ambiente.

Foi preparado um gel nativo de poliacrilamida, o gel de separação (Lower) foi feito na concentração de 8% de poliacrilamida [Tris-HCL (7,95 mL a 375mM, pH 8,8) acrilamida (1,95 mL a 40%), Persulfato de amônia (100  $\mu$ l a 0,1% (m/v)) e N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (10  $\mu$ l a 0,06% (v/v))]. O gel de concentração (Upper) foi montado na concentração de 5% [Tris-HCL (4,5 mL a 375mM, pH 8,8) acrilamida (0.5 mL a 40%), Persulfato de amônia (50  $\mu$ l a 0,1% (m/v)) e N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) (5  $\mu$ l a 0,06% (v/v))]. O mesmo foi carregado com as amostras de proteína e submetido a um sistema de

eletroforese por voltagem constante (Biorad System®) de 80 volts por 4 horas.

Os géis foram transferidos para membranas de PVDF ativadas por metanol, utilizando um sistema de transferência molhado (Biorad System®) por 2 horas e 30 minutos com uma corrente constante de 400mA. As membranas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente usando a solução de bloqueio Intercept® Blocking Buffer Li-cor®.

Os anticorpos primários anti TrkA Total – RD System (#AF1056) e anti NGF– Abcam (#ab6199) foram diluídos de acordo com as instruções dos fabricantes na solução de bloqueio e adicionados às membranas e incubados durante a noite a 4° C.

Após a incubação, as membranas foram lavadas por 15 minutos 3 vezes com TBS-T (tampão TBS e 0,1% de Tween 20), incubadas com os anticorpos secundários adequados IRDye 680RD donkey anti Rabbit (#RRID AB\_2716687) e IRDye 800CW donkey anti goat (#RRID AB\_2715510) por 1 hora a temperatura ambiente ao abrigo da luz e em seguida lavadas por 15 minutos, 3 vezes com TBS-T (tampão TBS e 0,1% de Tween 20). Os anticorpos secundários são compatíveis com o sistema de imagem Li-cor® Odyssey, utilizado para a aquisição das imagens.

A análise quantitativa dos experimentos foi realizada usando Image Studio™ Lite LI-COR, através da quantificação das bandas. As comparações para diferentes grupos foram feitas através do teste One-way ANOVA onde \*  $p = < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3.4 Imunoensaio *in cell* para determinação da atividade da TrkA.

O ensaio de atividade de quinase *in cell* é um imunoensaio para a análise quantitativa de proteínas em cultura de células aderentes, não sendo necessária a lise das células ou uso de géis para análise proteica. A técnica é realizada com células fixadas e permeabilizadas, ao invés de em antígeno imobilizado. Como a maioria dos Western Blots, ou ensaios de imunofluorescência, o antígeno é detectado usando uma série de dois anticorpos, um anticorpo primário para a proteína de interesse e um anticorpo secundário conjugado a uma enzima ou um fluoróforo (PANDRE et al., 2018).

Linhagens de células HEK 393T (*human embryonic kidney*) estáveis expressando a TrkA de rato e TrkA quimérica do NMR (geradas conforme descrito acima) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sigma-Aldrich optical filter MultiScreen®) na concentração de cem mil células ( $100 \times 10^3$ ) por poço. Após a confluência celular de 80% ser atingida, retirou-se o meio completo e adicionou-se DMEM (Dulbecco 's *modified Eagle' s medium*, Sigma-Aldrich) contendo 1% de soro fetal bovino por 24 horas. Em seguida adicionou-se NGF (100 ng/mL) por 0, 5, 10 e 15 minutos. Após a incubação com NGF, as células foram fixadas em uma solução de 4% de paraformaldeído por 20 minutos a 22°C e posteriormente lavadas com PBS três vezes. As células foram então permeabilizadas por 15 minutos com PBS contendo Triton X-100 (0,1%) e bloqueadas em PBS contendo Triton X-100 (0,1%) e 3 % de albumina sérica bovina (BSA) (*Sigma Aldrich*®), por 2 horas. As placas com as células bloqueadas foram lavadas com PBS-T (tampão PBS e 0,1% de Tween 20) e incubadas durante a noite a uma temperatura de 4°C com anticorpos primários anti Phospho TrkA Y674/675 (Cell Signaling) (1:500), anti

Phospho TrkA Y785 (Cell Signaling) (1:500) e anti TrkA Total (ABCAM) (1:4000) diluídos na solução de bloqueio (PBS contendo Triton X-100 (0,1%) e 3 % de BSA) em acordo com as instruções dos fabricantes.

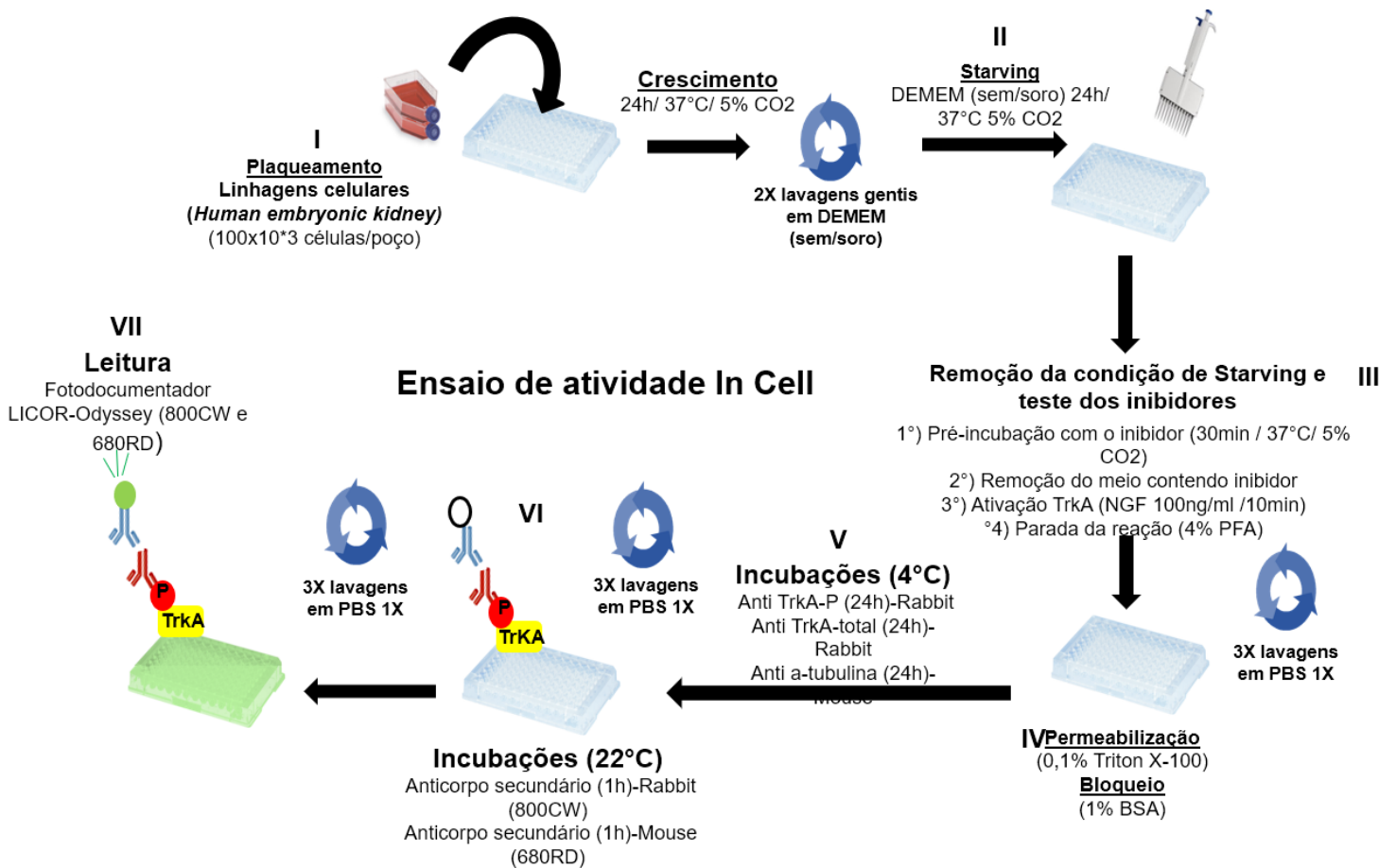
Pelo fato dos anticorpos primários anti TrkA (Phospho-TrkA e TrkA-Total) terem sido produzidos em uma mesma espécie animal (coelho) padronizou-se esses experimentos incubando as células separadamente com cada anticorpo, utilizando-se placas independentes para as incubações com os anti Phospho TrkA e anti TrkA total. Para controle do plaqueamento (número de células/ quantidade proteica) tanto as placas incubadas com os anticorpos Phospho TrkA quanto as incubadas com os anticorpos TrkA total receberam anticorpo anti  $\alpha$ -Tubulina (Thermo Fisher) produzido em camundongo (1:5000)

Após a incubação com os anticorpos primários, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com os anticorpos secundários anti coelho (RDye@Licor 800CW) e anti camundongo (RDye@Licor 680RD), por 1 hora à temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas com PBS-T e então a leitura dos poços foi realizada no sistema de captura de imagens LICOR Odyssey®.

Os sinais observados para o grupo HEK293T não transfectadas (sinal de ruído) foram subtraídos dos sinais obtidos das demais linhagens (TrkA Rato e TrkA Quimera) em todos os experimentos utilizando este ensaio, de modo a apresentar apenas os sinais decorrentes dos tratamentos. O grupo não transfectado (HEK 293T) foi submetido aos mesmos tratamentos empregados às demais linhagens, porém os dados referentes a este grupo foram classificados como sinal de ruído e não são apresentados na sessão de resultados. Considerando a apresentação gráfica, no eixo das abcissas (Eixo X) foram plotados os grupos experimentais, já no eixo das ordenadas (Eixo Y) foram plotadas as fluorescências, utilizando o



parâmetro de “razão de fluorescência”. O parâmetro razão de fluorescência se refere ao sinal bruto de fluorescência capturado pelo aparelho (LICOR Odyssey) descontado do sinal de ruído observado no grupo HEK 293T não transfectado. Esse valor obtido é então dividido pelo sinal de fluorescência da tubulina de modo a normalizar o sinal fosforilado por um elemento que apresentasse baixa variabilidade entre os grupos, dado o fato de termos utilizado placas separadas para as incubações com o anti TrkA Phospho e com o anti TrkA total. Após esses ajustes os dados foram plotados. Considerou-se como ponto mínimo de todas razões de fluorescência o grupo que apresentasse o menor sinal dentre os avaliados (0 min, em se tratando de cinética), sendo os demais grupos experimentais comparados a este controle para o estabelecimento das razões de aumento ou diminuição. As comparações entre os grupos foram feitas através do teste One-way ANOVA onde \*  $p = < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



**Figura 5. Sequência de etapas do ensaio de atividade in Cell.** Fases da metodologia partindo do (I) plaqueamento das células (II) “Starving” (carência nutricional) (III), incubação com o inibidor a ser testado e/ou NGF (IV), permeabilização e bloqueio das células já fixadas na placa de 96 poços (V), incubação com os anticorpos primários por 24h a 4°C (VI), incubação com os anticorpos secundários (VII) leitura em fotodocumentador.

### 3.5 Prospecção de peptídeos ligantes do NGFR por phage display.

#### 3.5.1 Biblioteca de peptídeos expressos em fagos.

Realizamos o rastreamento de peptídeos com a tecnologia do *phage display* para isso estabelecemos uma colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Giordano do IQ-USP que possui vasta experiência nessa área tendo identificado peptídeos que

competem com o *fator de crescimento do endotélio vascular* (VEGF) pela ligação ao seu receptor. O grupo dele possui duas bibliotecas peptídicas de alta diversidade que já foram utilizadas com sucesso para identificar peptídeos biologicamente ativos, sendo que recentemente um estudo deste grupo com receptores de VEGF identificou e validou um peptídeo que compete com este fator e inibe a formação de vasos sanguíneos em modelo patológico de retina angiogênica (Michaloski, J. S., Giordano, R. J, 2016).

As bibliotecas utilizadas neste projeto foram produzidas pelo grupo do professor Dr. Ricardo utilizando-se o vetor fUSE-5 e a metodologia desenvolvida por George Smith (Smith e Scott, 1993), com modificações para melhor eficiência e maior número de clones finais (Koivunen et al., 1993, 1999). Os oligonucleotídeos sintéticos contendo o códon degenerado (NNK)<sub>n</sub> (n = número de aminoácidos desejado) flanqueados por sítios de restrição *Bgl* II foram obtidos comercialmente (Invitrogen). Os insertos foram convertidos em DNA dupla fita com Klenow DNA polimerase, digeridos com *Bgl* II, ligados com T4 DNA ligase ao vetor fUSE-5 previamente tratado com *Sfi* I, e transformado por eletroporação (entre 100 e 200 eletroporações individuais por biblioteca) em bactéria *E. coli* cepa MC1061. As bibliotecas construídas foram do tipo X6 e CX8C (X representa qualquer aminoácido e C= cisteínas que permite criar bibliotecas cíclicas). O uso de bibliotecas lineares e cíclicas, e de diferentes tamanhos, foi empregado para aumentar a diversidade de peptídeos disponíveis para o estudo. As bibliotecas produzidas foram cultivadas por infecção bacteriana e o crescimento se deu em meio Luria-Bertani suplementado com Kanamicina (100 µg/ml) e tetraciclina (20 µg/ml), os fagos propriamente foram obtidos posteriormente do sobrenadante das culturas pelo método da precipitação com PEG/NaCl (Smith e Scott, 1993;

Giordano et al., 2001).

Essas bibliotecas peptídicas foram utilizadas para varrer nosso alvo de interesse (NGFR) imobilizado.

### **3.5.2 Ensaio de *Biopanning*.**

As bibliotecas de fagos foram produzidas conforme descrito anteriormente (Smith e Scott, 1993; Giordano et al., 2001). O NGFR, (R&D #1056-TK), foi imobilizado em placas de 96-poços (400 ng em 50  $\mu$ L de PBS) por 24h a 4°C. Os poços foram subsequentemente lavados com PBS, bloqueados com PBS 3% BSA por 2 horas à temperatura ambiente e incubados com as bibliotecas de fagos (X6 e CX8C) na concentração de  $1 \cdot 10^9$  UT's/50 $\mu$ L em PBS e 3% BSA. Após 2 horas à temperatura ambiente os poços foram lavados 8 vezes com PBS. Para fins experimentais o termo "*fago*" utilizado nesse modelo experimental é tido como sinônimo da expressão *unidade transdutora (UT)*, sendo a sigla UT por  $\mu$ L (UT/ $\mu$ L) a unidade de medida padrão para a quantificação de fagos presentes em uma unidade de volume e que se encontram em condição hábil de infecção.

Os fagos que permaneceram ligados ao receptor foram eluidos de duas maneiras distintas, por eluição direta: adição direta da bactéria *E. coli* K91kan, densidade ótica (OD) de 0,8, aos fagos remanescentes; e por eluição ácida: tratamento prévio dos fagos com tampão glicina (Glicina 50mM / NaCl 150mM / pH 2,2) por 5 minutos seguido de neutralização em tampão Tris pH 9,2 (Tris-base 1,5M) e adição da bactéria *E. coli* K91kan, densidade ótica (OD): 0,8 aos fagos remanescentes. Em ambas as formas de eluição, as bactérias permaneceram nos poços por 30 min a 37°C para que ocorresse a infecção dos fagos.

Após infectadas, as bactérias de cada eluição foram transferidas para 20 mL de meio LB líquido com tetraciclina (20  $\mu$ g/ $\mu$ L) e Kanamicina (50  $\mu$ g/ $\mu$ L). Dos

20 mL de cada um dos grupos, CX8C (eluição ácida e direta) e X6 (eluição ácida e direta), foram retirados 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 1  $\mu$ L que foram plaqueadas em triplicata em placas LB ágar (tetraciclina 20  $\mu$ g/ $\mu$ L Kanamicina 50  $\mu$ g/ $\mu$ L) de modo a diluir a cultura líquida contendo os fagos recuperados 200, 2000 e 20000 vezes respectivamente. As placas LB ágar contendo essas diluições foram incubadas por 24h a 37°C enquanto a cultura líquida restante foi mantida em agitação a 672 RCF pelo mesmo período e temperatura.

As diluições em série (200X, 2000X ou 20000X) foram utilizadas para a quantificação do número de fagos ligados ao receptor. Para a quantificação das colônias formadas foi dada a preferência para a contagem das colônias da diluição que apresentou a densidade de colônias intermediária, evitando-se contar placas demasiadamente cheias.

A quantidade de fagos recuperados de cada grupo, CX8C (eluição ácida e direta) e X6 (eluição ácida e direta), foi determinada pelo produto entre o número de colônias contadas e os fatores de diluição da cultura escolhida para a contagem (200X, 2000X ou 20000X).

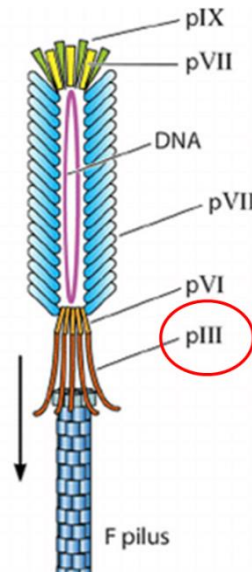
Os fagos oriundos da cultura líquida, produzida paralelamente a culturas plaqueadas, foram precipitados utilizando tampão de precipitação contendo polietilenoglicol 8000 (20%) e NaCl (2.5M). Após a precipitação os fagos foram titulados e utilizados como uma *biblioteca enriquecida* para a etapa subsequente.

Os “pannings” (ou “Biopannings”) são empregados de forma repetida nos denominados “ciclos” que nada mais são do que pannings consecutivos que visam obter populações de fagos progressivamente mais homogêneas, sendo que cada ciclo utiliza como “biblioteca” os fagos ligantes obtidos e purificados do ciclo que o antecedeu. Dessa forma, a cada ciclo são selecionadas populações de fagos cada

vez mais homogêneas que apresentam maior afinidade pelo ligante. Essa diminuição da variedade das populações ao longo dos ciclos é resultado da ligação dos fagos que apresentam maior afinidade pelo receptor imobilizado, o que permite uma expansão clonal dos mesmos em detrimento de fagos inespecíficos.

### **3.5.3 Sequenciamento dos fagos para a identificação da sequência dos peptídeos selecionados.**

Ao final do *biopanning*, as culturas contendo os fagos ligantes foram semeadas em placas de LB ágar-tetraciclina e colônias individuais foram selecionadas e lisadas mecanicamente por pipetagem em 50  $\mu$ L de PBS. A região do DNA codificante para o inserto (peptídeo) foi amplificada a partir desta amostra bacteriana em reação de cadeia da polimerase (PCR) (Tabela 1). Para a reação utilizou-se: 0,5 $\mu$ M de oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), 2mM dNTP's e 0,5  $\mu$ L da enzima Q5 *high fidelity DNA polimerase* (New England Biolabs) 20 U/mL. O volume final da reação foi ajustado com água ultrapura para 50 $\mu$ L e o protocolo seguiu com a realização da reação de PCR com ciclos e etapas estabelecidas conforme o esquema abaixo (Tabela 1). A reação de PCR em questão visa amplificar parte do gene da proteína PIII presente no capsídeo viral de bacteriófagos filamentosos (Figura 4 e 6). Sendo que é nesta proteína de superfície que se encontram fusionadas as sequências peptídicas que compõem as bibliotecas X6 e CX8C.



**Figura 6. Modelo esquemático de bacteriófago filamentosso.** Bacteriófago ligado a pilus de bactéria hospedeira, com destaque para proteínas do capsídeo viral (pIII, pVI, pVII e pIX) e material genético (DNA). O círculo em vermelho destaca a proteína pIII, utilizada como proteína estrutural para a apresentação dos peptídeos das bibliotecas X6 e CX8C (Huang et al., 2012).

Passo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	15s
35 ciclos	94°C	10s
	60°C	30s
	72°C	1min
Extensão final	72°C	10min

**Tabela 1. Ciclo da reação do PCR de colônia.** O ciclo de PCR foi executado de modo a amplificar as sequências dos fagos selecionados por meio do protocolo de phage display, sendo os amplicons posteriormente marcados com brometo de etídio em eletroforese específica e analisados em fotodocumentador para a conferência da correta amplificação.

<b>Oligonucleotídeos iniciadores</b>	
<b>Senso</b>	5'GATGGTTGTTGTCATTGTCGGCG-3'
<b>Anti-senso</b>	5'CAGAGCCACCACCCTCATTTTCAG-3'

**Tabela 2. Oligonucleotídeos para amplificação das sequências peptídicas selecionadas por phage display.** Oligonucleotídeos utilizados no procedimento de PCR de colônias e para a conferência dos peptídeos triados nos ciclos de enriquecimento (apenas o anti-senso). Os oligos foram desenhados tendo como modelo referência a proteína de capsídeo PIII, fundamental na capacidade infectiva de bacteriófagos filamentosos. Tal modelo foi utilizado pelo fato de as sequências peptídicas de interesse estarem inseridas na sequência desta proteína de superfície, visto ser esta “fusão” a estratégia empregada para a exposição das sequências peptídicas na metodologia de phage display.

Após a finalização da PCR, amostras contendo uma parcela dos *amplicons* (5 µL) foram preparadas pela adição de tampão de amostra (Sample 6X, New England Biolabs) e submetidas a corrida em eletroforese em gel de agarose (2%) adicionado de brometo de etídio (10 mg/mL) por 2 horas a 140 volts (Biorad System®).

Após a observação da amplificação das bandas de interesse no gel de poliacrilamida o volume remanescente de *amplicons* foi precipitado em solução de precipitação: acetato de sódio (3M, pH: 5.2), etanol 100% e glicogênio (20 mg/mL). A proporção utilizada foi de 25µL de solução de precipitação para cada 15 µL de *amplicons*. A mistura foi homogeneizada usando vórtex e mantida no gelo por 15 minutos, em seguida foi centrifugada por 15 minutos a 17000 RCF. Ao precipitado remanescente adicionou-se 50 µL de etanol 70% (sem ressuspender) e centrifugou-se por 10 minutos a 17000 RCF. Após se desprezar o sobrenadante secou-se a amostra precipitada a temperatura ambiente sendo em seguida



ressuspendida em 15  $\mu$ L de água ultrapura.

O DNA purificado obtido foi enviado ao Centro de Pesquisas sobre Genoma Humano e Células-tronco da Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, para sequenciamento Sanger, com o intuito de se descobrir quais eram os peptídeos codificados e que estavam sendo expressos na superfície dos fagos selecionados no biopanning. Para o sequenciamento foi utilizado o iniciador anti-senso (Tabela 2).

O reaparecimento de fagos ao longo dos ciclos, contendo o mesmo inserto é um parâmetro de afinidade do peptídeo pelo alvo testado. Isso ocorre, pois, as populações de fagos com insertos (peptídeos) com maior afinidade tendem a crescer ao longo dos ciclos e não se desligam facilmente do receptor após as lavagens. Desta forma, essas populações acabam sendo recuperadas em uma maior proporção quando comparadas aos fagos não ligantes, que por apresentarem pouca ou nenhuma afinidade pelo alvo acabam sendo eliminados ao longo do protocolo. A presença crescente de fagos com maior afinidade ao longo dos ciclos impede de forma competitiva que fagos inespecíficos voltem a se ligar ao receptor alvo, isso progressivamente ao longo dos ciclos também contribui para que as populações recuperadas se tornem mais homogêneas sendo em sua maioria formada por fagos ligantes. Com isso a diversidade de fagos vai diminuindo e passa a ser possível observar a repetição de fagos contendo os mesmos insertos ao longo de ciclos subsequentes, o que sinaliza para fagos contendo peptídeos potencialmente ligantes do alvo, nesse caso NGFR.

#### **3.5.4 Precipitação e purificação dos fagos.**

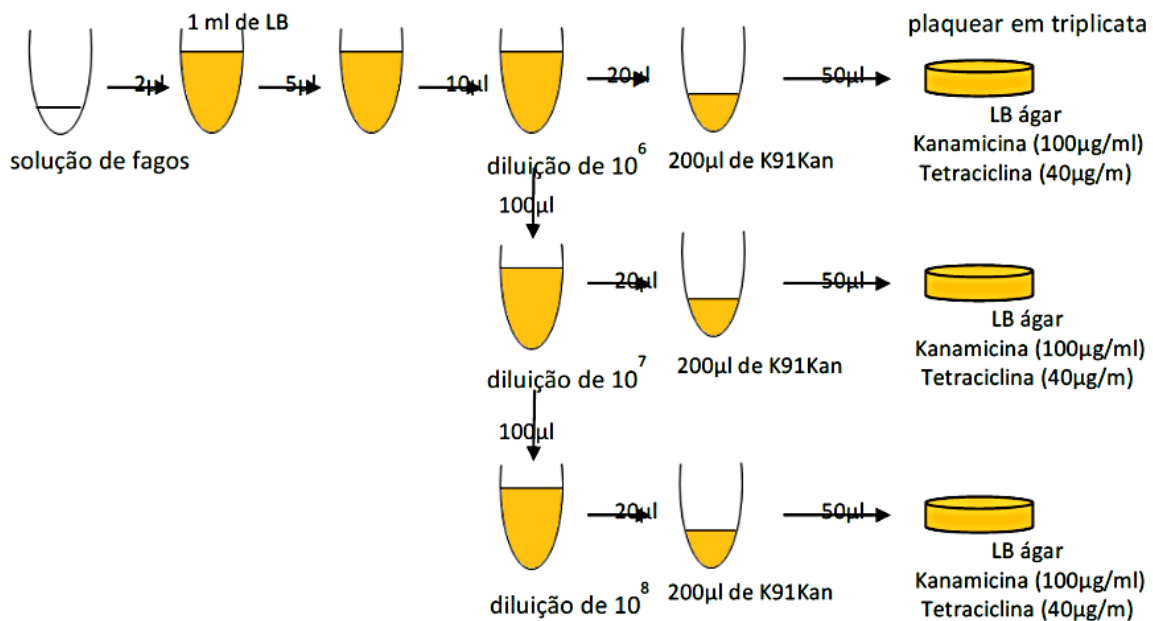
Inoculou-se uma colônia da bactéria K91-kan infectada com fago em 200 mL de meio LB (Kanamicina 50µg/mL) (Tetraciclina 20µg/mL). A cultura foi mantida por 18-20 horas a 37°C. A cultura saturada foi centrifugada a 8000 RCF por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante (fagos) transferido para um novo tubo de centrífuga ao qual acrescentou-se uma solução de PEG/NaCl para concentração final de 13% (adicionou-se 0.15 mL da solução de PEG/NaCl para cada 1 mL de sobrenadante de cultura). Após agitarem por 15 minutos em plataforma horizontal, o material foi mantido no gelo por 1 hora. Centrifugou-se a solução com PEG/NaCl a 8000 RCF por 30 minutos a 4°C e desprezou-se sobrenadante. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de fagos (*pellet*) ressuspendido em 1 ml de PBS estéril. Transferiu-se os fagos para tubos de 1,5 mL e centrifugou-se a 8000 RCF a 4°C por 15 minutos. Transferiu-se o sobrenadante contendo os fagos para novos tubos de 1,5ml contendo 13% PEG/NaCl e Incubou-se no gelo por 30 minutos. Os fagos foram então centrifugados a 8000 RCF por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado (*pellet*) de fagos em um volume de 100 µL a 500µl em PBS estéril. Centrifugou-se o material 8000 RCF por 15 minutos e transferiu-se o sobrenadante (fagos) para um novo tubo de 1,5 mL armazenado a 4°C. Procedeu-se então a titulação da solução de fagos purificada.

### **3.5.5 Titulação dos fagos.**

Para proceder a quantificação (titulação) dos fagos obtidos a cada ciclo, de modo a utilizá-los nos ciclos subsequentes na concentração padrão de  $1.10^9$  UT's/50µL, uma colônia de Bactérias K91-kan foi adicionada em 200mL de meio LB contendo Kanamicina (50 µg/mL) e Tetraciclina (20µg/mL). Esta cultura foi mantida por 4 horas a 37°C 60 RCF até atingir uma DO de 1,85 – 2,00 (600nm). Os fagos precipitados e já purificados foram diluídos na ordem de  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  e

adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de cada uma dessas diluições em alíquotas separadas contendo 200 $\mu\text{l}$  das bactérias K91-kan previamente crescidas, incubou-se a mistura por 30 minutos a 37°C para o processo de infecção. Finalizada a infecção, plaqueou-se separadamente 50 $\mu\text{l}$  das bactérias infectadas por cada uma diluição de fago ( $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$ ) em placas LB Kanamicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) e tetraciclina (40  $\mu\text{g/ml}$ ) sendo as mesmas posteriormente incubadas a 37°C durante a noite (Figura. 7). No dia seguinte, as colônias foram contadas do grupo que apresentou a densidade de colônias mais viável a ser contada, evitando-se contar placas demasiadamente cheias, podendo o grupo contado ser oriundo de qualquer das diluições ( $10^6$ ,  $10^7$  ou  $10^8$ ). Este procedimento foi repetido de duas a três vezes de modo a obter replicatas das titulações apresentando valores consistentes. O título dos fagos foi determinado pelo produto entre o valor médio de colônias nas replicatas e o seu respectivo fator da diluição ( $10^6$ ,  $10^7$  ou  $10^8$ ).

Como já mencionado, a concentração de fagos é representada em *unidades transdutoras (TU's)*, que representam os fagos recuperados e que se encontram em condição hábil de infecção, sendo o título dos fagos, expresso na unidade TU's por  $\mu\text{L}$  (TU/ $\mu\text{L}$ ), ou seja, carga de fagos (partículas virais) por unidade de volume (em 1 $\mu\text{L}$ ). O procedimento quantifica partículas virais independentemente da variabilidade ou homogeneidade das espécies, a titulação se trata de um procedimento para a quantificação tanto das populações heterogêneas de fagos, obtidas a cada ciclo do protocolo de *phage display*, quanto para a quantificação de populações de fagos isoladas (homogêneas) que apresentam apenas uma espécie viral.



**Figura 7. Esquema de titulação de fagos.** A solução contendo fagos, sejam populações variadas de fagos (bibliotecas) ou um fago isolado, é submetida a diluições seriadas e posteriormente adicionada a bactérias k91Kan, para o processo de infecção. Posteriormente, as bactérias infectadas são plaqueadas em placas LB ágar (Kanamicina/Tetraciclina) e mantidas por uma noite em estufa seca a 37°C (Guia de bioquímica combinatorial versão 1.01 (2017), Prof. Dr. Ricardo Giordano IQ-USP).

### 3.5.6 Ensaio de ligação dos fagos.

Os receptores NGFR de Rato (porção receptora da TrkA de Rato /R&D #1056-TK), NGFR humano (porção receptora da TrkA humana /R&D #175-TK), o BDNFR (porção receptora da TrkB /R&D #688-TK) e NT3R (porção receptora da TrkC/R&D #373-TC) foram imobilizados em placas de 96-poços (400 ng em 50 µL de PBS) por 24h a 4°C. Os poços foram lavados com PBS duas vezes, bloqueados com PBS com 3% BSA por 2 horas à temperatura ambiente e incubados com os fagos contendo insertos amplificados (identificados pelo sequenciamento) na concentração de  $1,5 \cdot 10^9$  TU's/50µL ( $3 \times 10^7$  TU/µL) em PBS e 3% BSA. Após 2

horas de incubação a temperatura ambiente os poços foram lavados 8 vezes com PBS e os fagos ligados aos receptores recuperados por infecção com *E. coli* (K91kan). Diluições em série (5000X, 10.000X e 100.000X) das culturas já infectadas pelos fagos recuperados foram plaqueadas em meio LB ágar com (Tetraciclina 50 µg/mL e Kanamicina 20 µg/mL) e incubadas a 37°C durante a noite. Para a quantificação do número de fagos ligados aos receptores as colônias foram contadas do grupo que apresentou a densidade de colônias mais factível de ser contada, evitando-se contar placas demasiadamente cheias de colônias. O número de fagos que se ligaram ao receptor ou controles foi determinado pelo produto entre o número de colônias contadas e os fatores da diluição das culturas (5000X, 10.000X e 100.000X).

Os fagos recuperados foram descritos como unidades transdutoras (TU) e mensurados em TU's por µL (TU/µL) que representam fagos que foram recuperados e que se encontravam ligados ao receptor, sendo o número de fagos ligados expresso na unidade TU's por µL (TU/µL), ou seja, carga de fagos (partículas virais) por unidade de volume (em 1µL). Como grupo controle foi utilizado um fago não expressando sequências peptídicas (Fago Fd), este fago por não expressar peptídeos em sua superfície nos permite avaliar o nível de ligação mínimo (inespecífico) no ensaio. As comparações para diferentes grupos foram avaliadas pelo teste One-way ANOVA onde \*  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

### **3.5.7 Análise das sequências peptídicas obtidas e mutagênese *in silico* do NGF.**

As sequências peptídicas contidas nos fagos selecionados pelo *phage display* foram identificadas mediante sequenciamento de Sanger (SeqCegh USP-SP). O software *BioEdit alignment editor* (versão 7.2.5) foi utilizado como ferramenta de visualização e alinhamento das sequências. As métricas de alinhamento seguiram o padrão pré-estabelecido pela aplicação acessória *Clustal W*, presente no software *BioEdit* como ferramenta de análise complementar.

A visualização da estrutura tridimensional do complexo NGF-TrkA (PDB:2IFG) e a troca de resíduos na estrutura do NGF foram realizadas utilizando o software PyMOL (PyMOL by Schrödinger, versão 2.5.3). Os parâmetros para a troca de resíduos seguiram as especificações da função “Mutagenesis Wizard”. A escolha da conformação espacial correta (rotâmero) do resíduo mutado (H4Y) foi determinada pelo índice “Mutation %”, o qual determina as possíveis conformações dos resíduos mutados e a probabilidade para a ocorrência de determinado posicionamento, sendo escolhida a conformação de maior valor percentual dentre as que foram obtidas. As distâncias entre os resíduos do NGF e os resíduos da TrkA, foram calculadas antes e após a mutação (H4Y), de modo a detectar alterações nas distâncias entre as estruturas do complexo (NGF-TrkA).

## 4 Resultados

### 4.1 Padronização de um ensaio *in cell* para a medida de atividade da TrkA.

#### 4.1.1 Padronização do imunoenensaio de atividade *in cell*.

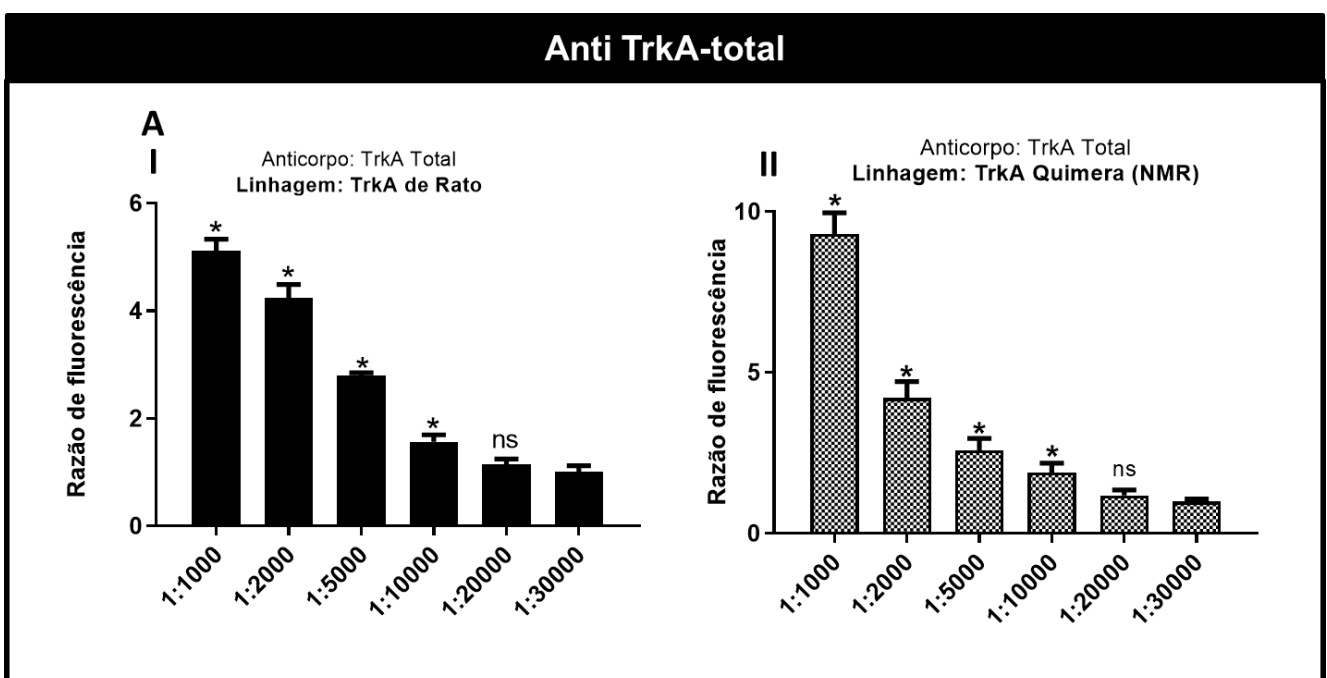
Com o intuito de avaliar a capacidade de detecção do ensaio de atividade *in cell* efetuou-se a titulação dos anticorpos anti-TrkA total e fosforilada/ ativa de modo a observar a capacidade do ensaio em detectar proteínas em um contexto celular.

Primeiramente, padronizou-se a concentração de anticorpo anti-TrkA ideal para o reconhecimento de TrkA total nas linhagens estáveis de células HEK expressando a TrkA de Rato e TrkA Quimera (NMR). Estas células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Em seguida, ao atingirem a confluência celular de ~80% as células foram fixadas, bloqueadas e incubadas com o anticorpo primário anti- TrkA total em diversas concentrações de forma seriada (1:1000 a 1:30000). Por fim, procedeu-se conforme descrito nos materiais e métodos para o ensaio de imunofluorescência *in cell* para atividade da TrkA.

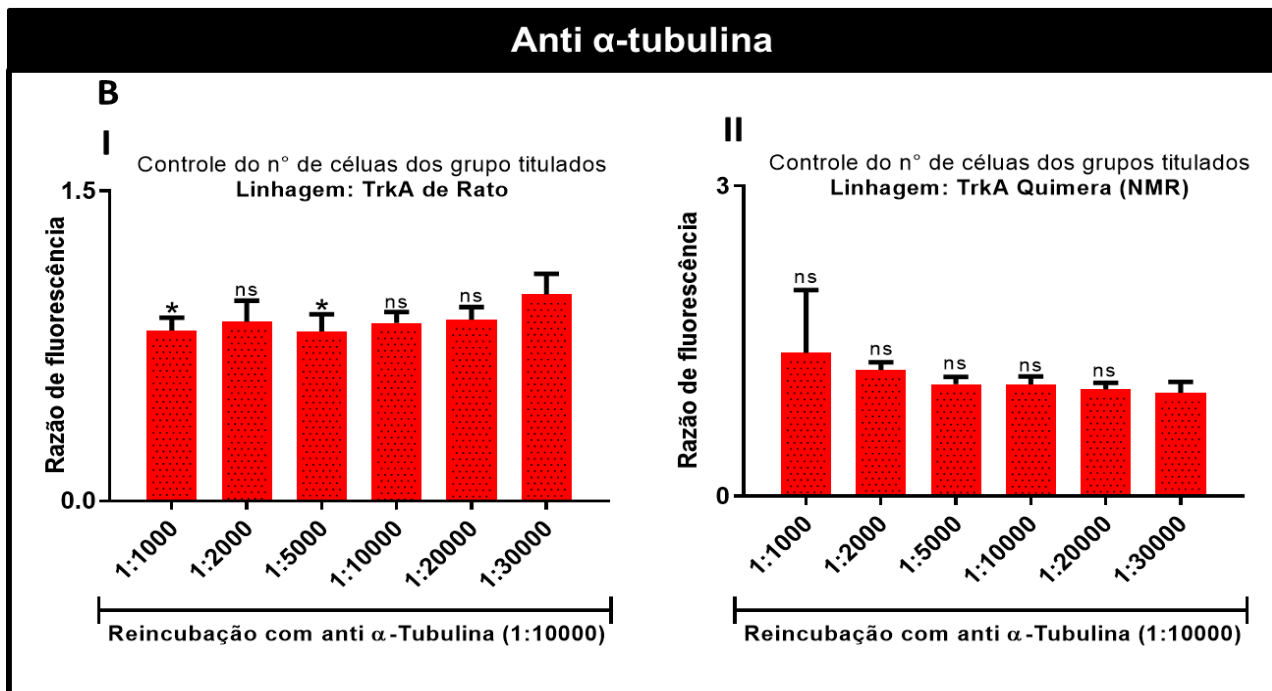
Foram realizados três experimentos independentes para cada uma das linhagens (TrkA de Rato e de NMR). Na Figura. 8 A (subitens I e II), observamos a representação gráfica de um desses experimentos onde destacamos a titulação, teste de diversas concentrações, do anticorpo anti TrkA total. Na figura 8. B, Subitens I e II, destacamos o controle de plaqueamento feito com anti  $\alpha$ -tubulina em uma concentração única de 1:10,000. Os dados estão representados como razão de fluorescência, obtidos do quociente entre a diluição de menor sinal (1:30,000) e as demais diluições. Observamos que o sinal fluorescente diminui até a diluição do anti-TrkA total de 1: 10,000, mantendo-se constante nas diluições

subsequentes até 1:30,000 para ambas as linhagens (Rato e quimera) (Figura 8. A subitens I e II).

As mesmas incubações foram realizadas com células não transfectadas (HEK293T) que apresentaram apenas um sinal de ruído constante em todas as diluições testadas com o anti-TrkA Total (dado não mostrado), sinal este que foi subtraído do sinal das linhagens (Rato e Quimera) de modo a destacar apenas sinais decorrentes da presença de TrkA. Foi observado para o anti  $\alpha$ -tubulina do grupo não transfectado um sinal semelhante ao das células transfectadas (dado não mostrado), significando que o número de células plaqueadas foi semelhante e que o decréscimo de sinal se deve à diluição do anti-TrkA total e não a um plaqueamento desigual. Padronizou-se então a diluição de uso do anti TrkA total para essas linhagens em 1:4000, de modo a se trabalhar em uma faixa de sinal superior àquela apresentada pelo ruído. O experimento foi realizado em triplicatas e em três réplicas experimentais independentes, com resultados semelhantes, sendo apresentada nesta sessão de resultados uma das réplicas.







**Figura 8. Titulação do anti TrkA total em linhagens estáveis de células HEK 293T utilizando o imunoensaio *in cell*.** A titulação do anticorpo anti TrkA total foi realizada em placas de 96 poços com fundo óptico para leitura. Em A e B são plotadas as linhagens experimentais, sendo representado nos subitens I e II a titulação do anticorpo anti TrkA total nas diferentes linhagens (Rato e Quimera). Foram plaqueadas  $100 \times 10^3$  células/poço e os experimentos foram realizados a uma confluência celular de 80%. O cultivo se deu em um volume final de  $200 \mu\text{L}$ /poço de meio DEMEM completo. Após a fixação das células e incubação com anticorpos primários (conforme materiais e métodos) foram seguidas incubações com anticorpos IRDye Licor Odyssey (800CW-Rabbit e 680RD-Mouse), sendo a reação capturada em fotodocumentador Licor Odyssey via protocolo do fabricante. Em B subitens I e II é apresentada a plotagem do sinal fluorescente para  $\alpha$ -tubulina, que foi utilizada como controle do plaqueamento das linhagens em cada diluição. No eixo das ordenadas (Eixo Y) a fluorescência foi plotada pelo parâmetro razão de fluorescência. Considerou-se como ponto mínimo o grupo que apresentasse o menor sinal dentre os avaliados (1:30,000), sendo os demais grupos experimentais comparados a esse controle para o estabelecimento das razões de aumento ou diminuição. A relevância estatística para os diferentes grupos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA onde \* equivale a  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

#### **4.1.2 Imunoensaio de atividade *in cell* detecta a forma ativa da TrkA nas linhagens por meio do reconhecimento de resíduos de tirosina fosforilados no domínio quinase da enzima**

Buscamos avaliar a ativação da TrkA em nosso ensaio por meio da detecção da forma fosforilada da enzima, que quando em sua forma ativa se autofosforila em diferentes resíduos de tirosina. Dentre esses resíduos autofosforilados da TrkA, após a ligação do NGF, estão os localizados nas posições Y674/Y675 (loop de ativação da quinase) e Y785 (sítio de ancoragem da PLC $\gamma$ ) (Figura 2) da sequência linear da TrkA humana, que equivalem as Tirosinas Y682/Y683 e Y793 respectivamente da sequência linear da TrkA de Rato.

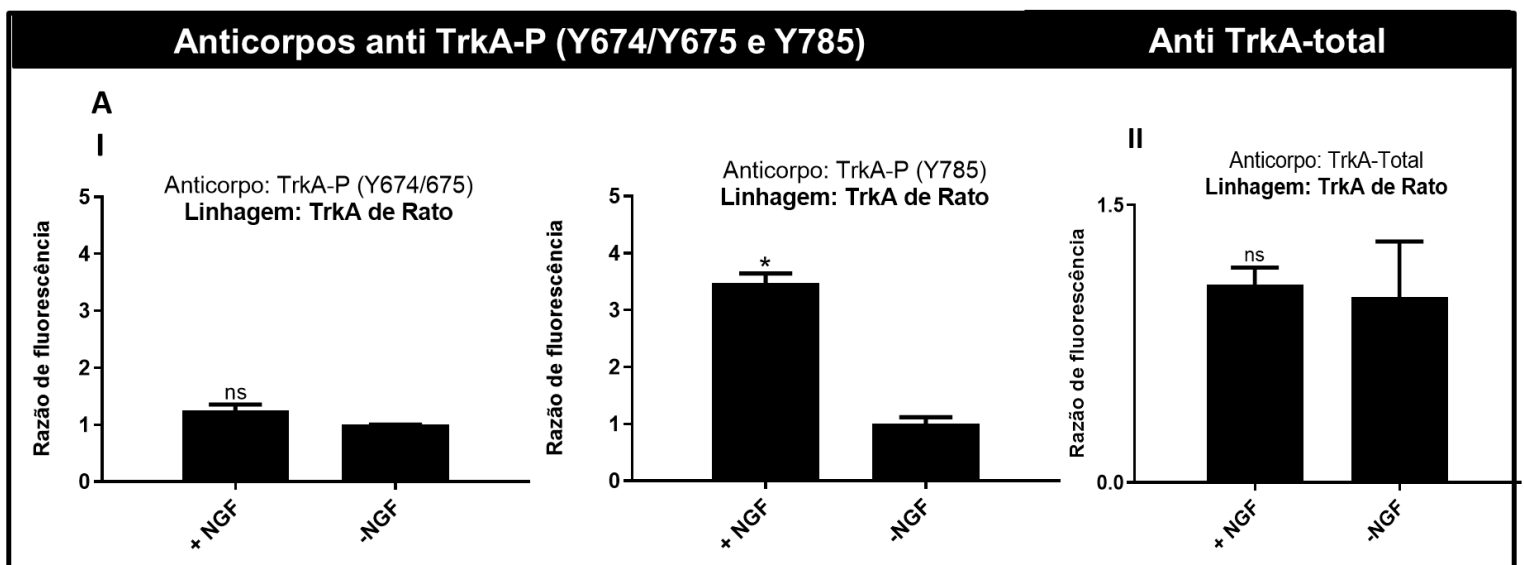
Após a padronização da concentração de anticorpos no ensaio via anti TrkA-total, testamos qual dos anticorpos anti P-TrkA disponíveis em nosso laboratório (anti P-TrkA Y674Y/675 e Y785) seria o mais adequado para a detecção da enzima ativa utilizando o imunoensaio *in cell*. Decidimos testar ambos os anticorpos na concentração de 1:500, decidimos por uma diluição mais concentrada pelo fato de se tratar de um protocolo que envolve permeabilização de células e de serem realizadas inúmeras lavagens ao longo das etapas.

Na Figura 9. A e B (subitem I), observamos a ativação do loop de ativação visto por uma reação maior do anti fosfo- tirosinas Y674Y/675 na presença de NGF em ambas as linhagens (Rato e Quimera), entretanto não foi significativo. Possivelmente devido ao procedimento de fixação das células que pode ter interferido na reatividade do anticorpo.

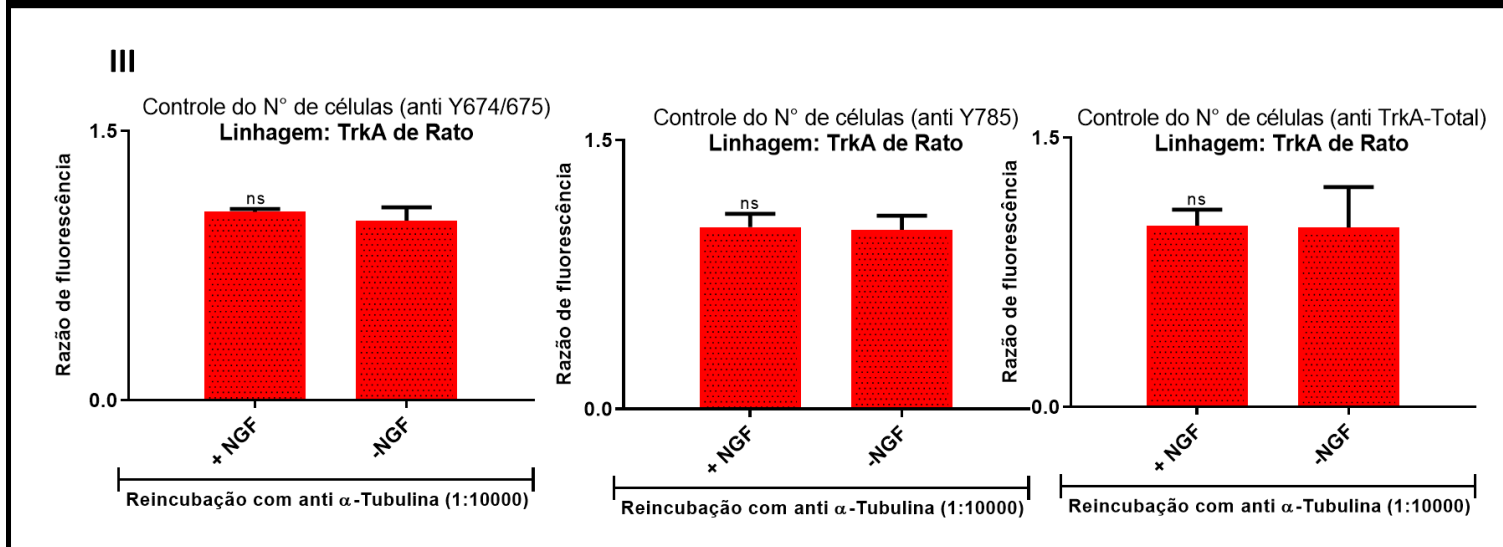
Observamos que o anticorpo anti-tirosina na posição 785 fosforilada (pY785), teve uma maior reatividade nas células tratadas com NGF em ambas as linhagens (Rato e Quimera) (concentração 1:500).

As mesmas incubações (+NGF e -NGF) foram realizadas em células HEK

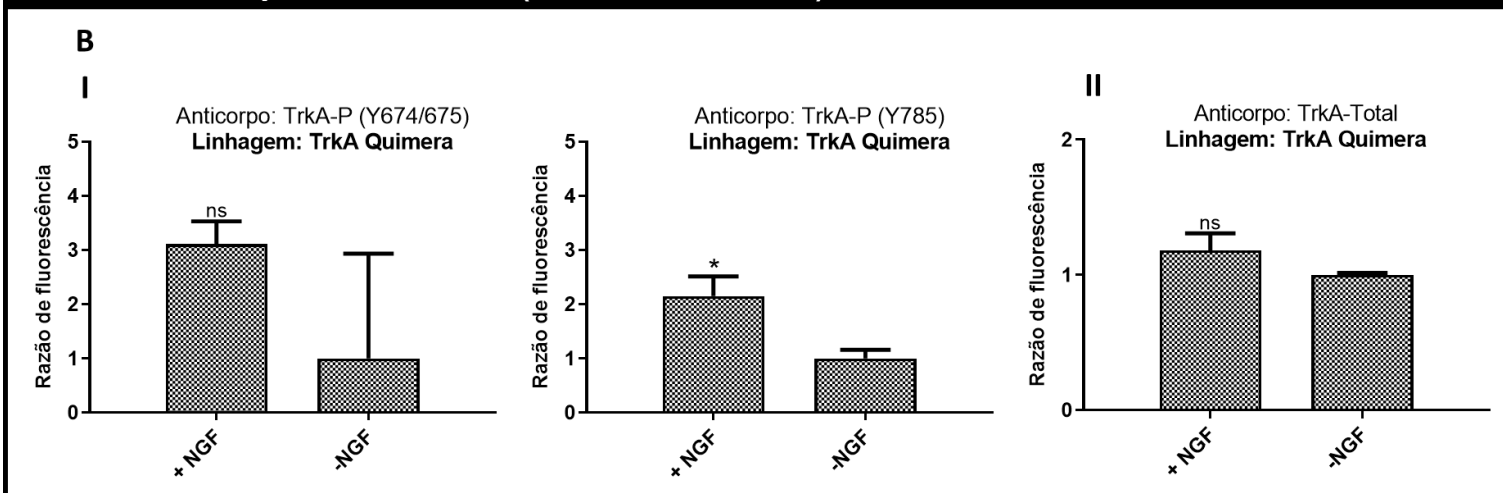
293T não transfectadas (dado não mostrado), o sinal de ruído observado para estas células foi então subtraído do sinal obtido das demais linhagens em ambas as condições (+NGF e -NGF) de modo a destacar apenas os sinais decorrentes da ativação pós tratamento (+NGF e -NGF). O nível endógeno da TrkA Figura 9. A e B (subitem II) e de  $\alpha$ -tubulina (Figura 9. de A e B (subitem III) também foram avaliados em todos os grupos (+NGF e -NGF) e linhagens (Rato, Quimera) como parâmetros de controle de expressão da TrkA e do número de células plaqueadas respectivamente, dado o fato dos grupos TrkA-P (Y674Y/Y675 e Y785) e TrkA-total terem sido avaliados em placas (células) diferentes. Os experimentos foram realizados em três réplicas experimentais independentes, com resultados semelhantes, sendo apresentada nesta sessão de resultados uma das réplicas experimentais.



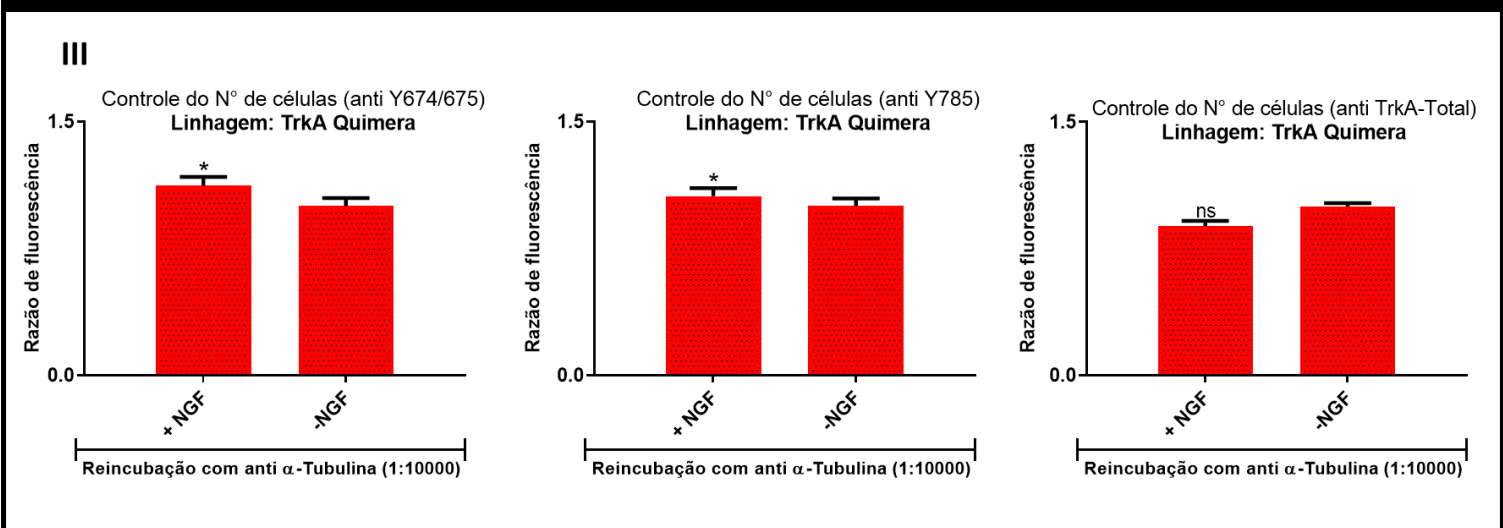
### Anti $\alpha$ -tubulina



### Anticorpos anti TrkA-P (Y674/Y675 e Y785)



### Anti $\alpha$ -tubulina



**Figura 9. Ativação da TrkA por meio da reatividade de anticorpos contra a sua forma fosforilada (TrkA-P).** Anticorpos monoclonais contra diferentes sítios de fosforilação da TrkA (Y674/Y675 e Y785) foram testados nas linhagens experimentais de modo a se observar a ativação da quinase. Os sinais do grupo tratado com NGF (+NGF) da linhagem de TrkA Rato foram analisados utilizando os diferentes anticorpos anti TrkA-P (A. subitem I). A mesma montagem experimental e análise foi feita com a linhagem TrkA Quimera (B. subitem I). Todos os grupos não tratados com NGF (-NGF) foram igualmente incubados com os anticorpos anti TrkA-P de modo a avaliar o nível basal de ativação da quinase. Um grupo representando cada uma das linhagens também foi incubado com o anti TrkA total (A e B subitem II) de modo a se analisar possíveis alterações na expressão da quinase ao longo do tratamento com NGF. Anticorpos secundários IRDye Licor (800CW-Rabbit e 680RD-Mouse) foram usados posteriormente e a reação foi capturada em fotodocumentador Licor Odyssey via protocolo do fabricante. O subitem III (A e B) apresenta a plotagem do sinal fluorescente para  $\alpha$ -tubulina (plot vermelho), que foi utilizada como controle do plaqueamento das linhagens nos grupos de tratamento (+NGF e -NGF). No eixo das ordenadas (Eixo Y) a fluorescência foi plotada pelo parâmetro de razão de fluorescência. Considerou-se como ponto mínimo o grupo que apresentasse o menor sinal dentre os avaliados (-NGF), sendo os demais grupos experimentais comparados a ele para o estabelecimento das razões de aumento ou diminuição. A relevância estatística para os diferentes grupos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA onde \* equivale a  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

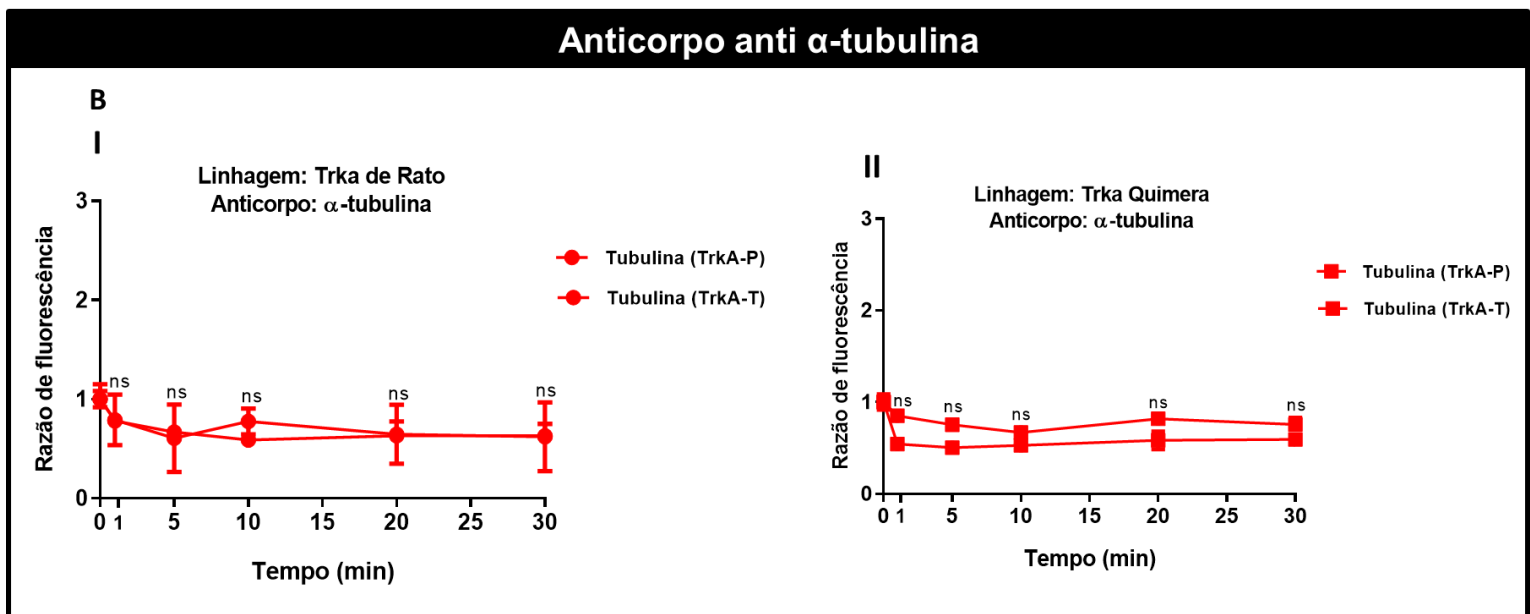
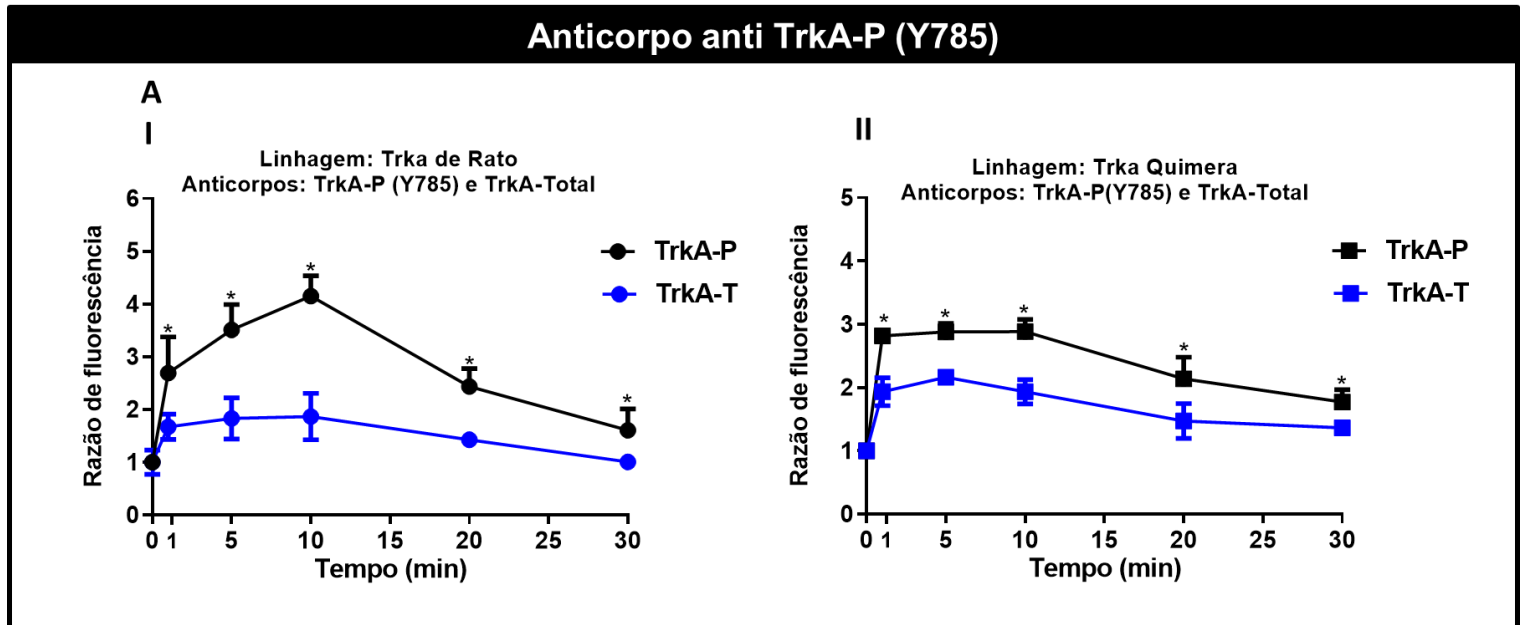
#### **4.1.3 Cinética de ativação em função do tempo demonstra hipoatividade da TrkA de NMR (Quimera) comparada à de rato.**

Com o intuito de trabalharmos com a enzima em sua faixa linear de atividade buscamos estabelecer por meio de nossas linhagens celulares uma cinética de ativação da TrkA frente a diferentes tempos de exposição a seu ativador (NGF). Utilizou-se o anti pY785 para se acompanhar a atividade das quinases.

Para comparar a cinética de ativação da TrkA de Rato e de NMR (Quimera) analisamos os níveis de fosforilação da Y785 da TrkA de ambas as linhagens em diferentes tempos (0min, 5min, 10min, 20min e 30min) logo após a ativação com

100 ng de NGF. Observamos que a TrkA atinge seu ponto máximo de ativação em 10 minutos após a aplicação de NGF. Depois desse período a ativação da quinase decai (Figura 10. A, subitem I – Linha preta). Já a TrkA de NMR (Quimera) tem sua ativação após 5 min da adição do NGF, ativação esta que se mantém em um nível abaixo do observado para a TrkA de Rato e posteriormente decai para níveis mínimos (Figura 10. A, subitem II – Linha preta). Os níveis de TrkA total tiveram um sinal de reatividade que se manteve constante durante o ensaio para ambas as linhagens.

Células HEK não transfectadas não apresentaram sinais de ativação ao longo do tempo após encubação com NGF, o sinal de ruído observado para este grupo foi subtraído do sinal das demais linhagens (Rato e NMR). Os níveis endógenos de TrkA total (Figura 10. A - Linhas azuis) foram avaliados como parâmetro de expressão da TrkA ao longo do tempo. Os níveis de  $\alpha$ -Tubulina nos grupos TrkA-P e TrkA-T demonstrou o correto plaqueamento das linhagens testadas dado o fato dos grupos TrkA-P e TrkA-T terem sido avaliados em placas (células) diferentes (Figura 10. B subitens I e II – Linhas vermelhas). O experimento foi realizado em três réplicas experimentais independentes, apresentando resultados semelhantes, sendo apresentada nesta sessão de resultados apenas uma das réplicas experimentais.



**Figura 10. Cinética de ativação da TrkA em função do tempo.** A ativação da quinase foi testada nas linhagens (TrkA-Rato, TrkA-Quimera e HEK) em diversos intervalos de tempo de modo a padronizar o mais adequado para a realização do ensaio, buscou-se observar o pico de atividade da enzima. Em A (I) tem-se os níveis de fosforilação da TrkA (linha preta) e de TrkA total (linha azul) da linhagem de TrkA de Rato. Em A (II) tem-se os níveis de fosforilação da TrkA (linha preta) e de TrkA total (linha azul) da linhagem Quimera. Os grupos em A (subitens I e II) após tratamento com NGF foram incubadas em anti TrkA-P (Y785) (linhas pretas) de modo a se observar a ativação da quinase e em anti TrkA total (Linhas azuis) para se analisar possíveis alterações na expressão

da quinase ao longo do intervalo testado (30min) Anticorpos secundários IRDye Licor (800CW-Rabbit e 680RD-Mouse) foram usados posteriormente, sendo a reação capturada em fotodocumentador Licor Odyssey via protocolo do fabricante. Em B (subitens I e II) têm-se as plotagens referentes ao sinal fluorescente para  $\alpha$ -tubulina, que foi utilizada como controle do plaqueamento das linhagens para o grupo TrkA-P e TrkA-total nos intervalos avaliados (0min a 30min). No eixo das ordenadas (Eixo Y) a fluorescência foi plotada pelo parâmetro de razão de fluorescência. Considerou-se como ponto mínimo o grupo que apresentasse o menor sinal dentre os avaliados, em se tratando de uma cinética utilizou-se o tempo 0 min, sendo os demais tempos experimentais (5min a 30min) comparados a ele para o estabelecimento das razões de aumento ou diminuição A relevância estatística para os diferentes grupos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA onde \* equivale a  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

#### **4.1.4 Ensaio de atividade *in cell* é capaz de detectar a inibição de atividade da TrkA pelo inibidor comercial pan-Trk GNF5837**

Após a padronização do ensaio em termos de detecção de atividade de quinase avaliou-se a capacidade do mesmo em acusar a inibição farmacológica da TrkA, através do tratamento das linhagens com o inibidor comercial da TrkA, GNF5837 (Albaugh P, et al 2012).

Somente as células expressando a TrkA de Rato e células HEK não transfectadas foram pré-incubadas com o inibidor na concentração final de  $1\mu\text{M}$  (veículo 0,01% DMSO) por 30min em estufa de cultivo celular ( $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ ). Em seguida, as células foram submetidas ao tratamento com NGF na concentração de  $100 \text{ ng/mL}$  por 15 min (pico de ativação) para se observar o efeito do inibidor.

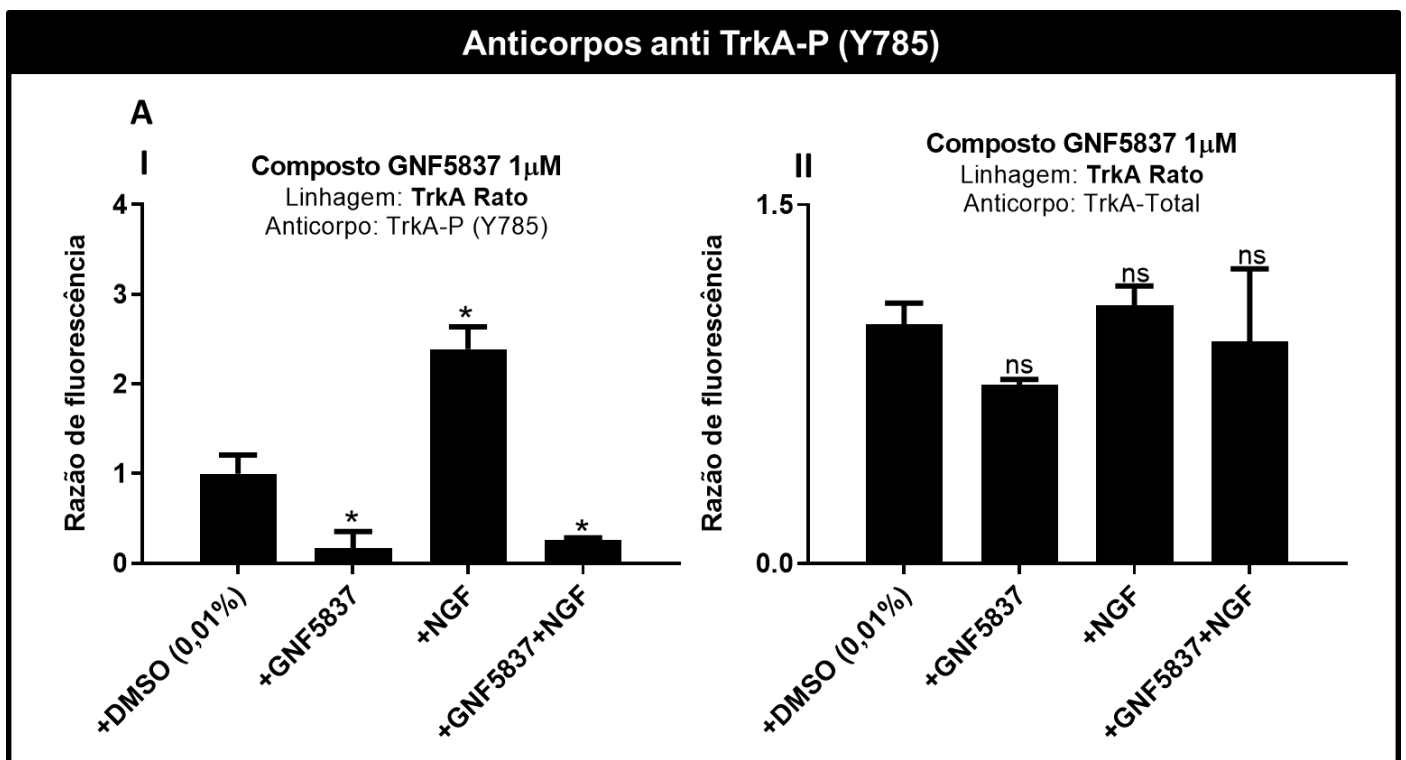
Observou-se a inibição basal e da atividade induzida por NGF na presença do inibidor (GNF5837) (Figura 11. A subitem I). O efeito inibitório é observado ao se comparar os grupos tratados com o inibidor ao grupo controle tratado apenas com NGF. No grupo tratado apenas com o veículo (+DMSO 0,01%) observa-se um nível basal de atividade usado como controle. Este mesmo grupo (DMSO 0,01%)

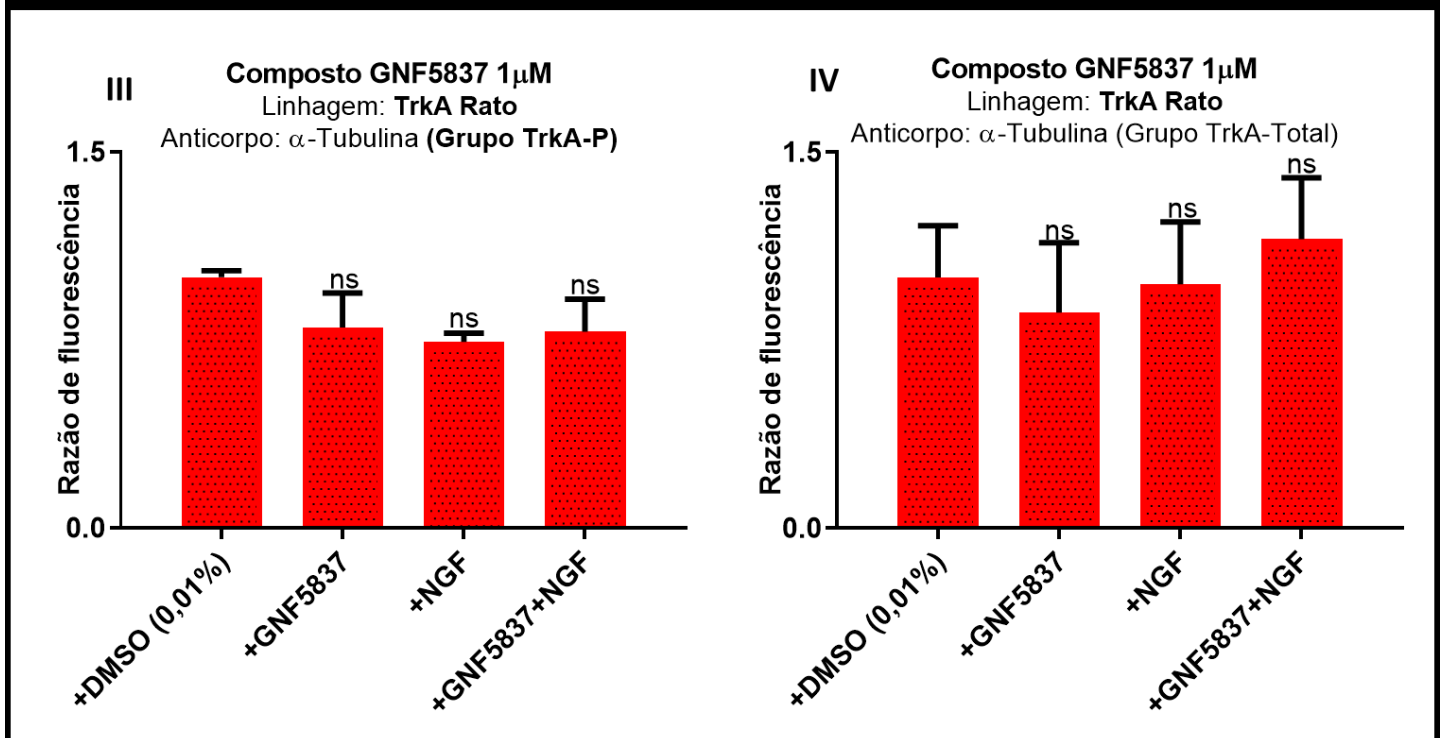


foi utilizado para o cálculo da razão de fluorescência na plotagem dos dados, onde se buscou observar o número de vezes que os demais grupos variaram em função deste controle. Não se observou alterações na expressão da TrkA total em nenhum dos casos.

A mesma montagem experimental citada foi realizada com células HEK293T não transfectadas, não sendo observado nenhum tipo de efeito decorrente dos tratamentos com o inibidor. O sinal de ruído observado para o grupo não transfectado foi subtraído do sinal das demais linhagens (Rato e NMR).

Os níveis endógenos de TrkA (Figura 10. A - subitem II) e de  $\alpha$ -Tubulina (Figura 11. A - subitens III e IV) foram avaliados como parâmetro de controle para a expressão da TrkA e do número de células plaqueadas, respectivamente, dado o fato dos grupos TrkA-P (Y785) e TrkA-total terem sido avaliados em placas (células) diferentes. O experimento foi realizado em três réplicas experimentais independentes, apresentando resultados semelhantes, sendo apresentada nesta sessão resultados apenas umas das réplicas experimentais.



Anti  $\alpha$ -tubulina

**Figura 11. Inibição farmacológica da TrkA pelo inibidor comercial GNF5837.** A inibição da quinase foi testada nas linhagens (TrkA-Rato e HEK) de modo a demonstrar a capacidade do ensaio de atividade *in cell* em acusar um perfil de inibição farmacológico. A concentração de inibidor testada foi de 1 $\mu$ M, e se deu por meio de uma pré-incubação das linhagens com o inibidor seguida pela ativação com NGF (100 ng/mL). Em A observa-se a plotagem do ensaio realizado com a linhagem TrkA de Rato, no subitem I têm-se o perfil de inibição da quinase no grupo +GNF5837 e o desafio da inibição mediante a tratamento posterior com NGF no grupo +GNF5830+NGF. Os controles positivos (+NGF) e negativo (DMSO 0.01%) destacam respectivamente a ativação e atividade basal da TrkA. Em A subitem II observa-se um grupo representando linhagem de TrkA Rato posteriormente incubado com o anti TrkA total. Anticorpos secundários IRDye Licor (800CW-Rabbit e 680RD-Mouse) foram usados e a reação capturada em fotodocumentador Licor Odyssey segundo o protocolo do fabricante. Em B (subitens III e IV) têm-se as plotagens referentes ao sinal fluorescente para  $\alpha$ -tubulina, que foi utilizada como controle do plaqueamento das linhagens. No eixo das ordenadas (Eixo Y) a fluorescência foi plotada pelo parâmetro de razão de fluorescência. Considerou-se como ponto mínimo do *fold change* o grupo que apresentasse o menor sinal dentre os avaliados (DMSO 0.01%) sendo os demais grupos experimentais comparados a ele para o

estabelecimento das razões de aumento ou diminuição. A relevância estatística para os diferentes grupos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA onde \* equivale a  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

Os dados obtidos nesta série de experimentos nos permitiram estabelecer um ensaio para se medir a atividade da TrkA. Observamos a auto fosforilação e a consequente ativação da TrkA na presença de NGF e a inibição da mesma com o inibidor comercial da TrkA GNF5837. Além disso, comparamos a cinética de ativação da TrkA de rato com a TrkA de NMR e observamos que ambas diferem ao longo da cinética, sendo que a última atinge um nível máximo de ativação inferior ao máximo observado para a TrkA de rato. Tal característica da TrkA do NMR é tida pela literatura como o fator que a caracteriza como uma enzima hipoativa. Deste modo, a menor ativação da quinase do NMR se mostra como potencial justificativa para a maior insensibilidade a dor do modelo (OMERBAŠIĆ et al., 2016).

Entretanto, ao observamos os primeiros cinco minutos dos perfis cinéticos de ambas as linhagens, é possível identificar uma semelhança nas inclinações das retas que representam as ativações dessas enzimas. Tal equivalência nas ativações (quando o contrário era o esperado) pode ter se dado devido a uma maior expressão da TrkA na linhagem de NMR, o que resultaria em uma maior quantidade de proteínas presentes nesta linhagem e aparentemente em uma maior ativação da mesma, igualando-a a TrkA de Rato, ao menos nos minutos cinéticos iniciais.

Este ensaio de atividade celular tem o potencial para ser usado para se testar a atividade de mutantes da TrkA bem como para se rastrear drogas ou peptídeos moduladores desta quinase.

## 4.2 Rastreamento de bibliotecas de *Phage display* para peptídeos que se ligam ao receptor do NGF (NGFR)

### 4.2.1 Formação do complexo NGF/NGFR garante viabilidade de aplicação do receptor comercial da TrkA (NGFR) em ensaios de seleção *in vitro*.

Primeiramente testamos se o NGFR recombinante comercial foi capaz de se ligar ao seu ligante, o NGF recombinante.

Fizemos uma ligação *in vitro* entre as formas recombinantes dessas espécies obtidas comercialmente. O ensaio foi realizado incubando-se o  $\beta$ -NGF humano e a porção receptora de NGF da TrkA de Rato (NGFR) na proporção molar de 1:1, a interação entre ambos foi observada por Western Blot em gel nativo como descrito nos métodos.

O ensaio contou com quatro grupos experimentais, sendo o primeiro composto pela incubação da TrkA com o NGF (+NGFR +NGF), o segundo contendo somente a TrkA e sem o NGF (+NGFR -NGF), o terceiro grupo sem a TrkA contendo apenas o NGF (-NGFR +NGF) e por último um grupo sem nenhuma das espécies (-NGFR -NGF). Os grupos foram incubados com anticorpos anti TrkA Total e anti NGF. Foram realizados dois experimentos independentes de modo a observar a consistência dos dados obtidos (Figura 12. de A à C, subitem I). Os resultados obtidos sugerem uma interação entre as espécies testadas (NGFR e NGF).

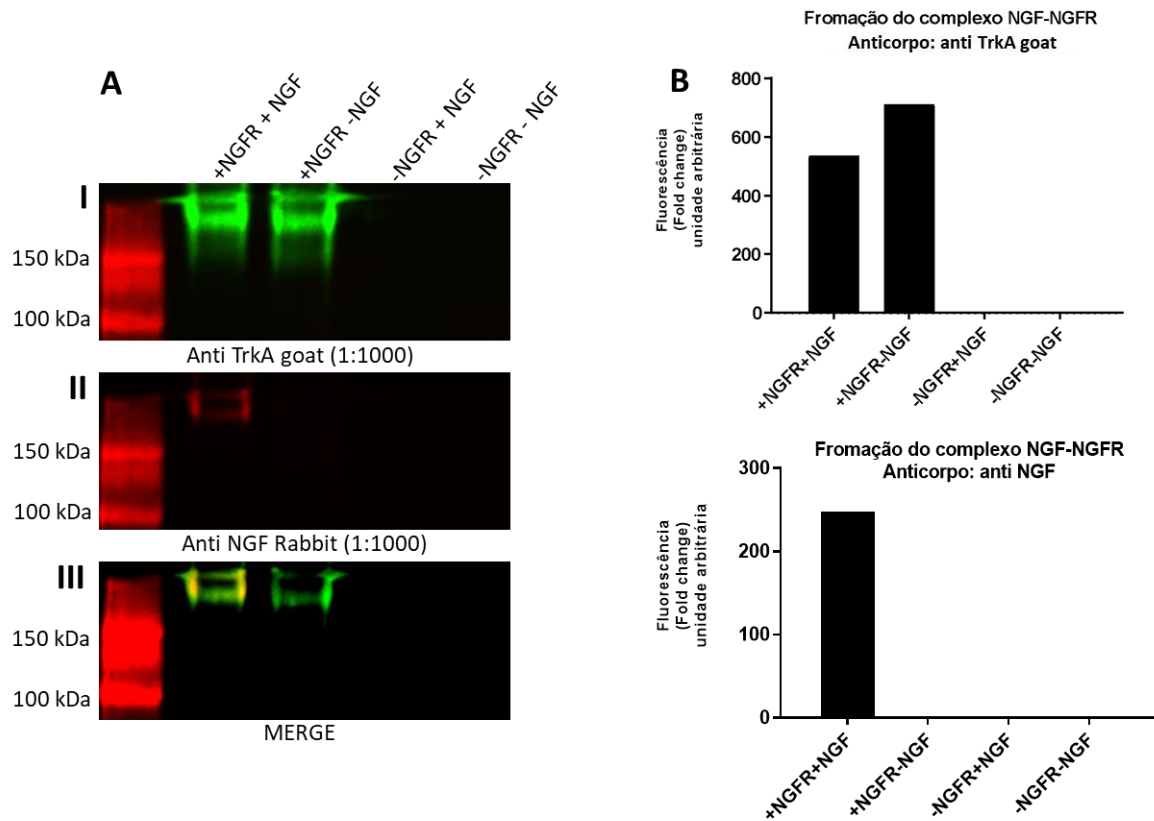
É possível observar através do anticorpo anti TrkA total as bandas do receptor (NGFR) no grupo onde o mesmo foi adicionado isoladamente (+NGFR -NGF) ou no grupo onde se encontrava complexado com o NGF (+NGFR +NGF) (Figura 12. A subitem I).

A mesma observação é válida para o observado com o anticorpo anti NGF, o mesmo destacou bandas adequadas do fator em sua forma complexada com o

NGFR (+NGFR +NGF), entretanto sua forma isolada (-NGFR+NGF) não se mostrou visível no gel. É possível que esta ausência tenha se dado pelo escape do fator da malha de acrilamida ao longo da corrida, dado o tamanho reduzido do fator (~27 kDa) (Figura 12. A, subitem II). As condições de corrida do gel podem ter dificultado a visualização de um ganho de peso molecular do complexo NGFR/NGF comparado ao NGFR sozinho.

Entretanto, ao analisarmos o grupo +NGFR +NGF (Figura 12. A, subitens I e II), foi observado que as bandas da TrkA (NGFR) e do NGF se sobrepõem, demonstrando a presença do NGF e seu receptor no grupo analisado. Infere-se então a possível ligação entre ambas as espécies durante o ensaio de ligação, sendo a colocação das bandas uma possível representação do complexo formado (NGF-TrkA) (Figura 12. A, subitem III). A Figura 12 B representa as quantificações das bandas, realizada no software ImageLab™ (Biorad).

O experimento foi realizado em duas réplicas experimentais independentes, apresentando resultados semelhantes, sendo apresentada nesta sessão resultados apenas umas das réplicas experimentais.



**Figura 12. Ensaio *in vitro* para a formação do complexo NGF-NGFR em gel nativo (Native-PAGE).** As espécies NGF e NGFR foram incubadas juntas *in vitro*. Em A (subitem I) observamos a detecção do receptor NGFR nos grupos +NGFR+NGF e +NGFR-NGF utilizando anticorpo anti NGFR (Anti TrkA Goat), no subitem II temos a detecção do NGF nos grupos +NGFR+NGF e -NGFR+NGF utilizando anticorpo anti NGF. O grupo -NGFR-NGF foi utilizado como controle negativo e medida inespecificidade. No subitem III (*MERGE*) observamos a sobreposição das bandas reativas com anti NGF e anti TrkA, onde se vê a presença das bandas do receptor NGFR e NGF no mesmo grupo (+NGFR+NGF), sobrepostas. Em B observamos a quantificação das bandas fluorescentes dos subitens I e II do item A realizada pelo software ImageLab™ Biorad.

#### **4.2.2 Rastreamento das bibliotecas cíclica (CX8C) e linear (X6) de *Phage display* resultou na seleção de fagos que se ligam ao NGFR.**

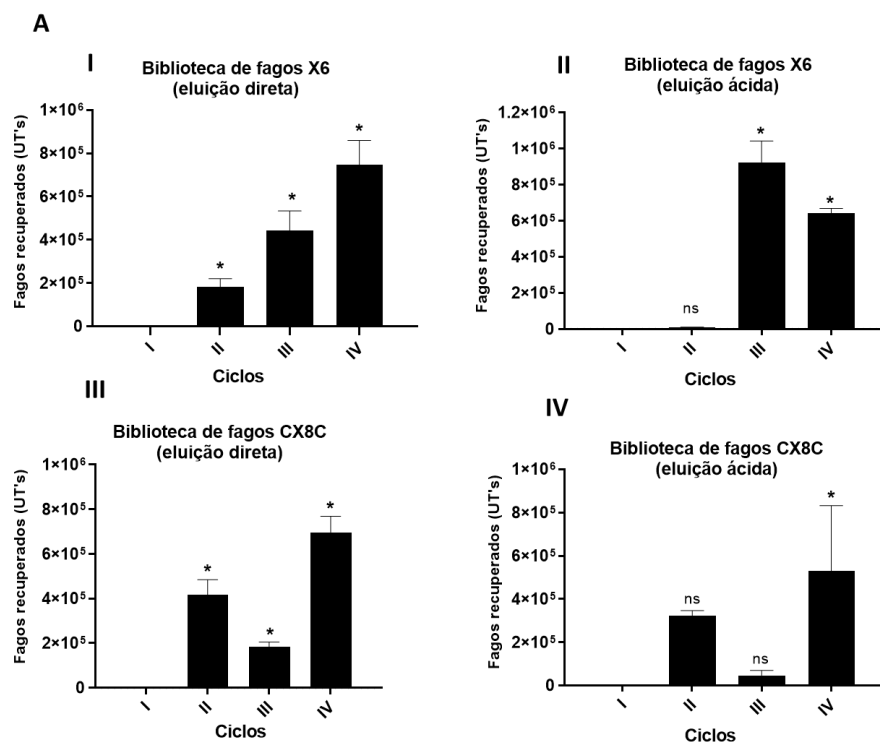
A metodologia de phage display se caracteriza como uma técnica de enriquecimento progressivo de populações de fagos expressando peptídeos ligantes que apresentam expressiva afinidade por um determinado alvo. Buscou-se então selecionar populações de fagos das bibliotecas X6 e CX8C que se ligam ao NGFR.

Com os fagos de cada biblioteca procedeu-se a interação inicial (ciclo I) com o receptor de NGF (NGFR). Os demais ciclos (II, III e IV) foram realizados sempre utilizando como ligante os fagos recuperados e purificados no ciclo imediatamente anterior, 'como descrito na metodologia. Como já descrito, os termos "panning" ou "Biopenning" se tratam dos ciclos de enriquecimento consecutivos aos quais as bibliotecas são submetidas, e que resultam em populações de fagos cada vez mais homogêneas.

Na Figura 13. A é possível observar o padrão e enriquecimento de cada uma das bibliotecas (X6 e CX8C) nas duas condições de eluição testadas: eluição direta (subitens I e III) e eluição ácida (subitens II e IV). A cada ciclo realizado observa-se populações de fagos cada vez mais enriquecidas, ou seja, populações de fagos com maior potencial de se ligarem ao ligante testado (NGFR), como é representado pelas barras dos fagos das bibliotecas X6 e CX8C, eluidos por eluição direta e CX8C por eluição ácida. Entretanto, alguns fagos com baixa capacidade ligante não eliminados ao longo dos ciclos de seleção, podem ocasionar um efeito oposto no padrão de enriquecimento levando a um decréscimo do mesmo, como pode ser visto no panning da biblioteca X6 por eluição ácida (Figura 13. A Subitem II).

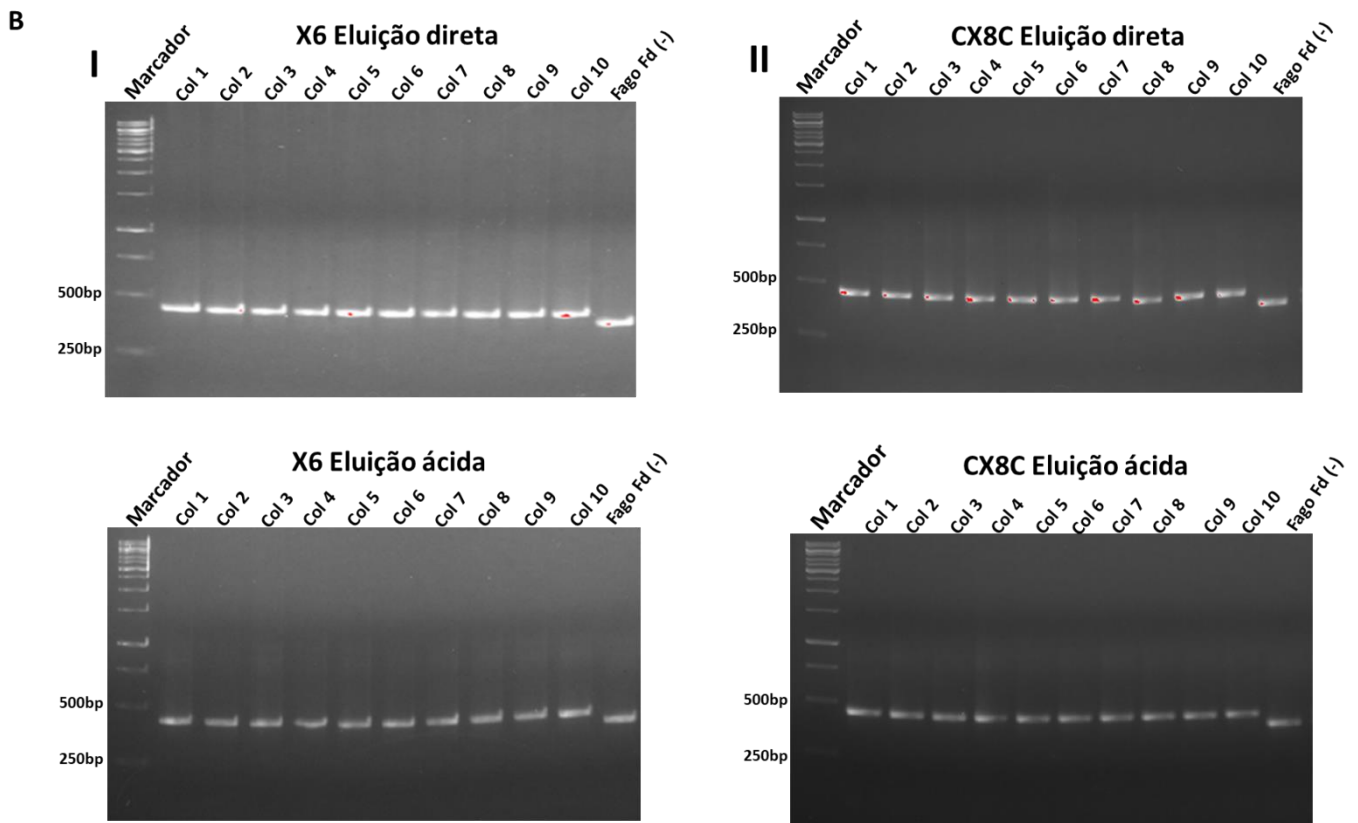
Do plaqueamento do terceiro e quarto ciclo de cada um dos grupos (CX8C e X6 eluição ácida e direta) foram selecionadas dez colônias. Estas colônias foram então utilizadas como molde em uma reação de PCR para se amplificar os insertos contidos nos fagos. Os produtos de PCR foram depois visualizados por um gel de agarose (Figura 13. B e C Subitens I a II) e sequenciados. A amplificação e sequenciamento deste material nos permitiu inferir que alguns dos fagos obtidos no terceiro e quarto ciclo apresentam peptídeos com o potencial de se ligarem ao receptor do NGFR (Figura 13. B e C Subitem III, destacados em ciano).

Os fagos que apresentaram as sequências peptídicas promissoras foram aqueles fagos expressando as sequências CLSAGYPLFC e CLQGFGLGRC, visto que ambos os fagos apareceram três e quatro vezes respectivamente no terceiro ciclo e duas vezes (ambos os fagos) no quarto ciclo. Já o fago expressando o peptídeo LFVALF apareceu apenas no quarto ciclo (duas vezes). Partimos então para a precipitação e purificação desses fagos (CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC e LFVALF) com o intuito de se confirmar a ligação desses fagos ao NGFR.





## Ciclo III



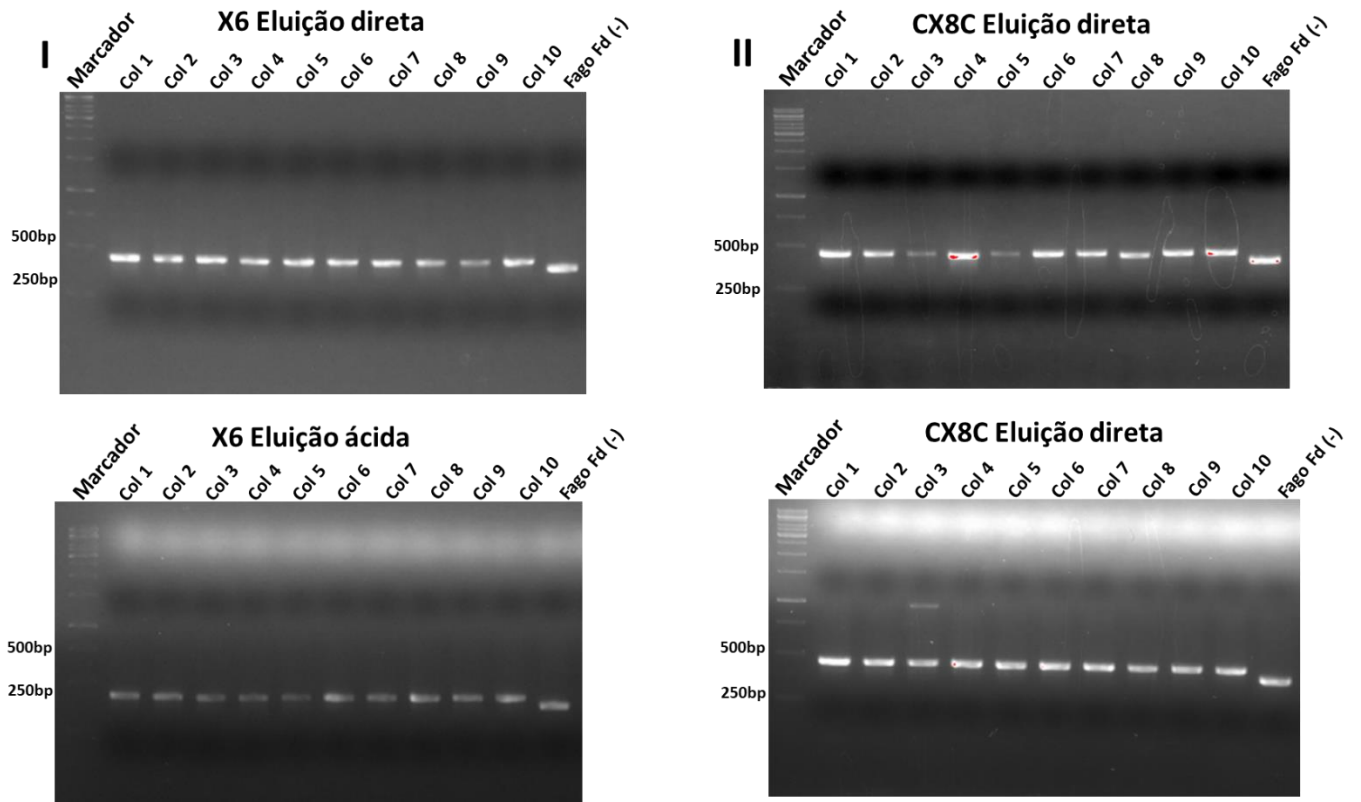
## III

## Ciclo III

X6 Eluição direta	X6 Eluição ácida	CX8C Eluição direta	CX8C Eluição ácida
Col 01: <b>VIVLGW</b>	Col 01: <b>WFGQQS</b>	Col 01: <b>CLSAGYPLFC</b>	Col 01: <b>CFNWHVNWVC</b>
Col 02: <b>ALSASF</b>	Col 02: <b>AYERRV</b>	Col 02: <b>CLSAGYPLFC</b>	Col 02: <b>CVFGFALKVC</b>
Col 03: <b>LFVALE</b>	Col 03: <b>CYVWVE</b>	Col 03: <b>LLGLVRFEC</b>	Col 03: <b>CVNVSPGLGC</b>
Col 04: <b>GCVFSI</b>	Col 04: <b>AITVYK</b>	Col 04: <b>CLSAGYPLFC</b>	Col 04: <b>CTFIKVGNGC</b>
Col 05: <b>RHTSLI</b>	Col 05: <b>DDYEWK</b>	Col 05: <b>CNMSVAAWWC</b>	Col 05: <b>CLQGFGLGRC</b>
Col 06: <b>VVVFHV</b>	Col 06: <b>ECIVRP</b>	Col 06: <b>LLLDFIGVC</b>	Col 06: <b>LLTDLVWRC</b>
Col 07: <b>IRSVDL</b>	Col 07: <b>HGSIWW</b>	Col 07: <b>CTSIASVAGC</b>	Col 07: <b>CLCFLGHCGC</b>
Col 08: <b>LIVVSV</b>	Col 08: <b>ILGRWR</b>	Col 08: <b>CHRSEIMRQC</b>	Col 08: <b>CLQGFGLGRC</b>
Col 09: <b>WAVLER</b>	Col 09: <b>ACGDNE</b>	Col 09: <b>CLGVDISATC</b>	Col 09: <b>CYGFIKYGSC</b>
Col 10: <b>AFRIGR</b>	Col 10: <b>GRSGRP</b>		Col 10: <b>CGSGRVITYC</b>

## Ciclo IV

C



III

## Ciclo IV

X6 Eluição direta	X6 Eluição ácida	CX8C Eluição direta	CX8C Eluição ácida
Col 01: XXXXXX	Col 01: FGSFWW	Col 01: CFNWHVNWVC	Col 01: CSFPAAAYC
Col 02: XXXWIX	Col 02: FGFRRD	Col 02: CALYNTIFLC	Col 02: CGSGRVITYC
Col 03: GAWPRR	Col 03: VRVVYI	Col 03: CLSAGYPLFC	Col 03: CXXXXXXXXXC
Col 04: XXXXXX	Col 04: ALLPRR	Col 05: CVGAHSVPAC	Col 04: CYGFIKYGSC
Col 05: LFVALE	Col 05: CDVRVC	Col 06: CDPCCWGRMC	Col 05: CLQGFGLGRC
Col 06: TILRRV	Col 06: LSLYWF	Col 07: CLSAGYPLFC	Col 06: CLWMASKVTC
Col 07: FFGSVD	Col 07: YIVFVG	Col 09: CXXXXXXXXXC	Col 07: CALPWSWGEC
Col 08: XXXXXV	Col 08: ALLPRR	Col 10: CPWHPSAAEC	Col 08: CISILQGLSC
Col 09: LSLYWF	Col 09: ASGTTV		Col 09: CSFXXAAXYC
Col 10: LFVALE	Col 10: XXSXXX		Col 10: CLQGFGLGRC

**Figura 13. Enriquecimento das bibliotecas peptídicas X6 e CX8C, amplificação dos insertos por PCR de colônia e sequenciamento dos fagos oriundas do terceiro e quarto ciclo do protocolo de *phage display*.** Em A (subitens I e II) eluição ácida e direta e quantificação dos fagos recuperados (em TU's) da biblioteca linear (X6). Em A (subitens III e IV) eluição ácida e direta e quantificação dos fagos recuperados (em TU's) da biblioteca cíclica (CX8C). Os valores plotados (Fagos recuperados UT's) são oriundos do número de colônias contadas para cada um dos grupos multiplicado pela diluição da amostra (N° de colônias contadas X 2000). Os ciclos II, III e IV foram quantificados observando-se um aumento do título dos fagos ligantes do NGFR ao longo dos ciclos. Dez colônias obtidas nos ciclos III e IV das bibliotecas testadas (X6 e Cx8C) foram selecionadas e sequenciadas para se obter a identidade dos peptídeos ligantes presentes nos fagos. Os grupos eluição ácida e direta se referem a diferentes formas de recuperação dos fagos ligantes, sendo a técnica pormenorizada na sessão de métodos. O primeiro ciclo não foi quantificado para se evitar a perda de fagos exibindo peptídeos únicos. Em B e C tem-se a eletroforese em gel de agarose 2% corado em brometo de etídio. No primeiro poço encontra-se o peso molecular Benchmark (*New England Biolabs*). Ainda em B e C são apresentados PCR's das colônias (Col 1 a Col 10) selecionadas do terceiro (B subitens I e II) e quarto ciclo (C subitens I e II) das bibliotecas linear (X6) e cíclica (CX8C), contendo o fragmento amplificado dos fagos selecionados (~500pb). O Controle negativo (Fago Fd (-) representa o fago selvagem sem insertos peptídicos em seu genoma. Os fragmentos amplificados (500pb) representam parte da proteína viral PIII na qual estão inseridas as sequências peptídicas que compõem as bibliotecas testadas (X6 e CX8C). No subitem III (B e C) tem-se as sequências obtidas do sequenciamento dos fragmentos amplificados que representam os peptídeos obtidos nos ciclos. Destacadas em verde estão os peptídeos obtidos da biblioteca X6 e em roxo os peptídeos obtidos da biblioteca CX8C, esta divisão está presente em cada um dos ciclos sequenciados. Os clones destacados em ciano representam os fagos que se repetiram dentro de um grupo analisado, e representam potenciais fagos contendo peptídeos ligantes da TrkA (NGFR).

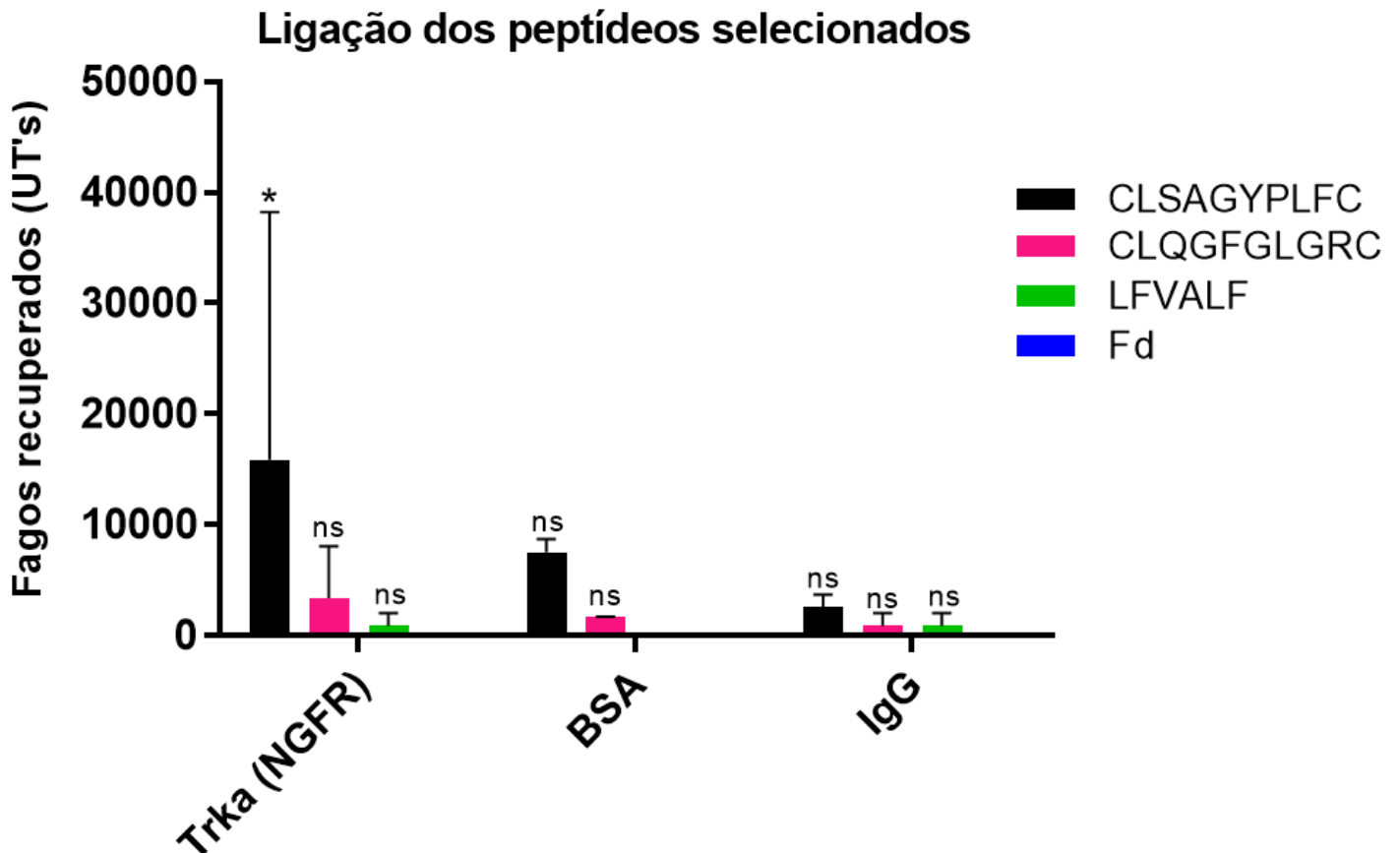
### **4.2.3 Fago expressando o peptídeo CLSAGYPLFC apresenta maior afinidade de ligação pela porção receptora da TrkA (NGFR) do que os demais fagos selecionados (CLQGFGLGRC e LFVALF).**

O receptor NGFR de Rato foi imobilizado em placas de 96-poços. Alguns controles também foram usados para avaliar a afinidade destes fagos pelo receptor, dentre eles a imunoglobulina 1 humana (IgG1) visto que o receptor comercial utilizado (NGFR) se tratar de uma proteína fusionada a uma IgG humana, e para garantir que os fagos foram selecionados contra a porção receptora do ligante procedemos com este controle. Também se utilizou como controle albumina sérica bovina (BSA) que se caracteriza como um elemento carreador sérico que se liga de forma inespecífica a diversas moléculas.

Fez-se então a ligação dos controles (IgG1 e BSA) juntamente com o NGFR em placas de 96 poços e nas mesmas condições. Posteriormente, procedeu-se às demais etapas do ensaio de ligação como já descrito nos métodos. O Fd é um fago que não expressa peptídeos em sua superfície, o que nos permite avaliar o nível de inespecificidade do ensaio.

Dos fagos testados neste ensaio (CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC, LFVALF e Fd) o que ainda manteve um bom perfil de ligação pelo NGFR, sendo recuperado mesmo após as lavagens, foi o fago apresentando o peptídeo CLSAGYPLFC. (Figura 14. Grupo CLSAGYPLFC - Preto). É possível observar a predileção deste fago em se ligar ao NGFR quando comparado ao perfil de ligação dos demais fagos testados (CLQGFGLGRC, LFVALF e Fd) pelo mesmo receptor. O alto erro apresentado pela ligação deste fago ao NGFR possivelmente pode ter sido resultado de uma recuperação desigual do fago CLSAGYPLFC na fase final do ensaio de ligação (fase de infecção), mas que em nada afetou a capacidade ligante preferencial do peptídeo pelo alvo (NGFR).

A ligação do fago contendo o peptídeo CLSAGYPLFC ao IgG1 foi baixa quando comparada à ligação com o NGFR, tendo-se como referência o fago Fd (sem inserto). A ligação do CLSAGYPLFC ao BSA apresentou-se relativamente alta neste experimento. Entretanto, foi algo que não se mostrou presente na replicata seguinte deste mesmo experimento, e nem mesmo no experimento posterior (Figura. 15) focado em identificar a possível seletividade do peptídeo CLSAGYPLFC pela TrkA, no qual a ligação do peptídeo ao BSA foi novamente utilizada como um dos controles. Estes fatos caracterizam podem caracterizar o fago CLASGYPLFC como o mais promissor em termos de afinidade pelo alvo NGFR. Os demais fagos testados (CLQGFGLGRC e LFVALF) se ligaram de forma insignificante tanto aos controles BSA e IgG quanto ao NGFR quando comparados ao Fd. Estes experimentos de ligação foram realizados em duas réplicas experimentais independentes, sendo cada grupo experimental testado em três repetições simultâneas (triplicata técnica). São apresentados nesta sessão de resultados os dados referentes a primeira réplica experimental.



**Figura 14. Ensaio de ligação dos peptídeos selecionados na etapa de *phage display* frente a TrkA e aos demais controles (IgG humano e BSA).** Quantificação dos níveis de ligação dos fagos contendo os peptídeos CLSAGYPLFC (Preto), CLQGFGLGRC (Rosa) E LFVALF (Verde) ao NGFR e aos controles BSA e IgG humano. Os valores plotados (Fagos recuperados UT's) são oriundos do número de colônias contadas para cada um dos grupos (NGFR, IgG e BSA) multiplicado pela diluição (Nº de colônias X 5000). Em azul o controle de ligação dos fagos (Fd) que representa o fago selvagem sem bibliotecas inseridas em seu genoma. Considerou-se como ponto mínimo para a quantificação o grupo "Fd", pois o mesmo apresentou o menor sinal de ligação considerando o número de colônias obtidas em relação ao fator de diluição (5000X). Os demais grupos experimentais (CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC e LFVALF) foram comparados ao Fd para o estabelecimento das diferenças nas UT's obtidas. A expressão "Fagos recuperados (UT's)" trata-se de uma terminologia que se refere a fagos obtidos no procedimento. A expressão "Fagos recuperados (UT's)" trata-se de uma terminologia que se refere aos fagos recuperados no ensaio de ligação e que se encontram em condição hábil de infecção. A relevância estatística para os

diferentes grupos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA onde \* equivale a  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

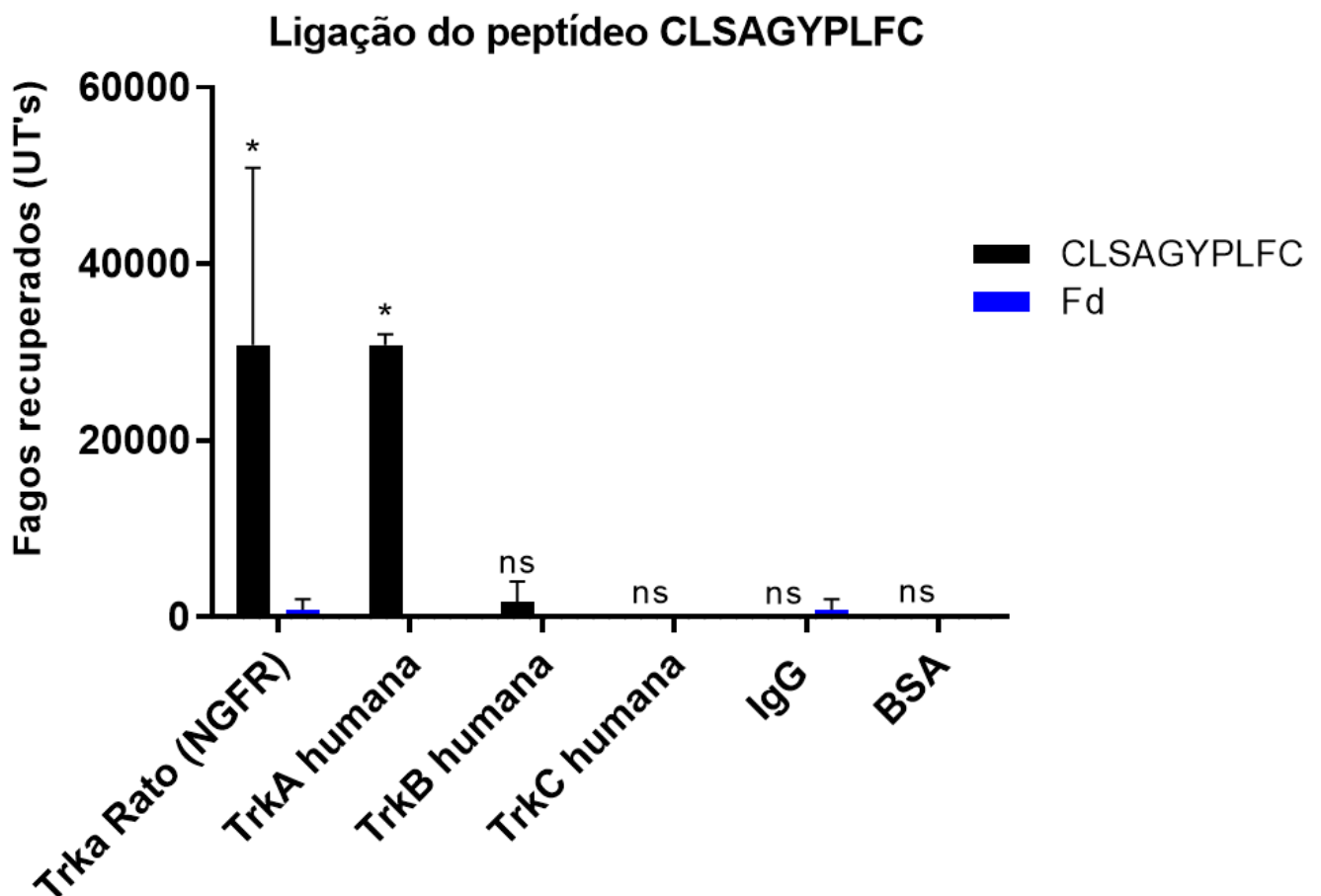
#### **4.2.4 Fago expressando o peptídeo CLSAGYPLFC se liga com maior especificidade a porção receptora da TrkA (NGFR) do que a porção receptora das demais Trk's (TrkB e TrkC)**

Os receptores NGFR de Rato, NGFR humano, porção receptora da TrkB humana, porção receptora da TrkC humana e os controles IgG1 e BSA foram imobilizados em placas de 96 poços. Após a imobilização, procedeu-se às demais etapas do ensaio de ligação como já descrito nos métodos.

A seleção dos fagos ligantes no *panning* foi feita utilizando o NGFR de rato, este receptor apresenta uma identidade superior a 85% com o NGFR humano (NIH - Blastp<sup>®</sup> suite sequences – ID's: #P04629 (TrkA humano), #P35739 (TrkA Rato). Dessa forma também testamos se o fago contendo o peptídeo CLSAGYPLFC seria capaz de se ligar igualmente a porção receptora da TrkA humana.

Nas réplicas experimentais o alto perfil de ligação apresentado pelo fago CLSAGYPLFC em relação ao NGFR se manteve fiel, replicando os resultados já obtidos anteriormente (Figura 15. Grupo CLSAGYPLFC – Preto). Já a capacidade de ligação do fago (CLSAGYPLFC) em relação as demais Trk's (TrkB e TrkC humanas) se mostrou muito baixa, o que o caracteriza este peptídeo como um ligante específico para o NGFR e nos permite descartar a possibilidade deste peptídeo apresentar um perfil de ligação pan Trk. Além disso, é possível concluir que o fago CLSAGYPLFC é capaz de se ligar igualmente ao NGFR de rato e humano.

Os sinais de ligação do fago CLSAGYPLFC aos demais controles (BSA e IgG) se mantiveram baixos ou até mesmo imperceptíveis entre as réplicas, semelhante ao sinal de fundo apresentado pelo fago controle (Fd). O experimento foi realizado em quatro réplicas experimentais independentes, sendo cada grupo experimental testado em três repetições simultâneas (triplicata técnica). Apresentamos nesta sessão de resultados apenas a quarta réplica experimental.



**Figura 15. Ensaio de ligação do peptídeo CLSAGYPLFC frente as Trk's (TrkA, TrkB e TrkC) e demais controles (IgG humano e BSA).** Observa-se a quantificação dos níveis de ligação do fago contendo o peptídeo CLSAGYPLFC (Preto) e do fago Fd (Azul) aos grupos: TrkA de Rato (NGFR Rato), TrkA humana (NGFR humano), TrkB humana, TrkC humana e aos controles BSA e IgG humano. Os valores plotados (Fagos recuperados UT's) são oriundos do número de colônias contadas para cada um dos grupos (TrkA Rato, IgG e BSA) multiplicado pela diluição (N° de



colônias X 5000). Em azul o controle de ligação dos fagos (Fd) que representa o fago selvagem sem bibliotecas inseridas em seu genoma, caracterizando assim os níveis de interação de fagos não ligados ao receptor (NGFR). Considerou-se como ponto mínimo para a quantificação o grupo "Fd", pois o mesmo apresentou o menor sinal de ligação considerando o número de colônias obtidas em relação ao fator de diluição (5000X). A ligação do peptídeo CLSAGYPLFC foi comparada a ligação do Fd (considerando cada receptor e controles testados) para o estabelecimento das diferenças nas UT's obtidas. A expressão "Fagos recuperados (UT's)" trata-se de uma terminologia que se refere aos fagos recuperados no ensaio de ligação e que se encontram em condição hábil de infecção. A relevância estatística para os diferentes grupos foi avaliada pelo teste One-way ANOVA onde \* equivale a  $p = < 0,05$  sendo considerado estatisticamente significativo.

#### **4.2.5 Análise da estrutura tridimensional do complexo NGF/NGFR e dos peptídeos selecionados por *phage display* revelam similaridades entre o peptídeo CLSAGYPLFC e o NGF.**

Inicialmente uma análise das sequências das Trks (TrkA, TrkB e TrkC) e das neurotrofinas que se ligam a esses receptores (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4) foi feita, onde se buscou avaliar as semelhanças e diferenças nas sequências dessas espécies tendo como base o estudo realizado por C. Wiesmann and A. M. de Vos (2001).

Primeiro alinhou-se às sequências das quatro neurotrofinas: NGF (acesso: P01138), BDNF (acesso: P23560), NT-3 (acesso: P23560) e NT-4 (acesso: P34130). Utilizando-se o software BioEdit Alignment Editor (versão 7.2.5) foi possível observar que as maiores diferenças apresentadas na sequência do NGF em relação às demais neurotrofinas se localizam justamente nos resíduos descritos por C. Wiesmann and A. M. de Vos como os responsáveis pela ligação entre o NGF e a TrkA (Figura 16. A Subitem I), o que demonstra a especificidade apresentada por esta neurotrofina em relação a seu receptor. As demais

neurotrofinas (BDNF, NT-3 e NT-4) apresentam resíduos bem diferentes daqueles apresentados pelo NGF quando se considera apenas as regiões em que o fator se liga à TrkA (Figura 16. A Subitem I).

Em seguida, buscou-se alinhar as sequências das três Trks: TrkA (acesso: #P35739), TrkB (acesso: #Q16620.1) e TrkC (acesso: #Q96CY4). Utilizando-se o mesmo software observou que as Trks se diferem em diversos pontos. Na sequência da TrkA estão destacados os resíduos responsáveis pela ligação de sua porção receptora (NGFR) ao NGF. Estes resíduos são diferentes das demais Trks quando se considera as mesmas posições, mostrando novamente a especificidade de ligação só que desta vez considerando a sequência do receptor (Figura 16. A Subitem II).

Esses consensos demonstrando a alta especificidade nos sítios de interação TrkA/NGF nos permitiu observar regiões específicas para se interferir no contato da enzima com o fator. Procedeu-se então uma nova análise buscando-se identificar similaridades entre as sequências peptídicas identificadas por *phage display* e o NGF.

Primeiramente utilizando-se o software BioEdit alignment editor (versão 7.2.5) alinou-se os peptídeos CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC e LFVALF à sequência linear do NGF humano. Nesses alinhamentos foram excluídos os resíduos de cisteínas das posições N-terminal e C-terminal dos peptídeos (Figura 16. B Subitem I a IV). A partir deste alinhamento, observou-se que o peptídeo CLSAGYPLFC possui três resíduos em comum com a sequência linear do NGF: uma Serina (SER-2), uma Prolina (PRO-6) e uma Fenilalanina (PHE-8) (Figura 16. B Subitem II). Já o peptídeo CLQGFGLGRC possui igualmente três resíduos similares aos do NGF: duas Glicinas (GLY-33 e GLY-40) e uma Leucina (LEU-39)

(Figura 16. B Subitem III). Por fim, o peptídeo LFVALF possui identidade de dois resíduos quando comparado ao NGF: duas fenilalaninas (PHE-49 e PHE-53) (Figura 16. B Subitem IV). Buscou-se avaliar se dentre os resíduos alinhados algum se posicionaria nas regiões de ligação do NGF a TrkA segundo C. Wiesmann e A. M. de Vos (Figura 16. B Subitem I (Retângulos pretos)).

Dos peptídeos avaliados o CLSAGYPLFC apresentou dois resíduos que se alinharam a resíduos do NGF e também fazem parte das regiões de interação entre NGF e TrkA, que foram os resíduos de Prolina 6 (P6) e Fenilalanina 8 (F8) (setas vermelhas).

Entre os resíduos de Prolina (PRO-5) e Fenilalanina (PHE-7) na sequência linear do NGF, existe um resíduo de Isoleucina formando a sequência PIF (Figura 16. B Subitem II – NGF Humano). No peptídeo CLSAGYPLFC entre a Prolina e Fenilalanina presentes só há uma leucina que o difere da sequência do NGF formando a sequência PLF (CLSAGYPLFC) (Figura 16. B Subitem II - Peptídeo).

Essas semelhanças nos fazem considerar a Leucina do peptídeo CLSAGYPLFC como um terceiro resíduo alinhado ao consenso de interação NGF-NGFR dada sua semelhança com a leucina. O peptídeo CLQGFGGLGRC apresentou apenas um resíduo que se alinhou ao NGF em uma região que faz parte do consenso de interação NGF-TrkA, o resíduo Glicina 33 (G33) (Figura 16. B Subitem III – Peptídeo). Por fim, o peptídeo LFVALF não apresentou resíduos alinhados ao NGF no consenso de interação NGF-TrkA (Figura 16. B Subitem IV – Peptídeo).

Também foi realizado o procedimento de mutagênese *in silico* por meio do software PyMOL (versão 2.5.3) na microrregião do NGF contendo a sequência HPIE, a qual se assemelha a sequência obtida no peptídeo CLSAGYPLFC (YPLF).

Foram analisadas as possíveis alterações estruturais ocorridas na interação NGF/TrkA após a troca da histidina presente imediatamente antes da sequência PIF (HPIF), localizada na posição 4 (HIS-4) da sequência linear da molécula de NGF por uma tirosina (NGF H4Y). Além de seu alinhamento a Tirosina do peptídeo (YPLF), a Histidina na posição 4 do NGF foi escolhida para a troca por apresentar uma importância chave na interação NGF/TrkA, sendo reportado que sua substituição por um resíduo de ácido aspártico resultar na redução, em até mil vezes, da capacidade de ligação do NGF à TrkA (Wiesmann., C (2001)).

Com a troca, essa microrregião da estrutura do NGF passou a apresentar em sua sequência linear um resíduo de tirosina localizado em uma posição semelhante à do resíduo de tirosina contido no peptídeo CLSAGYPLFC. Foi utilizado como modelo para tal procedimento a estrutura do NGF complexado ao NGFR (PDB: 2IFG), onde se buscou avaliar modificações nas distâncias entre o resíduo mutado do NGF (H4Y) e resíduos da TrkA que possivelmente interagiriam com o mesmo na formação do complexo.

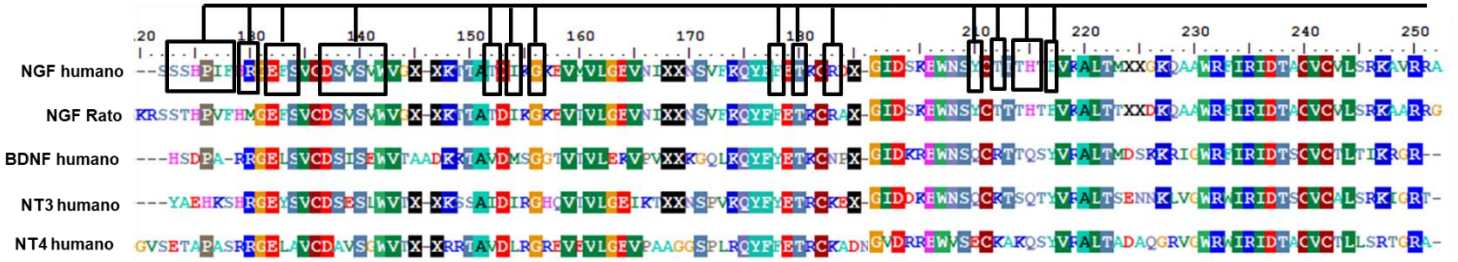
Essa análise foi realizada comparando-se, a estrutura do complexo contendo o NGF em sua forma não mutada (NGF WT) à uma outra versão da mesma estrutura com o NGF mutado (NGF HY4). Na Figura 16. C (subitem I) tem-se a estrutura cristalizada (PDB: 2IFG) do complexo NGF-NGFR, em vista frontal e lateralizada (90°C). Na Figura 16. C (subitem II), avaliou-se as distâncias entre o resíduo de Histidina do NGF na posição 4 (HIS-4) e os resíduos de Fenilalanina na posição 303 (PHE-303) e Serina na posição 304 (SER-304). Já no grupo mutado Figura 16. C (subitem III), foram avaliadas as distâncias entre o resíduo de Tirosina do NGF na posição 4 (TYR-4) e os resíduos de Fenilalanina na posição 303 (PHE-303) e Glicina na posição 344 (GLY-344). Nas linhas tracejadas (Figura 16. C

(subitem II) a direita), observa-se as distâncias entre a Histidina 4 (NGF WT) e os resíduos Fenilalanina 303 (3.1 Å) e Serina 304 (3.5 Å) em um modelo esquemático linear. Já nas linhas tracejadas na Figura 16. C (Subitem III a direita), são observadas as distâncias entre a Tirosina 4 (NGF H4Y) e os resíduos Fenilalanina 303 (2.9 Å) e Glicina 344 (2.0 Å / 2.1 Å) no mesmo esquema de representação linear. É possível observar que a troca H4Y, de modo a mimetizar aspectos do peptídeo CLSAGYPLFC no NGF, não surtiu efeitos significativos em relação a proximidade entre NGF e o NGFR, ao se avaliar a distância entre resíduos espacialmente próximos. A partir do observado na análise estrutural é possível propor que ocorra uma interação entre CLSAGYPLFC e o NGFR por meio da sequência YPLF do peptídeo. É teoricamente possível que a tirosina inserida pela mutação (H4Y) não se caracterize como um empecilho para a interação NGF-NGFR, apesar do que é reportado pela literatura em relação importância deste resíduo. Somados esses fatores, é possível que a interação do peptídeo CLSAGYPLFC com o NGFR ocorra por meio da sequência YPLF. Essas análises estruturais foram feitas em colaboração com o aluno de doutorado Allan Pradeli Roldão.

**A**

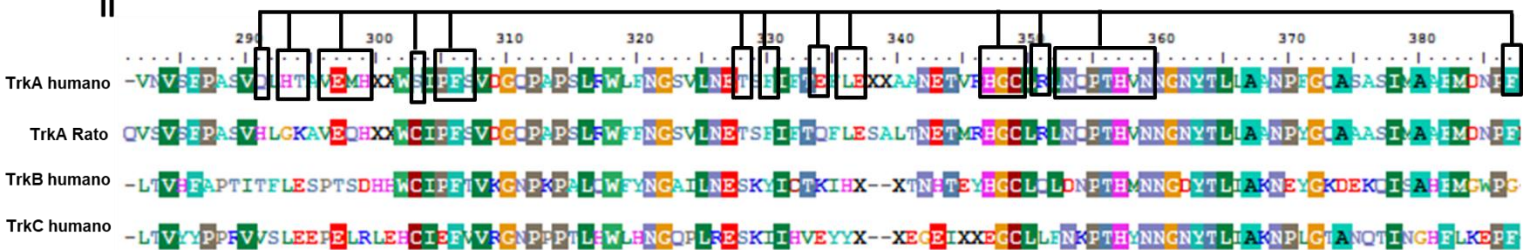
**I**

Resíduos do NGF responsáveis pelo contato com a TrkA  
(Consenso de interação NGF→TrkA de acordo com Wiesmann.,C (2001))



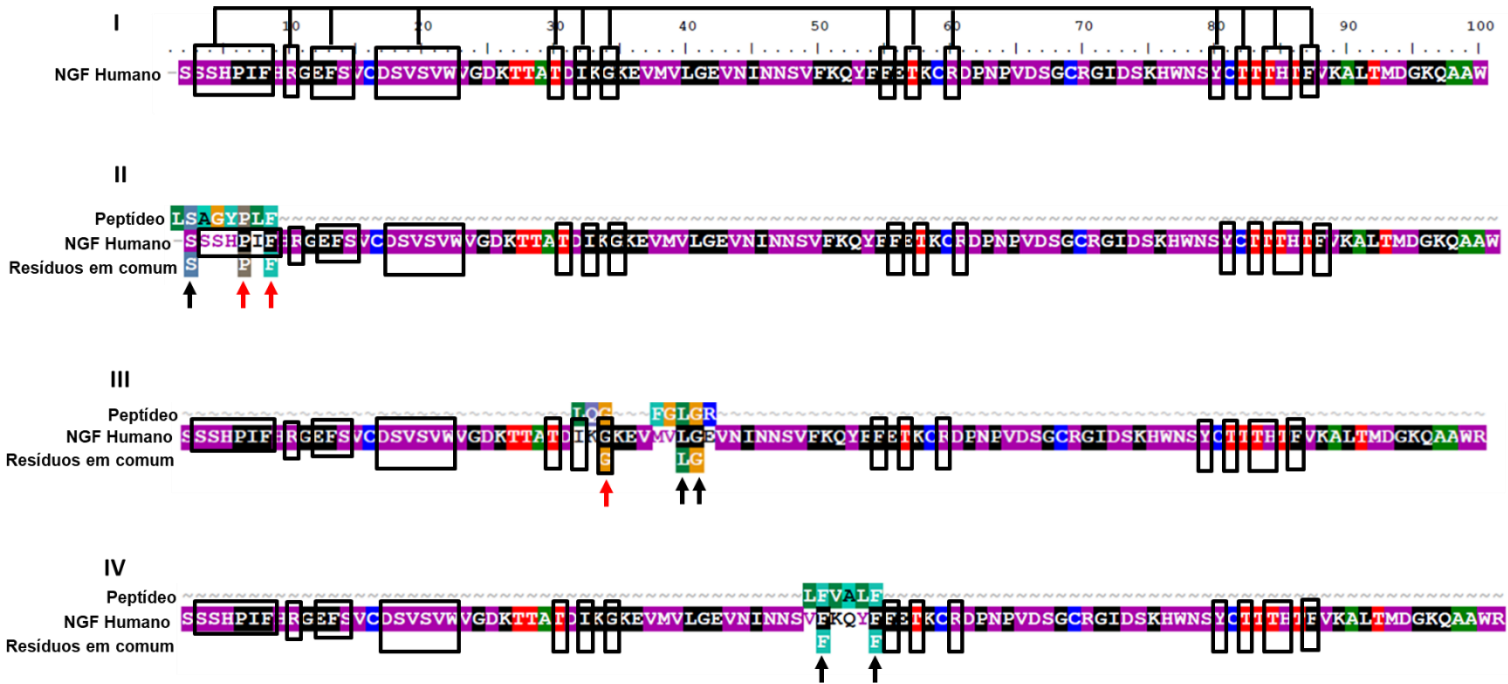
**II**

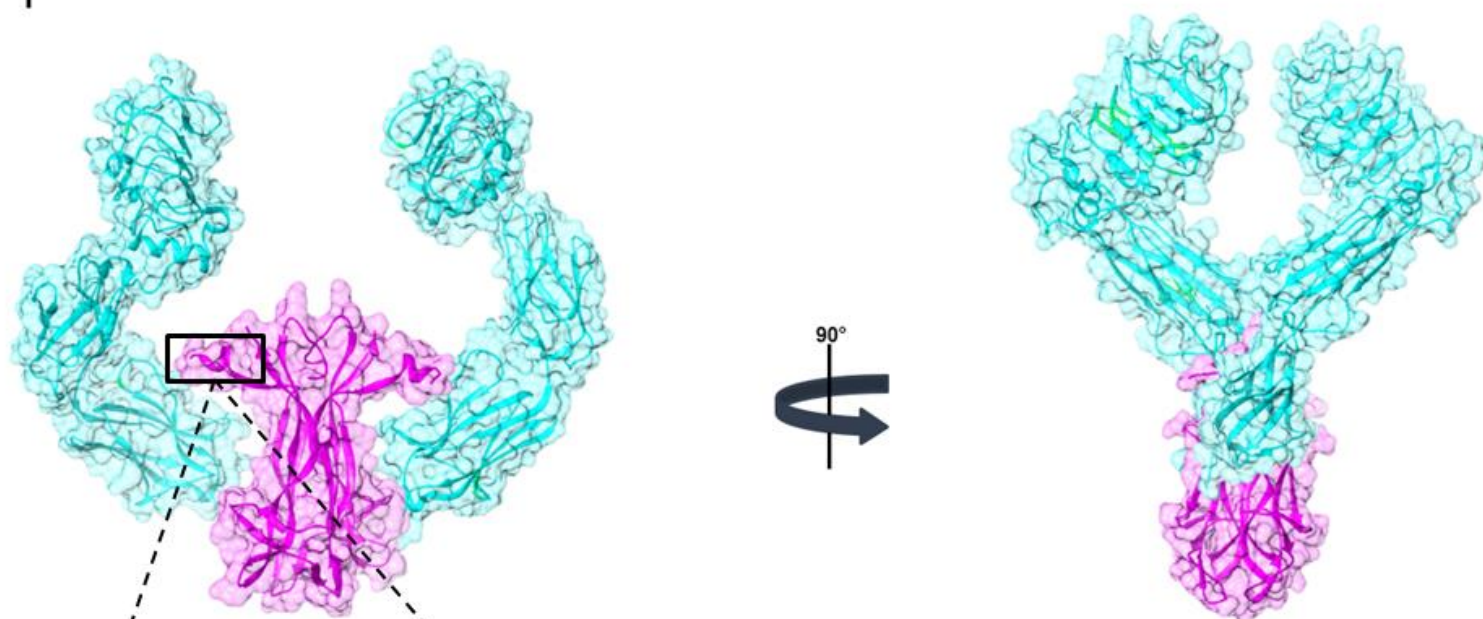
Resíduos da TrkA responsáveis pelo contato com o NGF  
(Consenso de interação NGF→TrkA de acordo com Wiesmann.,C (2001))



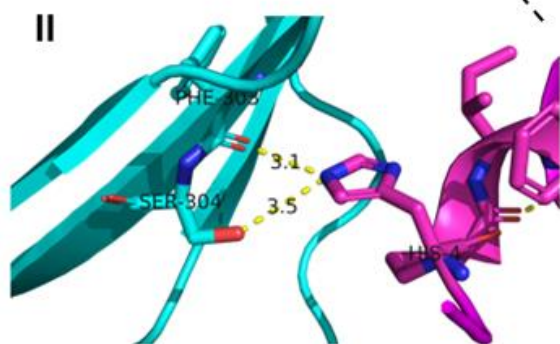
**B**

Resíduos do NGF responsáveis pelo contato com a TrkA  
(Consenso de interação NGF→TrkA de acordo com Wiesmann.,C (2001))

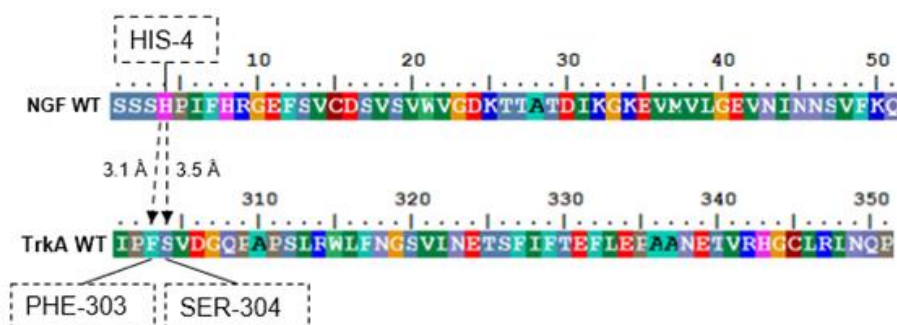


C  
I

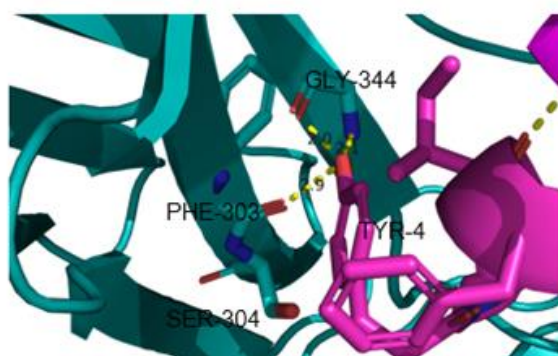
II



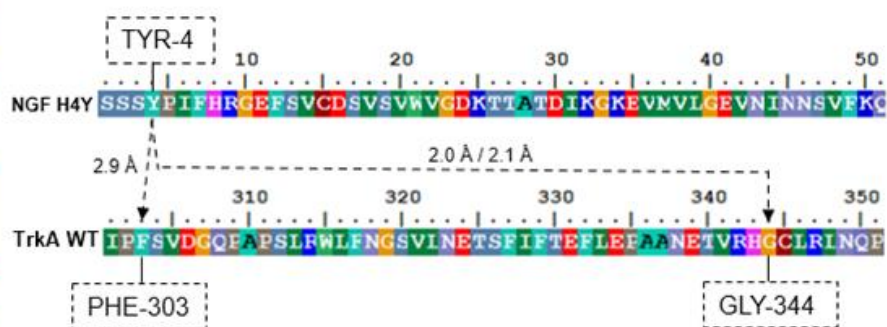
TrkA: ciano / NGF WT: magenta



III



TrkA: ciano / NGF H4Y: magenta



**Figura 16. Alinhamento dos fagos CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC E LFVALF com o NGF, e sequências dos receptores (TrkA, TrkB e TrkC) e neurotrofinas (NGF, BDNF, NT3 e NT4) alinhadas.** Em A (subitem I) é mostrada a sequência linear do NGF humano e de Rato e o alinhamento destas com as demais neurotrofinas (BDNF, NT3 e NT4 humanas). Os retângulos pretos representam os resíduos responsáveis pelo contato entre o NGF e a TrkA (consenso de interação), de acordo com C. Wiesmann and A. M. de Vos (2001). Em A (subitem II) mostramos as sequências lineares TrkA humana, TrkA de Rato, TrkB humana e TrkC humana. O destaque dado (retângulos pretos) às sequências da TrkA humana ilustra novamente os resíduos envolvidos na interação agora da quinase com o NGF (consenso de interação). Em B (subitens II, III e IV) observamos o alinhamento dos peptídeos obtidos nos ciclos de enriquecimento do *phage display* com a sequência do NGF humano. São destacados por setas os resíduos em comum entre os peptídeos e o NGF, as setas pretas representam resíduos dos peptídeos que se alinharam a sequência do NGF. As setas vermelhas representam os resíduos dos peptídeos que além de se alinharem a sequência do NGF, tiveram seu alinhamento em pontos dentro do consenso de interação. O alinhamento foi realizado apenas com a região variável dos peptídeos, sem as Cisteínas “N” e “C” terminais. Em C (subitem I) tem-se a estrutura da TrkA complexada com o NGF (PDB: 2IFG) em vista frontal e lateralizada (90°C). O retângulo destaca a região alvo da mutação (H4Y). Em C (subitem II) observa-se segmentos de distância entre o NGF (Magenta) e TrkA (Ciano) no complexo de interação NGF-TrkA (PDB: 2IFG). Em C (subitem III) tem-se um novo cálculo das distâncias entre a TrkA e o NGF após a substituição do resíduo de Histidina 4 (HIS-4) do NGF por uma Tirosina na mesma posição (H4Y), de modo a simular no NGF selvagem a tirosina presente no peptídeo cíclico (CLSAGYPLFC) e as alterações nas distâncias decorrentes desta diferença. As distâncias (em angstrom Å) dos resíduos da TrkA em relação aos resíduos do NGF são destacadas nas linhas tracejadas em amarelo (na figura estrutural à esquerda) e em linhas pretas na representação linear das sequências (à direita). Siglas numeradas (PHE-303, SER-304, HIS-4 e GLY-344) representam aminoácidos e suas respectivas posições.



Rastreamos em duas bibliotecas de *phage display* peptídeos que se ligam especificamente ao NGFR. Selecionamos três peptídeos sendo dois deles cíclicos que foram enriquecidos durante a seleção, aparecendo mais de uma vez nas amostras sequenciadas. Desses três peptídeos, apenas um deles (CLSAGYPLFC) de fato se ligou tanto ao NGFR de rato quanto ao de humano. Os demais peptídeos selecionados (CLQGFGLGRC e LFVALF), por não apresentarem efeito ligante e nem de seletividade satisfatórios, nos leva a acreditar que possam ter sido selecionados por conta de alguma interação mínima ao NGFR. Ambos os peptídeos de baixa seletividade se alinharam á regiões do NGF diferentes das descritas por serem as responsáveis por interagirem com a TrkA (consenso de interação), o que pode ter resultado na baixa interação dos mesmos ao NGFR nos testes realizados. Outro ponto importante é que o peptídeo CLQGFGLGRC, que apesar de ter se alinhado a três resíduos do NGF (fora do consenso), foi necessário ao software adicionar espaçamentos para que a sequência do peptídeo fosse alinhada a sequência do NGF. Diferentemente, o peptídeo CLSAGYPLFC teve alinhado quatro de seus resíduos ao mais importante dos consensos de interação NGF-TrkA, o "SSHPIF". Desses quatro resíduos, dois eram iguais a resíduos encontrados no NGF (Prolina (P) e Fenilalanina (F)). Os outros dois eram próprios do peptídeo, porém ainda alinhados ao consenso de interação NGF-NGFR: uma Tirosina (Y) e uma Leucina (L) (no peptídeo) onde se encontravam respectivamente uma Histidina (H) e uma Isoleucina (I) (no NGF). A região na estrutura da TrkA responsável pela interação com o NGF não apresenta homologia com as regiões de interação das demais Trk's (TrkB e TrkC) com seus respectivos ligantes, aspecto confirmado ao se observar a seletividade de ligação do peptídeo CLSAGYPLFC pela TrkA.

Os estudos de modelagem realizados ainda sugerem que a substituição de uma Histidina (H) por uma Tirosina (Y) na sequência linear do NGF não acarreta em complicações na ligação do NGF ao NGFR, permitindo ser teoricamente possível que a interação do peptídeo CLSAGYPLFC com o NGFR ocorra por meio da sequência YPLF do peptídeo.

## 5. Discussão

### 5.1 Referente a padronização do ensaio de atividade *In Cell*

A busca por novas moléculas analgésicas capazes de gerar os efeitos desejados e tendo em contrapartida o mínimo de efeitos colaterais se traduz como o objetivo final dos estudos ligados à nocicepção. A crise de opioides tem se tornado motivo de preocupação, visto que o uso indiscriminado dessas substâncias tem elevado de forma preocupante ocorrências de overdose, tolerância medicamentosa e outros efeitos adversos de ordem neurológica ligados ao uso clínico ou abusivo dessas substâncias (DEWEERDT, 2019). O fator de crescimento neurotrófico (NGF) e a Tropomiosina quinase A (TrkA) são alvos particularmente promissores dentro deste contexto devido ao papel chave que exercem em vias de sinalização associadas ao processo nociceptivo. A TrkA é estruturalmente dividida em três porções: uma porção intracelular [(porção quinase), um domínio transmembranar (TMD) e uma porção extra celular (porção receptora (NGFR)]. Sendo esta última (NGFR) a região que apresenta maior variabilidade estrutural por se tratar da superfície de interação com o fator (NGF) (MARTIN-ZANCA et al., 1989).

Com o objetivo de se selecionar moléculas capazes de interferir na ativação da TrkA, especificamente na fase onde ocorre a interação do NGF com a porção receptora da enzima, foram conduzidos experimentos de padronização metodológica e triagem de moléculas que resultaram no presente trabalho.

Buscamos também padronizar um ensaio de imunofluorescência *in cell* para a detecção de atividade da TrkA, de modo que o mesmo fosse capaz de acusar a ativação da enzima a nível celular, sendo conduzido em média ou larga escala,

visto que o ensaio é realizado em placas contendo múltiplos poços.

Com o uso de anticorpos anti TrkA total, observamos uma adequada capacidade do ensaio em detectar níveis totais da TrkA presentes em linhagens produzidas em nosso laboratório que expressam a enzima de forma estável. Através das linhagens utilizadas [TrkA de Rato e TrkA Quimera (NMR)] procedeu-se a titulação do anticorpo anti TrkA total (1:1000 a 1:30,000), onde se observou a capacidade de detecção da TrkA utilizando o ensaio de imunofluorescência *in cell* e padronizou-se então a diluição de uso do anti TrkA total para essas linhagens em 1:5000, de modo a se trabalhar em uma faixa de sinal superior àquela apresentada pelo ruído. Como controle de plaqueamento, as placas foram reincubadas com o anticorpo anti  $\alpha$ -Tubulina em uma única concentração (1:10,000) de modo a atestar que o decaimento observado nas leituras do anti TrkA total eram efeito de diluição do anticorpo anti TrkA total e não de um plaqueamento decrescente das linhagens, sendo os níveis de tubulina praticamente constantes em todas as concentrações que correspondem ao anti TrkA total. Concluiu-se então a adequada capacidade do ensaio em detectar a TrkA em um contexto celular.

Em seguida observou-se a capacidade do ensaio de detectar a forma ativa da TrkA utilizando anticorpos contra a forma fosforilada da enzima (TrkA-P). Após a ligação com o NGF a porção intracelular da TrkA sofre diversas auto fosforilações em resíduos de tirosina, em especial nas posições Y674/Y675 e Y785 que se caracterizam como importantes indicadores de ativação da enzima. O processo de autofosforilação é amplo e envolve a fosforilação de outros resíduos de tirosina de fundamental importância para as demais etapas da via (FRIEDMAN; GREENE, 1999).

Utilizando as linhagens celulares produzidas em nosso laboratório [TrkA de Rato e TrkA Quimera (NMR)] foi possível observar que dentre os anticorpos testados contra a forma fosforilada da TrkA o que mais se destacou, pela qualidade do sinal gerado e reprodutibilidade, foi o anticorpo contra a tirosina na posição Y785 (na concentração de 1:2000), sendo que a ativação da TrkA se deu após o tratamento com NGF. Além disso, observou-se a hipofuncionalidade da TrkA expressa pela linhagem TrkA Quimera (NMR), o que corroborou dados da literatura onde se observa a hipoativação da TrkA e de vias correlatas no modelo da toupeira pelada (*Naked mole Rat* (NMR)) (OMERBAŠIĆ et al., 2016). O NGF ativou na ordem de 3 vezes a TrkA de rato e 1,5 vezes a TrkA quimera quando comparadas ao controle não tratado (-NGF). Como controle, não observamos sinais de TrkA tão pouco de TrkA ativa em células HEK 293T não transfectadas.

Outro aspecto da bioquímica da TrkA que foi observado por meio do ensaio de imunofluorescência *in cell* foi o tempo de ativação da enzima de nossas linhagens celulares. Uma cinética em função do tempo de ativação da TrkA foi feita de modo a avaliar a ativação da quinase em diferentes tempos após seu tratamento com NGF. Observou-se que a TrkA de Rato, representante da enzima em sua forma selvagem, apresentou um perfil de ativação crescente ao longo dos tempos alcançando seu pico de ativação cerca de 10 minutos após o tratamento com NGF, apresentando neste ponto da cinética (10 minutos) uma razão de fluorescência, associado a sua atividade quinase máxima, 4 vezes acima do controle (HEK não transfectada), comportamento este em conformidade com o previsto pela literatura para a ativação desta tirosina quinase e que já havia sido observado por nosso grupo em experimentos prévios por Western Blot (Moraes et. al. 2022). Diferentemente, a linhagem expressando a TrkA Quimera (NMR) apresentou um

perfil de ativação cuja atividade máxima se deu em 5 minutos após a adição de NGF, porém alcançando uma razão de fluorescência (em 5 minutos), associado à sua atividade quinase máxima, cerca de 2,8 vezes acima do controle (HEK não transfectada), mantendo-se neste patamar de ativação até próximo de 10 minutos após adição do NGF.

Entretanto, ao analisarmos a inclinação das retas de ambas as linhagens neste experimento cinético, observamos que os perfis iniciais de ativação de ambas as linhagens se mostram semelhantes (de 0min a 1min), o que não se encaixa com dados da literatura que enquadram a TrkA do Naked Mole Rat (Quimera) como uma enzima hipoativa frente a TrkA selvagem (OMERBAŠIĆ et al., 2016). Quanto a esta particularidade, destacamos que os níveis de expressão da TrkA Quimera, em outras classes de ensaios realizados em nosso laboratório (Western Blot), se mostraram superiores aos níveis de expressão da TrkA de Rato nas linhagens estabelecidas por nós em células HEK293T. Buscamos estabelecer novas linhagens da TrkA do NMR tanto utilizando outra metodologia de transfecção (Lipofectamine2000 - Thermo Scientific<sup>TM</sup><sup>®</sup>) quanto variando as quantidades de inserto, porém as expressões de TrkA Quimera das linhagens assim geradas ainda se mantiveram desajustadas. Ainda assim, buscamos analisar a linhagem de NMR no *In cell*, porém tal problemática ainda se mostra como presente sendo possível observar uma ligeira diferença na expressão de ambas as linhagens no experimento cinético, apresentado na sessão de resultados (Figura 10. A - Linhas azuis – TrkA-T). Acreditamos que a ativação “semelhante” das linhagens na cinética não seja uma contestação do caráter hipoativo da TrkA do NMR, mas sim o resultado de uma maior expressão da TrkA em nossa linhagem quimérica. Este aumento na expressão poderia estar causando um aumento aparente na atividade

da quinase do NMR. Possivelmente, pelo fato da linhagem quimérica apresentar uma quantidade total de enzimas maior do que a linhagem de Rato, tal circunstância pode estar mascarando o aspecto hipoativo de da quinase do NMR de modo que a similaridade aparente entre as atividades das quinases seja na verdade o resultado de uma discrepância nos padrões de expressão. Desta forma, análises comparativas entre a linhagem selvagem (Rato) e do NMR (Quimera) e que levem em consideração expressão e atividade da TrkA se mostram como difíceis de serem realizadas até que se estabeleça de fato uma linhagem do NMR com níveis de expressão da TrkA mais adequados.

Este aspecto pode ser um fator importante, dada a possibilidade de existir uma certa preferência a determinados códons utilizados pelo NMR, o que poderia estar influenciando diretamente sua expressão. Tais pontos carecem de ser analisados de forma mais minuciosa em estudos posteriores.

Por fim, o ensaio de imunofluorescência *in cell* foi avaliado quanto a sua capacidade em detectar a inibição farmacológica da TrkA, visto ser este o fim desejado de sua aplicação. Com o ensaio, foi possível observar o perfil de inibição da TrkA de Rato frente ao tratamento com 1 $\mu$ M do inibidor comercial GNF5837. A inibição observada atesta a capacidade do ensaio em detectar eventos de inibição farmacológica direcionados a TrkA. O ensaio se mostra como efetivo em detectar a inibição da Trka de rato tanto no grupo tratado somente com o inibidor (+GNF5837), inibição basal da atividade, quanto no grupo incubado com o inibidor e posteriormente desafiado com NGF (+GNF5837+NGF). A ativação da quinase no grupo controle positivo (+NGF) se dá normalmente atestando a viabilidade da linhagem utilizada.

Entretanto, pontuamos que para uma padronização mais completa deste

ensaio experimentos adicionais se mostram como necessários. A eficiência deste método pode ser melhor corroborada por meio de testes com inibidores e ativadores da TrkA a níveis nanomolar e picomolar de modo a estabelecer os limites de detecção da técnica. Recentemente um ensaio em abordagem *high-throughput screening*, baseado em linhagens celulares de TrkA, foi estabelecido. O ensaio foi capaz de detectar a inibição da TrkA na ordem de 4,8nM (IC<sub>50</sub>) e de apresentar robustez para o estabelecimento de um índice de reprodutibilidade experimental (*Fator "Z"*) de 0,79 (Pandre et al., 2018). Entretanto, a o ensaio proposto pelos autores se diferencia do nosso por se utilizar de células KM12 que expressam a TrkA de forma constitutivamente ativa. Além disso, utilizou-se anticorpos anti TrkA (Y674/Y675) para se detectar a TrkA fosforilada (forma ativa) e Peroxidase alcalina de rabanete (HRP) acoplada ao anticorpo secundário como técnica de marcação/detecção.

Em um primeiro momento, a ativação constitutiva da TrkA pode dificultar o estabelecimento de controles funcionais que validem de forma adequada os eventos observados, tal como o decaimento progressivo da atividade em cinéticas de ativação enzimática. Modelos celulares com vias constitutivamente ativas são por vezes oriundos de drásticas alterações genômicas, podendo se observar variações em seus níveis globais de proteínas e o aparecimento de proteínas truncadas e quiméricas (Niedernberg., 2003). A linhagem KM12 apresenta a TrkA em uma forma constitutivamente ativa a partir de um processo oncogenético de formação da proteína quimérica TrkA-TPM3, justamente através de um processo de fusão entre a porção quinase da TrkA e parte da proteína TPM3 (NTRK1KD-TPM3). Tal fusão entre essas proteínas e a atividade constitutivamente ativa da quimera (TrkA-TPM3), foram descritos pela primeira vez em quadros de carcinoma



colorretal, o qual reportou acúmulo e hiperativação da espécie TrkA-TPM3 (Ardini et al, 2014).

O estudo citado (Pandre et al., 2018) utilizou-se de um método de detecção final baseado em Peroxidase alcalina e Tetrametilbenzidina (TMB), entretanto este método pode apresentar problemas consideráveis na geração dos sinais, visto a presença de peroxidases endógenas em diversos tipos celulares, inclusive em células KM12, tais como a glutathione redutase, que caso não sofra um processo adequado de inibição pode vir a competir com a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário detector (Liu G., 2006).

Em nosso trabalho foram utilizadas linhagens com expressões estáveis de TrkA e a ativação da quinase se deu mediante tratamento com NGF (e não de forma constitutiva). Tal aspecto além de atenuar a ativação cruzada de vias também permite a aplicação da técnica em análises que visem observar justamente o decaimento da atividade quinase da TrkA (por exemplo, em cinéticas), podendo mais facilmente ser empregada para se comparar diferentes linhagens mutantes. Além disso, como método de detecção final, nossa técnica utilizou de anticorpos conjugados com fluoróforos próximos do espectro infra vermelho (680nm a 800nm), que permitem emissões de sinais mais estáveis e não necessitam de espécies intermediárias para a geração desses sinais (Li-cor antibodies IRDye® - Infrared Fluorescent Dyes and near-infrared (NIR) fluorescence probes).

## **5.2 Referente a prospecção de peptídeos por *phage display***

Após a padronização do ensaio de atividade *in cell* deu-se início aos procedimentos da metodologia de *phage display*. A princípio avaliamos a possibilidade de se utilizar uma versão recombinante e dimerizada do NGFR

(comercial) em nosso procedimento de triagem dos fagos. Avaliamos a capacidade deste receptor em se ligar ao dímero de NGF (comercial), visto a importância de confirmarmos a aptidão do NGFR em estabelecer interações antes de ser empregado nos procedimentos de seleção de *phage display*.

Um ensaio de ligação foi então realizado utilizando o NGFR e seu ligante, NGF, sendo a reação na sequência corrida em gel nativo não desnaturante (Native-PAGE) de modo a não ocorrer a dissociação do complexo NGFR-NGF formado pela interação de ambos.

O resultado obtido com a marcação do anti NGF demonstra a presença de NGF no grupo contendo o fator e o receptor NGFR (+NGF+NGFR). Da mesma forma a marcação com o anti TrkA mostra a presença do NGFR no grupo contendo o receptor e o fator (+NGFR+NGF). É possível observar então na sobreposição da imagem (Merge) a colocalização das bandas do NGF e do receptor (NGFR) no mesmo grupo experimental (+NGFR+NGF), o que demonstra a ocorrência de uma possível ligação entre ambas as espécies e que as mesmas se encontram em uma forma complexada (complexo NGFR-NGF). Com o anticorpo anti TrkA foi possível marcar a presença do NGFR no grupo controle que continha apenas o receptor (+NGFR-NGF), sobretudo dado o seu alto peso molecular (138kDa). Entretanto, no controle contendo apenas o NGF (-NGFR+NGF) o anticorpo anti NGF não conseguiu marcar o ligante, possivelmente por conta de seu baixo peso molecular (27kDa). A não detecção do NGF isolado (-NGFR+NGF) pode ter se dado por dois fatores, primeiro pelo prolongado tempo da eletroforese exigido pela técnica (4h) e também pela baixa concentração da malha de acrilamida presente no gel de separação (8%), mais adequada para retenção de proteínas de alto peso molecular como o NGFR (138kDa). Desta forma, acreditamos não ter sido possível observar

as diferenças de pesos moleculares entre o complexo (NGFR-NGF) e o controle (-NGFR+NGF) devido ao fato de não separarmos essa faixa de peso molecular. Não detectamos o NGF sozinho sem o receptor, na sua forma isolada (dimérica: 27kDa) pois o mesmo pode ter saído do gel ao longo da eletroforese.

Após testarmos a capacidade de ligação do NGFR ao NGF, o receptor foi utilizado como alvo nas triagens do protocolo de *phage display* visando enriquecer as bibliotecas de fagos X6 e CX8C para que fosse possível a seleção de fagos que apresentassem peptídeos ligantes do NGFR. O enriquecimento foi feito por meio de apresentações sucessivas ao receptor NGFR das populações de fagos selecionadas sempre ao fim de cada ciclo do protocolo de *phage display*, ou seja, as populações de fagos ao fim de um ciclo foram utilizadas como fagos ligantes do ciclo seguinte de modo a homogeneizar a população de fagos obtida, enriquecendo assim a amostra e selecionando somente os fagos que apresentassem maior ligação ao alvo. O progresso do enriquecimento se mostrou evidente ao longo dos ciclos observando-se um aumento gradativo de fagos recuperados, atestando o enriquecimento das populações para ambas as bibliotecas (X6 e CX8C) e em todas as condições de eluição (eluições direta e ácida). Fagos de baixa afinidade não eliminados ao longo dos ciclos de seleção podem ocasionar um efeito oposto no padrão de enriquecimento, levando a um decréscimo do mesmo, como pode ser visto no panning da biblioteca X6 por eluição ácida. O terceiro e quarto ciclos de todos os grupos foram sequenciados e a identidade dos fagos foi então determinada chegando-se as sequências CLSAGYPLFC e CLQGFGLGRC e LFVALF, sendo os dois primeiros oriundos da biblioteca CX8C e o terceiro da biblioteca X6.

Dado o fato desses peptídeos selecionados (CLSAGYPLFC e

CLQGFGLGRC e LFVALF) terem sido os mais prevalentes nos ciclos sequenciados indicando uma boa capacidade dos mesmos de se ligarem ao NGFR, a análise da sequência dos mesmos em relação a do NGF apontou importantes similaridades, sobretudo entre o fator e o peptídeo CLSAGYPLFC. Como já apontado na seção de resultados, ambas as espécies (NGF e CLSAGYPLFC) compartilham uma sequência de três resíduos idênticos (Serina, Prolina e Fenilalanina) e um resíduo quimicamente similar [Leucina (peptídeo) e Isoleucina (NGF)]. É possível observar que entre os resíduos de Prolina e Fenilalanina na sequência do peptídeo, existe um resíduo de leucina que forma a sequência PLF (CLSAGYPLFC). Observamos que esta sequência (PLF) está parcialmente presente no NGF, porém tendo a Leucina que está presente no peptídeo trocada por uma Isoleucina na sequência linear do NGF (ILE-6), formando-se nessa região do NGF a sequência PIF (Prolina-Isoleucina-Fenilalanina). O peptídeo CLSAGYPLFC dentre todos os selecionados é o que possui a maior similaridade com o NGF, e além da similaridade, alguns dos resíduos do peptídeo (PLF) se alinham a uma região do fator (NGF) que é fundamental para interação com a porção receptora da TrkA (Wiesmann., C 2001).

Após a identificação dos peptídeos ligantes por sequenciamento (CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC e LFVALF) eles foram isolados, purificados e testados individualmente em um ensaio de ligação para se confirmar as afinidades observadas em relação ao NGFR. Neste ensaio testou-se as populações de fagos de forma individualizada (CLSAGYPLFC, CLQGFGLGRC ou LFVALF), diferente do executado nos ciclos tradicionais do protocolo de *phage display* onde se testam bibliotecas e as sub-bibliotecas obtidas do processo de enriquecimento dos fagos ligantes ao alvo de interesse (NGFR). Nas duas réplicas experimentais do ensaio

conseguimos observar uma boa capacidade de ligação do fago expressando o peptídeo CLSAGYPLFC ao NGFR, o que corrobora o alto perfil de enriquecimento que foi observado no grupo do protocolo de *phage display* do qual o fago CLSAGYPLFC foi obtido (CX8C eluição direta), caracterizando o mesmo como um fago ligante. Já o padrão de ligação dos demais peptídeos (CLQGFGLGRC e LFVALF) revelou uma baixa capacidade dos mesmos de se ligarem ao receptor (NGFR). Os peptídeos apresentaram apenas sinais residuais de ligação em relação aos demais controles (BSA e IgG) e de fato não apresentam homologias sequenciais significativas com regiões de ligação do NGF à TrkA.

Vimos também que o peptídeo CLSAGYPLFC é seletivo para a TrkA (NGFR), descartando a possibilidade do mesmo ser um peptídeo de ação pan Trk's. Realizamos novamente um ensaio de ligação, porém tendo como grupos controle a TrkA humana (NGFR humano), a TrkB humana e a TrkC humana; além dos já citados controles BSA, igG e TrkA (NGFR Rato). Este experimento foi conclusivo para observarmos que o peptídeo CLSAGYPLFC é um ligante preferencial do NGFR humano (TrkA humana) e de rato (TrkA de rato), apresentando um nível de interação quase que imperceptível pelas demais Trk's (TrkB e TrkC).

Esta baixa interação com os receptores TrkB e TrkC de certa forma já era esperada visto que as Trk's diferem consideravelmente entre si em suas porções receptoras, e são ativadas nessas regiões por fatores estruturalmente diferentes. Desta forma, a ligação entre o peptídeo CLSAGYPLFC e as demais Trk's é algo que já tínhamos como pouco provável de ocorrer, visto que o peptídeo demonstra ser um potencial mimético da molécula de NGF. Além disso, tais observações apenas corroboram a baixa identidade entre as Trk's já observada por meio do

alinhamento das mesmas (inferior a 55%) (NIH - Blastp<sup>®</sup> suite sequences – ID's: #P04629 (TrkA humana), #Q16620 (TrkB humana) e #Q16288 (TrkC humana)). Outro ponto interessante observado neste experimento foi a equivalente ligação do peptídeo CLSAGYPLFC ao NGFR de rato e humano. Como já citado nos resultados e igualmente descrito nos métodos, as fases de enriquecimento do protocolo de *phage display* foram realizadas utilizando o NGFR de Rato como alvo. Porém, neste ensaio de ligação decidimos usar o NGFR humano como controle para observarmos se o peptídeo CLSAGYPLFC, selecionado contra o receptor de rato, também possuiria afinidade pelo receptor de NGF humano. Foi observado que a afinidade do peptídeo pelo NGFR humano não só foi similar a afinidade apresentada NGFR de Rato como se mostrou até maior devendo esse resultado ser confirmado por outras técnicas que determinem constantes de afinidade.

Estudos recentes buscam desenvolver anticorpos anti NGF para aplicação em quadros de dor inflamatória. Tais abordagens têm obtido considerável progresso no desenvolvimento de anticorpos monoclonais [Tanezumab (Pfizer e Lilly Eli), Fasinumab (Regeneron e Teva) e Fulranumab (Janssen e Amgen)], alguns deles já administrados em grupos amostrais que apresentam patologias associadas com o desenvolvimento do fenótipo nociceptivo (Birbara., 2010). Entretanto, efeitos adversos foram observados e diretamente associados ao uso dessas terapias (Hochberg MC. 2015, Maloney J. 2016 e Lane NE. 2017). O Tanezumab, submetido a uma triagem clínica duplo cega em pacientes com osteoartrite e contendo a maior amostra de pacientes testados (dentre todos os anticorpos citados), foi associado ao progresso acelerado dos quadros de osteoartrite e ao desenvolvimento osteonecrose em locais até então não afetados pela patologia alvo nos pacientes submetidos ao tratamento com o anticorpo

(Hochberg MC., 2015). A partir de então os testes com a citada terapia (Tanezumab) foram temporariamente suspensos. A retomada dos testes para este anticorpo se deu após a agência reguladora norte americana (FDA - Food and Drug administration) estabelecer diversos parâmetros para novos testes, dentre eles, a concentração fixa de 5 mg como dosagem máxima a ser administrada (Hochberg MC., 2015). Essa dosagem limite estabelecida pelo órgão de controle (5 mg) se mostrou como problemática, visto que a faixa de ação do Tanezumab ter apresentado maior efetividade em doses acima de 5 mg (Hochberg MC. 2015 e Block. 2017). Sendo assim, atualmente apenas pequenas doses estão sendo avaliadas tanto do Tanezumab quanto do Fasinumab, com a possibilidades de ação subótima dadas as restrições legais estabelecidas (Block., 2017).

Diferentemente das estratégias que visam sequestrar a molécula de NGF para assim mitigar a ativação da TrkA, o uso de peptídeos como potenciais interferentes na ligação NGF/TrkA se mostra como uma ferramenta promissora, pois tais moléculas podem competir com o NGF impedindo a ligação do mesmo inibindo a ativação da quinase (TrkA). Também é possível de serem obtidos, peptídeos que se caracterizem como inibidores da TrkA sem apresentar as particularidades macroestruturais do NGF, tal como a capacidade de se dimerizar ligando em dois sítios da TrkA (Barde YA, 2004). Levando em consideração as propriedades do peptídeo CLSAGYPLFC e o seu potencial sítio de ligação, acredita-se que o mesmo não se dimeriza, mas isso não exclui o fato de que ele possa influenciar no processo de dimerização (e ativação) da TrkA.

Além de se diferenciar do ponto de vista de ação a produção de peptídeos sintéticos se mostra como menos custosa em escala industrial quando comparada a produção em larga escala de anticorpos monoclonais (Gaglione., 2019). Estudos

recentes têm demonstrado as vantagens do processo de produção de peptídeos sintéticos direcionados para a prática clínica no combate a viroses, doenças parasitárias e doenças associadas a bactérias resistentes monoclonais (Gaglione., 2019).

Prosseguindo com a análise, a mutagênese realizada na estrutura tridimensional do NGF complexado à TrkA nos permitiu observar que a presença de uma Tirosina (TYR-4) na posição da Histidina 4 (HIS-4), na região do NGF que interage com o NGFR, não gerou grandes efeitos que possam ter afetado a interação entre o NGF e seu receptor, visto ter ocorrido apenas pequenas alterações nas distâncias entre os resíduos espacialmente próximos. Após a mutação, encontrada no peptídeo, da HIS-4 para TYR-4 (no NGF) observou-se a distância de 2.9 Å desse resíduo para a PHE-303 do NGFR comparada a distância de 3.1 Å encontrada entre a HIS-4 e a PHE-3 (no NGFR), tendo a mutação aproximado em 0.2 Å o NGF da porção receptora da TrkA. Houve em decorrência da mutação um distanciamento do resíduo de Serina (SER-304). Em compensação, após a mutação H4Y também ocorreu uma aproximação entre o resíduo de Tirosina (TYR-4), adicionado pela mutação, e um resíduo de Glicina (GLY-344) até então não observado na microrregião como um resíduo que interage com o NGF criando desta forma mais um ponto de contato entre o NGF e o NGFR.

É possível levantar a hipótese de que essas características fazem do peptídeo CLSAGYPLFC um mimético em potencial do NGF. Como mostrado, Isoleucina e Leucina presentes nos segmentos P<sub>I</sub>F e P<sub>L</sub>F do NGF e do peptídeo, respectivamente, compartilham uma importante semelhança, são isômeros de posição. Somado a isso, tem-se a análise estrutural apresentada que mostra ser possível que a mutação da Histidina 4 do NGF por uma Tirosina (NGF H4Y) não



se caracterize como um empecilho para a interação NGF-TrkA. Essas observações preliminares trazem a possibilidade de que o peptídeo CLSAGYPLFC possa estar interagindo com o NGFR por meio da sequência YPLF.

De modo a garantir o que foi constatado, que a interação do peptídeo com o NGFR esteja se dando por meio da região PLF, temos em mente testar por meio de um ensaio competitivo se a capacidade ligante do CLSAGYPLFC pelo NGFR é mantida utilizando o NGF como agente competidor. Caso a capacidade ligante do peptídeo pelo NGFR venha a ser mantida, mesmo na presença do NGF como competidor, é possível que o CLSAGYPLFC esteja se ligando ao receptor através de uma outra região que não mesma utilizada pelo NGF para se ligar ao receptor. Caso contrário, se observarmos um decréscimo na ligação peptídeo/NGFR é por que de fato o NGF interferiu de forma competitiva na ligação e que provavelmente o peptídeo se ligue ao receptor por meio da mesma região utilizada pelo NGF.

Apesar dos resultados obtidos neste trabalho se mostrarem promissores, seja pela especificidade do peptídeo CLSAGYPLFC pelo NGFR, ou por também termos caracterizado algumas similaridades estruturais do peptídeo em relação a molécula de NGF, é plausível considerarmos que este peptídeo possa não desempenhar nenhuma atividade inibidora da via da TrkA, ou pelo contrário, se mostre como um ativador da via (*NGF like*), ou até mesmo possa ser uma espécie inerte, sem efeito algum.

O fato é que o peptídeo CLSAGYPLFC apresenta boa especificidade pela região receptora de NGF da TrkA (NGFR), tal aspecto nos permite vislumbrar outras aplicações para esta molécula que não se limitam necessariamente a linha clássica de aplicação farmacológica.

Diversas técnicas com peptídeos conjugados a sondas fluorescentes têm

sido exploradas e largamente aperfeiçoadas ao longo das últimas duas décadas (Maity., 2020).

As aplicações mais convencionais atualmente de peptídeos conjugados a fluoróforos se dá pela técnica de transferência de energia fluorescente por ressonância (FRET). Na técnica de FRET, após o peptídeo guia se ligar ao alvo de interesse, um par de fluoróforos, igualmente ligados ao peptídeo, interagem dada a proximidade que adquirem após a ligação do peptídeo ao seu alvo, o que ocasiona a emissão de um sinal fluorescente diferente dos sinais até então emitidos pelos fluoróforos individualmente, acusando assim a adequada interação do peptídeo com o seu alvo (Maity., 2020).

Em estudo futuros, o peptídeo CLSAGYPLFC conjugado a fluoróforos fluorescentes poderá ser sintetizado com o propósito de ser utilizado para a identificação de tecidos expressando o receptor de o NGF. Um dos modelos mais bem estabelecidos para estudos do desenvolvimento e dinâmica embrionária é o do embrião de galinha (Kasemeier-Kulesa., 2010). Sendo um modelo chave neste campo, o mesmo é atualmente utilizado por nosso grupo para investigar o papel da TrkA no desenvolvimento do sistema nervoso sensorial. Porém, observa-se uma certa carência no mercado de anticorpos que reconheçam a TrkA de galinha. Sendo o peptídeo CLSAGYPLFC um ligante específico da TrkA em pelo menos duas espécies (Rato e Humano), é possível propormos a aplicação do mesmo, conjugado a fluoróforos fluorescentes, para detectarmos células TrkA positivas. A aplicação em tal modelo embrionário, em substituição aos tradicionais e escassos anticorpos anti TrkA de galinha, se mostra viável dada a taxa de identidade entre a TrkA desta espécie e as TrkA's humana e de rato ser superior a 70% (NIH - Blastp® suite sequences – ID's: #P04629 (TrkA humano), #P35739 (TrkA Rato) e

#Q91009 (TrkA galinha).

Nos últimos vinte anos alguns trabalhos buscaram desenvolver peptidomiméticos tendo como base os pontos de contato do NGF com a TrkA. Um desses trabalhos observou que o peptídeo “P92” (dímero de cinco aminoácidos Pen\*-T-D-E-K-Q-C\*-NH<sub>2</sub> e mimético do loop 4 do NGF) foi capaz de se ligar a porção receptora da TrkA, promover a ativação da quinase e de vias correlatas (ERK e AKT) além de estimular, assim como o NGF, a neuritogênese e sobrevivência de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Entretanto, em sua forma monomérica o peptídeo P92 veio a não apresentar as mesmas potencialidades frente a TrkA quando submetido aos testes de indução de crescimento e sobrevivência celular, demonstrando a dímero dependência do P92. Este fato pode demonstrar uma perda da capacidade ligante da versão monomérica do peptídeo, fato que é ainda mais acentuado quando o P92 (dímero) tem sua cisteína terminal substituída por uma penicilamina, o que torna a formulação dimérica completamente não funcional atestando a importância do resíduo de cisteína terminal na estruturação da sequência (Xie Y, 2000).

Outro trabalho de 2020 demonstrou a capacidade de outro peptídeo mimético do NGF, porém de formulação linear. O hNGF1-14 (SSSH4PIFH8RGESFV-NH<sub>2</sub>) foi capaz de se ligar a TrkA e promover a ativação da quinase e de algumas vias correlatas tais como a Shc/PI3K e PLCγ/MAPK, vindo a deflagrar com isso uma resposta direta em neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico. O hNGF1-14 ainda teve a sua capacidade NGF mimética atestada por ser capaz de manter e diferenciar culturas de DRG. Além disso, o peptídeo apresentou capacidade neuroprotetiva ao manter os níveis de expressão da enzima Colina acetiltransferase (ChAT), resultando assim na

expressão contínua de BDNF (em sua forma madura) que se caracterizou por atuar na plasticidade neuronal de culturas de neurônios colinérgicos oriundos da região septal de embriões de ratos Wistar E17, modelo celular já bem estabelecido para o estudo de doenças neurodegenerativas (Triaca, V 2020).

Diferente da formulação dimérica proposta por Xie Y., et al 2000, o peptídeo hNGF1-14 se caracteriza como um peptídeo funcional em formulação monomérica e estável. Além disso, a sequência do hNGF1-14 contém em sua sequência justamente três das regiões consenso (SSSHPIFHRGESFV-NH<sub>2</sub>) responsáveis pela interação do NGF com a TrkA de acordo com Wiesmann., C 2001. O peptídeo selecionado em nosso estudo (CLSAGYPLFC) apresenta em sua sequência os resíduos YPLF que se assemelham aos resíduos do consenso HPIF, presente de forma integral no NGF e também no peptídeo hNGF1-14. A capacidade de ligação do peptídeo hNHG1-14 a TrkA, tendo justamente o consenso de ligação HPIF dentre seus resíduos, nos embasa novamente a supor que a interação entre o peptídeo CLSAGYPLFC selecionado por *phage display* e o NGFR possa estar se dando justamente pela região YPLF. Um ponto de diferenciação entre o hNGF1-14 e o peptídeo encontrado por nós, o CLSAGYPLFC, é que este (de acordo com os resultados referentes a ligação e seletividade pelo NGFR) se liga ao NGFR com apenas oito resíduos (excluídas as cisteínas terminais). Além disso, o CLSAGYPLFC é uma sequência monomérica com cisteínas terminais, o que poderia auxiliar o peptídeo a assumir uma configuração cíclica e mais estável, tornando-o mais resistente a degradação (Chen X., 2012).

Outro trabalho que avalia o hNGF1-14 visa propor as possíveis formas de ativação da TrkA por intermédio deste peptídeo monomérico e de apenas quatorze aminoácidos, visto que a ativação e dimerização desta quinase ocorrer mediante

ligação do NGF, também em forma dimerizada e com aproximadamente 27kDa. É observado que o hNGF1-14 não possui propensão a se dimerizar em solução, mesmo em altas concentrações (superiores a milimolar). Desta forma, é proposto que o peptídeo hNGF1-14 esteja agindo de duas formas para dimerizar e ativar a TrkA: (I) promovendo mudanças conformacionais na porção receptora da quinase após sua ligação, favorecendo assim a dimerização direta da enzima ou (II) aumentando a mobilidade do receptor na membrana, o que poderia estar favorecendo um processo de dimerização espontânea da TrkA e sua consequente ativação. Também se observou neste trabalho que o peptídeo hNGF1-14 mostrou-se capaz de ativar CREB, uma das vias ativadas pelo NGF mediante a ativação da PI3K/AKT, confirmada pelo aumento dos níveis de fosforilação do fator (phospho-CREB) em células PC12 expostas ao peptídeo em diferentes concentrações (1 $\mu$ M a 100 $\mu$ M) (Travaglia A., 2015).

Em um outro trabalho de 2021, utilizando técnicas computacionais, espectroscópicas e bioquímicas uma versão dimérica do hNGF1-14 foi desenvolvida, o d-NGF1-15. Neste trabalho é elucidada a ação de íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) no processo de estabilização do peptídeo em sua forma dimérica e como a ação deste mesmo metal também auxilia na inibição de tirosino fosfatases, vindo a potencializar a atividade quinase da TrkA. Observou-se que a ação deste peptídeo se restringe a regular as vias MAPK-ERK e PI3K-AKT que são deflagradas pela fosforilação das tirosinas Y490 e Y751 respectivamente. Entretanto, se observa que o d-NGF1-15 não induz a fosforilação da tirosina Y785 da TrkA, marca responsável por deflagrar a ativação da via da PLC $\gamma$ -PKC e o processo de nocicepção, o que pode ser uma vantagem de se utilizar esse peptídeo para se induzir o brotamento neural ou sobrevivência de neurônios sem

a ativação de vias que levam à dor (Mores et al 2022). Por fim, o grupo demonstra a ação estimuladora de BDNF tanto do d-NGF1-15 quanto do hNGF1-14 e como esta característica somada a capacidade ionófora do d-NGF1-15 contribuem para a regulação da atividade de uma matriz de metaloproteases (mMP) que agem de forma fundamental na degradação de proteínas  $\beta$ -amilóide em modelo celular de Alzheimer (Naletova I., 2019).

Observou-se que a capacidade ionófora (ligante de  $\text{Cu}^{2+}$ ) do d-NGF1-15 contribui não só na estabilidade de sua forma dimérica, mas também na neuroquímica das células nervosas. Primeiro, é proposto que o peptídeo potencialmente transfere íons  $\text{Cu}^{2+}$  ao transportador iônico hCtr1 presente em células neuronais, além disso, se levanta a hipótese de que o NGF (e conseqüentemente o d-NGF1-15) atue como uma chaperona do hCtr1 no processo de internalização dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  transferidos. O contato posterior deste transportador (hCtr1) com metaloproteases (estimuladas por BDNF) e destas com proteínas  $\beta$ -amiloides retoma o “link” de regulação do fenótipo de Alzheimer em modelos celulares, já explorado em trabalhos anteriores do grupo (Magri A., 2021).

Considerando os trabalhos e a gama de dados apresentados, é de fundamental importância a avaliação da atividade do CLSAGYPLFC. Os resultados obtidos com os peptídeos hNGF1-14 (Travaglia A., 2015 e Triaca., V 2020) e d-NGF1-15 (Naletova I., 2019 e Magri A., 2021) e as semelhanças destes com o CLSAGYPLFC nos direciona a futuramente analisar os efeitos deste peptídeo frente as outras vias ativadas pela interação NGF-TrkA, que não apenas o eixo PLC $\gamma$ /PKC/TRPV1 (Figura 2). Esses dados sugerem que o peptídeo que identificamos possa ser também um peptídeo ativador e não um inibidor como desejado para o tratamento da dor. Estudos posteriores irão verificar a atividade

do peptídeo CKSAGYPLFC.

## 6. Conclusão

Parte deste trabalho teve como foco o desenvolvimento de um ensaio bioquímico capaz de detectar a atividade quinase da TrkA em linhagens celulares. O imunoensaio de atividade in cell desenvolvido se mostrou reprodutível e capaz de identificar a TrkA em termos de ativação tempo dependente e sua inibição farmacológica com o uso de inibidores comerciais, revelando-se como uma importante ferramenta de aplicação para os nossos estudos assim como para uso colaborativo. Em paralelo, realizamos uma análise exploratória por meio da técnica de Phage display, com a qual conseguimos descobrir um peptídeo que foi capaz de mimetizar de forma parcial certos aspectos da molécula de NGF (CLSAGYPLFC), mostrando-se capaz de se ligar de forma específica a porção receptora de NGF da TrkA (NGFR).



## 7. Referências bibliográficas

- AHLUWALIA, A. et al. **Nerve growth factor is critical requirement for in vitro angiogenesis in gastric endothelial cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 311, p. 981–987, 2016.
- Albaugh P, Fan Y, Mi Y, et al. **Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models.** *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(2):140-145.
- Almeida B, Nag OK, Rogers KE, Delehanty JB. **Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery.** *Molecules.* 2020;25(23):5672. Published 2020
- ALOE, L. et al. **Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis.** *Arthritis and rheumatism*, v. 35, n. 3, p. 351–5, mar. 1992.
- AMADESI, S. et al. **Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C epsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice.** *J Physiol*, p. 555– 71, 2006.
- AMADESI, S. et al. **Protein kinase D isoforms are expressed in rat and mouse primary sensory neurons and are activated by agonists of protease-activated receptor 2.** *Journal of Comparative Neurology*, v. 516, n. 2, p. 141–156, 10 set. 2009.
- Angeles, T. S., S. X. Yang, C. Steffler and C. A. Dionne (1998). "**Kinetics of trkA tyrosine kinase activity and inhibition by K-252a.**" *Arch Biochem Biophys* 349(2): 267-274.
- Apkarian, A. V. and D. Reckziegel (2019). "**Peripheral and central viewpoints of chronic pain, and translational implications.**" *Neurosci Lett* 702: 3-5.
- Barde YA. **Death of injured neurons caused by the precursor of nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(16):5703-5704.
- Bhagwat, S.V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., Shapiro, L.H. **CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation.** *Blood* 97, 652-9. 2001.
- BONNINGTON, J. K.; MCNAUGHTON, P. A. **Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor.** *The Journal of Physiology*, v. 551, n. 2, p. 433–446, 1 set. 2003.

- Buffenstein R **Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species.** *J Comp Physiol* (2008) B 178:439–445.
- Buffenstein R, Yahav S. ***Is the naked mole-rat *Heterocephalus glaber* an endothermic yet poikilothermic mammal?*** *J Therm Biol* (1991) 16:227–232.
- Buffenstein R. ***Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats.*** *In: Life underground: the biology of subterranean rodents.* The University of Chicago Press (2000), Chicago, p62.
- Buffenstein R. ***Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species.*** *J Comp Physiol* (2008) B 178:439–445.
- Buffenstein R. ***The naked mole-rat: a new long-living model for human aging.*** *research. J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (2005) 60:1369–1377
- BUFFENSTEIN, R. **Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: Insights from a successfully aging species.** *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, v. 178, n. 4, p. 439–445, 2008.
- BUFFENSTEIN, R. **The Naked Mole-Rat: A New Long-Living Model for Human Aging Research.** *Journal of Gerontology*, v. 60A, n. 11, p. 1369–1377, 2005.
- Bunney TD, Esposito D, Mas-Droux C, et al. **Structural and functional integration of the PLC $\gamma$  interaction domains critical for regulatory mechanisms and signaling deregulation.** *Structure*. 2012;20(12):2062-2075.
- CATERINA, M. J. et al. **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.** *Science*, v. 288, n. 5464, p. 306–313, 14 abr. 2000.
- CDC. **Opioid Data Analysis and Resources.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugoverdose/data/analysis.html>>. Acesso em: 22 maio. 2020.
- Chen X, Guo C, Kong J. **Oxidative stress in neurodegenerative diseases.** *Neural Regen Res*. 2012;7(5): 376-385.
- Chen YH, Lipes BD, Kenan DJ, Staats HF, Gunn MD.(2009) **Identification of recombinant antibodies against multiple distinct toll-like receptors by homolog mining a single immune scFv phage library.** *J Immunol Methods*. 340:144-53.
- CHENG, J.K. and R.R. Ji, **Intracellular signaling in primary sensory**

**neurons and persistent pain.** *Neurochem Res*, 200833(10): p. 1970-8.

➤ CHUNG, M. K.; JUNG, S. J.; OH, S. B. **Role of TRP channels in pain sensation.** *Advances in Experimental Medicine and Biology. Anais*, 2011; Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-0265-3\\_33](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-0265-3_33)>. Acesso em: 21 maio. 2020

➤ COHEN, S. **PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 46, n. 3, p. 302–311, 1 mar. 1960.

➤ DAVIS, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, v. 405, n. 6783, p. 183–187, 11 maio 2000.

➤ de Oliveira, P. S., F. A. Ferraz, D. A. Pena, D. T. Pramio, F. A. Morais and D. Schechtman (2016). "Revisiting protein kinase-substrate interactions: Toward therapeutic development." *Sci Signal* 9(420): re3.

➤ DELLA SETA, D. et al. **NGF effects on hot plate behaviors in mice.** *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 49, n. 3, p. 701–5, nov. 1994.

➤ DEWEERDT, S. **OPIOIDS OUTLOOK: The natural history of an epidemic.** *Nature*, p. S10–S12, 2019.

➤ DIKIC, I. et al. **Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain.** *The Journal of biological chemistry*, v. 270, n. 25, p. 15125–9, 23 jun. 1995.

➤ DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. **Nociceptors: the sensors of the pain pathway.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 1 nov. 2010.

➤ DUNN, K. M. et al. **Opioid Prescriptions for Chronic Pain and Overdose.** *Annals of Internal Medicine*, v. 152, n. 2, p. 85, 19 jan. 2010

➤ DYCK, P. J. et al. **Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans.** *Neurology*, v. 48, n. 2, p. 501–5, fev. 1997.

➤ Edrey YH, Hanes M, Pinto M, Mele J, Buffenstein R. **Successful Aging and Sustained Good Health in the Naked Mole Rat: A Long-Lived Mammalian Model for Biogerontology and Biomedical Research.** *ILAR* (2011) J 52:41–53.

➤ Freiherr, J.; Hallschmid, M.; Frey, W.H.; Brünner, Y.F.; Chapman, C.D.; Hölscher, C.; Craft, S.; De Felice, F.G.; Benedict, C. **Intranasal insulin as a treatment for alzheimer's disease: A review of basic research and clinical evidence.** *CNS Drugs* 2013,

27, 505–514.

- FRIEDMAN, W. J.; GREENE, L. A. Neurotrophin Signaling via Trks and p75. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 1, p. 131–142, nov. 1999.
- Gaglione R, Pane K, Dell'Olmo E, et al. **Cost-effective production of recombinant peptides in Escherichia coli.** *N Biotechnol.* 2019;51:39-48. doi:10.1016/j.nbt.2019.02.004
- George, L., J. Kasemeier-Kulesa, B. R. Nelson, N. Koyano-Nakagawa and F. Lefcort (2010). "**Patterned assembly and neurogenesis in the chick dorsal root ganglion.**" *J Comp Neurol* 518(4): 405-422.
- Giordano RJ, Edwards JK, Tuder RM, Arap W, Pasqualini R. **Combinatorial ligand-directed lung targeting.** *Proc Am Thorac Soc* 6(5):411-5. 2009
- Giordano, R.J., Cardo-Vila, M., Lahdenranta, J., Pasqualini, R., Arap, W. **Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands.** *Nat. Med.* 7, 1249-1253. 2001.
- Grimes KM, Voorhees A, Chiao YA, Han HC, Lindsey ML, Buffenstein R. **Cardiac function of the naked mole-rat: ecophysiological responses to working underground.** *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* (2014) 306:H730–H737.
- HALLIDAY, D. A. et al. **Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease.** *Neurochemical research*, v. 23, n. 6, p. 919–22, jun. 1998.
- Hanson, L.R.; Frey, W.H. **Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease.** *BMC Neurosci.* 2008, 9, 1–4.
- HEFTI, F. F. et al. **Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF.** *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, n. 2, p. 85–91, fev. 2006.
- Hirose, M., Y. Kuroda and E. Murata (2016). "**NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain.**" *Pain Pract* 16(2): 175-182.
- Hochberg MC. **Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies.** *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23 (Suppl 1): S18–21
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. **Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 609–642, 28 jun.2003.

- Huang, J. X., Bishop-Hurley, S. L., & Cooper, M. A. (2012). ***Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites***. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(9), 4569–4582.
- INDO, Y. **Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): Mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor**. *Human Mutation*, v. 18, n. 6, p. 462–471, 2001.
- International association for the study of pain (IASP). Education; Terminology; Pain. Disponível em: <<http://www.iasppain.org/terminology?navItemNumber=576#Pain>> Acesso 4 de Setembro de 2018.
- IVANISEVIC, L.; SARAGOVI, H. U. **Neurotrophins**. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 1639–1646.
- Jarvis J. ***Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies***. *Science* (1981) 212:571–573.
- Ji, R. R. et al. **p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia**. *Neuron*, v. 36, n. 1, p. 57–68, 26 set. 2002.
- Kashyap, M. P., C. Roberts, M. Waseem and P. Tyagi (2018). "Drug Targets in Neurotrophin Signaling in the Central and Peripheral Nervous System." *Mol Neurobiol*, 2018.
- Kitts, D. D., Weiler, K. **Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery**. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309–1323. 2003.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. **Patofisiologia da dor**. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.
- Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O.P., Heikkilä, P., Kantor, C., Gahmberg, C.G., Salo, T., Konttinen, Y.T., Sorsa, T., Ruoslahti, E., Pasqualini, R. **Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor**. *Nat. Biotechnol.* 17, 768-74. 1999.
- Koob G.F., Sanna P.P., Bloom F.E. *Neuroscience of addiction*. *Neuron.*; 21:467–476. 1998.
- Kumar, V. and B. A. Mahal (2012). "NGF - the TrkA to successful pain

treatment." J Pain Res 5: 279-287.

➤ KUMAR, V.; MAHAL. NGF - **The TrkA to successful pain treatment**. Journal of Pain Research, p. 279, ago. 2012.

➤ Kurosawa G, Akahori Y, Morita M, Sumitomo M, Sato N, Muramatsu C, Eguchi K, et al. (2008) **Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic**. *Proc Natl Acad Sci USA*.105:7287-92.

➤ Lambiase, A.; Coassin, M.; Sposato, V.; Micera, A.; Sacchetti, M.; Bonini, S.; Aloe, L. **NGF topical application in patients with corneal ulcer does not generate circulating NGF antibodies**. *Pharmacol. Res.* 2007, 56, 65–69.

➤ Lane NE, Corr M. Osteoarthritis in 2016: **Anti-NGF treatments for pain - two steps forward, one step back?** *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 13:76–78.

➤ Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, et al. **Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee**. *N Engl J Med.* 2010; 363:1521–31

➤ LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A **diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo**. *Journal of Experimental Zoology*, v. 123, n. 2, p. 233–287, jul. 1953.

➤ LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. **TRP channels: Targets for the relief of pain** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, ago. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443907000324>>. Acesso em: 21 maio. 2020

➤ LEWIN, G. R.; LECHNER, S. G.; SMITH, E. S. J. **Nerve Growth Factor and Nociception: From Experimental Embryology to New Analgesic Therapy**. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. p. 251–282.

➤ LEWIN, G. R.; RUEFF, A.; MENDELL, L. M. **Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia**. *The European journal of neuroscience*, v. 6, n. 12, p. 1903–12, 1 dez. 1994.

➤ Lewis KN, Andziak B, Yang T, Buffenstein R. **The Naked mole-rat response to oxidative stress: just deal with it**. *Antioxid Redox Signal* (2013) 19:1388–1399.

➤ Lewis KN, Soifer I, Melamud E, Roy M, Mclsaac RS, Hibbs M, Buffenstein R. **Unraveling the message: insights into comparative genomics of the naked mole-rat**.

Mamm Genome (2016) 27:259–278.

- LEWIS, K. N. et al. **Unraveling the message: insights into comparative genomics of the naked mole-rat.** *Mammalian genome*, n. 27, p. 259–278, 2016.
- LEWIS, K. N.; RUBINSTEIN, N. D.; BUFFENSTEIN, R. **A window into extreme longevity; the circulating metabolomic signature of the naked mole-rat, a mammal that shows negligible senescence.** *GeroScience*, n. 40, p. 105–121, 2018.
- Lionakis, M.S., Lahdenranta, J., Sun, J., Liu, W., Lewis, R.E., Albert, N.D., Pasqualini, R., Arap, W., Kontoyiannis, D.P. (2005) **Development of a ligand-directed approach to study the pathogenesis of invasive aspergillosis.** *Infect Immun.* 73, 7747-7758.
- Liu G, Amin S, Okuhama NN, Liao G, Mingle LA. **A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry.** *Histochem Cell Biol.* 2006;126(2):283-291.
- LOMEN-HOERTH, C.; SHOOTER, E. M. **Widespread Neurotrophin Receptor Expression in the Immune System and Other Nonneuronal Rat Tissues.** *Journal of Neurochemistry*, v. 64, n. 4, p. 1780–1789, 23 nov. 1995.
- LOWE, E. M. et al. **Increased nerve growth factor levels in the urinary bladder of women with idiopathic sensory urgency and interstitial cystitis.** *British journal of urology*, v. 79, n. 4, p. 572–7, abr. 1997.
- Ma, W. Y., E. Murata, K. Ueda, Y. Kuroda, M. H. Cao, M. Abe, K. Shigemi and M. Hirose (2010). **"A synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice."** *J Pharmacol Sci* 114(1): 79-84.
- Magrì A, La Mendola D, Rizzarelli E. **Nerve Growth Factor Peptides Bind Copper(II) with High Affinity: A Thermodynamic Approach to Unveil Overlooked Neurotrophin Roles.** *Int J Mol Sci.* 2021;22(10):5085.
- Maity D. **Selected peptide-based fluorescent probes for biological applications.** *Beilstein J Org Chem.* 2020;16:2971-2982. Published 2020 Dec 3.
- Maloney J, Kivitz A, Schnitzer TJ, Dakin P, Stehman-Breen C, Geba G. **Efficacy and Safety of Fasinumab for Osteoarthritic Pain in Patients with Moderate to Severe Osteoarthritis of the Knees or Hips.** *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68
- MARTIN-ZANCA, D. et al. **Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 9, n. 1, p. 24–33, jan.

1989.

➤ MARTIN-ZANCA, D.; HUGHES, S. H.; BARBACID, M. **A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences.** *Nature*, v. 319, n. 6056, p. 743–748, 1986.

➤ Michaloski, J. S., Redondo, A. R., Magalhães, L. S., Cambui, C. C., & Giordano, R. J. **Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors.** *Science advances*, 2(10), e1600611. 2016.

➤ Miller RE, Malfait AM, Block JA. **Current status of nerve growth factor antibodies for the treatment of osteoarthritis pain.** *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35 Suppl 107(5):85-87.

➤ Moraes, B. C., Ribeiro-Filho, H. V., Roldão, A. P., Toniolo, E. F., Carretero, G., Sgro, G. G., Batista, F., Berardi, D. E., Oliveira, V., Tomasin, R., Vieceli, F. M., Pramio, D. T., Cardoso, A. B., Figueira, A., Farah, S. C., Devi, L. A., Dale, C. S., de Oliveira, P., & Schechtman, D. **Structural analysis of TrkA mutations in patients with congenital insensitivity to pain reveals PLC $\gamma$  as an analgesic drug target.** *Science signaling*, (2022) 15 (731), eabm6046.

➤ N., Erdmann, B., Heppenstall, P.A., et al. **Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*).** *PLoS Bio* (2008). 6, e13.

➤ Naletova I, Satriano C, Pietropaolo A, et al. **The Copper(II)-Assisted Connection between NGF and BDNF by Means of Nerve Growth Factor-Mimicking Short Peptides.** *Cells*. 2019;8(4):301.

➤ Newton JR, Kelly KA, Mahmood U, Weissleder R, Deutscher SL.(2006) **In vivo selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice.** *Neoplasia*. 8(9):772-80.

➤ OBERMEIER, A. et al. **Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex.** *The Journal of biological chemistry*, v. 268, n. 31, p. 22963–6, 5 nov. 1993.

➤ ODDIAH, D. et al. **Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder.** *Neuroreport*, v. 9, n. 7, p. 1455–8, 11 maio 1998

➤ OMERBASIC, D. et al. **Hypofunctional TrkA Accounts for the Absence of Pain Sensitization in the African Naked Mole-Rat.** *Cell reports*, v. 17, n. 3, p. 748–758,



2016

- PANDRE, M. K., Shaik, S., Satya Pratap, V. V. V., Yadlapalli, P., Yanamandra, M., & Mitra, S. ***A novel in-cell ELISA method for screening of compounds inhibiting TrkA phosphorylation, using KM12 cell line harboring TrkA rearrangement.*** Analytical Biochemistry, 545, 78–83, 2018.
- PAREEK, T. K. et al. **Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 2, p. 660–665, 9 jan. 2007.
- Park TJ, Reznick J, Peterson BL, Blass G, Omerbašić D, Bennett NC, Kuich PHJL, Zasada C, Browe BM, Hamann W, Applegate DT, Radke MH, Kosten T, Lutermann H, Gavaghan V, Eigenbrod O, Bégay V, Amoroso VG, Govind V, Minshall RD, Smith ESJ, Larson J, Gotthardt M, Kempa S, Lewin GR. **Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat.** Science (2017) 356:307–311.
- Park, T.J., Lu, Y., Jüttner, R., Smith, E.S.J., Hu, J., Brand, A., Wetzel, C., Milenkovic,
- PEREIRA, Wendel Batista. **Relação dos canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) e a dor: uma revisão /** Wendel Batista Pereira. – João Pessoa : [s.n.], 2013.
- PÉREZ, P. et al. **NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains.** Molecular and Cellular Neuroscience, v. 6, n. 2, p. 97–105, abr. 1995.
- Pezet, S. and S. B. McMahon (2006). **"Neurotrophins: mediators and modulators of pain."** Annu Rev Neurosci 29: 507-538.
- RAFFIONI, S.; BRADSHAW, R. A. **Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 19, p. 9121–9125, 1 out. 1992.
- ROUX, P. P.; BARKER, P. A. **Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor** Progress in Neurobiology. Prog Neurobiology 2002.
- Ruby JG, Smith M, Buffenstein R. ***Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age.***

(2018) *elife* 7.

- RUBY, J. G.; SMITH, M.; BUFFENSTEIN, R. **Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age.** *eLife*, n. 7, p. 1–18, 2018
- SARCHIELLI, P. et al. **Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients.** *Neurology*, v. 57, n. 1, p. 132–4, 10 jul. 2001
- SCHATZBERG, A. F. E KORN, M. B. **Beyond Depression: The Somatic/Affective Interface.** *Medscape*, 2002.
- Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. (2006) **Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents.** *Adv Drug Deliv Rev.* 58:1622-54
- Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. (2006) **Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents.** *Adv Drug Deliv Rev.* 58:1622-54.
- SHI, H. et al. **Nerve growth factor and Tropomyosin receptor kinase A are increased in the gastric mucosa of patients with functional dyspepsia.** *BMC Gastroenterology*, v. 19, n. 221, p. 1–8, 2019.
- SHIBAYAMA, E.; KOIZUMI, H. **Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues.** *American Journal of Pathology*, v. 148, n. 6, p. 1807–1818, 1996.
- Singh, B. P., Vij, S., Hati, S. **Functional significance of bioactive peptides derived from soybean.** *Peptides*, 54: 171–179.2014.
- Smith GP, Scott JK. **Libraries of peptides and proteins displayed in filamentous phage.** *Methods Enzimol* 217:228-57.1993.
- Smith GP. **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science*. 1985 Jun 14;228(4705):1315-7
- Smith, E.S.J., Omerbasic, D., Lechner, S.G., Anirudhan, G., Lapatsina, L., and Lewin, G.R. **The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat.** *Science* (2011) 334, 1557–1560.
- TENG, K. K. et al. **Understanding Proneurotrophin Actions: Recent Advances and Challenges.** *Developmental neurobiology*, v. 70, n. 5, p. 350–359, 2010.
- Tirassa, P. **The nerve growth factor administrated as eye drops activates mature and precursor cells in subventricular zone of adult rats.** *Arch. Ital. Biol.* 2011,

149, 205–213.

- Travaglia A, Pietropaolo A, Di Martino R, et al. **A small linear peptide encompassing the NGF N-terminus partly mimics the biological activities of the entire neurotrophin in PC12 cells.** ACS Chem Neurosci. 2015;6(8):1379-1392.
- Triaca V, Fico E, Sposato V, et al. **hNGF Peptides Elicit the NGF-TrkA Signalling Pathway in Cholinergic Neurons and Retain Full Neurotrophic Activity in the DRG Assay.** Biomolecules. 2020;10(2):216
- Ugolini G, Marinelli S, Covaceuszach S, Cattaneo A, Pavone F. **The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(8):2985-2990.
- ULTSCH, M. H. et al. **Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC.** Journal of Molecular Biology, v. 290, n. 1, p. 149–159, 2 jul. 1999.
- VETTER, M. L. et al. **Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 88, n. 13, p. 5650–5654, 1 jul. 1991.
- Wiesmann, C., & de Vos, A. M. (2001). **Nerve growth factor: structure and function.** Cellular and molecular life sciences : CMLS, 58(5-6), 748–759.
- Xie Y, Tisi MA, Yeo TT, Longo FM. **Nerve growth factor (NGF) loop 4 dimeric mimetics activate ERK and AKT and promote NGF-like neurotrophic effects.** J Biol Chem. 2000;275(38):29868-29874.
- ZHU, W.; OXFORD, G. S. **Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1.** Molecular and Cellular Neuroscience, v. 34, n. 4, p. 689–700, abr. 2007.
- ZHUANG, Z. Y. et al. **Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization.** Journal of Neuroscience, v. 24, n. 38, p. 8300–8309, 22 set. 2004.
- Radeke M., Misko T., Hsu C. (1987). **Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor.** Nature 325, 593–597.
- Chao M. V. (1992). **Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation.** Neuron 9, 583–593. 10.1016

- Reichardt L. F. (2006). **Neurotrophin-regulated signalling pathways.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1545–1564.
- Mitsiadis TA, Pagella P. **Expression of Nerve Growth Factor (NGF), TrkA, and p75(NTR) in Developing Human Fetal Teeth.** *Front Physiol.* 2016 Aug
- Chahl LA. **Opioids - mechanisms of action.** *Aust Prescr.* 1996; 19:63 5.
- Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. **Principles of early drug discovery.** *Br J Pharmacol.* 2011 Mar;162(6):1239-49
- Fox S, Farr-Jones S, Sopchak L, Boggs A, Nicely AW, Khoury R, et al. **High-throughput screening; Update on practices and success.** *J Biol Screen.* 2006;11:864–869
- McInnes C. **Virtual screening strategies in drug discovery.** *Curr Opin Chem Biol.* 2007;11:494–502.

## 8. SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS:

- Nome: Matheus Monteiro da Silva
- Local e data de nascimento: Caieiras, SP, 04 de fevereiro de 1996

### EDUCAÇÃO:

- ETEC Dr. Emílio Hernandez Aguiar, Franco da Rocha, SP, 2011 a 2013.  
(Ensino médio)
- Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, 2015 a 2018.  
(Bacharelado em Biomedicina)
- Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 2019 a 2023.  
Mestrado em Bioquímica

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

- Comunicação oral científica em inglês (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil 2017.
- Seminário avançados em Biomedicina (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil 2017.
- Neurobiologia da empatia (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil 2017.
- Envelhecimento e sistema imune (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil 2017.
- Ciclo epigenético e de pluripotência por meio das células germinativas e dos gametas.  
(Carga horária: 30h) Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil 2017.

### OCUPAÇÃO:

- Bolsista de Mestrado, PROEX CAPES, março /2019 - agosto/2021.
- Agente de Pesquisa e Mapeamento estatístico (IBGE), fevereiro/2022 - fevereiro/2023
- Oficial administrativo (Prefeitura Municipal de Carapicuíba), fevereiro/2023 - atual

## PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

### Artigos completos:

Marcelino T.P.; Fala A.M.; **da Silva, M.M.**; Schenkman.S. Identification of inhibitors for the trans-membrane Trypanosoma cruzi eIF2 $\alpha$  kinase relevant for parasite proliferation (submetido – em análise)

### Resumos publicados em anais de Congressos:

1. Characterization of the protein kinase of translation initiation factor 2 of Trypanosoma cruzi (Tck2) **\*DA SILVA, M.M** 1; MARCELINO, T.P 1; SCHENKMAN, S 1. (1) UNIFESP, SÃO PAULO – SP BRASIL - XXXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease Caxambu, Minas Gerais, Brazil, November 05th to 07th, 2018.

2. A target-based approach to identify bioactive compounds against T. cruzi Tck2, a protein kinase involved in parasite differentiation and survival in the mammalian host **\*MARCELINO, T.P.1; FALA, A.M.2; COUÑAGO, R.M.2; DA SILVA, M.M.1; MASSIRER, K.B.2; SCHENKMAN, S.1** – (1) UNIFESP, SAO PAULO - SP - BRASIL; 2 UNICAMP, CAMPINAS – SP, BRASIL - XXXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease Caxambu, Minas Gerais, Brazil, November 05th to 07th, 2018.

3. Caracterização da proteína quinase do fator de iniciação da tradução 2 de Trypanosoma cruzi **\*DA SILVA, M.M.1; MARCELINO, T.P.1; SCHENKMAN, S.1**(1) UNIFESP, SÃO PAULO - SP – BRASIL - XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease Caxambu, Minas Gerais, Brazil, November 06th to 08th, 2017.

4. Caracterização da proteína quinase do fator de iniciação da tradução 2 de Trypanosoma cruzi (Tck2); **\*DA SILVA, M.M**; III CONGRESSO ACADÊMICO – UNIFESP, Campus São Paulo - SP, Brasil. 30 de maio a 2 de junho de 2017.

5. IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE DO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO 2 DE TRYPANOSOMA CRUZI. (Tck2); **\*DA SILVA, M.M**; II CONGRESSO ACADÊMICO – UNIFESP, Campus São Paulo – SP, Brasil. 06 a 09 de junho de 2016.