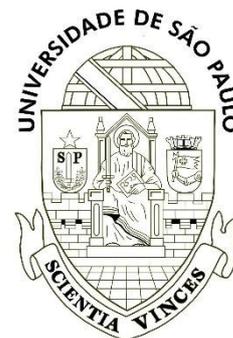




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área de Tecnologia Fermentações



ALEXY OROZCO VALENCIA

Estudo da conjugação da IL-2 com o peptídeo apoptótico pep5, no
contexto das doenças autoimunes e inflamatórias

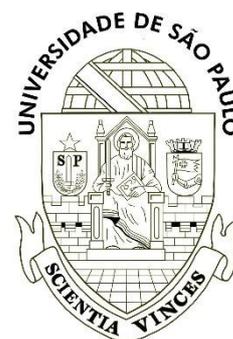
Tese apresentada para obtenção de título
de DOUTOR ao Programa de Pós-
Graduação em Tecnologia Bioquímica
Farmacêutica da Universidade de São
Paulo

São Paulo

2021



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área de Tecnologia Fermentações



Estudo da conjugação da IL-2 com o peptídeo apoptótico pep5, no
contexto das doenças autoimunes e inflamatórias

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

Versão Corrigida

São Paulo

2021

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

Valencia, Alexy

V135e Estudo da conjugação da IL-2 com o peptídeo
apoptótico pep5, no contexto das doenças autoimunes e
inflamatórias / Alexy Valencia. - São Paulo, 2021.

210 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Stephano, Marco Antônio

1. Interleucina 2. 2. Doenças autoimunes e
inflamatórias. 3. Peguilação. 4. Peptídeo apoptótico.

5. Supressão. I. T. II. Stephano, Marco Antônio,
orientador.

Alexy Orozco Valencia

Estudo da conjugação da IL-2 com o peptídeo apoptótico pep5, no tratamento de doenças autoimunes

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

Orientador / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo _____ de _____ 2021

ÈPIGRAFE

**“Conhecimento não é
aquilo que você sabe, mas
o que você faz com aquilo
que você sabe”**

Aldous Huxley

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho antes de tudo a Deus, por me permitir realizar meus objetivos como este projeto a pesar das dificuldades encontradas ao longo desta caminhada.

A meus pais, especialmente a minha mãe Ana Lid Valencia por ser uma mulher extraordinária que me ensinou desde pequeno os valores do respeito, educação, dedicação a perseverança de nunca desistir dos nossos sonhos. Minha amada mãe, “Não importa se o tempo que passamos foi pouco ou muito, não importa se você era ou não jovem, doe muito sempre a um filho ver partir a sua mãe. Faz tão poucos meses que vi a Deus levar para o céu a mulher que mais amava, que me ensinou e deu todas as ferramentas para que fosse possível alcançar este sonho profissional. Devo a ela tudo o que hoje eu sou, pelo que estarei eternamente agradecido. O seu lugar no meu coração será eterno e não vou deixar de pensar em ti mãe, nem um dia de minha vida sentindo muita saudade ”.

A toda minha família e amigos da Colômbia, Brasil, Espanha e da Alemanha que foram as pessoas que me acompanharam em cada fase da minha vida, tanto nos melhores momentos como os não tão bons, mesmo desde a distância sempre me incentivaram para chegar até final desta jornada. Suas palavras de apoio e auxílio, foram os pilares fundamentais que contribuíram em grande parte a esta maravilhosa conquista acadêmica. Também, as pessoas que de alguma e outra forma tiveram presentes neste caminho, quero dizer a todos vocês. **Muito obrigado!**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo desta tese de doutorado o professor Marco Antônio Stephano, pela disposição e a confiança em aceitar-me a orientar, abrindo as portas do seu laboratório, foi a pessoa que durante estes anos de pesquisa me ensinou a crescer como pesquisador na área de ciências aplicadas e me mostrou o caminho para ver que cada passo na inovação pode tornar-se uma oportunidade a ser aproveitada para contribuir com ao bem-estar e saúde das pessoas. Obrigado por sua paciência, por todas as suas recomendações que considereei pertinentes ao longo deste processo de estudos de doutoramento. Ele, sempre teve disposto a me ajudar.

A agencia de fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte econômico o qual me possibilitou a dedicação exclusiva ao projeto de doutorado no Brasil. Também ao programa AROP (*Advanced Research Opportunities Program*) da *RWTH Aachen University*, que me selecionou para o benefício de uma bolsa de pesquisa durante o tempo no Exterior.

Ao grupo do laboratório de imunobiológicos e biofarmacêuticos, a Caroline Yumi, Marcos Knirsch, quem me auxiliaram nos trabalhos desenvolvidos no laboratório. Ao pessoal técnico de laboratório do departamento de tecnologia bioquímico farmacêutica, como é o Alexandre Mariani. Também a meus outros colegas de laboratórios quem me assistiram neste tempo.

Ao grupo de laboratório do departamento de bioquímica e imunologia molecular da universidade RWTH Aachen *Uniklink* de Aachen Alemanha, liderado pelo professor Michael Huber, quem me permitiu realizar os ensaios *in vitro* no seu laboratório, fornecendo todo o suporte técnico e intelectual para alcançar os objetivos deste trabalho de pesquisa, além de agradecer por competir o tempo e o conhecimento.

Ao grupo de pesquisa da pesquisadora Telma Miyuki, a Laís Teodoro e a Bruna Tiyo, por abrir-me as portas do seu laboratório, quem me auxiliaram para realizar os ensaios finais que de alguma forma, nos ajudaram a ter uma melhor compressão de linhagens celulares derivados do sistema imune, a todos meu sincero. **Muito obrigado**

Resumo

VALENCIA, A. O. **Estudo da conjugação da IL-2 com o peptídeo apoptótico pep5, no contexto das doenças autoimunes e inflamatórias.** 2021. 210f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As doenças autoimunes são o resultado de falhas da imunotolerância, em que anticorpos produzidos pelo sistema imunológico atacam as próprias células do organismo com uma estrita relação com as interleucinas. As interleucinas, denominadas também como citocinas, são proteínas secretoras que se ligam a receptores específicos e desempenham um papel crítico na comunicação intercelular das células do sistema imune. Dentre suas funções, estão: a ativação e supressão de respostas do sistema imunológico; indução à divisão celular além da função em células de memória. A interleucina 2 é uma glicoproteína monomérica secretora, composta por 149 aminoácidos, com um peptídeo sinal de 20 aminoácidos, classificada na família das citocinas do tipo I. Esta molécula apresenta alta afinidade com o receptor de IL-2R e desempenha uma função de sinalização, que promove a ativação de vários subtipos de linfócitos durante o processo de diferenciação celular, como uma resposta imunológica ou homeostática. Existe uma relação entre as IL-2 e as doenças autoimunes, devido à sua interação com outras citocinas em processos de respostas imunológicas, sendo elementos chaves no controle e diminuição desse tipo de doenças. Nesse contexto, o objetivo central deste trabalho foi estudar a conjugação da IL-2 com o peptídeo apoptótico pep5, através de um PEG heterobifuncional, e avaliar sua atividade em células T com receptores IL-2R de humano e camundongo, mastócitos humanos e células leucêmicas. Observou-se uma supressão na linhagem HMC 1.2 de mastócitos e na linhagem de células T HEK-Blue, a diferença das linhagens HMC 1.1 e células leucêmicas Jurkat, em que não foi confirmado o mesmo efeito. Os resultados também revelaram a expressão dos três receptores para interleucina-2 (alfa, beta e gama) na linhagem HMC 1.2 e a ativação via intracelular JAK/pTAT5, após estimulação com a mesma citocina.

Palavras chaves: Interleucina 2 (IL-2), doenças autoimunes e inflamatórias, peguilação, peptídeo apoptótico, supressão

Abstract

VALENCIA, A. O. **Study of the conjugation of IL-2 with the apoptotic peptide pep5, in the context of autoimmune and inflammatory diseases.** 2021. 210f. Thesis (Ph.D) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Autoimmune diseases are the result of mistake the immunotolerance where antibodies produced for the immunologic system attack their cells and organs and by close liaison with the interleukins. The interleukins also called cytokines, secretory proteins that bind to specific receptors and play a critical role in the intercellular communication of cells of the immune system. These cytokines are mainly produced by T lymphocytes, macrophages, and eosinophils. Among its functions are the activation and suppression of immune system responses, induction of cell division beyond function in memory cells. Interleukin 2 is a secretory monomeric glycoprotein composed of 149 amino acids with a signal peptide of 20 amino acids, classified in the family of type I cytokines. This molecule exhibits a high affinity for the IL-2R receptor and performs the signaling function that promotes the activation of various subtypes of lymphocytes during the process of cell differentiation as an immune or homeostatic response. The specificity of IL-2 depends on its binding to low, medium, or high-affinity receptors. There is a relationship between IL-2 and autoimmune diseases due to its interaction with other cytokines in the processes of immunological responses being key elements in the control and reduction of this type of disease. In this context, the central objective of this work was to study the conjunction of IL-2 with the apoptotic peptide pep5 through a hetero-bifunctional PEG and to evaluate its activity in T cells with human and mouse IL-2R receptors, human mast cells, and leukemic cells. . A suppression was observed in the HMC 1.2 line of mast cells and the HEK-Blue T cell line, unlike the HMC 1.1 lines and Jurkat leukemic cells where the same effect was not confirmed. The results also revealed the expression of the three receptors for interleukin-2 (alpha, beta, and gamma) in the HMC 1.2 strain and the activation via intracellular JAK / pTAT5 after stimulation with the same cytokine.

Keywords: Interleukin 2 (IL-2), inflammatory and autoimmune diseases, pegylation, apoptotic peptide, suppression

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
Estudo e Expressão da Interleucina-2 (IL-2).....	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Interleucina 2 (IL-2)	2
1.1.2 Receptores de IL-2R.....	3
1.1.3 Mecanismos de ação da Interleucina 2 (IL-2).....	5
1.1.4 A IL-2 e as doenças autoimunes	6
1.1.5 Regulação das doenças autoimunes mediadas pela interleucina 2 (IL-2).....	8
1.1.6 Imunoterapia associada a interleucinas	9
1.1.7 Imunoterapia associada a interleucina 2 (IL-2).....	10
1.1.8 Aplicação farmacêutica da Interleucina 2 (IL-2)	11
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2. Objetivos Específicos.....	15
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	16
1.3.1 Otimização da sequência genética da interleucina-2 murina e humana.....	16
1.3.2 Construção de plasmídeos com inserção da sequência da interleucina-2 murina e humana	16
1.3.3 Sistema de expressão bacteriano e condições de crescimento	17
1.3.4 Obtenção de proteínas totais a partir da linhagem BL21-DE3.....	18
1.3.5 Verificação da expressão da proteína IL-2m pelo método de eletroforese SDS-PAGE.....	19
1.3.6 Purificação da proteína IL-2m por cromatografia de exclusão molecular (SEC).....	19
1.4 RESULTADOS	21
1.4.1 Avaliação estrutural da proteína IL-2 murina	21
1.4.2 Mapa de tradução de códons de frequências de <i>E. coli</i> K12 para genes IL-2m e IL-2m.....	23
1.4.3 Otimização das sequências nucleotídicas dos genes IL-2m e IL-2h para expressão em Bactéria.....	25
1.4.4 Construção dos vetores pET3a_rIL-2m e pET3a_rIL-2h	26
1.4.5 Expressão da proteína recombinante interleucina -2 murina (rIL-2m) na cepa BL21-DE3	27
1.4.6 Purificação da proteína recombinante interleucina -2 murina (rIL-2m)	28

1.4.7 Verificação da purificação da proteína rIL-2m	30
1.5 DISCUSSÕES	31
1.6 CONCLUSÕES	34
1.7 REFERÊNCIAS	35
2. CAPÍTULO 2	43
Construção Peguilha Quimérica de Il-2 ao peptídeo apoptótico pep5	44
INTRODUÇÃO	45
2.1.1 Peguilação	435
2.2 Tipos de peguilação	45
2.2.3 A Peguilação e o uso farmacêutico	47
2.2.4 Peptídeos Intracelulares	49
2.2.5 Peptídeo apoptótico pep5	51
2.3 OBJETIVOS	52
2.3.1 Objetivo Geral	52
2.3.2. Objetivos Específicos	52
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.4.1 Determinação estrutural <i>in silico</i> do sítio de ligação da IL-2 humana	53
2.4.1.1 Determinação estrutural <i>in silico</i> do peptídeo apoptótico pep5	53
2.4.1.2 Construção química da peguilada da IL-2 e o peptídeo apoptótico pep5	53
2.4.1.3 Verificação da peguilação entre a IL-2 humana e o peptídeo pep5	55
2.5 RESULTADOS	56
2.5.1 Avaliação <i>in silico</i> do sítio de ligação da IL-2h e o MAL-PEG-NH2	56
2.5.2 Estudo <i>in silico</i> do peptídeo apoptótico pep5	57
2.5.3 Verificação da construção entre a IL-2 humana e o peptídeo apoptótico pep5	59
2.6 DISCUSSÕES	60
2.7 CONCLUSÕES	62
2.8 REFERÊNCIAS	63
3. CAPÍTULO 3	866
Atividade Biológica do produto IL-2PEGpep5 em Mastócitos e célula Leucêmica	87
3. INTRODUÇÃO	87
3.1. Os mastócitos (MCs)	86
3.1.1 Patologias alérgicas e inflamatórias formadas a partir dos MCs	88
3.1.2 Ativação Primária	91
3.1.2.1 Mastocitose	91

3.1.3 Ativação secundária	92
3.1.3.1 Manifestações reativas	92
3.2 OBJETIVOS.....	95
3.2.1 Objetivo Geral.....	95
3.2.2 Objetivos Específicos.....	95
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	96
3.3.1 Linhagens celulares Mastocitárias.....	96
3.3.1.1 Linhagem Celular Humana de Mastócitos HMC 1.1 e HMC 1.2.....	96
3.3.1.2 Linhagem Celular Humana de Mastócitos Rosa (wt) e D816V.....	97
3.3.2.1 Linhagem Celular Leucêmicas Humanas.....	97
3.3.2. Determinação dos níveis de expressão do receptor CD25 (α) por Citometria de fluxo-FACS	98
3.3.3 Determinação da Viabilidade celular pelo programa CASY	99
3.3.4 Determinação da viabilidade celular pelo método do Ensaio de Citotoxicidade XTT	100
3.3.5 Determinação de níveis de expressão dos genes para os receptores IL-2Ra, IL-2Rb e IL-2Rg pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	101
3.3.6 Determinação de níveis de expressão dos genes CCND1, CCND2, Bcl2, CISH e OSM pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	104
3.3.6 Determinação da ativação da proteína pSTAT5 após tratamento com a interleucina -2 (IL-2) pelo método de Western Blotting.....	106
3.3.7 Análise estatística.....	109
3.4 RESULTADOS	110
3.4.1 Efeito da IL-2 peguilada com o pep5 na viabilidade células das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2.....	110
3.4.2 Expressão do receptor IL-2R Alfa nas linhagens celulares HMC 1.1 e HMC 1.2.....	111
3.4.3 Expressão dos receptores IL-2R nas linhagens celulares HMC 1.1 e HMC 1.2	112
3.4.4 Expressão dos genes CCND1, CCND2, Bcl2, CISH e OSM na linhagem HMC1.2.....	113
3.4.5 Expressão dos genes CISH e OSM sob indução com IL-2 e Ruxolitinib na linhagem HMC 1.2 em 1 hora.....	115
3.4.6 Ativação de STAT5 induzida por IL-2 em linhagens Humanas de mastócitos	116
3.4.7 Ativação da proteína pSTAT5 na linhagem HMC 1.2 sob indução da IL-2 em intervalos de tempo	117

3.4.8 Efeito da molécula peguilada IL-2PEGpep5 na viabilidade células na linhagem leucêmica Jurkat	117
3.4.9 Expressão do receptor CD25 induzido por fitohemaglutinina (PHA) na linhagem leucêmica Jurkat	117
3.4.10 Apoptose induzida na linhagem leucêmica Jurkat em diferentes concentrações de fitohemaglutinina (PHA)	119
3.5 DISCUSSÕES	120
3.6 CONCLUSÕES	130
3.7 REFERÊNCIAS	132
4. CAPTULO 4	156
Atividade Biológica do produto IL-2PEGpep5 murino e humano em células CD8	157
4. INTRODUÇÃO	157
4.1.1 Linfócitos T	156
4.1.2 Células T efetoras e de diferenciação	157
4.1.2 Células T CD8 ⁺ citotóxicas	158
4.1.3 A ativação das células T CD8 e as doenças autoimunes	158
4.1.4. Análise estatística	160
4.2 OBJETIVOS	161
4.2.1 Objetivo Geral	161
4.2.2 Objetivos Específicos	161
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	162
4.3.1 Determinação de linfócitos totais de camundongo	162
4.3.1.1 Teste ex vivo	162
4.3.1.2 Isolamento de linfócitos In vitro	162
4.3.2 Determinação da viabilidade celular pelo método de citometria para células T CD8 citotóxicas	163
4.3.2.1 Quantificação total de células T	163
4.3.2.2 Ensaio de viabilidade	163
4.3.2.2.1 Determinação de subpopulações de células T CD8 pelo método de citometria de fluxo	163
4.3.3.1 Determinação da expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) na linhagem celular HEK-Blue	164
4.3.3.2 Determinação da viabilidade celular da linhagem celular HEK-Blue após tratamento com IL-2PEGpep5	165
4.4 RESULTADOS	166
4.4.1 Quantificação de Linfócitos Totais PBMCs de Camundongo	166

4.4.2	Quantificação da subpopulação de células CD8 de camundongo.....	167
4.4.3	Efeito da IL-2 peguilada com o pep5 na viabilidade em células CD8 de Camundongo	168
4.4.4	Expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) na linhagem celular HEK-BLUE	169
4.4.5	Efeito da IL-2 peguilada com o pep5 na viabilidade celular da linhagem HEK-BLUE.....	170
4.5	DISCUSSÕES	172
4.6	CONCLUSÕES.....	175
4.7	PERSPECTIVAS	177
4.8	REFERÊNCIAS	178
5.	ANEXO 1- Ficha do Aluno	185
6.	ANEXO 2- Certificado CEUA	186
7.	ANEXO -3 Artigo publicado	187
8.	ANEXO 4- Solicitação de patente	188
9.	Anexo 5- concessão de Bolsa no Exterior	189
10.	Anexo 6 - Seleção de tecnologia promissória pelo ICB-USP.....	190

Lista de Figuras

Figura 1. (A), Estrutura cristalizada da IL-2 publicada em Protein Data Bank (PDB:1M47), (B) Representação gráfica da formação do complexo IL-2R quaternário com as subunidades IL-2R α , IL-2R β , γ_c e a IL-2. Adaptado de (WANG, 2005) e (OROZCO VALENCIA et al., 2020) 2

Figura 2. Esquema representativo de cromatografia de exclusão molecular (A), sistema utilizado para cromatografia de exclusão molecular. (B), cromatograma representativo mostrando o fracionamento de proteínas e o tempo de eluição por tamanho. Fonte: <https://comis.med.uvm.edu/> 20

Figura 3. Representação da estrutura secundária da IL-2. Peptídeo sinal na região N-terminal (vermelho). Modificação pós-transcricional (O-glicosilação) em verde. Aminoácidos polimórficos ou propensos a variações (amarelo.) Ponte bissulfeto cisteína 92 e 140 (fluorescente). 21

Figura 4. Alinhamento das sequências, IL-2 murina e a IL-2 humana. Sítio de glicosilação (azul). Formação de ponte bissulfeto entre duas cisteínas (amarelo). Região relevante para atividade proteica (quadro vermelho). Cisteína para ligação química com o polímero (seta verde) 22

Figura 5. Códon de frequência da linhagem bacteriana K12 de *E. coli* para a sequência da IL-2 humana (IL-2h) usando o programa de bioinformática da base de dados do website www.geneinfinity.org 23

Figura 6. Códon de frequência da linhagem bacteriana K12 de *E. coli* para a sequência da IL-2 murina (IL-2m) usando o programa de bioinformática da base de dados do website www.geneinfinity.org 24

Figura 7. Sequências nucleotídicas otimizadas do gene da interleucina-2 murina (IL-2m) e humana (IL-2h) a partir dos códon de frequência da linhagem bacteriana K12 de *E. coli* usando o programa de bioinformática da base de dados do website www.geneinfinity.org 25

Figura 8. Construção de vetores de expressão para rIL-2m. (A) vetor pET3a, (B) vetor pET3a com a inserção da sequência otimizada do gene interleucina-2 humana IL-2h e (C)

vetor pET3a com a inserção da sequência otimizada do gene interleucina-2 murina IL-2h.
27

Figura 9. Gel de poliacrilamida de eletroforese SDS-PAGE para extrato total proteico bacteriano. (WM) padrão de peso molecular, (1) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,0 mM IPTG, (2) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,0 mM IPTG na fase insolúvel. 28

Figura 10. Cromatogramas correspondentes a injeção de 1 mL de extrato proteico total. (A) cromatograma com faixa de fluxo de 0,75 mL/min com 3 separações, representando a última separação (seta vermelha) a eluição da rIL-2m. (B) cromatograma com faixa de fluxo de 0,5 mL/min com 2 separações, representando a última separação (seta vermelha) a eluição da rIL-2m. (C) cromatograma da injeção das frações 15 e 16 com faixa de fluxo de 1 mL/min (seta vermelha) a eluição da rIL-2m. 29

Figura 11. Gel de poliacrilamida de eletroforese SDS-PAGE das frações 15 e 16. (WM) padrão de peso molecular, (1) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,0 mM IPTG, (2) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,5 mM IPTG, (3) extrato total proteico da cepa BL21-E3 (controle negativo) e (4) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,0 mM IPTG na fase insolúvel. 30

Figura 12. Estrutura química do polietileno óxido (PEO) e o polietileno glicol (PEG). Fonte (ZIA et al., 2017). 44

Figura 13. Possíveis sítios de peguilação química em proteínas e suas ligações. Adaptado de (PFISTER; MORBIDELLI, 2014) 45

Figura 14. Esquema representativo do crosslinker entre a IL-2 e o Pep5 utilizando o método de peguilação hetero-bifuncional. Etapa 1, peguilação entre (1) o polímero MAL-PEG-NH₂ e o peptídeo apoptótico. Etapa 2, peguilação entre o (3) MAL-PEG-NH₂-pep5 e a IL-2h, seta verde lugar de ligação do hbPEG na IL-2 (cisteína-125) da IL-2h. 53

Figura 15. Reação da construção química entre a IL-2 e o Pep5 utilizando o método de peguilação hetero-bifuncional. 54

Figura 16. Estrutura tridimensional de raios X da interleucina-2 humana disponível na base de dados de Uniprot PDB, identificado com o código 1IRL (PBD). Em cor roxa, a cisteína na posição 125 na quarta alfa hélice, o círculo amarelo o íon sulfidrila do grupo tiol, o círculo vermelho o íon hidrogênio. 56

Figura 17. Propriedades físico-químicas da sequência do peptídeo pep5 utilizando o programa de análise de bioinformática disponível online do Innovagen. Os dados

apresentados são peso molecular, coeficiente de extinção molar, ponto isoelétrico e índice de solubilização. As cores embaixo representam o caráter hidropático de cada um dos resíduos. 57

Figura 18. Alinhamento das sequências da proteína D2 ciclina humana e murina, utilizando o programa bioinformático BLAST-ProSplign da plataforma National Center for Biotechnology Information NCBI. (Query) sequência da proteína D2 ciclina humana e (Sbjct) sequência da proteína D2 ciclina murina. 58

Figura 19. Gel de poliacrilamida de eletroforese SDS-PAGE de verificação da peguilação da IL-2h humana. (WM) padrão de peso molecular, (1) interleucina-2 humana, (2) produto peguilado IL-2h-MAL-PEG-NH₂ 59

Figura 20. (A) esquema representativo da formação dos mastócitos, diferenciação e função. (B), vias de transcrição a partir do estímulo por IgE (receptor FcεRI) ou citocinas (receptor Kit) e canal de fluxo de íons cálcio adaptado de (GERMIC et al., 2019) e (SIEBENHAAR et al., 2018) 88

Figura 21. Sistema de quantificação de células pelo programa CASY. Diferenciação de células vivas, mortas e resíduos orgânicos presentes em uma amostra. Fonte website <http://Casyprogram.com>. 100

Figura 22. Formação do composto de formazan a partir da redução do XTT. Adaptado de (SHOKRZADEH; MODANLOO, 2017). 101

Figura 23. O efeito do produto IL-2PEGpep5, IL-2 e sem na linhagem de mastócitos HMC 1.1 e o efeito do produto IL-2PEGpep5, IL-2, Ruxolitinib (Ruxo) e sem na linhagem de mastócitos HMC 1.2. 111

Figura 24. Determinação da porcentagem de expressão do receptor CD25 nas linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2. Em linha azul detecção de expressão do receptor CD25. Em linha vermelha porcentagem total de população celular. 112

Figura 25. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os receptores IL-2R Alfa, IL-2R Beta e IL-2R Gama nas linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos. 113

Figure 26. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os genes CCND1, CCND2 e Bcl2-11 na linhagem HMC 1.2. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos. 114

Figura 27. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os genes CCND1, CCND2 e Bcl2-11 na linhagem HMC 1.2. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos. 114

Figura 28. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os genes CISH e OSM na linhagem HMC 1.2 sob estimulação com IL-2 e Ruxolitinib em 1 hora. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos. 115

Figura 29. Expressão das proteínas pSTAT5 e pERK sob estimulação da interleucina-2 nas HMC 1.1, HMC 1.2, Rosa WT e D816V de mastócitos humanos linhagens, (+) representa presença da IL-2 e (-) representa ausência da IL-2. 116

Figure 30. Expressão das proteínas pSTAT5 e pERK sob estimulação da interleucina-2 em diferentes intervalos de tempo (1', 5', 15', 30' e 60') minutos da linhagem HMC 1.2. (Con) amostra controle. 117

Figura 31. O efeito do produto IL-2PEGpep5 nas concentrações 1ng/mL, 3ng/mL, 10ng/mL, 30ng/mL e 100ng/mL testadas na linhagem leucêmica Jurkat após 72 horas de tratamento. 118

Figura 32. Detecção da expressão do receptor CD25 induzido pela fito-hemaglutinina (PHA) nas concentrações 1µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL após 48 horas de tratamento na linhagem leucêmica Jurkat, utilizando a técnica de citometria FACS. Valor médio de porcentagem dos valores registrados para três leituras no citômetro de fluxo FACS. 118

Figura 33. Detecção de apoptose induzida por fitohemaglutinina (PHA) nas concentrações 1µg/mL, 2µg/mL, 5µg/mL e 5µg/mL após 48 horas de tratamento na linhagem leucêmica Jurkat, utilizando a técnica de citometria FACS. Valor médio de porcentagem dos valores registrados para três leituras no citômetro de fluxo FACS. 119

Figura 34. Isolamento de linfócitos totais utilizando o método Ficoll-Paque PLUS. (1) tubo de ensaio contendo 3 mL e 4 mL. (2). Após primeira centrifugação se observa separação em fases da amostra. (3) Remoção da fase superior para coleta dos linfócitos totais. (4) Isolamento e lavagem de linfócitos totais. (5) Preservação de linfócitos totais em meio RPMI1640. 163

Figura 35. (A) Quantificação do número de linfócitos totais em isolados de sangue periférico e baço de camundongo. (B) Microscopia ótica das amostras isoladas de sangue periférico e baço de camundongo. 166

Figura 36. Porcentagem de número de células T CD8 presentes em culturas celulares de PBMCs de baço e do sangue periférico de camundongo. 167

Figura 37. Porcentagem de número de células T CD8 presentes em culturas celulares de PBMCs de baço e do sangue periférico de camundongo após tratamento de 24 horas com IL-2PEGpep5 e controle. 168

Figura 38. Porcentagem de expressão do receptor IL-2 alfa (CD25) em células HEK-Blue quantificado por meio da marcação específica com anticorpo monoclonal anti-CD25/PE. 169

Figura 39. (A) quantificação da viabilidade celular da linhagem HEK-Blue após 24 horas de estímulo em diferentes concentrações de IL-2. (B), quantificação da viabilidade celular após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de IL-2 e o produto IL-2PEG
170

Lista de abreviaturas

CNK Células natural *Killer*

CTL Linfócitos T *Killer*

DCs Células dendríticas

HMC – *Human Mast Cell*

IL-2 Interleucina 2

IL-2R Receptor da interleucina 2

IL-7 Interleucina 7

IL-12 Interleucina 12

IL-15 Interleucina 15

IL-18 Interleucina 18

IL-21 Interleucina 21

INF- α Interferon alfa

ILCs Células linfoides inatas

Th Células auxiliaadoras

KO Nocaute

WT cepa selvagem

Pep5 Peptídeo apoptótico

mPEG Polietileno glicol

MTT brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5

PHA- Fitohemaglutinina

Ruxo- Ruxolitinib

CAPÍTULO 1

Estudo e Expressão da Interleucina-2 (IL-2)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Interleucina 2 (IL-2)

A IL-2 é uma glicoproteína monomérica secretora, com atividade pleiotrópica produzida principalmente por células $CD4^+$ *helper* (Th) activadas, células T citotóxicas activadas $CD8^+$ e, sob algumas circunstâncias, também produzidas por subtipos de células naturais *Killer* (CNK) (“Basic & Clinical Immunology.”, 2013). Esta proteína possui um tamanho de aproximadamente 15,5 a 16 kDa, classificada na família das citocinas tipo I. Cada membro desta família possui um feixe de quatro alfa hélices (Figura 1). Dentre a família das citocinas tipo I, estão inclusas as interleucinas: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. A interleucina 2 está conformada por 133 aminoácidos em humanos e 169 aminoácidos em murinos. Com a presença de um peptídeo sinal de 20 aminoácidos (1-20) em ambas as espécies, no início da região N-terminal da sequência proteica, e um solitário ponte de dissulfeto entre duas cisteínas (58 e 105), sendo esta ligação essencial para a atividade biológica desta citocina (SMITH, 1988). Por outro lado, dados experimentais mostram que 44 dos 149 resíduos restantes têm uma função importante na molécula, 21 estruturais e 23 com atividade de interação com receptores celulares e separados em diferentes regiões da proteína (ZURAWSKI et al., 1993).

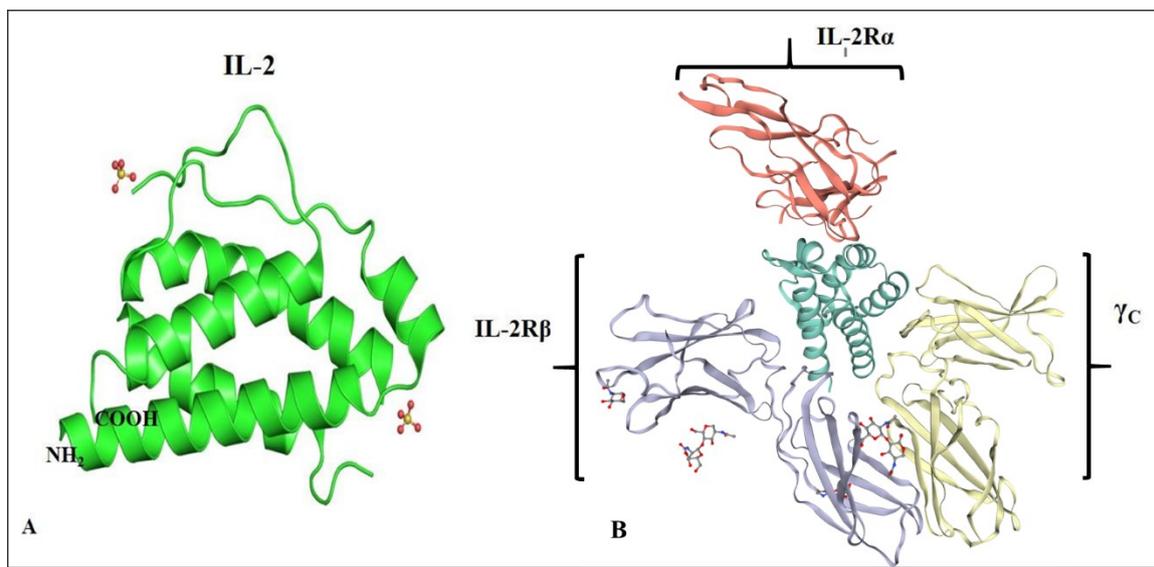


Figura 1. (A), Estrutura cristalizada da IL-2 publicada em *Protein Data Bank* (PDB:1M47), (B) Representação gráfica da formação do complexo IL-2R quaternário com as subunidades IL-2R α , IL-2R β , γ_c e a IL-2. Adaptado de (WANG, 2005) e (OROZCO VALENCIA et al., 2020).

A IL-2 desempenha funções sinalizadoras que influenciam vários subtipos de linfócitos durante processo de diferenciação, respostas imunológicas e homeostase. Sua especificidade depende da sua ligação com receptores de baixa, média ou alta afinidade. Uma das funções principais é a de promover a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (TAGA et al., 1991). A proliferação induzida por IL-2 ocorre através de sinais proliferativos dos proto-oncogenes *C-myc* e *C-fos*, em combinação com sinais anti-apoptóticos, através de membros da família Bcl-2 (KAWAHARA et al., 1995). Estudos recentes mostram que, além dos sinais anti-apoptóticos, a IL-2 também atua sobre o metabolismo celular no ciclo da glicólise, em que esses tipos de sinais são necessários para a sobrevivência de longo prazo das células T regulatórias (Treg) (ROLLINGS et al., 2018). Além disso, as IL-2 atuam em algumas células B, via ligação específica ao receptor, como fator de crescimento e estimulante da produção de anticorpos (MURAGUCHI et al., 1985).

Por outro lado, estudos relacionados com a atividade da IL-2 mostram ter um papel importante na diminuição das células tumorais. A IL-2 não mata as células tumorais diretamente, como a quimioterapia clássica. Em vez disso, a IL-2 ativa e estimula o crescimento de células imunológicas, principalmente células T, mas também células “natural killer” (células NK), ambas capazes de destruir diretamente as células cancerígenas (LEHMANN; ZEIS; UHAREK, 2001).

Outros estudos mostram uma outra função das IL-2: sua habilidade de inibir a geração de células T auxiliares pró-inflamatórias (*T helper*) e células T auxiliares foliculares Th17, as quais são o centro de produção de auto-anticorpos e estão associadas com os efeitos nas células regulatórias (*T_{reg}*) nos tratamentos de doenças autoimunes e inflamatórias (KAISER et al., 2004).

1.1.2 Receptores de IL-2R

A IL-2 sinaliza por meio de três diferentes formas de receptores IL-2R, que consistem em três subunidades designadas como IL-2R α , IL-2R β e γ c (Figura 1B). Cada uma delas apresenta baixa, média ou alta afinidade para interação com a IL-2 (STAUBER et al., 2006), (BARCLAY et al., 1997). A cadeia gama é conservada em todos os membros da família das citocinas tipo I, que incluem as IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, e a IL-21 (HE; MALEK, 2012), (LIAO; LIN; LEONARD, 2011). Estudos de interação cinética mostraram que os

receptores de alta afinidade, formados pela interação das subunidades IL-2R α , IL-2R β , γ c e a IL-2, deve-se à rápida taxa de associação ($K_{d_{on}} = 10^7 M$), mas também, à sua lenta taxa de dissociação ($K_{d_{off}} = 10^{-4} M$). A subunidade IL-2R α participa na rápida associação com a IL-2, enquanto a subunidade IL-2R β é a encarregada pela lenta dissociação (WANG, 2004)

Embora a incapacidade da subunidade IL-2R α em transmitir sinais seja por ausência de domínios na região de transdução de intracelular (FIG; DRYDEN-EDWARDS; HOW2STATS, 2015), sua significância fisiológica constitui uma função relevante para as células TH CD4⁺ (PAPIERNIK et al., 1998). Isto foi demonstrado em estudos realizados em ratos nocaute do gene que expressa a subunidade IL-2R α , e em humanos com deficiência genética em receptores CD25 (IL-2R α), exibindo resultados semelhantes aos apresentados em experimentos com ausência de IL-2. Também manifestando que as concentrações de IL-2, presentes no meio extracelular, não seriam suficientes para ligar-se ao complexo IL-2R β , γ c (WILLERFORD et al., 1995), (SHARFE et al., 2002). Dados clínicos em pacientes com deficiência de CD25 (IL-2R α) estão associados a sintomas que compreendem as endocrinopatias, eczema, anemia hemolítica, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e enteropatia, mostrando uma instabilidade da função das células T regulatórias. Contudo, a expressão constitutiva da subunidade IL-2R α , em altos níveis em células CD4⁺-CD25-FOXP3, permite a rápida resposta para IL-2, levando a uma regulação das respostas imunes (GAMBINERI; TORGERSON, 2012).

A subunidade γ c, ou cadeia gama, é um receptor comum para todos os membros da família das citocinas tipo I (LIN; LEONARD, 2018). Com efeito biológico de regulação na diferenciação, sobrevivência, ativação de múltiplos linhagens linfócitos e controle da proliferação de células leucêmicas linfóides, que expressam receptores γ c (GOH; HONG, 2017). Por outro lado, a enfermidade autossomal recessiva XSCID, é causada pela mutação no gene que expressa a subunidade γ c (*IL2RG*) (PUCK JM, 2007). Esta doença se caracteriza pela ausência do desenvolvimento de células T e células naturais *Killer*, mostrando uma falha da funcionalidade das células T periféricas (DE SAINT BASILE et al., 2006).

O papel na imunidade de IL-2R β ainda é pouco compreendido. Camundongos defectivos em função da subunidade IL-2R β , portavam diminuição de atividade de células efectoras citotóxicas e autoimunidade severa, além de apresentarem níveis elevados de IgG1, IgE e autoanticorpos.

Apesar de exibir ativação e aumento de células com receptores superficiais CD69 e CD25, as células T de murinos defectivas da função IL-2R β , falharam em responder a estímulos de IL-2 e de outras quimiocinas, diminuindo a atividade citotóxica de células T CD8 quando ativadas, e também a uma redução de número de células NK. Esses resultados sugerem que a ausência da atividade do receptor IL-2R β em camundongos, pode produzir uma maior sensibilidade à infecção, além de ativação de outras células T, promovendo a autoimunidade (TIMMS et al., 2006).

As vias de sinalização das células T estão associadas aos receptores de alta afinidade, embora alguns estudos mostrem que, a associação entre as subunidades IL-2R β e γ c, também pode sinalizar mecanismos de ativação de genes envolvidos em respostas do sistema imune (RUSSELL et al., 2003). Devido à ausência da atividade catalítica intrínseca dos receptores para a IL-2, estes dependem da interação mediada por proteínas que interagem com domínios específicos no interior da célula. Este mecanismo permite a indução de vias sinalizadoras intermoleculares. A participação inicial da proteína *Janus Kinase* (JAK), resulta na ativação subsequente do fator de transcrição STAT5, que, por sua vez, recruta as quinases PI3K e a MAPK, intermediárias em vias de sinalização intracelulares. Este complexo sistema de ativação, permite a regulação constitutiva de genes vinculados à progressão e sobrevivência celular em determinadas respostas imunes (WANG et al., 1999), (TURKA THOMPSON et al., 2004).

1.1.3 Mecanismos de ação da Interleucina 2 (IL-2)

Geneticamente, a transcrição do gene da IL-2 é controlada por uma região de 300 pares de bases nucleotídicas, antes do início da sua transcrição do gene. Esta região promotora também regula outros fatores de transcrição que foram identificados como elementos de regulação positiva das células T (DURAND et al., 1988). A interleucina 2, como um fator de crescimento dos linfócitos, é requerida para o avanço da fase G1 (síntese proteica) e a síntese do DNA do ciclo celular. Em humanos, foi evidente que a IL-2 apresentava dois mecanismos de regulação diferentes nas células T periféricas do sangue, estimulando especificamente os receptores de membrana CD3 e CD8 destas células (JUNE et al., 1989).

Estudos desenvolvidos nos últimos anos, mostram que a proteína quimérica IL-2 apresenta uma alta afinidade por receptores IL-2R alfa, presentes na fase inicial de desenvolvimento dos linfócitos T e B, sendo responsáveis pela transformação em linfócitos maduros (WILLERFORD et al., 1995), prevenindo doenças autoimunes e promovendo a diferenciação de certas células T imaturas. Este processo pode, eventualmente, ativar as células T reguladoras a controlar outros tipos de células T, que atacam as células saudáveis do corpo (LIAO; LIN; LEONARD, 2011). Desta forma, este mecanismo de repressão mostra ser um potencial terapêutico contra doenças autoimunes.

1.1.4 A IL-2 e as doenças autoimunes

As doenças autoimunes derivam de alterações do sistema imunológico. Estes tipos de alterações consistem na quebra da tolerância aos antígenos próprios (“self” – “non-self”), ou seja, o sistema imunológico é induzido a produzir anticorpos que atacam células, tecidos e órgãos normais, afetando qualquer parte do organismo do próprio indivíduo (NANCY GARRICK, 2017). Até o momento, foram identificadas mais de 80 doenças autoimunes, tais como: esclerose múltipla, diabetes tipo 1, artrite reumatoide e lúpus. No entanto, existem outros tipos de doenças autoimunes raras e que são de difícil diagnóstico (ZOUALI, 2013).

Por outro lado, uma propriedade importante do sistema imunológico é a tolerância adquirida. Esta característica permite ao sistema imunológico a habilidade de proteger e prevenir ataques de si mesmo contra suas próprias moléculas. No entanto, quando este atributo de tolerância falha, pode promover o desenvolvimento da autoimunogenecidade (SILVERSTEIN, 2009).

A incidência e prevalência variam entre as doenças autoimunes. A geoepidemiologia torna-se mais complexa quando são consideradas as variações como a idade, gênero, etnia, regiões geográficas, entre outras características, podendo surgir em qualquer faixa etária, mas diferentes doenças têm sua própria idade característica de começo. (WAHREN-

HERLENIUS; DÖRNER, 2013).

Estudos mostram que existe uma relação entre as IL-2 e as doenças autoimunes, devido à sua interação com outras citocinas em processos como ativação, repressão e diferenciação celular (GENG et al., 2012; SCHIMPL et al., 2002). Análises em ratos deficientes de IL-2 e componentes do receptor de alta afinidade, mostram falhas na interação ‘célula – célula’. A consequência destas alterações é a morte celular, quando o sistema imune responde a um antígeno em ausência da função IL-2/IL-2R, incluindo leves alterações das células T, mas afetando diretamente a função das células T auxiliares e regulatórias (CHINEN et al., 2016).

Foi demonstrado que a IL-2 promove o desenvolvimento e a ativação de subtipos TH1 e TH2 de células T auxiliares, dependentes da presença de outras citocinas (RAY et al., 2015). As células TH1 são formadas quando a interleucina 12 (IL-12), interferon IFN- γ e IL-2 estão presentes, enquanto células TH2 formam-se quando a IL-4 e IL-2 estão presentes. As células TH1 produzem citocinas, incluindo o IFN- γ (DUPAGE; BLUESTONE, 2016). Esses estudos constataam o papel protagônico da IL-2 na ativação das células auxiliares THCs.

Estudos realizados em pacientes com falhas congênitas nas células regulatórias, desenvolveram doenças autoimunes ainda na infância (D’HENNEZEL et al., 2012). As células regulatórias THCs podem ser identificadas pela presença de receptores periféricos como CD4⁺, CD25⁺ e CD 127⁺. Os receptores CD25⁺ não são um marcador para as células regulatórias, mas são importantes para a manutenção e função destas células. Essas células, por sua vez, encontram-se associadas aos marcadores CD122⁺ e CD132⁺, para formar um receptor de alta afinidade para interleucina 2 (IL-2). Desta forma, o receptor CD25⁺ é constitutivamente expresso em células regulatórias, enquanto sua expressão em outras células T é induzida somente após a ativação. Portanto, as células regulatórias podem responder melhor à IL-2 do que outras células T em estado estacionário. Foi observado também que, nas células T e células natural *killer* (NK), expressam constitutivamente os receptores CD122⁺ e CD132⁺, que podem responder a altas doses de IL-2, levando à sua ativação e destruição tecidual anormal (TANG et al., 2008). Contudo, a Interleucina-2, mostra ser uma biomolécula mediadora chave para o tratamento potencial de várias doenças autoimunes.

1.1.5 Regulação das doenças autoimunes mediadas pela interleucina 2 (IL-2)

Nos últimos anos, a realização de estudos sustenta um papel essencial para a interleucina 2 (IL-2) na tolerância imunológica. Essa ideia é bastante distante do que originalmente se pensava: que a IL-2 só participava em um papel central para respostas imunes protetoras (LEE et al., 1986; MOSMANN; COFFMAN, 1989). Esta variação de pensamento ocorreu quando foram comprovadas deficiências em células T reguladoras, manifestando serem responsáveis pela autoimunidade letal associada à ausência de IL-2 / IL-2R (FURTADO et al., 2002; LAN; SELMI; GERSHWIN, 2008).

Estudos a nível molecular, em camundongos com deleção do gene (IL-2), mostraram ser mais propensos a desenvolver doenças complexas autoimunes e apresentar maior deficiência em gerar respostas imunes (CTL), após infecção, quando comparados com camundongos saudáveis como controle (KÜNDIG et al., 1993). Esses resultados ajudam a ter uma melhor compreensão do papel na ativação de sistemas de resposta imunes à infecção *in vivo* das interleucinas-2 (IL-2).

Estudos também feitos em camundongos deficientes na produção de IL-2 e no receptor (IL-2R), desenvolveram uma doença linfoproliferativa e uma síndrome autoimune letal, que foi posteriormente denominada: síndrome de deficiência IL-2. Esses dados confirmam que - embora a capacidade de promover a sobrevivência e o crescimento de células T exercido por meio da interleucina 2, e que essas mesmas funções possam ser supridas por outros fatores de crescimento - a interleucina-2 seria uma proteína essencial para a regulação negativa de respostas imunes (KNEITZ et al., 1995; WANG et al., 1996).

A IL-2 também tem sido implicada na patogênese de transtornos neuronais. Estudos mostraram que camundongos adultos nocautes para IL-2 (*KO*), exibem patologia septo-hipocampal por perda marcante e seletiva dos neurônios colinérgicos septais, relacionados com os déficits comportamentais, quando comparados com os camundongos tipo selvagem (*WT*). Essas observações levam a postular que a perda de funções neuronais é devida a neurodegeneração seletiva para as células T, com um aumento dos níveis de autoimunidade periférica (HUANG et al., 2009).

1.1.6 Imunoterapia associada a interleucinas

As interleucinas (ILs) pertencem ao grupo das citocinas, proteínas secretoras que se ligam a receptores específicos e desempenham um papel na comunicação intercelular das células do sistema imune (DINARELLO; MIER, 1986). Dentre suas funções, estão: a ativação, supressão, indução à divisão celular e formação de células de memória dentro dos mecanismos efetores da resposta imune, sendo a divisão celular a função de maior interesse no desenvolvimento de novos medicamentos (CAVAILLON, 1990; NETA; SAYERS; OPPENHEIM, 1992; STONE, 2011).

A imunoterapia é um tipo de tratamento que utiliza as próprias moléculas do sistema imunológico para combater vários tipos de doenças e, na última década, tornou-se amplamente usado para tratar certos tipos de cânceres. A imunoterapia está baseada em três grandes categorias modificadoras das respostas imunológicas (FREUND et al., 1992), anticorpos monoclonais, policlonais (SINGH et al., 2013) e vacinas (WU, 2012).

Os primeiros testes clínicos relacionados com a imunoterapia, utilizando as interleucinas, foram realizados em vários tipos de metástase de células malignas, mostrando evidências que, pacientes com esses tumores malignos, tiveram uma resposta positiva quando tratados com a interleucina-2 (IL-2) (ROSENBERG et al., 1987) ou interferon- α (IFN- α) (PYRHÖNEN et al., 1999). Na década passada, diversas interleucinas - que incluem as IL-2, IL-7, IL-12, IL-18 e a IL-21 - foram utilizadas em ensaios clínicos em pacientes com câncer com estágios avançados (LEE; MARGOLIN, 2011), (ELKASSAR; GRESS, 2010) (LASEK; ZAGOZDZON; JAKOBISIAK, 2014), (JAKOBISIAK; GOLAB; LASEK, 2011), (YEUNG et al., 2013).

Até o momento, foram descritos mais de 36 tipos de ILs. Suas numerações acontecem de acordo com a ordem em que foram descobertas, sendo divididas em famílias e subtipos, dependendo da sua atividade (BROCKER et al., 2010). As ILs são assinadas em cada família, baseado na homologia da sequência, similaridade com a estrutura do seu receptor ou propriedades funcionais (DINARELLO et al., 2010). Por outro lado, a maioria das células do sistema imunológico, exibem subconjuntos funcionais diferentes e são caracterizadas por receptores de superfície distintos, presentes na superfície das células como: células T CD4⁺ e CD8⁺, células B, células linfoides inatas (ILCs), células naturais *killer* (NK) e células dendríticas (DCs) (JAY; NADEAU, 2014).

1.1.7 Imunoterapia associada a interleucina 2 (IL-2)

A interleucina-2 (IL-2) foi descoberta como um fator de crescimento autócrino, sendo a primeira citocina clonada e cultivada em 1983 (TANIGUCHI et al., 1983). Os primeiros estudos moleculares revelaram um papel de molécula sinalizadora, na proliferação e geração de células T efectoras e células T de memória. Isto levou à avaliação, em ensaios clínicos, da capacidade da IL-2 em altas doses, estimulando as respostas imunológicas antitumorais em pacientes com melanomas, câncer de rins e outras doenças com presença de células anormais (ROSENBERG, 2014) e, nas últimas décadas, como um terapêutico no tratamento de pacientes com doenças autoimunes (K.Y., 2002).

A IL-2 foi a primeira interleucina a ser aprovada para tratamento de carcinomas em células renais, em 1992 (MERCHANT et al., 1992) e 1998 (ROSENBERG et al., 1998), para metástase de melanomas. Embora o uso de altas doses de interleucina-2 tivesse graves efeitos colaterais, a formulação de IL-2 como imunoterapêutico, em combinação com outros imunoterapêuticos anticâncer, como transferência de células, vacinas antígeno-específico e antígeno 4, associados a células T citotóxicas, poderiam aumentar a eficiência do tratamento, diminuindo a dosagem da IL-2 e atenuando as reações adversas (WOLCHOK et al., 2010).

Atualmente, foram desenvolvidos 123 estudos clínicos (em fase de conclusão) associados a interleucina-2, com enfoque em tratamentos, principalmente, de carcinomas, leucemias agudas, doenças autoimunes, imunodeficiência humana (HIV), entre outras doenças (https://clinicaltrials.gov/ct2/results/browse?recrs=eh&rslt=With&type=Intr&condterleuk in+2&brwse=cond_alpha_all). Dentre esses estudos, o tratamento contra a doença crônica autoimune dos lúpus eritematosos sistêmicos (SLE) apresenta resultados significativos. De acordo com o estudo, um grupo de 40 pacientes tratados com baixas doses de IL-2 recombinante humana, mostraram que, 14 dias após receberem a dose, tiveram uma melhoria da anormalidade das células T auxiliaadoras (Th).

Por outro lado, estudos experimentais em 29 pacientes, com diferentes leucemias agudas melanoides (identificação de 6 diferentes leucemias), foram tratados com Bussulfano (1,4-butanediol dimethanesulfonate) e Etoposido (4'-demethyl-epipodophyllotoxin 9-[4,6-O-(R)-ethylidene-beta-D-glucopyranoside], 4'-(dihydrogen phosphate), seguidos de

transplante de células tronco de sangue periférico e Aldesleucina (interleucina-2 recombinante humana), em baixas doses, em diferentes períodos. Como resultado destes ensaios clínicos, foi observado que os 29 pacientes foram submetidos a transplante e que 21 desses pacientes, após o transplante, passaram a receber tratamento com IL-2, mostrando uma diminuição significativa de células cancerígenas, por meio da estimulação da atividade das células T. No entanto, alguns pacientes apresentaram reações adversas em diferentes graus (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00003875?term=Interleukin+2&recrs=abeh&rslt=With&cond=%22Leukemia%2C+Myeloid%22&draw=3&rank=1>).

Nos últimos anos, estão sendo desenvolvidas terapias biológicas para tratamento de diferentes doenças autoimunes, direcionadas às moléculas envolvidas nos mecanismos do sistema imunológico, como são as interleucinas como mediadores em processos de resposta do sistema imunológico. Os agentes biológicos são projetados como terapias moleculares sítio dirigidas, que incluem anticorpos, receptores e bloqueadores, podendo ser de origem químico e parcial, ou totalmente humanizados, considerando estes últimos como uma alternativa potencial para substituição dos tratamentos já existentes, utilizados para o tratamento de doenças autoimunes (medicações antirreumáticas e imunossupressoras) (ROSMAN; SHOENFELD; ZANDMAN-GODDARD, 2013).

1.1.8 Aplicação farmacêutica da Interleucina 2 (IL-2)

Atualmente, a administração de doses baixas de interleucina 2 (IL-2), suprime respostas imunes indesejadas em camundongos e humanos, constatando o potencial da IL-2 no tratamento de doenças autoimunes. A atividade aumentada de células T regulatórias é um dos possíveis mecanismos potenciais, pelos quais a baixa dose de IL-2 induz a imunossupressão. Além disso, dados recentes indicam que a IL-2 pode colaborar para evasão de respostas autorreativas indesejadas, evitando o desenvolvimento de células T auxiliares foliculares, um subconjunto de células com receptores CD4⁺, que se desenvolve em pacientes com doenças autoimunes e promove respostas efetoras de células B (BALLESTEROS-TATO, 2014).

Apesar destes métodos serem eficazes no tratamento de doenças autoimunes e de controle de doenças principalmente derivadas de células tumorais, eles apresentam várias desvantagens, devido aos efeitos adversos causados pelas doses aplicadas em pacientes tratados com a IL-2 (VIAL; DESCOTES, 1992), (SCHWARTZ; STOVER; DUTCHER, 2002). Um exemplo claro, apresentado em terapias com altas doses de IL-2, é a superexpressão de receptores IL-2R em células epiteliais pulmonares (KRIEG et al., 2010). Esta manifestação resulta em uma síndrome de vazamento capilar hipovolêmico (VLS) e acúmulo de líquidos no espaço extravascular, aumentando a permeabilidade e produzindo um extravasamento de fluidos dentro dos órgãos. Resultados clínicos mostram que a síndrome do vazamento capilar contribui significativamente para o desenvolvimento de uma série de eventos patológicos. Entre eles, estão: a diminuição da albumina sérica, osmolaridade plasmática, extravasamento de água e eletrólitos em tecidos, edema intersticial e falha múltipla de órgãos. Por outro lado, o edema intersticial caracteriza-se por duas condições específicas: a primeira por apresentar diferentes graus de insuficiência pulmonar e, a segunda, por uma hipovolemia intravascular, causada por vazamento de fluido para o pulmão, sendo a responsável pela insuficiência cardiovascular e insuficiência respiratória, requerendo ventilação mecânica em pacientes que a padecem (BALUNA; VITETTA, 1997).

Estas manifestações clínicas levam a pensar que ainda são necessários diversos estudos para um melhor entendimento sobre a atividade pleiotrópica da IL-2, e como atua em resposta a tratamentos de doenças autoimunes e células tumorais. Atualmente, estão sendo avaliados diferentes tratamentos com o uso da interleucina-2 como adjuvante, quimérica, ou conjugada com peptídeos, que permitem uma maior eficiência de ação, minimizando os efeitos colaterais nos tratamentos terapêuticos.

A IL-2 está sendo utilizada como adjuvante de vacinas em testes clínicos para o tratamento de doenças crônicas, como o vírus da imunodeficiência humana e a diabetes tipo I (HARTEMANN et al., 2013; TINCATI; MONFORTE; MARCHETTI, 2009). A IL-2 também tem uso como elemento associado a proteínas recombinantes de uso farmacêutico. Um exemplo é o biofármaco chamado: denileukin difitox (LITZINGER et al., 2007), que é uma proteína de fusão recombinante, ligada à interleucina 2 de origem humana. Este fármaco liga-se aos receptores da IL-2 e coloca a toxina diftérica nas células que expressam esses tipos de receptores, levando-as à morte celular, sendo também efetivo em outros tipos

de doenças tumorais, como as leucemias e linfomas, que são células malignas que expressam receptores para a IL-2. A interleucina *diftitox* foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), dos EUA, para o tratamento do Linfoma de Células T cutâneas (CTCL) no ano de 1999 (FDA, 2008).

Outros estudos realizados com a interleucina 2 mostram a produção de IL-2 como proteínas quiméricas recombinantes. Neste estudo, como exemplo, avaliam a ligação da IL-2 com um peptídeo truncado mutante de uma exotoxina de *Pseudomonas*, denominada IL2-PE66^{4Glu}, como uma molécula sintética capaz de matar células T ativadas, assim como, linfomas e células leucêmicas que expressam receptores para interleucina 2. Foram realizados testes *in vivo* em ratos e macacos, em que a IL2-PE66^{4Glu} foi injetada de forma intraperitoneal e intravenosa, respectivamente, mostrando que a IL2-PE66^{4Glu} apresenta uma atividade imunológica contra as células T ativadas, em animais testados, além de aumento de meia-vida quando comparados com outras moléculas, como a IL2-PE40 e as moléculas controle. Os resultados deste trabalho indicam que o IL2-PE66^{4Glu} poderia ser avaliado como um promissor agente imunossupressor, para o tratamento de doenças imunes humanas que expressam receptores de IL-2 (LORBERBOUM-GALSKI et al., 1990).

Outros estudos semelhantes foram realizados com o epítipo Bax, conjugado com a IL-2. A IL2-Bax, é uma nova proteína quimera apoptose-induzível de alta afinidade para receptores IL-2R, presentes em células com fibrose pulmonar. Ensaios *in vivo* desta molécula mostraram a capacidade de eliminar linfócitos infiltrados em pulmão, em resposta a uma indução por bleomicina, sendo significativamente atenuadas, mas este efeito não é acompanhado por diminuição da fibrose pulmonar (SIEGEL et al., 2005).

Embora o panorama mostrado pela utilização de interleucina-2 como proteína quimérica ou conjugada com compostos de origem bacteriana, mostra ter uma alta capacidade de supressão celular via necrose ou apoptose celular, principalmente em células T leucêmicas, ou em outras células anormais, causadoras de algum tipo de afeção crônica, em razão à sua resposta imunológica. Elas ainda representam um alto risco, devido à presença de epítopos de caráter antigênico bacteriano e podem, eventualmente, desencadear um fluxo de respostas imunológicas e processos inflamatórios, comprometendo a saúde dos pacientes tratados com estes tipos de medicamentos. Nesse cenário, nossa proposta de estudo é a

construção de um *Crosslinker* entre a interleucina 2 (IL-2) e um peptídeo apoptótico intracelular (pep5) derivado de célula humana. Estudos prévios sobre este peptídeo intracelular derivado da linhagem celular Hela, mostrou ter uma atividade biológica deletéria em 8 diferentes linhagens celulares humanas, quando ligado a um peptídeo penetrador TAT e encubado após 24 horas de tratamento (DE ARAUJO et al., 2014).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Produção da interleucina-2 murina e humana, utilizando o sistema de expressão bacteriano *E. coli* BL21-DE3.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Construção de plasmídeo, portando os genes codificando os produtos interleucina-2 murina (IL-2m) e humana (IL-2h);
- Expressão da proteína interleucina -2 murina (IL-2), utilizando o modelo bacteriano *E.coli* BL21-DE3;
- Purificação da proteína interleucina -2 murina a partir do extrato total bacteriano.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Otimização da sequência genética da interleucina-2 murina e humana

A partir das sequências genéticas da interleucina-2 murina (IL-2m) e humana (IL-2h), identificadas com os códigos P04351 e P60568, respectivamente, plotadas no banco de dados da *Uniprot*, foi realizada uma análise de bioinformática, para obter as sequências genéticas mais adequadas para a expressão de proteínas recombinantes de origem eucariontes, utilizando modelos de expressão bacterianos. Para esta avaliação, foi utilizada a base de dados acessível do sítio web da SIB *Swiss Institute of Bioinformatics*. Esta ferramenta, disponível online, nos permitiu construir a sequência codificante (RNA), correspondente à proteína codificada para os genes da interleucina-2 murina e humana. Logo após este processo, as sequências foram alinhadas com sequências da interleucina-2, reportadas em empresas de síntese de proteínas recombinantes, para observar o grau de identidade e similaridade de nossa sequência codificante. Finalmente, para a verificação correta do produto codificado nesta sequência, foi utilizada a ferramenta de tradução gênica o sítio web (Expasy.org/translate/) e o software de bioinformática SnapGENE.

1.3.2 Construção de plasmídeos com inserção da sequência da interleucina-2 murina e humana

Para a expressão das proteínas da interleucina-2 murina e humana, foi utilizada a cepa bacteriana BL-21 E3, derivada da *E. coli*. O primeiro passo foi a seleção do plasmídeo adequado para a expressão das proteínas. Para tal fim, utilizamos o vetor plasmidial pTE3a. Este vetor inclui três regiões essenciais para uma correta expressão de proteínas: a região origem de replicação (ORI); uma região de múltiplo clonagem MCS (multiple cloning site); e uma região promotora T7, seguido de um sítio de ligação com o ribossomo (RBS). Este vetor também porta o gene (amp^R) que codifica a enzima β -lactamase, que confere resistência à ampicilina como marca de seleção de cepas positivas. Assim, a sequência otimizada do gene da interleucina-2 (IL-2), foi inserida na região de múltiplo clonagem, próxima da região promotora T7, cuja característica particular é sua indução à expressão, utilizando o composto isopropil-b-D-galactosídeo (IPTG) como indutor artificial do operon Lac. Por último, os vetores portando os genes das proteínas da IL-2 murina e humana, pTE3a_IL-2m e pTE3_IL-2h, respectivamente, foram sintetizados pela empresa brasileira GenOne[©].

1.3.3 Sistema de expressão bacteriano e condições de crescimento

Para realizar a amplificação e clonagem do plasmídeo pTE3a_rIL-2m, utilizamos a linhagem bacteriana quimiocompetente DH-5 α de *E. coli*. Assim, de forma resumida, colocamos 2 μ L da solução, contendo uma concentração de 374,48 ng/ μ L de DNA plasmidial, em 50 μ L de suspensão bacteriana da linhagem DH-5 α . Após este processo, a mistura foi incubada em gelo por 10 minutos e, em seguida, colocada em banho quente a 42°C (graus célsius), por 2 minutos. Posteriormente, a mistura foi retirada e transferida para uma placa com meio sólido LB, contendo 1mg/mL de concentração do antibiótico ampicilina para seleção das colônias. Como controle da transformação, foi realizado o mesmo processo descrito anteriormente, utilizando a linhagem DH-5 α , mas, neste caso, sem o DNA plasmidial. Para verificação das colônias positivas, realizou-se uma segunda transferência, selecionando as colônias crescidas na primeira placa e transferindo-as para uma segunda placa, contendo o meio sólido LB e uma concentração de 1mg/mL de ampicilina. O próximo passo foi o crescimento de uma cultura, a partir de uma colônia transformada e portadora do plasmídeo pTE3a_rIL-2m para isolamento do vetor.

Assim, esta colônia foi crescida em meio líquido LB e uma concentração de 1mg/mL de ampicilina overnight, a uma temperatura de 37°C, a 120 rpm, sob agitação constante. Após este crescimento, a cultura bacteriana foi isolada pelo método de centrifugação, a 25°C, a 4000 rpm, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi coletado, para posterior isolamento do DNA plasmidial. Para purificação do vetor pTE3a_rIL-2m, utilizamos o kit The PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit, identificado com o código K210010, da empresa INVITROGEN®, obtendo assim, nosso vetor pTE3a_rIL-2m em uma alta concentração. O seguinte passo foi a expressão da proteína da interleucina-2 murina, utilizando como sistema de expressão a linhagem bacteriana BL21-DE3 de *E. coli*.

A partir do vetor pTE3a_rIL-2m isolado, realizamos novamente a transformação, mas neste caso, utilizando a linhagem bacteriana BL21-DE3 de *E. coli*. Esta cepa contém o prófago lambda DE3, que carrega o gene da RNA polimerase T7 e, sob o controle do promotor lacUV5, permite que a expressão da RNA polimerase T7 seja induzida com o composto IPTG. Também a cepa apresenta um baixo nível de produção de proteases, o que permite ter uma alta capacidade de expressão de proteína exógenas (JEONG et al., 2009).

Assim, de forma resumida, colocamos 2 μ L da solução, contendo uma concentração de 832 ng/ μ L de DNA plasmidial, em 50 μ L de suspensão bacteriano da linhagem BL21-DE3. Após este processo, a mistura foi incubada em gelo por 10 minutos, em seguida, colocada em banho quente, a 42°C (graus célsius), por 2 minutos. Posteriormente, a mistura foi retirada e transferida para uma placa com meio sólido LB, contendo 1mg/mL de concentração do antibiótico ampicilina, para seleção das colônias. Como controle da transformação, foi realizado o mesmo processo descrito anteriormente, utilizando a linhagem BL21-DE3, mas, neste caso, sem o DNA plasmidial. Para verificação das colônias positivas, realizou-se uma segunda transferência, selecionando as colônias crescidas na primeira placa e transferindo-as para uma segunda placa, contendo o meio sólido LB e uma concentração de 1mg/mL de ampicilina.

1.3.4 Obtenção de proteínas totais a partir da linhagem BL21-DE3

O próximo passo foi o crescimento de uma cultura, a partir de uma colônia transformada e portadora do plasmídeo pTE3a_rIL-2m, para a expressão da proteína da interleucina-2 murina. Assim, esta colônia foi crescida em meio líquido LB com ampicilina, com uma concentração de 1mg/mL, a uma temperatura de 37°C e uma agitação constante de 120 rpm, por minuto, até atingir uma DO de 0,4-0,5 nm. Este valor foi estimado na absorbância de 600 nm, com um comprimento de onda em um espectrofotômetro. Logo após este processo, colocou-se uma concentração final de 1mM de IPTG no meio de cultura, para indução da expressão da proteína na bactéria, com tempo máximo de crescimento de 15 horas. Logo após este período, o pellet bacteriano foi isolado pelo método de centrifugação, a 25°C, a 4000 rpm, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet coletado e ressuspensionado em solução BugBuster® de lises celular, para extração de proteínas totais, identificado com o código 70584 e fornecido pela empresa Merck©. A incubação com a solução de lise celular ficou, durante 1 hora, em agitação horizontal constante, a 25°C. Logo após este tempo, o lisado bacteriano foi centrifugado, a 11000 rpm, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e separado do precipitado.

1.3.5 Verificação da expressão da proteína IL-2m pelo método de eletroforese SDS-PAGE

Para determinar a expressão da proteína IL-2m, utilizamos o método de eletroforese, com gel desnaturante SDS-PAGE redutor; 5 µL da fração solúvel e 5 µL insolúvel, coletadas do lisado bacteriano BL21-DE3-pTE3a_rIL-2m e BL21-DE3, como controle. Assim, as amostras foram colocadas em tubos eppendorf, adicionando 2,5 µL de tampão de amostra, aquecidas a 95 °C, por 5 minutos. Posteriormente, as amostras preparadas foram transferidas para poços individuais, em gel SDS-PAGE, formado pelos seguintes compostos: Primeira fase (gel de separação 15%) 2 mL de dH₂O, 4 mL Tris-HCl 1M pH 8,8, 6,3 mL Acrilamida 30%, 120 µL PSA 10% , 160 µL de SDS 10% e 8µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina; Segunda fase (gel de empacotamento): 2 mL de dH₂O, 4 mL Tris-HCl 1M pH 6,8, 3,0 mL acrilamida 30%, 50 µL PSA 10% e 10 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina) e 2,5 mL H₂O destilada.

Para a corrida do gel, foi utilizado o equipamento *Power Pac Basic 300V* da *BioRad*, utilizando os seguintes parâmetros: 130 Volts, por 60-90 min. Logo após a eletroforese, o gel foi corado com solução corante de azul de coomassie (metanol 30%, ácido acético 10%, Coomassie Blue G-250 0,5% e H₂O destilada 10%) *overnight*, e depois, tratado com tampão descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e H₂O destilada 80 %).

1.3.6 Purificação da proteína IL-2m por cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Para separação da proteína interleucina-2, utilizou-se o método de exclusão de tamanho proteico (*Size Exclusion Chromatography* -SEC). Esta técnica por biocromatografia, fraciona as proteínas de acordo com a sua dimensão molecular, utilizando uma coluna com matriz de resina, com diferentes tamanhos de poros, que determinam a faixa de peso molecular das proteínas que podem ser separadas na cromatografia (Figura 2) (HALL, 2018; KUNJI et al., 2008). Assim, as proteínas de maior tamanho (agregados maiores), são eluídas primeiro, enquanto as proteínas menores (dímero e monômeros), permeiam pelos poros da coluna, eluindo ao final do fluxo contínuo da corrida cromatográfica.

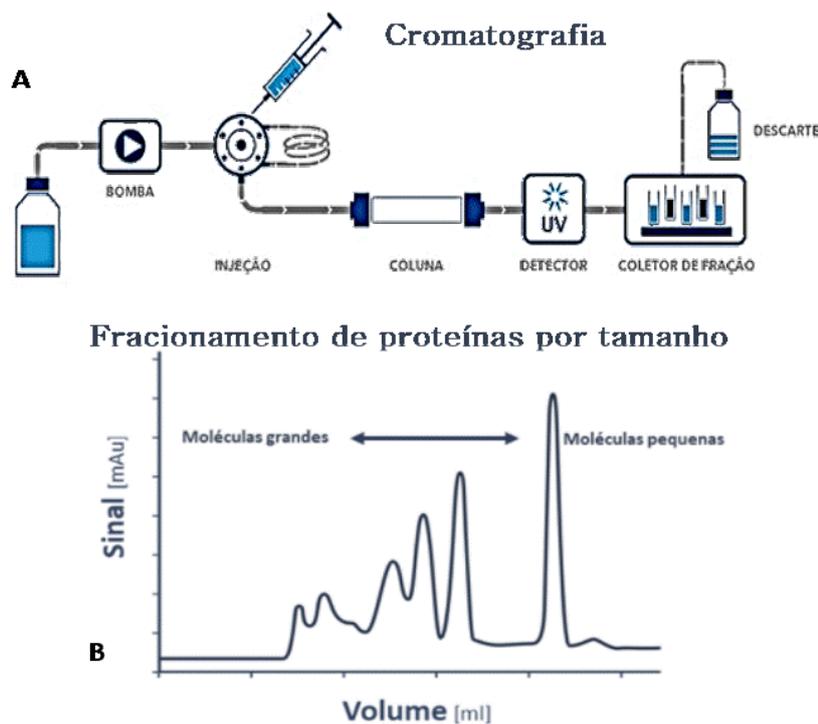


Figura 2. Esquema representativo de cromatografia de exclusão molecular (A), sistema utilizado para cromatografia de exclusão molecular. (B), cromatograma representativo mostrando o fracionamento de proteínas e o tempo de eluição por tamanho. Fonte: <https://comis.med.uvm.edu/>

A cromatografia de exclusão por tamanho, iniciou-se injetando 1 mL do extrato original, até completar 7 mL de amostra total, no sistema FPLC, usando o aparelho *ÅKTApurifier FPLC systems* da *GE Healthcare*®, para realização do processo de dessalinização e troca de solução tamponante, com a fase móvel de tampão fosfato 0,1 M, KH_2PO_4 0,1 M, K_2HPO_4 0,1 M e com pH de 7,6, na coluna *HiTrap® Desalting Columns*, de 5 x 5 mL. Logo após este passo, utilizamos a coluna de resina super sephadex G-50 (*Sigma*®), de 1,5 x 20 cm, para a separação das proteínas do extrato original bacteriano. Assim, a coluna super sephadex G-50, foi pré-lavada e equilibrada com o tampão fosfato 0,1 M, KH_2PO_4 0,1 M, K_2HPO_4 0,1 M e com pH de 7,6. Em seguida, foram injetados 7 mL - injetando 1 mL de amostra de cada vez - no sistema FPLC. Finalmente, as frações 15, 16 e 17 foram coletadas, nas quais a proteína IL-2 foi eluída e detectada (tamanho 17,7-18 kD), a partir da curva de absorvância (UV), a 280 nm. Para a concentração total da proteína IL-2 presente nas frações coletadas, foram precipitadas utilizando o programa de 30°C, a 11000 rpm, de 10 a 12 horas, no concentrador a vácuo rotativo (*5301 Vacuumconcentrator*®), da marca *Eppendorf*®. Por último, as amostras foram concentradas para um volume final de 0,6 mL, e dialisadas em meio aquoso PBS 1X com pH 7,4, para posterior avaliação por eletroforese SDS-PAGE.

Nas análises posteriores de alinhamento de sequências peptídicas, com o programa bioinformática *ClustalW2* de EMBL-EBI, comparando a IL-2 murina com a IL-2 humana, foram observadas uma identidade de 57,8% e uma similaridade de 72,3% entre as sequências. Dentre as regiões conservadas, está presente o peptídeo sinal na extremidade amino terminal, uma treonina na posição 23, uma ponte de bissulfeto entre duas cisteínas 92-140 na IL-2 murina, e 78 -155 cisteínas na IL-2 humana (Figura 4). Este estudo se relaciona com dados experimentais reportados na IL-2 humana (JU et al., 1987), em que se demonstrou que existem três regiões de importância para a atividade biológica da molécula, constituindo estas regiões: aminoácidos 1 a 20 (peptídeo sinal), aminoácidos de 121 a 131 e as cisteínas 92 e 140, elementos vitais para a interação com receptores IL-2R.

1	MYSMQLASCVTLLVLLVNSAP	T	SSSTSSTAE	AQQQQQQQQQQQHLEQ	50				
	. . : . : . : .								
1	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAP	T	SSST	-----KKTQLQLEH	36				
51	LLMDLQELLSRMENYRNLKLP	RMLTFK	FYLPKQATEL	KDLQ	C	LEDELGPL	100		
	: . : : . . . : . . : : . : .								
37	LLLDLQMI	LNGINNYKNPKL	TRMLTFK	FYMPKKATEL	KHLQ	C	LEEELKPL	86	
101	RHVL	DLTQSKSFQLEDAENFISNIRVT	VV	KLKGS	DNT	F	C	QFDDESATV	150
	. . : . : : : : . . : . . : :								
87	EEVLNLAQSKNFHLR-PRDLISNIN	VIVLEL	KGSET	TFM	C	EYADETATIV	135		
151	DFLRRWIA	FCQSIIST	166						
	: . .								
136	EFLNRWIT	FCQSIIST	151						

Figura 4. Alinhamento das sequências, IL-2 murina e a IL-2 humana. Sítio de glicosilação (azul). Formação de ponte bissulfeto entre duas cisteínas (Amarelo). Região relevante para atividade proteica (quadro vermelho). Cisteína para ligação química com o polímero (seta verde)

Considerando que a interleucina-2 apresenta uma atividade pleiotrópica, é de vital importância análises na sua estrutura para conhecer os sítios adequados de ligação com outras moléculas, de forma que não afete a integridade da proteína e sua atividade. Os estudos de topologia e alinhamento, nos permitiu visualizar a fração mais apropriada para acoplamento químico com o polímero hetero-bifuncional (mPEG).

A cisteína na posição 160 da sequência peptídica, na IL-2 murina, e a posição 145, na IL-2 humana, está associada com estudos de mutagênese sítio específica, onde se exibe que este aminoácido próximo à região carboxila terminal, encontra-se em uma fração não

essencial para a proteína (JU et al., 1987), razão pela qual foi considerada como o lugar adequado para a conjugação. Por outro lado, a cisteína contém um grupo SH (também chamado Grupo tiol), caracterizado por ser grupo reativo para uma das suas extremidades do polietilenoglicol (mPEG), formando a peguilação de IL-2-mPEG.

1.4.2 Mapa de tradução de códons de frequências de *E. coli* K12 para genes IL-2m e IL-2m

1	MetTyrArgMetGln	LeuLeuSerCysIle	AlaLeuSerLeuAla	LeuValThrAsnSer
1	ATGTATAGGATGCAG	TTGTTGAGGTGTATA	GCGTTGAGGTGGCG	TTGGTGACGAATAGG
	CC A	A C AC ATCA	C T AC ATCAC	A A C A A A CTCA
	T	T T T	C T T T T	T T T T
	C	C C C	C C C C C	C C C C
21	AlaProThrSerSer	SerThrLysLysThr	GlnLeuGlnLeuGlu	HisLeuLeuLeuAsp
61	GCGCCGACGAGGAGG	AGGACGAAGAAGACG	CAGTTGCAGTTGGAG	CATTTGTTGTTGGAT
	A A ATCATCA	TCA A A A	AC A AC A A	CC AC AC A C
	T T T T T	T T T	T T T	T T T
	C C C C C	C C C	C C C	C C C
41	LeuGlnMetIleLeu	AsnGlyIleAsnAsn	TyrLysAsnProLys	LeuThrArgMetLeu
121	TTGCAGATGATATTG	AATGGGATAAATAAT	TATAAGAATCCGAAG	TTGACGAGGATGTTG
	C A A TC A	C A T C C	C A C A A C A	AC A C A
	T C T	T C	T T T	T T T
	C C	C C	C C C	C C C C
61	ThrPheLysPheTyr	MetProLysLysAla	ThrGluLeuLysHis	LeuGlnCysLeuGlu
181	ACGTTTAAAGTTTTAT	ATGCCGAAGAAGGCG	ACGGAGTTGAAGCAT	TTGCAGTGTTTGGAG
	A C A C C	A A A A	A AC A A C	C A A CC A A
	T T T	T T T	T T T	T T T
	C C C	C C C	C C C	C C C
81	GluGluLeuLysPro	LeuGluGluValLeu	AsnLeuAlaGlnSer	LysAsnPheHisLeu
241	GAGGAGTTGAAGCCG	TTGGAGGAGGTGTTG	AATTTGGCGCAGAGG	AAGAATTTTCATTTG
	A AC A A A C A	A A AC A	CC A A ATCA	A C C CC A
	T T T	T T T	T T T	T T T
	C C C	C C C	C C C	C C C
101	ArgProArgAspLeu	IleSerAsnIleAsn	ValIleValLeuGlu	LeuLysGlySerGlu
301	AGGCCGAGGGATTTG	ATAAGGAATATAAAT	GTGATAGTGTGGAG	TTGAAGGGGAGGGAG
	C A AC A CC A	TTCA C T C	A T AC A A C A	A A ATCA A
	T T T T	C T C	T C T T	T T T
	C C C C	C C C	C C C C	C C C C
121	ThrThrPheMetCys	GluTyrAlaAspGlu	ThrAlaThrIleVal	GluPheLeuAsnArg
361	ACGACGTTTATGTGT	GAGTATGCGGATGAG	ACGGCGACGATAGTG	GAGTTTTTGAATAGG
	A A C C	A C A C A	A A A T A	A CC A CC A
	T T T	T T T	T T T C T	T T T
	C C C	C C C	C C C C	C C C C
141	TrpIleThrPheCys	GlnSerIleIleSer	ThrLeuThr	
421	TGGATAACGTTTTTGT	CAGAGGATAATAAGG	ACGTTGACG	
	T A C C	ATCA T TTCA	AC A A	
	C T T	T C C T	T T T	
	C C C	C C C	C C C	

Figura 5. Códoms de frequência da linhagem bacteriana K12 de *E. coli* para a sequência da IL-2 humana (IL-2h) usando o programa de bioinformática da base de dados do website www.geneinfinity.org

1 MetTyrSerMetGln LeuAlaSerCysVal ThrLeuThrLeuVal LeuLeuValAsnSer												
1	ATGTATAGGATGCAG	TTGGCGAGGTGTGTG	ACGTTGACGTTGGTG	TTGTTGGTGAATAGG								
	CTCA	A C A	ATCA C A	AC A AC A A	C AC A A	CTCA						
	T	T T T	T	T T T T T	T T T T T	T						
	C	C C C	C	C C C C C	C C C C C	C						
21 AlaProThrSerSer SerThrSerSerSer ThrAlaGluAlaGln GlnGlnGlnGlnGln												
61	GCGCCGACGAGGAGG	AGGACGAGGAGGAGG	ACGGCGGAGGCGCAG	CAGCAGCAGCAGCAG								
	A A ATCATCA	TCA ATCATCATCA	A A A A A	A A A A A								
	T T T T T	T T T T T	T T T	T T T								
	C C C C C	C C C C C	C C C	C C C								
41 GlnGlnGlnGlnGln GlnHisLeuGluGln LeuLeuMetAspLeu GlnGluLeuLeuSer												
121	CAGCAGCAGCAGCAG	CAGCATTGGAGCAG	TTGTTGATGGATTTG	CAGGAGTTGTTGAGG								
	A A A A A	A CC A A A	C AC A CC A	A AC AC ATCA								
		T	T T	T T T								
		C	C C	C C C								
61 ArgMetGluAsnTyr ArgAsnLeuLysLeu ProArgMetLeuThr PheLysPheTyrLeu												
181	AGGATGGAGAATTAT	AGGAATTTGAAGTTG	CCGAGGATGTTGACG	TTAAGTTTTATTTG								
	C A A C C	C A CC A AC A	AC A C A A	C A C CC A								
	T	T T	T T T	T T T								
	C	C C	C C C	C C C								
81 ProLysGlnAlaThr GluLeuLysAspLeu GlnCysLeuGluAsp GluLeuGlyProLeu												
241	CCGAAGCAGGCGACG	GAGTTGAAGGATTTG	CAGTGTGGAGGAT	GAGTTGGGGCCGTTG								
	A A A A A	AC A A CC A	A CC A A C	AC A A AC A								
	T	T T	T	T T T T								
	C	C C	C	C C C C								
101 ArgHisValLeuAsp LeuThrGlnSerLys SerPheGlnLeuGlu AspAlaGluAsnPhe												
301	AGGCATGTGTTGGAT	TTGACGCAGAGGAAG	AGGTTTCAGTTGGAG	GATGCGGAGAATTTT								
	C A C AC A C	C A A ATCA A	TCA C AC A A	C A A C C								
	T	T T T	T T T	T T T T								
	C	C C C	C C C	C C C C								
121 IleSerAsnIleArg ValThrValValLys LeuLysGlySerAsp AsnThrPheGluCys												
361	ATAAGGAATATAAGG	GTGACGGTGGTGAAG	TTGAAGGGGAGGGAT	AATACGTTTGAGTGT								
	TTCA C TC A	A A A A A	C A A ATCA C	C A C A C								
	C T C T	T T T T	T T T	T T								
	C	C C C C	C C C	C C C								
141 GlnPheAspAspGlu SerAlaThrValVal AspPheLeuArgArg TrpIleAlaPheCys												
421	CAGTTTGATGATGAG	AGGGCGACGGTGGTG	GATTTTTTGAGGAGG	TGGATAGCGTTTTGT								
	A C C C A	TCA A A A A	C CC AC AC A	T A C C								
		T T T T T	T T T	T T								
		C C C C C	C C C	C C C								
161 GlnSerIleIleSer ThrSerProGln												
481	CAGAGGATAATAAGG	ACGAGGCCGCAG										
	ATCA T TTCA	ATCA A A										
	T C C T	T T T										
	C	C C C										

Figura 6. Códon de frequência da linhagem bacteriana K12 de *E. coli* para a sequência da IL-2 murina (IL-2m) usando o programa de bioinformática da base de dados do website www.geneinfinity.org

1.4.3 Otimização das sequências nucleotídicas dos genes *IL-2m* e *IL-2h* para expressão em Bactéria

Devido às origens eucariontes dos genes da interleucina-2 murina (*IL-2m*) e da interleucina-2 humana (*IL-2h*), foram otimizados os códons de nucleotídeos destes genes. O programa da base de dados da *geneinfinity.org*, nos permitiu realizar as análises das sequências, por meio da tradução e comparação dos códigos codificantes destes genes, com códons de frequência da linhagem bacteriana K12, derivada de *E. coli*. Na figura 5, observamos a sequência nucleotídica para o gene da interleucina-2 humana (*IL-2h*), que compreende um total de 459 pares de base, codificando uma sequência peptídica de 153 aminoácidos. Podemos ressaltar também, as possíveis trocas de nucleotídeos nos códons para cada três pares de bases no fragmento total de DNA. Identificamos também, na sequência peptídica, a cisteína livre na posição 131, como alvo específico para pegulação nesta proteína.

<u>Interleukin 2 (IL-2) HUMAN</u>														
ATG	TAT	AGG	ATG	CAG	TTG	TTG	AGG	TGT	ATA	GCG	TTG	AGG	TTG	GCG
TTG	GTG	ACG	AAT	AGG	GCG	CCG	ACG	AGG	AGG	AGG	ACG	AAG	AAG	ACG
CAG	TTG	CAG	TTG	GAG	CAT	TTG	TTG	TTG	GAT	TTG	CAG	ATG	ATA	TTG
AAT	GGG	ATA	AAT	AAT	TAT	AAG	AAT	CCG	AAG	TTG	ACG	AGG	ATG	TTG
ACG	TTT	AAG	TTT	TAT	ATG	CCG	AAG	AAG	GCG	ACG	GAG	TTG	AAG	CAT
TTG	CAG	TGT	TTG	GAG	GAG	GAG	TTG	AAG	CCG	TTG	GAG	GAG	GTG	TTG
AAT	TTG	GCG	CAG	AGG	AAG	AAT	TTT	CAT	TTG	AGG	CCG	AGG	GAT	TTG
ATA	AGG	AAT	ATA	AAT	GTG	ATA	GTG	TTG	GAG	TTG	AAG	GGG	AGG	GAG
ACG	ACG	TTT	ATG	TGT	GAG	TAT	GCG	GAT	GAG	ACG	GCG	ACG	ATA	GTG
GAG	TTT	TTG	AAT	AGG	TGG	ATA	ACG	TTT	TGT	CAG	AGG	ATA	ATA	AGG
ACG	TTG	ACG	TGA											
<u>Interleukin 2 (IL-2) MURINE</u>														
ATG	TAT	AGC	ATG	CAG	CTG	GCG	AGC	TGC	GTG	ACC	CTG	ACC	CTG	GTG
CTG	CTG	GTG	AAC	AGC	GCG	CCG	ACC	AGC	AGC	AGC	ACC	AGC	AGC	AGC
ACC	GCG	GAA	GCG	CAG										
CAG	CAT	CTG	GAA	CAG	CTG	CTG	ATG	GAT	CTG	CAG	GAA	CTG	CTG	AGC
CGC	ATG	GAA	AAC	TAT	CGC	AAC	CTG	AAA	CTG	CCG	CGC	ATG	CTG	ACC
TTT	AAA	TTT	TAT	CTG	CCG	AAA	CAG	GCG	ACC	GAA	CTG	AAA	GAT	CTG
CAG	TGC	CTG	GAA	GAT	GAA	CTG	GGC	CCG	CTG	CGC	CAT	GTG	CTG	GAT
CTG	ACC	CAG	AGC	AAA	AGC	TTT	CAG	CTG	GAA	GAT	GCG	GAA	AAC	TTT
ATT	AGC	AAC	ATT	CGC	GTG	ACC	GTG	GTG	AAA	CTG	AAA	GGC	AGC	GAT
AAC	ACC	TTT	GAA	TGC	CAG	TTT	GAT	GAT	GAA	AGC	GCG	ACC	GTG	GTG
GAT	TTT	CTG	GCG	CGC	TGG	ATT	GCG	TTT	TGC	CAG	AGC	ATT	ATT	AGC
ACC	AGC	CCG	CAG	TGA										

Figura 7. Sequências nucleotídicas otimizadas do gene da interleucina-2 murina (*IL-2m*) e humana (*IL-2h*) a partir dos códons de frequência da linhagem bacteriana K12 de *E. coli* usando o programa de bioinformática da base de dados do website www.geneinfinity.org

Por outro lado, na Figura 6, observamos a sequência nucleotídica do gene que codifica a interleucina-2 murina (IL-2h), que compreende um total de 507 pares de bases, codificando uma sequência peptídica de 169 aminoácidos. Podemos ressaltar também, as possíveis trocas de nucleotídeos nos códons, para cada três pares de bases, no fragmento total de DNA. Identificamos também, na sequência peptídica, a cisteína livre na posição 141, como alvo específico para peguilação nesta proteína.

Desta forma, obtivemos uma sequência otimizada do DNA derivado dos genes originais eucariontes, dos genes murino e humano da interleucina-2. Na Figura 7, podemos observar um total de 169 códons para o fragmento codificante do gene otimizado para interleucina-2 murina, e 153 códons para o fragmento codificante para o gene otimizado da interleucina-2 humana, adequados para a inserção no vetor de expressão selecionado, mostrando o códon de iniciação e códon de terminação para cada uma das sequências.

1.4.4 Construção dos vetores pET3a_rIL-2m e pET3a_rIL-2h

O vetor pET3a compreende um DNA circular de 4640 pares de bases, contendo uma região de origem da replicação entre as bases 2813 e 3401, para um total de 589 pb (5'→3'); um sítio codificante do gene Rop, entre as bases 2192 e 2383 (192 pb), expressando uma proteína de 7 kDa; um sítio codificante, incluindo sua região promotora do gene AmpR, entre as bases 3572 e 4537 (966pb), expressando a enzima β -lactamase; a região promotora da RNA polimerase T7, localizada entre as bases 613 e 631 (19 pb) e o sítio de ligação de ribossomo (RBS), localizado entre as bases 560 e 565 (6 pb) (Figura 8^a). O fragmento do gene otimizado da interleucina-2 murina, foi inserido entre as bases 36 e 485 do vetor pET3a, em frente ao sítio de ligação do ribossomo (Figura 8B). Da mesma forma, o fragmento do gene otimizado da interleucina-2 humana, foi inserido entre as bases 36 e 437 do vetor pET3a., gerando proteínas de tamanho molecular de 17,3 e 15,5 kDa.

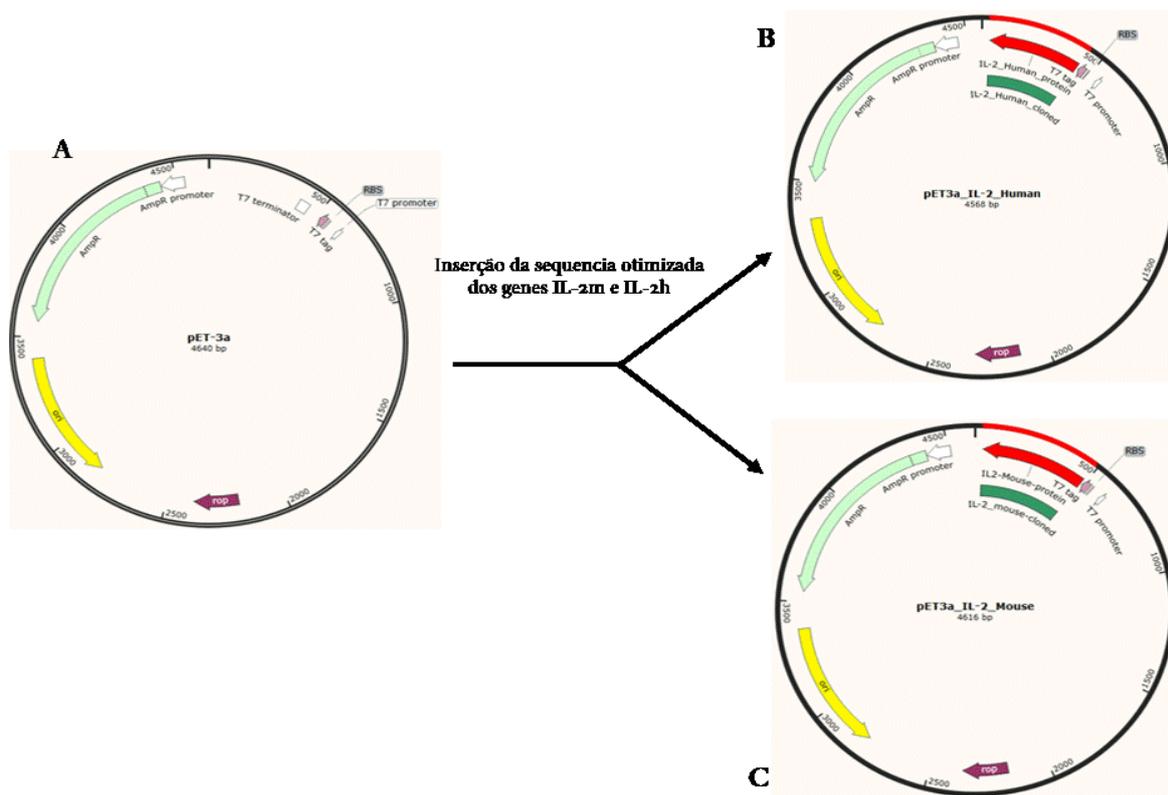


Figura 8. Construção de vetores de expressão para rIL-2m. (A) vetor pET3a, (B) vetor pET3a com a inserção da sequência otimizada do gene interleucina-2 humana IL-2h e (C) vetor pET3a com a inserção da sequência otimizada do gene interleucina-2 murina IL-2h.

1.4.5 Expressão da proteína recombinante interleucina -2 murina (rIL-2m) na cepa BL21-DE3

Após extração das proteínas totais, presentes no crescimento bacteriano da cepa BL21-DE3, portando o plasmídeo pET3a-rIL-2m, verificamos, por meio de gel de poliácridamida em eletroforese SDS-PAGE, a fração de banda correspondente à expressão da proteína interleucina-2 murina (rIL-2m). Na Figura 9, observamos 4 amostras corridas, onde as colunas 1 e 2 do gel correspondem ao extrato de proteínas totais da cepa BL21-DE3, portando o plasmídeo pET3a-rIL-2m, induzida com IPTG 1,0 e 1,5 mM, respectivamente. Nestas duas colunas, detectamos a expressão da proteína rIL-2m na fração próxima aos 20 kDa, indicado pelo padrão de peso molecular (WM). Entretanto, na coluna 3, observamos o extrato de proteínas totais da cepa BL21-DE3 sem o plasmídeo como controle negativo (sem expressão da banda desejada). Por outro lado, na coluna 4 do gel, observamos o extrato de proteínas totais da fase insolúvel, onde notamos, também, a presença da fração correspondente à expressão da proteína rIL-2m em uma alta proporção.

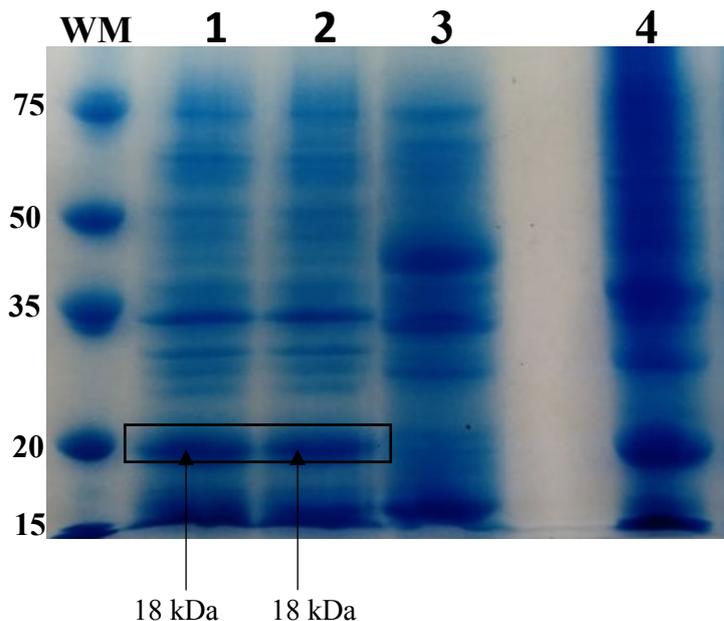


Figura 9. Gel de poliacrilamida de eletroforese SDS-PAGE para extrato total proteico bacteriano. (WM) padrão de peso molecular, (1) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,0 mM IPTG, (2) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,5 mM IPTG. (3) extrato total proteico da cepa BL21-E3 (controle negativo) e (4) extrato total proteico da cepa BL21-E3[pET3a-rIL-2m] com indução de 1,0 mM IPTG na fase insolúvel.

1.4.6 Purificação da proteína recombinante interleucina -2 murina (rIL-2m)

Após identificação da expressão da interleucina-2 murina no extrato total bacteriano, realizamos o processo de separação e purificação da proteína interleucina-2 murina, pelo método de exclusão por tamanho molecular SEC. Na figura 10, podemos observar 3 cromatogramas, que identificam as frações eluídas após corrida cromatográfica. No primeiro gráfico (Figura 10A), obtivemos a separação das proteínas totais de um 1 mL injetado na fase móvel tampão fosfato 0,1M, KH_2PO_4 0,1 M, K_2HPO_4 0,1 M, com pH de 7,6, com uma faixa de fluxo 0,75 mL/min e uma detecção de comprimento de onda UV (280 nm). Na primeira corrida, foram eluídas 3 separações: o pico de 499,797 mAU, frações 2,3 e 4; o pico 1790,023 mAU, frações 7-13 como agregados maiores; e o pico de 1099,954 mAU, frações 15 e 16, correspondendo à nossa proteína de interesse (rIL-2m). O grau de pureza obtido foi de 21,29%, com retenção de 15,98 min, e uma resolução de 0,87 para a rIL-2m.

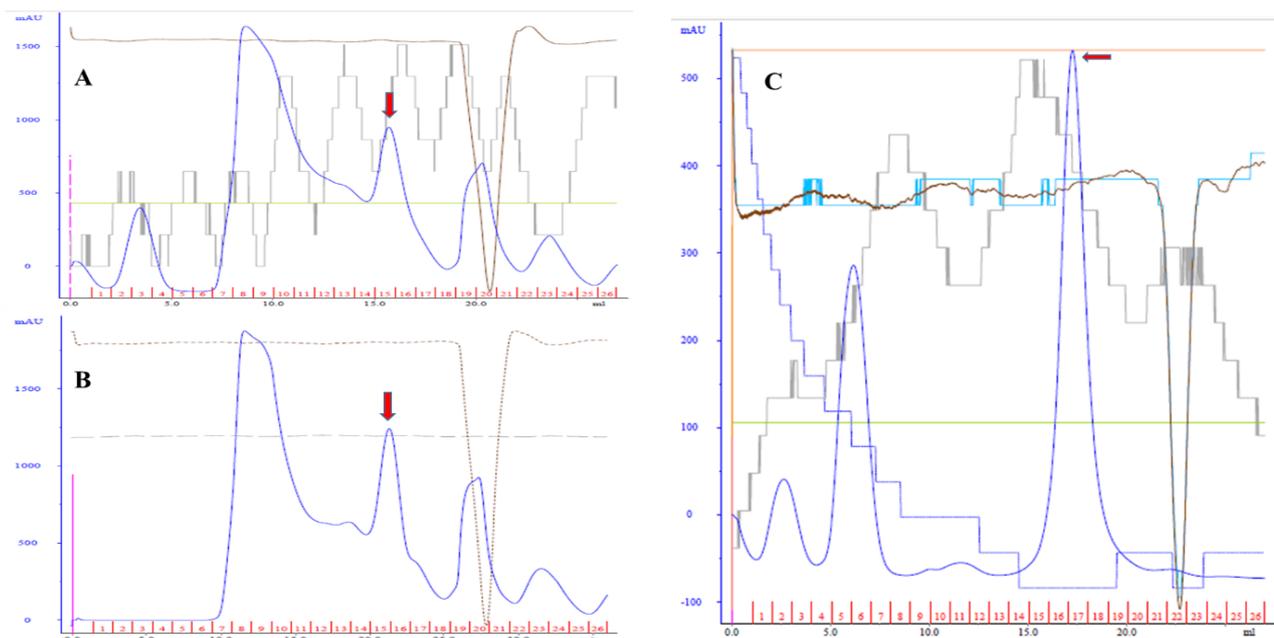


Figura 10. Cromatogramas correspondentes a injeção de 1 mL de extrato proteico total. (A) cromatograma com faixa de fluxo de 0,75 mL/min com 3 separações, representando a última separação (seta vermelha) a eluição da rIL-2m. (B) cromatograma com faixa de fluxo de 0,5 mL/min com 2 separações, representando a última separação (seta vermelha) a eluição da rIL-2m. (C) cromatograma da injeção das frações 15 e 16 com faixa de fluxo de 1 mL/min (seta vermelha) a eluição da rIL-2m.

Da mesma forma, no cromatograma (Figura 10B), observamos a separação das proteínas totais de um 1 mL injetado na fase móvel tampão fosfato 0,1M, KH_2PO_4 0,1 M, K_2HPO_4 0,1 M, com pH de 7,6, com uma faixa de fluxo 0,5 mL/min e uma detecção de comprimento de onda UV (280 nm). Nesta corrida, detectamos 3 separações, que representam também agregados maiores: no pico 1726,968 mAU, as frações 7-12: o pico 1726,968 mAU, as frações 13-14; e o pico de 988,761 mAU, as frações 15 e 16, sendo estas últimas frações, a eluição da nossa proteína de interesse (rIL-2m). O grau de pureza obtido foi de 18,21%, com retenção de 15,98 min, e uma resolução de 1,63 para a rIL-2m.

No gráfico 9C, foi realizada uma segunda corrida após injeção das frações 15 e 16, com uma faixa de fluxo de 1 mL/min, onde obtivemos um valor de 574,32 mAU, que corresponde a um grau de pureza de 93,85%, com retenção de 17,26 min, e resolução de 1,82 para a interleucina -2 recombinante murina.

1.4.7 Verificação da purificação da proteína rIL-2m

O seguinte passo, foi confirmar por meio da eletroforese de SDS-PAGE as frações f15 e f16 eluídas na cromatografia os níveis de pureza das amostras. Na figura 11, observamos duas colunas, contendo as amostras da proteína interleucina-2 murina eluída tanto na fração 15 como na fração 16. Este gráfico assim, permite constatar os níveis baixos de pureza após a primeira corrida cromatográfica. Por outro lado, notamos também uma perda proteica alta, aproximada a mais do que o 50% presente na amostra quando comparada com o estrato total inicial, sendo necessário a realização de uma segunda corrida cromatográfica para obtenção de um maior grau de pureza.

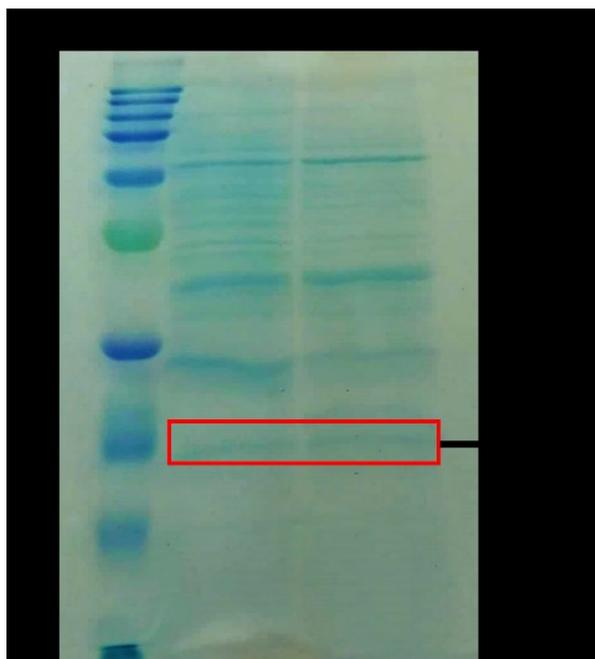


Figura 11. Gel de poliacrilamida de eletroforese SDS-PAGE das frações 15 e 16. (WM) padrão de peso molecular, (1) fração 15 coletada na primeira corrida cromatográfica com fluxo de 1 mL/min, (2) fração 16 coletada na primeira corrida cromatográfica com fluxo de 1 mL/min.

1.5 DISCUSSÕES

O conhecimento prévio das estruturas de proteínas serve como base fundamental na identificação das propriedades exibidas para determinada função biológica. Nesse sentido, a avaliação alcançada através da análise *in silico* da sequência peptídica da interleucina-2 murina, nos permite analisar diferenças estruturais ao longo da isomorfa proteica, na qual destacamos a presença de um peptídeo sinal no começo da porção N-terminal (20 aminoácidos), uma O-glicosilação na posição 23, característica importante em moléculas moduladoras de vias de sinalização em células do sistema imunológico (FERREIRA et al., 2018; J., 2012; TIAN; HOFFMAN; TEN HAGEN, 2012). Também foi identificada uma região de poli- L-glutaminas (12 glutaminas de extensão), sendo esta região, presente na IL-2 murina, entretanto, ausente em outras IL-2, incluindo a humana. É interessante notar que as regiões ricas em glutaminas estariam associadas à interação com fatores de transcrição, favorecendo um alto nível de afinidade por este tipo de proteínas (STOTT et al., 1995). Esta característica, anteriormente mencionada, e o 57,8% de identidade da proteína, comparada com a proteína IL-2 humana, explicaria, em certo ponto, a atividade cruzada mostrada por a IL-2 murina em alguns estudos, sendo ainda um assunto pouco compreendido (MOSMANN et al., 1987).

Dentre as análises de topologia e alinhamento entre a IL-2 murina e IL-2 humana, identificamos a presença de três cisteínas, em ambas as sequências. Duas destas cisteínas encontram-se, formando parte de uma ligação de ponte de bissulfeto entre elas. Na IL-2 murina, na posição 92-140, e na IL-2 humana, na posição 78-155 da sequência peptídica. A terceira cisteína não mostrou ter um caráter essencial nas propriedades funcionais da molécula. Tanto para IL-2 murina, quanto como para a IL-2 humana, este aminoácido representa um lugar potencial para realizar uma conjugação química. Isto se deve ao fato que a cisteína apresenta um grupo tiol (-SH) na sua cadeia molecular, o qual reage de forma similar ao grupo funcional sulfeto de hidrogênio (H₂S) com aminas aromáticas p-substituídas, favorecendo a adição de outras estruturas moleculares na sua própria molécula, a partir da interação com este grupo químico (LEICHERT; JAKOB, 2004; POOLE, 2015; ROY, 2000).

Como estratégia de produção das proteínas IL-2 murina e IL-2 humana, ativas em sistemas de expressão bacterianos, devemos considerar a otimização da sua sequência original, em função das diferenças dos processos de transcrição, transdução, formação e a obtenção das proteínas alvo, sejam funcional e estruturalmente análogas (MAURO, 2018; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). Em nossos estudos, fizemos uma análise, na qual avaliamos a sequência de aminoácidos original das proteínas IL-2 murina e a IL-2 humana, de modo a conferir os códons correspondentes para cada aminoácido do total da sequência peptídica. Assim, através de uma transdução reversa da sequência original, examinamos os códons gerados (cDNA) no programa de bioinformática, e os comparamos com o mapa de frequência de códons (online), para expressão em bactéria, utilizando como modelo a linhagem bacteriana K12 de *E. coli*, onde valoramos a combinação de códons mais adequada (Figura 7), para a expressão das proteínas recombinantes no sistema bacteriano BL21-DE3, obtendo 462 pb (154 códons) para a IL-2 murina e 510 pb (170 códons) para a IL-2 humana. Estas sequências foram finalmente inseridas no vetor plasmidial pET3a como veículo de expressão. Estudos prévios, a partir do uso deste vetor, obtiveram uma super expressão de interferon-gama humano recombinante na linhagem bacteriana BL21-DE3 (KHALILZADEH et al., 2003).

Entretanto, em outros estudos, mostraram também ter uma alta taxa de produção de proteína de membrana, utilizando o mesmo modelo bacteriano (DILWORTH et al., 2018). Em contraste, a nossa produção de IL-2 murina foi limitada (0,035 mg/mL). Isto devido a uma sobre expressão proteica e a uma baixa capacidade de densidade celular, levando a formação a altos níveis de corpos de inclusão da proteína (fase insolúvel) - como observado na Figura 9 - após 15 horas de crescimento microbiano, impedindo um maior rendimento de produção da proteína em fase solúvel. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos em estudos, nos quais usaram como modelo de expressão a linhagem bacteriana BL21-DE3, mostrando que a toxicidade de proteínas exógenas e a propensão a agregação seriam fatores determinantes que influenciariam os níveis de dobramento, favorecendo, assim, a formação de agregados em esta bactéria (KOPP et al., 2019; RAMKUMAR et al., 2017).

Por outro lado, o perfil cromatográfico para a rIL-2m, obtido através da primeira corrida do extrato total de proteínas, na coluna sepharose G-50, com uma faixa de fluxo de 0,75

mL/min, mostrou um grau de pureza de 21,29%, com retenção de 15,98 min e resolução de 0,87, enquanto, para faixa de fluxo de 0,75 mL/min, mostrou ter um grau de pureza de 18,21%, com retenção de 15,98 min e resolução de 1,63. Teve uma diferença da pureza da primeira cromatografia, utilizando duas faixas de fluxos diferentes, para a segunda cromatografia, utilizando unicamente as frações 15 e 16, já que nesta última o grau de pureza foi de 93,85%, com retenção de 17,26 min e uma resolução de 1,82 no fracionamento da proteína IL-2 murina. Portanto, consideramos que este último método, pode ser determinante na obtenção de um alto grau de pureza e uma maior resolução da separação da interleucina-2 recombinante murina.

1.6 CONCLUSÕES

- Foram obtidas as sequências nucleotídicas 462 pb (154 códons) para a interleucina-2 murina, e 510 pb (170 códons) para a interleucina-2 humana, para expressão de proteínas recombinantes, com sequências otimizadas sistema bacteriano BL21-DE3 derivada de *E. coli*, a partir da avaliação em análises de bioinformática e, finalmente, inseridas no vetor plasmidial pET3a como veículo de expressão.
- Identificamos uma cisteína na posição 141 da sequência peptídica do gene da interleucina-2 murina, e cisteína na posição 131 da sequência peptídica do gene da interleucina-2 humana. Este aminoácido representou o lugar adequado para realizar a conjugação química com o grupo maleimide, presente no polímero MAL-PEG-NH₂, em ambas moléculas.
- A nossa produção de IL-2 murina foi limitada (0,035 mg/mL). Isto se deve a uma sobre expressão proteica e uma baixa capacidade de densidade celular, levando a formação de corpos de inclusão (fase insolúvel) em altos níveis da proteína, após 15 horas de crescimento microbiano, impedindo um maior rendimento de produção da proteína em fase solúvel.
- O perfil cromatográfico da primeira corrida para a rIL-2 murina, foi de 21,29% e 18,21% de grau de pureza, obtido através dos fluxos 0,75mL/min e 0,50 mL/min do extrato total de proteínas na coluna sepharose G-50. Na segunda corrida, injetado 1 mL das frações 15 e 16 obtidas na primeira corrida, obteve-se um grau de pureza de 93,85%, com faixa de fluxo de 1mL/min e tempo de retenção de 17,26 min.

1.7 REFERÊNCIAS

- BALLESTEROS-TATO, A. **Beyond regulatory T cells: The potential role for IL-2 to deplete T-follicular helper cells and treat autoimmune diseases** *Immunotherapy*, 2014.
- BALUNA, R.; VITETTA, E. S. **Vascular leak syndrome: A side effect of immunotherapy** *Immunopharmacology*, 1997.
- BARCLAY, A. N. et al. IL-2R. In: **The Leucocyte Antigen FactsBook**. [s.l: s.n.]. p. 486–489.
- Basic & Clinical Immunology. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 3, p. 371, 2013.
- BROCKER, C. et al. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. **Human Genomics**, v. 5, n. 1, p. 30–55, 2010.
- CAVAILLON, J. M. [Interleukins and inflammation]. **Pathologie-biologie**, v. 38, n. 1, p. 36–42, 1990.
- D’HENNEZEL, E. et al. **The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome** *Journal of Medical Genetics*, 2012.
- DE SAINT BASILE, G. et al. Defective human interleukin 2 receptor gamma chain in an atypical X chromosome-linked severe combined immunodeficiency with peripheral T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 20, p. 9466–9470, 2006.
- DINARELLO, C. et al. **IL-1 family nomenclature** *Nature Immunology*, 2010.
- DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. Interleukins. **Annu Rev Med**, v. 37, p. 173–178, 1986.
- DUPAGE, M.; BLUESTONE, J. A. **Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease** *Nature Reviews Immunology*, 2016.
- DURAND, D. B. et al. Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. **Molecular and cellular biology**, v. 8, n. 4, p. 1715–24, 1988.
- ELKASSAR, N.; GRESS, R. E. **An overview of IL-7 biology and its use in immunotherapy**. *Journal of Immunotoxicology*. **Anais...**2010

EVERDS, N.; BOLLINGER, A. P. Hematology of the mouse. In: **The laboratory mouse**. [s.l: s.n.]. p. 331–347.

FDA. ONTAK® (denileukin diftitox) Solution for Intravenous use Initial U.S. Approval: 1999. **@BULLET Warnings and Precautions**, v. 1, n. 52, 2008.

FIG, K.; DRYDEN-EDWARDS, R.; HOW2STATS. Chapter 13: Cytokines. **Cytokines**, p. 1–9, 2015.

FREUND, M. et al. Cytokines and modifiers of immune response. **Innere Medizin**, v. 19, n. 3, p. 79–87, 1992.

FURTADO, G. C. et al. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 6, p. 851–857, 2002.

GAMBINERI, E.; TORGERSON, T. R. **Genetic disorders with immune dysregulation** Cellular and Molecular Life Sciences, 2012.

GOH, T. S.; HONG, C. **New insights of common gamma chain in hematological malignancies** Cytokine, 2017.

HALL, M. Size Exclusion Chromatography (SEC). In: **Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes**. [s.l: s.n.].

HARTEMANN, A. et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 1, n. 4, p. 295–305, 2013.

HE, Y.-W.; MALEK, T. R. The Structure and Function of γ c-Dependent Cytokines and Receptors: Regulation of T Lymphocyte Development and Homeostasis. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 503–524, 2012.

HUANG, Z. et al. Interleukin-2 deficiency-induced T cell autoimmunity in the mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 463, n. 1, p. 44–48, 2009.

JAKOBISIAK, M.; GOLAB, J.; LASEK, W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 2, p. 99–108, 2011.

JAY, D. C.; NADEAU, K. C. **Immune Mechanisms of Sublingual Immunotherapy** Current Allergy and Asthma Reports, 2014.

JEONG, H. et al. Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, 2009.

JU, G. et al. Structure-function analysis of human interleukin-2. Identification of amino acid residues required for biological activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5723–5731, 1987.

JUNE, C. H. et al. Two distinct mechanisms of interleukin-2 gene expression in human T lymphocytes. **Journal of autoimmunity**, v. 2 Suppl, p. 55–65, 1989.

K.Y., F. Immunotherapy in autoimmune diseases. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 31, n. 6, p. 702–706, 2002.

KAISER, P. et al. **Evolution of the interleukins** *Developmental and Comparative Immunology*, 2004.

KAWAHARA, A. et al. Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma-chain-associated Jak3 in the IL-2-induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gene induction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 19, p. 8724–8, 1995.

KNEITZ, B. et al. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 9, p. 2572–2577, 1995.

KRIEG, C. et al. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11906–11911, 2010.

KÜNDIG, T. M. et al. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. **Science**, v. 262, n. 5136, p. 1059–1061, 1993.

KUNJI, E. R. S. et al. **Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography** *Methods*, 2008.

LAN, R. Y.; SELMI, C.; GERSHWIN, M. E. **The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2)** *Journal of Autoimmunity*, 2008.

LASEK, W.; ZAGOZDZON, R.; JAKOBISIAK, M. **Interleukin 12: Still a promising candidate for tumor immunotherapy?** *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2014.

LEE, F. et al. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 7, p. 2061–5, 1986.

LEE, S.; MARGOLIN, K. **Cytokines in cancer immunotherapy** *Cancers*, 2011.

LEHMANN, C.; ZEIS, M.; UHAREK, L. Activation of natural *killer* cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. **British Journal of Haematology**, v. 114, n. 3, p. 660–665, 2001.

LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. **IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation** *Current Opinion in Immunology*, 2011.

LIN, J. X.; LEONARD, W. J. **The common cytokine receptor γ chain family of cytokines** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018.

LITZINGER, M. T. et al. IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3192–3201, 2007.

LORBERBOUM-GALSKI, H. et al. IL2-PE66(4Glu), a new chimeric protein cytotoxic to human-activated T lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 27, p. 16311–16317, 1990.

MERCHANT, R. E. et al. Treatment of recurrent malignant glioma by repeated intracerebral injections of human recombinant interleukin-2 alone or in combination with systemic interferon- α . Results of a phase I clinical trial. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 12, n. 1, p. 75–83, 1992.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n. 1, p. 145–173, 1989.

MURAGUCHI, A. et al. Interleukin 2 receptors on human B cells. Implications for the role of interleukin 2 in human B cell function. **The Journal of experimental medicine**, v. 161, n. 1, p. 181–97, 1985.

NANCY GARRICK, D. D. **Autoimmune Diseases**. Disponível em: <<https://www.niams.nih.gov/health-topics/autoimmune-diseases>>.

NETA, R.; SAYERS, T. J.; OPPENHEIM, J. J. Relationship of TNF to interleukins. **Immunology series**, v. 56, p. 499–566, 1992.

PAPIERNIK, M. et al. Regulatory CD4 T cells: Expression of IL-2R α chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. **International Immunology**, v. 10, n. 4, p. 371–378, 1998.

PUCK JM. X-linked severe combined immunodeficiency. In: **Primary immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach**. [s.l: s.n.]. p. 123–36.

PYRHÖNEN, S. et al. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 9, p. 2859–2867, 1999.

RAY, J. P. et al. The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 690–702, 2015.

ROLLINGS, C. M. et al. **Interleukin-2 shapes the cytotoxic T cell proteome and immune environment—sensing programs** *Science Signaling*, 2018.

ROSENBERG, S. A. et al. A Progress Report on the Treatment of 157 Patients with Advanced Cancer Using Lymphokine-Activated *Killer* Cells and Interleukin-2 or High-Dose Interleukin-2 Alone. **The New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 15, p. 889–897, 1987.

ROSENBERG, S. A. et al. **Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: Identification of the antigens mediating response**. *Annals of Surgery*. **Anais...**1998

ROSENBERG, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 2014.

ROSMAN, Z.; SHOENFELD, Y.; ZANDMAN-GODDARD, G. **Biologic therapy for autoimmune diseases: An update** *BMC Medicine*, 2013.

RUSSELL, S. M. et al. Heterodimerization of the IL-2 receptor β - and γ -chain cytoplasmic domains is required for signalling. **Nature**, v. 369, n. 6478, p. 330–333, 2003.

SCHWARTZ, R. N.; STOVER, L.; DUTCHER, J. Managing toxicities of high-dose

interleukin-2. **Oncology**, v. 16, n. 11 Suppl 13, p. 11–20, 2002.

SEGEL, M. J. et al. Effect of IL-2-Bax, a novel interleukin-2-receptor-targeted chimeric protein, on bleomycin lung injury. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 5, p. 279–288, 2005.

SHARFE, N. et al. Human immune disorder arising from mutation of the α chain of the interleukin-2 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3168–3171, 2002.

SILVA, D. A. et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. **Nature**, v. 565, n. 7738, p. 186–191, 2019.

SILVERSTEIN, A. **A History of Immunology**. [s.l: s.n.].

SINGH, A. et al. Antibodies: Monoclonal and Polyclonal. In: **Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation**. [s.l: s.n.]. p. 265–287.

SMITH, K. A. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. **Science**, v. 240, n. 4856, p. 1169–1176, 1988.

STAUBER, D. J. et al. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2788–2793, 2006.

STONE, K. P. **Interleukins as Adipokines**. [s.l: s.n.].

TAGA, K. et al. Preferential expression of IL-2 receptor subunits on memory populations within CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Immunology**, v. 72, n. 1, p. 15–19, 1991.

TANG, Q. et al. Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction. **Immunity**, v. 28, n. 5, p. 687–697, 2008.

TANIGUCHI, T. et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**, v. 302, n. 5906, p. 305–10, 1983.

TIMMS, E. et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1472–1476, 2006.

TINCATI, C.; MONFORTE, A.; MARCHETTI, G. Immunological Mechanisms of Interleukin-2 (IL-2) Treatment in HIV/AIDS Disease. **Current Molecular Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 40–45, 2009.

TURKA THOMPSON, L. A. et al. Distinct IL-2 Receptor Signaling Pattern in Distinct IL-2 Receptor Signaling Pattern in CD4. **J Immunol The Journal of Immunology at University of Dundee on**, v. 172, p. 5287–5296, 2004.

VIAL, T.; DESCOTES, J. Clinical Toxicity of Interleukin-2. **Drug Safety**, v. 7, n. 6, p. 417–433, 1992.

WAHREN-HERLENIUS, M.; DÖRNER, T. **Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease****The Lancet**, 2013.

WANG, H. M. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 4, p. 1055–1069, 2004.

WANG, L. H. et al. JAK3, STAT, and MAPK Signaling Pathways as Novel Molecular Targets for the Tyrphostin AG-490 Regulation of IL-2-Mediated T Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 7, p. 3897–3904, 1999.

WANG, R. et al. Induction of sensitivity to activation-induced death in primary CD4+cells: A role for interleukin-2 in the negative regulation of responses by mature CD4+T cells. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 9, p. 2263–2270, 1996.

WILLERFORD, D. M. et al. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. **Immunity**, v. 3, n. 4, p. 521–530, 1995.

WOLCHOK, J. D. et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 2, p. 155–164, 2010.

WU, A. Y.-Y. Immunotherapy - Vaccines for allergic diseases. **Journal of thoracic disease**, v. 4, n. 2, p. 198–202, 2012.

YEUNG, Y. T. et al. **Interleukins in glioblastoma pathophysiology: Implications for therapy****British Journal of Pharmacology**, 2013.

ZOUALI, M. Epigenetics and Autoimmune Diseases. In: **The Autoimmune Diseases: Fifth Edition**. [s.l: s.n.]. p. 381–401.

ZURAWSKI, S. M. et al. Definition and spatial location of mouse interleukin-2 residues that interact with its heterotrimeric receptor. **The EMBO journal**, v. 12, n. 13, p. 5113–9, 1993.

Capítulo 2

Construção Peguilada Quimérica de IL-2 ao peptídeo
apoptótico pep5

2. INTRODUÇÃO

2.1.1 Peguilação

As modificações pós-traducionais (PTMs) são reações enzimáticas caracterizadas por atingir modificações químicas covalentes em proteínas e transcorrem especialmente depois da tradução dos RNA mensageiros (mRNAs) (MANN; JENSEN, 2003). Essas modificações são relevantes pois podem alterar potencialmente as propriedades químicas, físicas, funcionais ou de localização de uma proteína (PRUS et al., 2019; VIRÁG et al., 2020). Desta forma, as variações pós-traducionais exercem papéis importantes em distintas funções celulares, como a regulação da estabilidade da proteína representada, como a ubiquitinação, a regulação da transcrição pela acetilação ou metilação de histonas, a sinalização intracelular por meio da fosforilação ou a desfosforilação e a sinalização na superfície das células (glicosilação) (BAH; FORMAN-KAY, 2016; KARLAFTIS et al., 2016). Por outro lado, estas alterações permitem superar certas limitações naturais exibidas pelas moléculas, como vidas circulantes curtas, baixa estabilidade, degradação proteolítica *in vivo* e rápida eliminação do corpo via filtração glomerular (WALSH; JEFFERIS, 2006). Assim, estas modificações pós-traducionais tornaram-se processos inovadores de rápido crescimento biotecnológico, significando um aumento substancial de inúmeros produtos biológicos nas últimas décadas (HOFFMAN, 2016; RAVIKIRAN; MAHALAKSHMI, 2014).

Dentre os processos de variações químicas, a peguilação representa uma estratégia potencial que atribui, principalmente, uma alta especificidade, um rápido início de ação ou um aumento da meia-vida das biomoléculas para aplicações farmacêuticas (HERMANSON, 2013; PARAMBATH, 2018). O primeiro passo químico na peguilação foi desenvolvido, pela primeira vez, por Frank Davis e colegas, no final da década dos anos 70, sendo seu principal interesse, o uso desta metodologia para aumentar a disponibilidade de moléculas terapêuticas (DAVIS et al., 1978). Também, através destes estudos, o grupo de pesquisa demonstrou poder alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica da albumina como molécula terapêutica, sem as limitações apresentadas pelos lipossomas tradicionais como molécula carreadora (DAVIS et al., 1977).

A peguilação é considerada como um processo através do qual uma cadeia do polímero polietileno glicol (PEG) se acopla, por ligação química covalente, a macromoléculas como proteínas, peptídeos ou outros tipos de entidades químicas (DAMODARAN, 2010). O polímero PEG está formado por uma sequência repetida de polietileno glicol ($\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$) (Figura 12), sendo uma característica particular destas unidades estruturais a sua capacidade de solubilizar em meio aquoso, tanto orgânico como inorgânico (JM; RB., 2003). Assim, o grupo funcional etileno, presente no polímero, confere um efeito de hidrofobicidade, enquanto os átomos de oxigênio disponíveis permitem a formação de fortes ligações com a molécula de água, podendo adicionar à sua cadeia até 7 moléculas de água, levando a um aumento de tamanho, aproximadamente, 10 vezes maior do que o peso molecular equivalente da molécula original (G.; F.M., 2012).

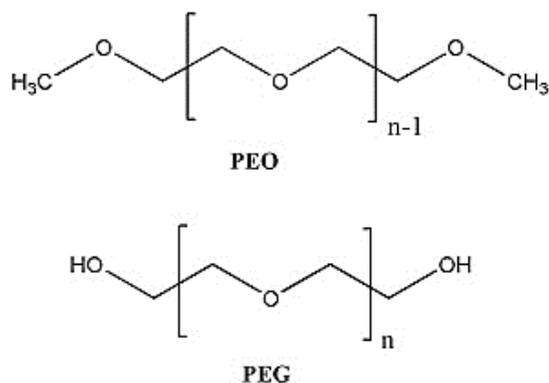


Figura 12. Estrutura química do poli etileno óxido (PEO) e o polietileno glicol (PEG). Fonte (ZIA et al., 2017).

Existem dois tipos de funcionalidade do polímero PEG. A primeira é o monofuncional, que inclui o polietileno glicol éter metílico e o polietileno glicol éter vinílico, cuja terminação tem uma substituição por um grupo éter metílico reativo, ou um éter vanílico reativo (M-PEG ou V-PEG) (BARMAN; CHAMPION; SJOBERG, 2009). A segunda seria o polímero PEG hetero-funcional, que permite a adição de duas moléculas em ambas terminações da cadeia (*crosslinker*), utilizando o mesmo (X-PEG-X) ou diferente grupo reativo nas terminações (X-PEG-Y) (PASUT; VERONESE, 2012).

Estas condições versáteis permitem, com maior facilidade, a fixação de um exclusivo ponto do polímero a alvos, por meio de uma ligação a um único grupo reativo, atuando como

agentes de articulação, ou espaçadores entre duas entidades químicas, ou evitando reações de ponte que podem ocorrer entre a interação das moléculas e que possam afetar a sua integridade. Ou, simplesmente, como um carreador específico protetor e solúvel.

2.2 Tipos de peguilação

Existem várias estratégias utilizando o PEG como conjugado em outras unidades estruturais. Dentre os métodos de peguilação, encontram-se os de ligação não específica, ligação sítio específica, ligação enzimática e de ligação não covalente (SANTOS et al., 2018). A peguilação não específica se dá principalmente em proteínas, por meio de reações com os grupos amino presentes, tanto na cadeia lateral dos resíduos de lisinas como na região N-terminal. Apesar deste método ser apropriado para a formação dos conjugados através da peguilação de proteínas, em alguns casos pode levar a uma mistura heterogênea de material Peguilado com cada conjugado PEG, mudando tanto sua atividade como suas propriedades físico-químicas da proteína (PANDEY et al., 2013). Um exemplo claro sucede com a peguilação do interferon alfa (INF- α 2a), devido à sua estrutura que possui 8 resíduos de lisina. Assim, a interação com estas lisinas permitem a formação de 8 diferentes isomorfias peguilhadas, por meio da ligação com cada um dos 8 resíduos de lisina da cadeia lateral, reduzindo de forma considerável a atividade da proteína (FOSER et al., 2003).

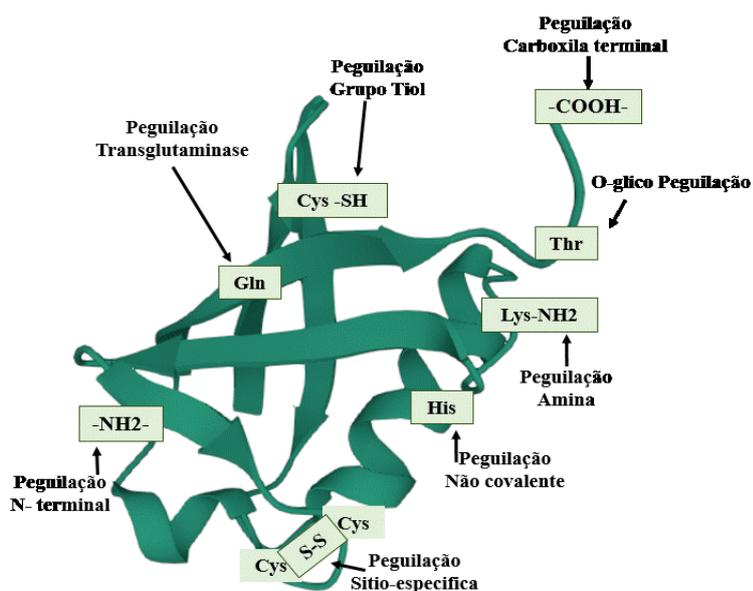


Figura 13. Possíveis sítios de peguilação química em proteínas e suas ligações. Adaptado de (PFISTER; MORBIDELLI, 2014)

Recentemente, a peguilação sítio específica foi vista como um esforço sintético que visa proporcionar métodos químicos para o direcionamento quimiosseletivo de aminoácidos canônicos, presentes na topografia dos peptídeos e proteínas terapêuticas, resultando no

melhoramento da farmacocinética da molécula (Figura 13). Portanto, sob determinadas condições de reação, pode-se favorecer a exclusividade de adição dos polímeros (PEGs) a grupos funcionais que formam parte estrutural de proteínas e peptídeos (DOZIER; DISTEFANO, 2015). No caso do PEG com terminação em grupos aldeídos, promove aumentar a seletividade em relação às aminas N-terminais dos polipeptídeos (LEE et al., 2003). Os aldeídos são compostos orgânicos que se caracterizam por ter um agrupamento carbonila (-CHO) na extremidade da cadeia. Desta forma, aminas secundárias reagem com o grupo carbonila do aldeído formando iminas, sendo necessária a presença de um catalizador ácido (pH 4-6) para que a reação ocorra mais rapidamente (KUYKENDALL; KUYKENDALL, 2018; SPRUNG, 1940). Além disso, o meio ácido favorece a exclusividade de adição a este sítio (N- terminal), dado que apresenta um menor pKa quando comparado com o pKa das aminas presentes em outros resíduos da cadeia (ZHU et al., 1995). Por outro lado, grupos tiol presentes nos resíduos de cisteína, exibem uma excelente seletividade química para grupos maleimida (LI et al., 2010). O grupo maleimida reage especificamente com a sulfidril do grupo tiol, presente no resíduo da cisteína em condições de pH entre 6,5 e 7,5, resultando em uma ligação tioéter estável não reversível. Esta reação sítio seletiva é também conhecida como a adição de Michael (HUANG et al., 2019; NAIR et al., 2014). Embora a localização da cisteína na unidade estrutural esteja em sítios hidrofóbicos e de baixa acessibilidade, análises *in silico* são necessárias para que a peguilação no grupo tiol seja bem-sucedida, permitindo a conjugação da molécula.

Existem outras estratégias de peguilação, como a enzimática. Ao contrário das outras conjugações químicas descritas, este tipo de peguilação se produz pela atividade catalítica

e específica da enzima da transglutaminase (FONTANA et al., 2008). Esta proteína catalisa uma reação, adicionando o polímero PEG-amina a um grupo acila, presente no resíduo da

glutamina (MERO et al., 2011). O sucesso da reação depende no número de glutaminas presentes na molécula conjugada e do acesso desta enzima ao sítio da glutamina na estrutura, sendo uma limitante a atividade da transglutaminase (KAARTINEN et al., 2005). Não obstante, apesar dos processos anteriores melhorarem notavelmente, as propriedades físico-químicas e a estabilidade das moléculas ainda apresentam algumas limitações, como a perda de algumas das funções, dado o número de ligantes que podem ser adicionados na sua estrutura. Assim, com o objetivo de superar a perda de atividade biológica resultante da peguilação covalente tradicional, a peguilação por ligação não covalente oferece uma alternativa, tentando ultrapassar esta limitação e mantendo a meia-vida prolongada decorrente da peguilação.

2.2.3 A Peguilação e o uso farmacêutico

Em março de 1990, a FDA aprovou a primeira proteína conjugada derivada da peguilação entre um mono-PEG e a enzima bovina adenosina desaminase (PEG-ADA) (HERSHFIELD et al., 1987). A doença de imunodeficiência combinada grave (SCID) é uma desordem autossomal recessiva, que causa a deficiência da enzima adenosina desaminase no organismo (CANDOTTI et al., 2012; GENNERLY; CANT, 2001). Desta forma, a peguilação PEG-ADA mostrou ter resultados satisfatórios no tratamento de pacientes com esta doença (CHAN et al., 2005; HERSHFIELD, 1995). A partir desse momento, um grande número de novos produtos farmacêuticos peguilados foram introduzidos no mercado, principalmente a utilização do PEG como carreador ou base de alimentos, cosméticos e medicamentos, incluindo formulações injetável, uso tópico, nasal ou retal.

A atividade biológica *in vivo* dos conjugados PEG-proteína mostrou ter características importantes, como o aumento do tempo de retenção, redução da imunogenicidade, aumento da estabilidade dos fármacos a serem metabolizados por enzimas dependentes do número de polímeros (PEG) ligados e do peso molecular. Distintas classes de medicamentos para tratamentos como citocinas, anticorpos e enzimas, tiveram um melhoramento significativo utilizando a técnica de peguilação.

Estudos feitos utilizando o interferon alfa (α) peguilado com o polímero PEG2-NHS, alcançaram resultados satisfatórios, uma vez que, após conjugação e aumento do tamanho

da molécula de 19.000 a 40.000 kDa, solucionou o problema da baixa concentração da proteína sinalizadora no sangue. Isto foi demonstrado quando animais utilizados como modelo de estudo, que foram injetados com o bioproduto, mantiveram valores constantes de concentração no sangue, quando comparados com o grupo placebo, necessitando apenas de injeções subcutâneas uma vez por semana. Assim, o peguilado PEG2–NHS diminui a taxa de depuração em 100 vezes com relação interferon alfa nativo, incrementando sua meia-vida, passando de uma eliminação de 5 horas a 77 horas (KOZLOWSKI; MILTON HARRIS, 2001). Em ensaios clínicos fase III, a peguilação da enzima adenosina desaminase (ADA) evidenciou ser uma melhor isoforma terapêutica para o tratamento contra neoplasias malignas. Nestes ensaios, o peguilado PEG20-ADA mostrou ter melhor eficiência em termos de atividade antimetabólica quando comparado ao grupo controle (HOLTSBERG et al., 2002). Atualmente, estes estudos encontram-se em ensaios clínicos fase III, para tratamento de carcinomas hepáticos; fase II, para leucemias mieloides agudas (GLAZER et al., 2010); e, na fase I, para melanomas metastáticos (ASCIERTO et al., 2005). Existem outros produtos peguilados derivados de fármacos disponíveis comercialmente, como é o caso de biofármaco PEG-SN38 (EZN-2208) (ZHAO et al., 2008). O SN38 é uma fração do fármaco CPT-11 (Camptosar®-irinotecan), um potente inibidor da enzima topoisomerase I. Este fragmento foi acoplado com um PEG de 40 kDa (PEG-SN38) e foi capaz de aumentar a solubilidade de SN38 em cerca de 1000 vezes, quando comparado com o CPT-11 em camundongos tratados, resultando em uma maior exposição da fração SN38 em comparação com o composto original CPT-11, mostrando uma promissória na atividade antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo* (SAPRA et al., 2008).

Apesar deste processo melhorar os atributos da molécula, uma limitante são os níveis de viscosidade apresentados. Atualmente, os polímeros PEG ramificados foram desenvolvidos para estender a meia-vida em circulação *in vivo* das moléculas conjugadas, sem o problema da viscosidade (SHATZ et al., 2018; SOLMS et al., 2020). Estudos baseados usando este método, indicam que as propriedades adquiridas através da conjugação com PEG ramificados são altamente eficientes em várias aplicações, incluindo absorção celular, eficácia de regulação de genes, bidistribuição e ligação com oligonucleotídeos (LU; ZHANG, 2018; PLESNER, 2010).

Embora possíveis efeitos colaterais e complicações tenham sido encontrados a partir do acúmulo de moléculas terapêuticas peguiladas metabolizadas em vários tecidos, considera-se pertinente uma avaliação meticulosa na construção de moléculas terapêuticas, dosagem e ensaios, sobre os quais se consiga visualizar os níveis apropriados dos bioprodutos para novos tratamentos, com objetivo de minimizar os riscos, tendo como foco crítico a caracterização da hipersensibilidade, toxicidade, possíveis alterações inesperadas no comportamento farmacocinético e antagonismo da degradação por estresse mecânico no organismo.

2.2.4 Peptídeos Intracelulares

Durante o ciclo celular, as células eucariotas apresentam mecanismos de manutenção de seus componentes, controlando o tempo de vida da maioria de suas proteínas, incluindo proteínas regulatórias (HATFIELD; VIERSTRA, 1997). Estes mecanismos envolvem a participação dos proteossomos, complexos proteicos dependentes de ATP, constituídos por um conjunto de subunidades que tem, como ação catalítica, a clivagem de proteínas marcadas para a sua degradação através de ligações de cadeias de poli-ubiquitinas (GOLDBERG, 2003; SOROKIN; KIM; OVCHINNIKOV, 2010). Gerando, desta forma, peptídeos pequenos entre 2 a 20 aminoácidos (KISSELEV et al., 1999). Assim, os peptídeos gerados a partir desta degradação proteossomal, são utilizados pelas células em processos regulatórios, incluindo: o reconhecimento antigênico (MHC), biogênese, divisão celular, resposta imune e inflamação, resposta a estresse, infecção viral, apoptose, entre outros (CLARK et al., 2010; HAWIGER, 1997; KALENIK; GÓRA-SOCHACKA; SIRKO, 2018; KESSLER; GLAS; PLOEGH, 2002), sendo alguns desses sistemas complexos e ainda pouco compreendidos.

Nos últimos anos, vêm sendo realizados estudos com base na geração de peptídeos intracelulares para avaliar suas possíveis funções. Estudos recentes, abordando a função do proteossomo e seus ativadores, mostraram uma melhor compreensão do processamento citosólico de peptídeos. Transportadores associados ao processamento de antígenos (TAPs), translocam esses peptídeos para o retículo endoplasmático, onde moléculas MHC I são retidas em complexos formados por chaperonas e TAPs, esperando para interagir. A

especificidade da sequência e a preferência pelo tamanho do peptídeo TAPs, atendem os requerimentos moleculares para a interação com moléculas MHC I em diferentes espécies, sugerindo uma forma evolutiva da especificidade dos peptídeos TAPs (KOOPMANN; HÄMMERLING; MOMBURG, 1997).

A doença de Alzheimer é uma patologia causada pela disposição extracelular do peptídeo A β 42, que, por sua vez, deriva da degradação da proteína A β PP. Estudos sobre esta doença identificaram um domínio COOH- terminal, denominado AID, em tecido cerebral, que encontra-se ligado ao peptídeo A β 42 (AID- A β 42). Este agrupamento atua como um regulador positivo de apoptose e, quando super expresso (peptídeo A β 42), pode causar efeitos tóxicos, acelerando a neurodegeneração (PASSER et al., 2000).

Outros estudos experimentais *in vivo* mostraram um epítipo peptídico, derivado de antígenos de diferenciação de linhagem celular de melanócitos Melan A/MART-1, em humanos. Este epítipo peptídico foi identificado, caracterizado e, posteriormente, sintetizado para a determinação da resposta em células T citotóxicas em pacientes com melanomas. Assim, este epítipo peptídico, associado e derivado de melanócitos Melan A/MART-1, foi injetado semanalmente, durante 4 semanas, via intradérmica, em pacientes que apresentavam melanomas em estado crítico. Como controle dos experimentos, também foi injetado em pacientes saudáveis. Como resultado, foi observado que houve uma ativação apropriada imunogênica, aumentando a reatividade contra este tipo de peptídeo, tanto em pacientes com a doença, como em pacientes do grupo placebo (JÄEGER et al., 1996). Estes experimentos foram positivos para testes experimentais em humanos, mostrando uma resposta eficiente das células T citotóxicas.

Contudo, a identificação destes peptídeos e seu papel, desempenham alternativas potenciais como métodos terapêuticos (GUPTA; LEVCHENKO; TORCHILIN, 2005; LAU; DUNN, 2018; VERDINE; HILINSKI, 2012) no tratamento das diferentes doenças causadas por falhas nos processos regulatórios (MÜNZ, 2016; XU et al., 2001; ZOLOTAREVSKY et al., 2002).

2.2.5 Peptídeo apoptótico pep5

A partir de culturas de linhagens celulares de HeLa, células derivadas de um carcinoma cervical humano imortalizadas (LANDRY et al., 2013; LYAPUN; ANDRYUKOV; BYNINA, 2019), que possuem a capacidade de manter sobrevivência contínua celular (utilizada para fins científicos), foram cultivadas e sincronizadas em diferentes fases de ciclo celular (G1, S e G2/M). Após crescimento nas diferentes fases celulares, foram isolados e quantificados os peptídeos presentes, identificando um total de 19 peptídeos, por meio do método de espectrofotometria de massa e, posteriormente, sequenciados e avaliados. Dos 19 fragmentos peptídicos isolados e identificados, os peptídeos 3 e 5, mostraram ter uma alteração nas fases específicas G1 e S do ciclo celular. Desta forma, para avaliar a atividade biológica destes dois peptídeos, os fragmentos foram sintetizados e acoplados a outro peptídeo penetrador de célula TAT 47-57 (DE ARAUJO et al., 2014; ZIEGLER et al., 2005). Como resultado destes testes, o peptídeo apoptótico acoplado ao peptídeo TAT (peptídeo-5-TAT), demonstrou ter uma alta eficácia na indução da morte celular, conforme observado nos oito tipos diferentes de linhagens de células humanas tratadas (Hela, SKRB, SK-MEL-28, MEL-85, SBCI-2, TPC-1, Nthy-ori3-1 e KTC-2), onde aproximadamente 90% destas células foram induzidas a supressão celular via morte programada apoptose *in vitro*, sendo que esse valor de taxa de mortalidade foi encontrado quando a região N- terminal do peptídeo 5 estava livre (DE ARAUJO et al., 2014). Nesse contexto, a ideia central deste trabalho foi desenvolver a construção química entre a interleucina-2 humana e murina com o peptídeo-5 (pep5), para avaliar seu potencial e eficácia na supressão celular via apoptose em linhagens celulares causadoras do aparecimento de doenças autoimunes e inflamatórias, como são as T CD8 +, leucêmicas e células mastocitárias, cuja especificidade seja por afinidade da interleucina-2 (IL-2) com os receptores IL-2R⁺ (beta CD122 / gama CD132 e alfa CD25).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um produto alternativo peguilado para prova de conceito em doenças autoimunes inflamatórias e leucemias.

2.3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o sítio de conjugação da interleucina -2 humana *in silico*;
- Avaliar o peptídeo apoptótico pep5 *in silico*;
- Realizar a construção química “*crosslinker*” entre a IL-2 humana e o peptídeo apoptótico pep5, através da ligação com o PEG MAL-PEG-NH₂;

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Determinação estrutural *in silico* do sítio de ligação da interleucina-2 humana

2.4.1.1 Determinação estrutural *in silico* do peptídeo apoptótico pep5

O seguinte passo foi a realização de um alinhamento do peptídeo pep5, comparando a sequência peptídica dos 9 aminoácidos com as sequências peptídicas de proteínas reportadas no *The National Center for Biotechnology Information* NCBI, acessando no banco de dados de informação genômica disponível, utilizando como ferramenta o *software* BLAST-*ProSplign* para sequências individuais.

2.4.1.2 Construção química através da peguilação da IL-2 e o peptídeo apoptótico pep5

Neste estudo, realizamos a conjugação da interleucina-2 humana (IL-2h) fornecida pela empresa *Biosytems*® *Acro*, identificada com o código do produto IL-2-H4113 e o peptídeo pep5, sintetizado pela empresa *GenScript*® *Biotech*, utilizando o polímero hetero-bifuncional MAL-PEG-NH2 (2 kDa), identificado com o código A5005-1 e fornecido pela empresa *JenKem Technology*® *USA*. Este polímero nos permite ligar na fração amina do polímero com o grupo carboxila livre do peptídeo pep5, e, por outro lado, a fração Maleimide do polímero permite a ligação específica com o grupo tiol no resíduo da cisteína presente na estrutura da interleucina-2 humana (Figura 14).

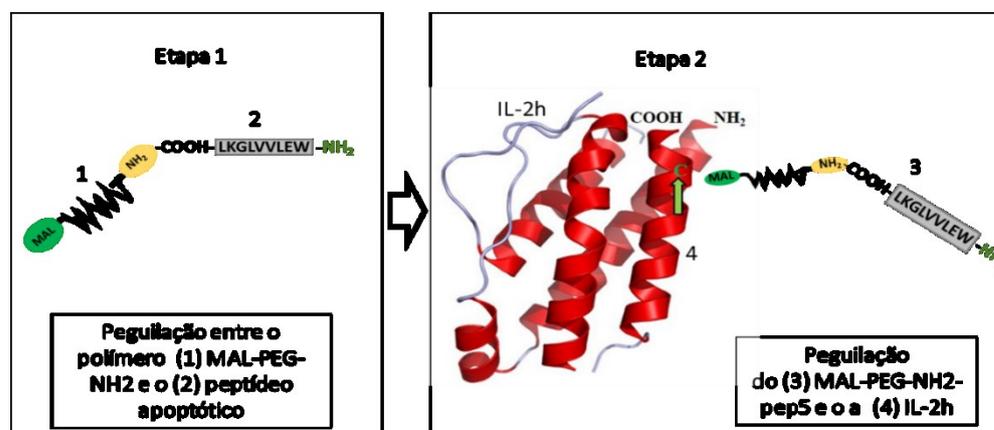


Figura 14. Esquema representativo do *crosslinker* entre a IL-2 e o Pep5 utilizando o método de peguilação hetero-bifuncional. Etapa 1, peguilação entre (1) o polímero MAL-PEG-NH2 e o (2) peptídeo apoptótico. Etapa 2, peguilação entre o (3) MAL-PEG-NH2-pep5 e a (4) IL-2h, seta verde lugar de ligação do hbPEG na IL-2 (cisteína-125) da IL-2h.

Desta forma, o passo inicial na obtenção do produto conjugado foi realizar análises preliminares da estrutura da interleucina-2 humana, para identificar o resíduo de cisteína para a ligação com fração terminal Maleimide do polímero PEG, que não interferisse com os sítios de interação da molécula e seu receptor. Após este processo, a construção química foi realizada em duas etapas. A primeira foi a reação do polímero MAL-PEG-NH₂ com uma concentração final de 15 mM, o peptídeo pep5 com uma concentração de 30 mM na proporção 1:2, respectivamente, em meio aquoso tampão fosfato 1x com pH de 7,4, encubado, à temperatura ambiente, sob agitação constante a 70 rpm/min, durante 6 horas. Previamente, o peptídeo pep5 foi tratado com a solução DMSO 80% e dH₂O 20% para solubilização do composto. A segunda etapa consistiu na reação entre a IL-2h e o peguilado MAL-PEG-NH₂-pep5 na proporção 1:2. Desse modo, foi utilizado um volume de 100µL da IL-2h na concentração de 40µg/mL e 5 µL do peguilado MAL-PEG-NH₂-pep5 na concentração de 50µg/mL, encubado à temperatura ambiente, sob agitação constante a 70 rpm/min, durante 8 horas (Figura 15).

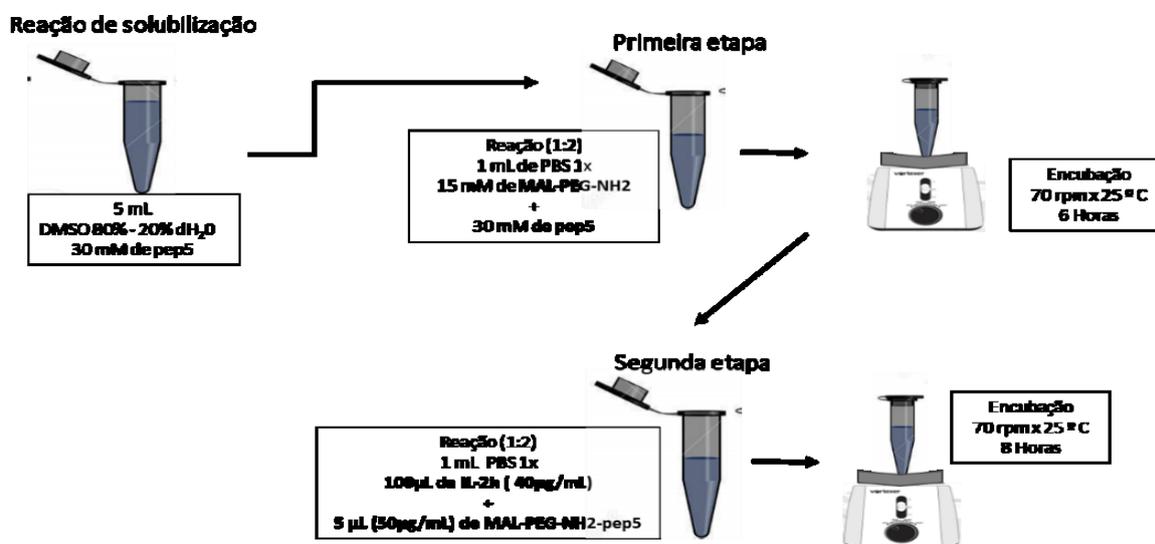


Figura 15. Reação da construção química entre a IL-2 e o Pep5 utilizando o método de peguilação hetero-bifuncional.

2.4.1.3 Eletroforese para verificação da peguilação entre a IL-2 humana e o peptídeo apoptótico pep5

Para verificar a construção química IL-2h-MALPEGNH2-pep5, utilizamos o método de eletroforese com gel desnaturante SDS-PAGE redutor. Utilizamos 10 µL do produto peguilado e 10 µL da IL-2h como controle para corrida da eletroforese SDS-PAGE. Assim, as amostras foram colocadas em tubos eppendorf, adicionando 5 µL de tampão de amostra e aquecidas a 95 °C, por 5 min. Posteriormente, as amostras foram transferidas para poços individuais em gel SDS-PAGE, formado pelos seguintes compostos: Primeira fase (gel de separação 17,5%), 2 mL de dH₂O, 4 mL Tris-HCl 1M pH 8,8, 6,3 mL Acrilamida 30%, 120 µL PSA 10% , 160 µL de SDS 10% e 8µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina; Segunda fase (gel de empacotamento 4%), 2 mL de dH₂O, 4 mL Tris-HCl 1M pH 6,8, 3,0 mL acrilamida 30%, 50 µL PSA 10% e 10 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina) e 2,5 mL H₂O destilada.

Para a corrida do gel foi utilizado o equipamento *Power Pac Basic 300V* da *BioRad*, utilizando os seguintes parâmetros: 130 Volts, por 60-90 min. Logo após a eletroforese, o gel foi corado com solução corante de azul de coomassie (metanol 30%, ácido acético 10%, Comassie Blue G-250 0,5% e H₂O destilada 10%) *overnight* e depois tratado com tampão descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e H₂O destilada 80 %).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Avaliação *in silico* do sítio de ligação da IL-2h e o polímero MAL-PEG-NH₂

Utilizando a ferramenta de bioinformática da base de dados de *Uniprot*, através da cristalografia de raio X, realizamos a análise tridimensional estrutural da interleucina-2 humana, identificado na base de dados PDB com o código 1IRL. Especificamente, analisamos a cisteína na posição 125 da sequência peptídica da molécula. Esta proteína consiste em 3 loops que atuam como espaçadores, 3 folhas beta e 4 alfa hélice, sendo que o resíduo da cisteína em estudo, encontra-se localizado na quarta alfa hélice da estrutura, compreendendo uma região hidrofóbica, dado que é um sítio de interação com o receptor gama (IL-2R_g). O espaçamento entre alfa hélice 3 e 4 apresenta um valor aproximado de 3,6 Å (0,36 nanômetros), com disposição estereoquímica do grupo tiol (-SH) (Figura 16).

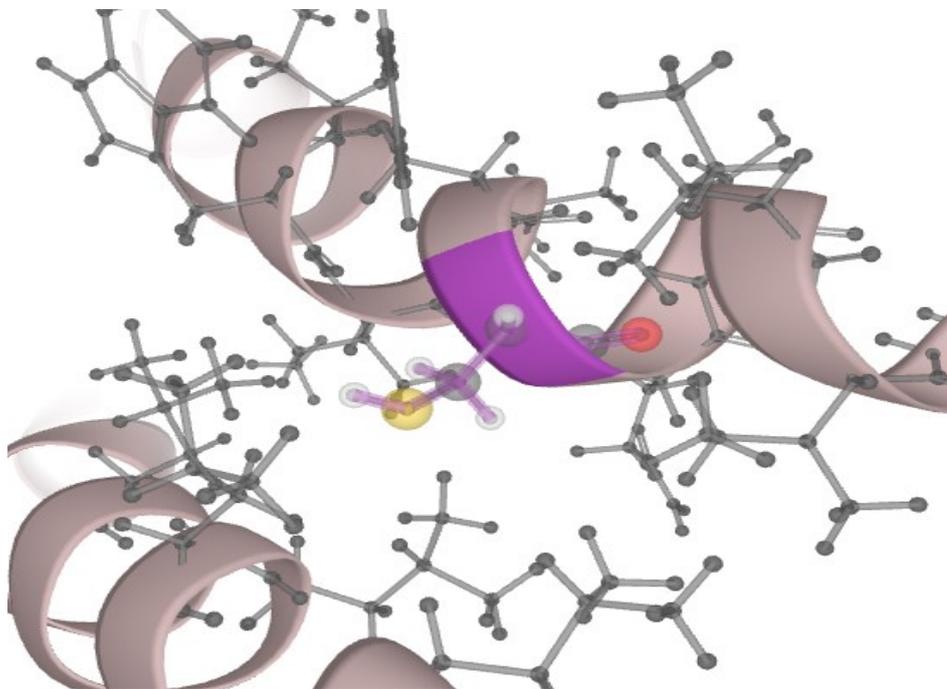


Figura 16. Estrutura tridimensional de raios X da interleucina-2 humana disponível na base de dados de *Uniprot* PDB, identificado com o código 1IRL (PDB). Em cor roxa, a cisteína na posição 125 na quarta alfa hélice, o círculo amarelo o íon sulfidríla do grupo tiol, o círculo vermelho o íon hidrogênio.

2.5.2 Estudo *in silico* do peptídeo apoptótico pep5

Através do programa de análise de bioinformática Innovagen, realizamos o cálculo das propriedades químicas do peptídeo apoptótico. Este peptídeo consiste em um fragmento de 9 aminoácidos, seguindo a ordem, começando pela região N-terminal: triptofano, glutamina, leucina, valina, valina, leucina, glicina, lisina e leucina. Dentre os resultados, confirmamos o tamanho molecular de 1056,3 kDa, compreendendo o total dos 9 aminoácidos, um ponto isoelétrico de 6,73 de pH e um coeficiente de extinção molar de $5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mostrando a capacidade de absorção de luz em determinado comprimento de onda. Do total dos 9 aminoácidos, 5 resíduos são alifáticos (3 leucinas e 2 valinas), 1 ácido (glutamina), 1 básico (lisina), 1 aromático (triptofano) e 1 neutro (glicina). A soma de todas as hidropatias dos aminoácidos mostra um índice de caráter hidrofóbico (baixa solubilidade em água) (Figura 17).

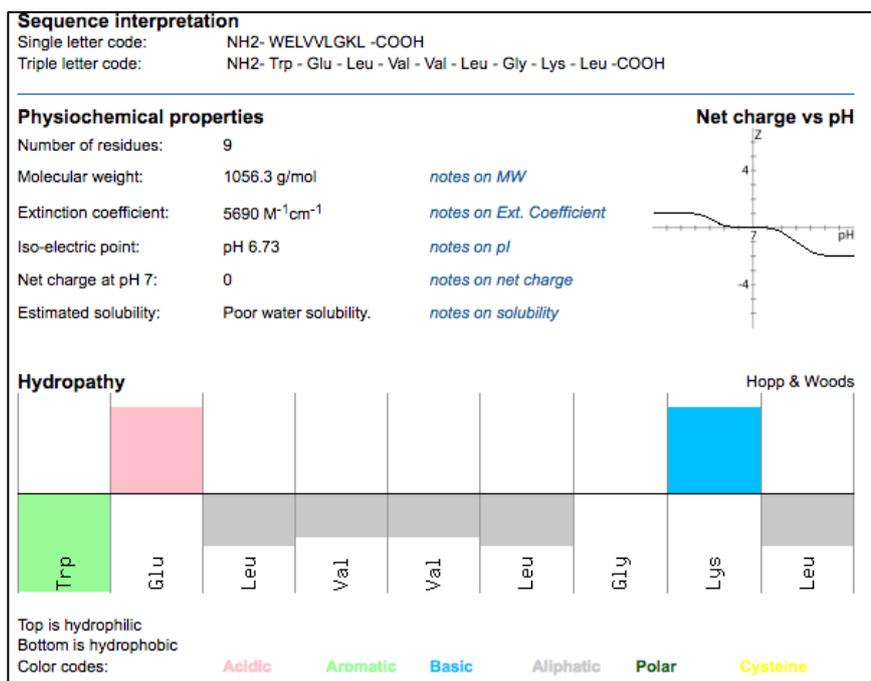


Figure 17. Propriedades físico-químicas da sequência do peptídeo pep5 utilizando o programa de análise de bioinformática disponível online do Innovagen. Os dados apresentados são peso molecular, coeficiente de extinção molar, ponto isoelétrico e índice de solubilização. As cores embaixo representam o caráter hidropático de cada um dos resíduos.

Comparamos, especificamente, sequências proteicas do gênero *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Como resultado do alinhamento peptídeo-proteína, observamos que o peptídeo WELVVLGKL apresenta uma identidade de 100%, com 24 proteínas no gênero *Homo sapiens*, compreendendo, entre essas proteínas: a ciclina D2; ciclina D3 com 4 isoformas; a proteína de ligação ao RNA com 4 isoformas; a proteína PHD *Finger* com 5 isoformas; a proteína DENN6A com 3 isoformas; e, por último, a proteína *Heat repeat containing* com 2 isoformas. No caso do gênero *Mus musculus*, o resultado mostrou uma identidade de 100% para um total de 12 sequências proteicas do mesmo gênero, compreendendo: a proteína ciclina D2 com 2 isoformas; ciclina D3; a proteína de ligação ao RNA; a proteína PHD *Finger* com 3 isoformas; e a proteína DENN6A (NCBI-Blast).

Score	Expect	Method	Identities	Positives
543 bits(1400)	0.0	Compositional matrix adjust.	266/290(92%)	282/290(97%)
Query 1		MELLICHEVDPVRRRAVRDRNLLRDDRVLQNLLETIEERYLPQCSYFKCVQKDIQ		
Sbjct 1		MELLC EVDVRRRAV DRNLL +DRVLQNLLETIEERYLPQCSYFKCVQKDIQ		
Query 61		TWMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLAGVPTPKSHLQLLGAVCMFLASKL		
Sbjct 60		TWMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLAGVPTPK+HLQLLGAVCMFLASKL		
Query 121		EKLCIYTDNSIKPQELLEWELVVLGKLKWNLA AVTPHDFIEHILRKLPQQRE		
Sbjct 120		EKLCIYTDNS+KPQELLEWELVVLGKLKWNLA AVTPHDFIEHILRKLPQQ+E		
Query 181		AQTFIALCATDFKFAMYPPSMIATGSGVAAICGLQQDDEEVSSLTCDALTELL		
Sbjct 180		AQTFIALCATDFKFAMYPPSMIATGSGVAAICGLQQD+EV++LTCDALTELL		
Query 241		DCLKACQEQIEAVLLNSLQQYRQDQRD-GSKSEDELQASTPTDVRDIDL		
Sbjct 240		DCLKACQEQIEA+LLNSLQQ+RQ+Q + GSKS ++ DQA+TPTDVRD+DL		

Figura 18. Alinhamento das sequências da proteína D2 ciclina humana e murina utilizando o programa bioinformático BLAST-ProSplign da plataforma National Center for Biotechnology Information NCBI. (Query) sequência da proteína D2 ciclina humana e (Sbjct) sequência da proteína D2 ciclina murina.

Por outro lado, o alinhamento entre as sequências peptídicas entre a proteína ciclina D2 humana e a proteína ciclina D2 murina, mostrou uma identidade de 92% (266/290) e similaridade de (282/290), com regiões variáveis tanto na fração N-terminal como na fração carboxila terminal. Localizamos o fragmento correspondente a WELVVLGKL (pep5) na posição entre os resíduos 139 a 147 na sequência de ciclina D2 humana, enquanto na ciclina D2 murina, encontra-se entre os resíduos 138 a 146, mudando a posição em só um resíduo.

Também observamos que o fragmento do pep5 se mantém em uma região conservada de ambas proteínas. Esta região compreende uma sequência de 39 resíduos (Figura 18).

2.5.3 Verificação da construção química entre a IL-2 humana e o peptídeo apoptótico pep5

Para confirmar a correta conjugação entre a interleucina-2 humana (IL-2h) e o peptídeo apoptótico pep5, tomamos uma alíquota após reação da segunda etapa da peguilação e a comparamos com uma alíquota da IL-2h em solitário como controle. A interleucina -2 humana livre de His-tag foi detectada abaixo do padrão de peso molecular de 18 kDa, confirmado assim, o tamanho molecular de 15,4 kDa descrito pela empresa fornecedora. Da mesma forma, detectamos o produto peguilado entre IL-2h e peptídeo apoptótico acima do padrão de peso molecular de 18 kDa, exibindo um valor de aproximadamente 21 kDa. Cabe ressaltar que a conjugação química entre as duas moléculas (IL-2h e o pep5) se daria em um valor correspondente a essa fração de peso molecular, já que o valor entre polímero MAL-PEG-NH2 e o peptídeo apoptótico é de 3 kDa, somaria um total de 21,4 kDa (Figura 19).

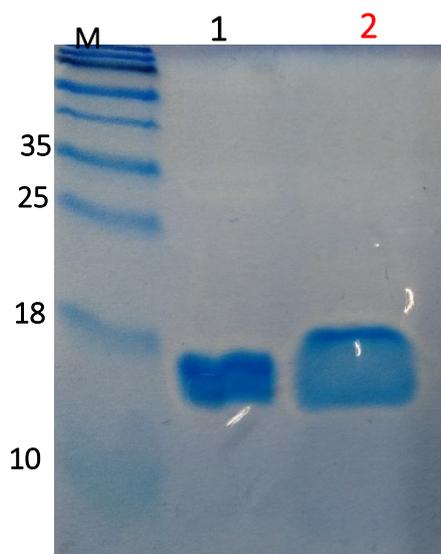


Figura 19. Gel de poliacrilamida de eletroforese SDS-PAGE de verificação da peguilação da IL-2h humana. (WM) padrão de peso molecular, (1) interleucina-2 humana, (2) produto peguilado IL-2h-MAL-PEG-NH2

2.6 DISCUSSÕES

O polímero hetero-bifuncional MAL-PEG-NH₂ mostrou ser um adequado veículo carreador, oferecendo a possibilidade de conjugar a proteína IL-2 humana e o peptídeo apoptótico, permitindo direcionar a atividade mostrada por este peptídeo, mas com especificidade para células com receptores IL-2R e afinidade pela interleucina-2, embora estudos das propriedades físico-químicas, farmacocinética e da farmacodinâmica sejam necessários para confirmar sua estabilidade, degradação e tempo em circulação *in vitro* e *in vivo* como futuras investigações.

A peguilação em duas etapas de reação mostrou ser um processo eficiente, dado que a molécula da interleucina-2 apresenta uma região carboxila terminal em estado livre (-COOH), podendo agir com grupos químicos funcionais presentes na solução. Desta forma, consideramos conveniente realizar uma prévia reação, conjugando, primeiro, o grupo amina reativo presente no polímero, com o grupo carboxila livre na sequência peptídica do peptídeo apoptótico pep5, bloqueando futuras reações neste grupo e facilitando uma segunda reação específica, entre o grupo tiol presente no resíduo da cisteína e o grupo Maleimide do polímero. Foi apropriado considerar a fração n-terminal do peptídeo pep5 como região não conjugável, visto que os estudos relacionados com ação deste peptídeo revelaram uma efetividade na indução de morte celular quando esta fração se encontra em estado livre (DE ARAUJO et al., 2014).

Estudos relacionados, nos quais desenvolveram um sistema inovador de seleção para peptídeos funcionais intracelulares derivados da sequência peptídica WELVVLGKL, combinados com um sistema de dissociação de um dímero pela clivagem de uma ponte de bissulfeto, que possibilita a liberação do peptídeo dentro da célula, mostrou que trocas de aminoácidos na sequência original do peptídeo exibem uma maior atividade, quando comparado com a sequência nativa, reportando um total de 6 combinações diferentes peptídicas com um alto potencial apoptótico (KOZAKI; SHIMIZU; HONDA, 2020). Estes dados sugerem que mudanças de resíduos na sequência original do peptídeo pep5 podem

ser consideradas como moléculas alternativas e base para bioprodutos em testes para novos tratamentos terapêuticos.

O fragmento de 9 aminoácidos, que compreendem os resíduos WELVVLGKL e derivado da proteína ciclina D2, consideramos de vital importância a análise *in silico* através da comparação e alinhamento da sua estrutura primária com proteínas reportadas na base de dados (NCBI). Dentre estas análises, foi confirmada a presença do fragmento na sequência peptídica da proteína ciclina D2, localizada em uma região conservada da proteína. Como relatado em alguns estudos, a proteína ciclina D2 cumpre um papel essencial na diferenciação celular, principalmente na transição de fase G1/S, atuando como molécula reguladora na progressão do ciclo celular principalmente detectada em células tumorais (KOYAMA-NASU et al., 2013).

Do mesmo modo, estas análises nos permitiram observar a homologia (identidade de 92%) da proteína ciclina D2 humana com a murina. Possivelmente, o fragmento peptídico pep5 desenvolva o mesmo efeito apoptótico em células de origem murina, abrindo a possibilidade de testes em camundongos como modelo animal e avaliando sua atividade supressora. Por outro lado, podemos observar também uma frequência da sequência peptídica WELVVLGKL em outras proteínas, como ciclina 1 e 3, a proteína de ligação ao RNA, proteína PHD *Finger*, proteína DENN6A e a proteína *Heat repeat containing*, todas descritas moléculas mediadoras nos processos de regulação da transição do ciclo celular e a junção célula-célula (DE FRANCESCHI et al., 2014; GOZANI et al., 2003; LIU et al., 2018; YOSHIMURA; HIRANO, 2016).

2.7 CONCLUSÕES

- Podemos concluir que a peguilação é um processo químico eficiente, mostrando um acoplamento por meio de ligação química covalente, ou não, com grupos funcionais presentes nas moléculas com alta especificidade. Podemos considerar este método adequado para a junção das moléculas interleucina-2 humana e o peptídeo apoptótico pep5, sendo uma reação de duas etapas para um acoplamento correto entre as duas moléculas e o polímero (MAL-PEG-NH₂).
- Estudos preliminares, utilizando como base os programas de análises estruturais das proteínas, nos auxiliaram para a escolha do sítio de ligação na proteína IL-2h, especificamente, na cisteína, na posição 125 da sequência peptídica. Adicionalmente, foram determinantes também estes tipos de análises, para a seleção do polímero específico para ligação com o grupo tiol presente na cisteína, considerando que este grupo reage pela hidrólise com outras entidades químicas, com o composto Maleimide, localizado na extremidade do polímero.
- Através das análises de alinhamento e comparação de sequências, podemos concluir que o peptídeo pep 5 é um fragmento proveniente de uma região conservada da proteína ciclina D2 humana, com alta homologia com a proteína ciclina D2 de origem murina, além de outros organismos, mantendo sua identidade em outras proteínas funcionais destas duas espécies.

2.8 REFERÊNCIAS

ABID, A.; MALONE, M. A.; CURCI, K. **Mastocytosis Primary Care - Clinics in Office Practice**, 2016.

ACTOR, J. K. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. In: **Introductory Immunology**. [s.l: s.n.].

AFRIN, L. B. et al. Characterization of Mast Cell Activation Syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, 2017.

AHMADI, M. et al. **Epigenetic modifications and epigenetic based medication implementations of autoimmune diseases** **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.

AKIN, C. **Mast Cell Activation Disorders** **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, 2014.

AKIN, C. **Mast cell activation syndromes** **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2017.

AKIN, C.; VALENT, P.; METCALFE, D. D. Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010.

AMAN, M. J. et al. CIS associates with the interleukin-2 receptor β chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. **Journal of Biological Chemistry**, 1999.

AMIN, K. **The role of mast cells in allergic inflammation** **Respiratory Medicine**, 2012.

AROCK, M. et al. **KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: Recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis** **Leukemia**, 2015.

ASCIERTO, P. A. et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: Results from phase I and II studies. **Journal of Clinical Oncology**, 2005.

BĄBOLEWSKA, E.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Mast cell inhibitory receptors. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, 2012.

BAH, A.; FORMAN-KAY, J. D. Modulation of intrinsically disordered protein function by post-translational modifications. **Journal of Biological Chemistry**, 2016.

BAO, L.; ZHANG, H.; CHAN, L. S. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. **JAK-STAT**, 2013.

BARMAN, B. N.; CHAMPION, D. H.; SJOBERG, S. L. Identification and quantification of polyethylene glycol types in polyethylene glycol methyl ether and polyethylene glycol vinyl ether. **Journal of Chromatography A**, 2009.

BAUMGARTNER, C. et al. Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: Subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V. **American Journal of Pathology**, 2009.

BEVINGTON, S. L. et al. IL- 2/IL- 7- inducible factors pioneer the path to T cell differentiation in advance of lineage- defining factors. **The EMBO Journal**, 2020.

BJØRN, M. E.; HASSELBALCH, H. C. The impact of ruxolitinib treatment on inflammation-mediated comorbidities in myelofibrosis and related neoplasms. **Clinical Case Reports**, 2015.

BLANCO, P. et al. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, 2005.

BONAMICHI-SANTOS, R.; CASTELLS, M. **Mast Cell Activation Syndromes Current Treatment Options in Allergy**, 2016.

BOS, S. D. et al. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. **PLoS ONE**, 2015.

BRASIER, A. R. **Expanding role of cyclin dependent kinases in cytokine inducible gene expression** **Cell Cycle**, 2008.

BRAZZELLI, V. et al. Narrow-band UVB phototherapy and psoralen–ultraviolet A photochemotherapy in the treatment of cutaneous mastocytosis: a study in 20 patients. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, 2016.

BROCKOW, K. **Urticaria pigmentosa** **Immunology and Allergy Clinics of North America**, 2004.

BULFONE-PAUS, S. et al. **Positive and Negative Signals in Mast Cell Activation** **Trends in Immunology**, 2017.

CANDOTTI, F. et al. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: Clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. **Blood**, 2012.

CARDET, J. C.; CASTELLS, M. C.; HAMILTON, M. J. Immunology and clinical manifestations of non-clonal mast cell activation syndrome. **Current Allergy and Asthma Reports**, 2013.

CARTER, M. C. et al. Adverse reactions to drugs and biologics in patients with clonal mast cell disorders: A Work Group Report of the Mast Cells Disorder Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2019.

CATALDI, M. et al. Histamine receptors and antihistamines: From discovery to clinical applications. **Chemical Immunology and Allergy**, 2014.

CHAN, B. et al. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for Adenosine deaminase (ADA)-deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID). **Clinical Immunology**, 2005.

CHEN, C. C. et al. Identification of mast cell progenitors in adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005.

CHEN, R. et al. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. **Journal of Clinical Investigation**, 2001.

CHERIAN, S. et al. Expression of CD2 and CD25 on mast cell populations can be seen outside the setting of systemic mastocytosis. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2016.

CHERVENICK, P. A.; BOGGS, D. R. Decreased neutrophils and megakaryocytes in anemic mice of genotype W/W^v. **Journal of Cellular Physiology**, 1969.

CHINEN, T. et al. An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function. **Nature immunology**, 2016.

CHIPUK, J. E. et al. **The BCL-2 Family Reunion** *Molecular Cell*, 2010.

CLARK, S. D. et al. Importance of extracellular loop one of the neuropeptide S receptor for biogenesis and function. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 130–138, 2010.

CLÉNET, M. L. et al. Peripheral human CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. **Scientific Reports**, 2017.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. **Wnt/ β -catenin signaling and disease** *Cell*, 2012.

COLLINGTON, S. J.; WILLIAMS, T. J.; WELLER, C. L. **Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues** *Trends in Immunology*, 2011.

COOKSON, H.; GRATTAN, C. An update on mast cell disorders. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, 2016.

COSTA, D. L. M. et al. Telangiectasia macularis eruptiva perstans: A rare form of adult mastocytosis. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, 2011.

COSTA, S. et al. **Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes** *Immunology*, 2019.

CRUSE, G.; METCALFE, D. D.; OLIVERA, A. **Functional deregulation of KIT: Link to mast cell proliferative diseases and other neoplasms** *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2014.

DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. **Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2014.

DAHLIN, J. S.; HALLGREN, J. **Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues** *Molecular Immunology*, 2015.

DAVIS, F. et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, 1977.

DAVIS, F. F. et al. Enzyme-Polyethylene Glycol Adducts: Modified Enzymes with Unique Properties. In: **Enzyme Engineering**. [s.l: s.n.].

DE ARAUJO, C. B. et al. A novel intracellular peptide derived from G1/S cyclin D2 induces cell death. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

DE FRANCESCHI, N. et al. Longin and GAF Domains: Structural Evolution and Adaptation to the Subcellular Trafficking Machinery. **Traffic**, 2014.

DEHBASHI, M. et al. Integral membrane protein expression of human CD25 on the cell surface of HEK293 cell line: The available cellular model of CD25 positive to facilitate in vitro developing assays. **Biomolecular Concepts**, 2019.

DELCONTE, R. B. et al. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. **Nature Immunology**, 2016.

DEY, M. et al. **The evolving role of CD8+CD28- immunosenescent T cells in cancer immunology***International Journal of Molecular Sciences*, 2019.

DILWORTH, M. V. et al. **Microbial expression systems for membrane proteins***Methods*, 2018.

DLOUHY, I. et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor (sIL2-R), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF) are associated with adverse clinical features and predict poor outcome in diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia Research**, 2017.

DOENER, F. et al. Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions. **International Immunology**, 2013.

DOZIER, J. K.; DISTEFANO, M. D. **Site-specific pegylation of therapeutic proteins***International Journal of Molecular Sciences*, 2015.

DRABER, P. et al. Signal transduction and chemotaxis in mast cells. **European Journal of Pharmacology**, 2016.

DROOGENDIJK, H. J. et al. Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: A phase II trial. **Cancer**, 2006.

DUFAIT, I. et al. Perforin and granzyme b expressed by murine myeloid-derived suppressor cells: A study on their role in outgrowth of cancer cells. **Cancers**, 2019.

DURAND, B. et al. Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3. **Blood**, 1994.

EFFROS, R. B. et al. **The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging***Immunological Reviews*, 2005.

EHRlich, P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. **Archiv für Mikroskopische Anatomie**, 1877.

ELLIS, J. M. Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. **Archives of pathology**, 1949.

ELLMIEIER, W.; HAUST, L.; TSCHISMAROV, R. **Transcriptional control of CD4 and**

CD8 coreceptor expression during T cell development*Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013.

EVERDS, N.; BOLLINGER, A. P. Hematology of the mouse. In: **The laboratory mouse**. [s.l: s.n.]. p. 331–347.

FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, 2014.

FDA. The Drug Development Process - Step 3: Clinical Research.

FELTON, J. M. et al. Mer-mediated eosinophil efferocytosis regulates resolution of allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2018.

FERRANDO-MARTÍNEZ, S. et al. IFN γ -TNF α -IL2-MIP1 α -CD107a+PRF1+ CD8 pp65-Specific T-Cell Response Is Independently Associated with Time to Death in Elderly Humans. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, 2014.

FERREIRA, I. G. et al. **Glycosylation as a main regulator of growth and death factor receptors signaling***International Journal of Molecular Sciences*, 2018.

FONTANA, A. et al. **Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase***Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008.

FOSER, S. et al. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification**, 2003.

FRIERI, M. **Mast Cell Activation Syndrome***Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2018.

FRIERI, M.; PATEL, R.; CELESTIN, J. Mast cell activation syndrome: A review. **Current Allergy and Asthma Reports**, 2013.

FRIESE, M. A. et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8 + T cells in multiple sclerosis. **Nature Medicine**, 2008.

G., P.; F.M., V. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, 2012.

GALLI, S. J. et al. **Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent advances***Annual Review of Immunology*, 2005.

GALLI, S. J.; TSAI, M. **Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity***European Journal of Immunology*, 2010.

GENG, X. et al. **Interleukin-2 and autoimmune disease occurrence and therapy***European review for medical and pharmacological sciences*, 2012.

GENNERY, A. R.; CANT, A. J. **Diagnosis of severe combined immunodeficiency***Journal of Clinical Pathology*, 2001.

GERMIC, N. et al. **Regulation of the innate immune system by autophagy: neutrophils, eosinophils, mast cells, NK cells***Cell Death and Differentiation*, 2019.

GLAZER, E. S. et al. Phase II Study of Pegylated Arginine Deiminase for Nonresectable and Metastatic Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 2010.

GOLDBERG, A. L. **Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins***Nature*, 2003.

GOZANI, O. et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*, 2003.

GRIMBALDESTON, M. A. et al. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant kit^{W-sh/W-sh} mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. **American Journal of Pathology**, 2005.

GUPTA, B.; LEVCHENKO, T. S.; TORCHILIN, V. P. **Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides***Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005.

GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. **Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets***Immunity*, 2012.

HARRISON, C. et al. **Practical management of patients with myelofibrosis receiving ruxolitinib***Expert Review of Hematology*, 2013.

HATFIELD, P. M.; VIERSTRA, R. D. Protein degradation. In: **Plant metabolism**. [s.l: s.n.]. p. 26–36.

HAWIGER, J. **Cellular import of functional peptides to block intracellular signaling***Current Opinion in Immunology*, 1997.

HENSEL, J. A. et al. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. **Laboratory Investigation**, 2019.

HENZ, B. M. et al. **Mast cells as initiators of immunity and host defense***Experimental Dermatology*, 2001.

HERMANS, M. A. W. et al. The JAK1/JAK2- inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. **Clinical and Experimental Allergy**, 2018.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques Dedication**. [s.l: s.n.].

HERSHFIELD, M. S. et al. Treatment of Adenosine Deaminase Deficiency with Polyethylene Glycol–Modified Adenosine Deaminase. **New England Journal of Medicine**, 1987.

HERSHFIELD, M. S. PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: An update after 8.5 years. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 1995.

HERSHKO, A. Y. et al. Mast Cell Interleukin-2 Production Contributes to Suppression of Chronic Allergic Dermatitis. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 562–571, 2011.

HOFFMAN, A. S. The early days of PEG and PEGylation (1970s–1990s). **Acta Biomaterialia**, 2016.

HOLTSBERG, F. W. et al. Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: Effects of PEG formulations on its pharmacological properties. **Journal of Controlled Release**, 2002.

HORNY, H. P.; SOTLAR, K.; VALENT, P. **Mastocytosis: Immunophenotypical features of the transformed mast cells are unique among hematopoietic cells***Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2014.

HSU, C. L.; NEILSEN, C. V.; BRYCE, P. J. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. **PLoS ONE**, 2010.

HU, Z. et al. Polymorphisms in CISH gene are associated with persistent hepatitis B virus

- infection in Han Chinese population. **PLoS ONE**, 2014.
- HUANG, W. et al. Maleimide–thiol adducts stabilized through stretching. **Nature Chemistry**, 2019.
- HUGHES, E. L. et al. Mast Cells Mediate Early Neutrophil Recruitment and Exhibit Anti-Inflammatory Properties via FPR2/ALX. **British Journal of Pharmacology**, 2017.
- HUNTER, R. P. et al. **Overview of the animal health drug development and registration process: An industry perspective** *Future Medicinal Chemistry*, 2011.
- IKEMIZU, S.; CHIRIFU, M.; DAVIS, S. J. **IL-2 and IL-15 signaling complexes: Different but the same** *Nature Immunology*, 2012.
- INABA, T. et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. **Genomics**, 1992.
- IZAWA, T. et al. Fas-Independent T-Cell Apoptosis by Dendritic Cells Controls Autoimmune Arthritis in MRL/lpr Mice. **PLoS ONE**, 2012.
- IZRAELSON, M. et al. **T cell immunity does not age in a long-lived rodent species** *bioRxiv*, 2018.
- J., B. The Role of Glycosylation in Receptor Signaling. In: **Glycosylation**. [s.l: s.n.].
- JÄEGER, E. et al. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: Implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. **International Journal of Cancer**, v. 66, n. 2, p. 162–169, 1996.
- JIAO, J. et al. Comparison of two commonly used methods for stimulating T cells. **Biotechnology Letters**, 2019.
- JM, H.; RB., C. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2003.
- JOHNSON, H. L. et al. Perforin competent CD8 T cells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. **PLoS ONE**, 2014.
- JOSHI, N. S. et al. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. **Immunity**, 2007.

KAARTINEN, M. T. et al. Transglutaminase crosslinking of SIBLING proteins in teeth. **Journal of Dental Research**, 2005.

KALENIK, B. M.; GÓRA-SOCHACKA, A.; SIRKO, A. **B-defensins – Underestimated peptides in influenza combat** *Virus Research*, 2018.

KAMINSKI, W. E. et al. **On the horizon: Flexible immune recognition outside lymphocytes** *Immunobiology*, 2013.

KARLAFTIS, V. et al. **Importance of post-translational modifications on the function of key haemostatic proteins** *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2016.

KAUSHANSKY, K. **Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2006.

KELLY-WELCH, A. E. et al. **Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps** *Science*, 2003.

KESSLER, B. M.; GLAS, R.; PLOEGH, H. L. **MHC class I antigen processing regulated by cytosolic proteolysis - Short cuts that alter peptide generation** *Molecular Immunology*, 2002.

KHALILZADEH, R. et al. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 2003.

KHOR, C. C. et al. CISH and Susceptibility to Infectious Diseases . **New England Journal of Medicine**, 2010.

KISSELEV, A. F. et al. The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3363–3371, 1999.

KITAMURA, Y.; ITO, A. **Mast cell-committed progenitors** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005.

KOOPMANN, J. O.; HÄMMERLING, G. J.; MOMBURG, F. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 80–88, 1997.

KOPP, J. et al. Boosting recombinant inclusion body production—from classical fed-batch approach to continuous cultivation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2019.

KOYAMA-NASU, R. et al. The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. **Oncogene**, 2013.

KOZAKI, I.; SHIMIZU, K.; HONDA, H. Disulfide linked hetero dimeric peptide arrays for screening functional peptides inside cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020.

KOZLOWSKI, A.; MILTON HARRIS, J. Improvements in protein PEGylation: Pegylated interferons for treatment of hepatitis C. **Journal of Controlled Release**, 2001.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. **Mast cell: A multi-functional master cell** *Frontiers in Immunology*, 2016.

KUMAR, S. et al. Ex vivo antigen-pulsed PBMCs generate potent and long lasting immunity to infection when administered as a vaccine. **Vaccine**, 2017.

KUYKENDALL, J. R.; KUYKENDALL, N. S. Aldehydes. In: **Comprehensive Toxicology: Third Edition**. [s.l: s.n.].

LAFLEUR, M. A. et al. MRGPRX2 activation as a rapid, high-throughput mechanistic-based approach for detecting peptide-mediated human mast cell degranulation liabilities. **Journal of Immunotoxicology**, 2020.

LAI, K. N.; LEUNG, J. C. K.; LAI, F. M. M. Soluble interleukin 2 receptor release, interleukin 2 production, and interleukin 2 receptor expression in activated T-lymphocytes in vitro. **Pathology**, 1991.

LAIDLAW, B. J.; CRAFT, J. E.; KAECH, S. M. **The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory** *Nature Reviews Immunology*, 2016.

LANDRY, J. J. M. et al. The genomic and transcriptomic landscape of a hela cell line. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 2013.

LANGE, M. et al. **Diffuse cutaneous mastocytosis: Analysis of 10 cases and a brief review of the literature** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012.

LANGE, M. et al. Does the aberrant expression of CD2 and CD25 by skin mast cells truly correlate with systemic involvement in patients presenting with mastocytosis in the skin? **International Archives of Allergy and Immunology**, 2014.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 2018.

LE, M. et al. **Natural history and treatment of cutaneous and systemic mastocytosis** *Postgraduate Medicine*, 2017.

LEE, H. et al. N-terminal site-specific mono-PEGylation of epidermal growth factor. **Pharmaceutical Research**, 2003.

LEICHERT, L. I.; JAKOB, U. Protein thiol modifications visualized in vivo. **PLoS Biology**, 2004.

LENARDO, M. J. Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. **Nature**, 1991.

LI, G. Z. et al. Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts. **Polymer Chemistry**, 2010.

LI, S. et al. Cytokine-induced Src homology 2 protein (CIS) promotes T cell receptor-mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells. **Journal of Experimental Medicine**, 2000.

LI, X.; XIAO, B.; CHEN, X. S. **DNA Methylation: a New Player in Multiple Sclerosis** *Molecular Neurobiology*, 2017.

LIMA, K. et al. Reversine exhibits antineoplastic activity in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Scientific Reports**, 2019.

LIN, J. X.; LEONARD, W. J. **The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines** *Oncogene*, 2000.

LIU, R. et al. PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis. **Nucleic Acids Research**, 2018.

LU, X.; ZHANG, K. **PEGylation of therapeutic oligonucleotides: From linear to highly branched PEG architectures** *Nano Research*, 2018.

LUBBERS, R. et al. **Production of complement components by cells of the immune system** *Clinical and Experimental Immunology*, 2017.

LYAPUN, I. N.; ANDRYUKOV, B. G.; BYNINA, M. P. **HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks** *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2019.

MALBEC, O.; DAËRON, M. **The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation** *Immunological Reviews*, 2007.

MANN, M.; JENSEN, O. N. **Proteomic analysis of post-translational modifications** *Nature Biotechnology*, 2003.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. **Defining memory CD8 T cell** *Frontiers in Immunology*, 2018.

MASCARENHAS, J.; HOFFMAN, R. Ruxolitinib: The first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. **Clinical Cancer Research**, 2012.

MATITO, A.; CARTER, M. Cutaneous and systemic mastocytosis in children: A risk factor for anaphylaxis? **Current Allergy and Asthma Reports**, 2015.

MAURER, M. et al. **What is the physiological function of mast cells? Introduction** *Experimental Dermatology*, 2003.

MAURO, V. P. **Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations** *BioDrugs*, 2018.

MEIXIONG, J. et al. Activation of Mast-Cell-Expressed Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors Drives Non-histaminergic Itch. **Immunity**, 2019.

MERO, A. et al. Covalent conjugation of poly(Ethylene glycol) to proteins and peptides: Strategies and methods. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.].

MEYER, A.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. CD25 Is Expressed by Canine Cutaneous Mast Cell Tumors but not by Cutaneous Connective Tissue Mast Cells. **Veterinary Pathology**, 2012.

MOLDERINGS, G. J. et al. **Pharmacological treatment options for mast cell activation disease** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2016.

MORALES, J. K. et al. **Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway** *Genes and Immunity*, 2010.

MORGAN, N. G. et al. **Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus** *IUBMB Life*, 2014.

MOSMANN, T. R. et al. Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1987.

MOSS, R. B. et al. **Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: Therapeutic implications***Expert Opinion on Biological Therapy*, 2004.

MUKAI, K. et al. **Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors***Immunological Reviews*, 2018.

MÜNZ, C. **Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation***Trends in Immunology*, 2016.

NAIR, D. P. et al. **The Thiol-Michael addition click reaction: A powerful and widely used tool in materials chemistry***Chemistry of Materials*, 2014.

NAKASE, K. et al. Diagnostic and clinical importance of interleukin- 2 receptor alpha chain expression on non- T- cell acute leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, 1992.

NAKASE, K. et al. Interleukin-2 receptor alpha chain on acute myelocytic leukemia cells is involved in cell-to-cell interactions. **Leukemia Research**, 1993.

NAKASE, K. et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor in acute myeloid leukemia: Correlation with poor prognosis and CD4 expression on blast cells. **Cancer Epidemiology**, 2012.

NATOLI, G. et al. CD25 Activities Independent – Cells Discriminated By IL-2 Two Functionally Distinct Subsets of Mast Two Functionally Distinct Subsets of Mast Cells Discriminated By IL-2–Independent CD25 Activities. **DCSupplemental The Journal of Immunology by guest on May The Journal of Immunology The Journal of Immunology**, 2018.

NAVINÉS-FERRER, A. et al. MRGPRX2-mediated mast cell response to drugs used in perioperative procedures and anaesthesia. **Scientific Reports**, 2018.

NEGRIN, R. S. **Role of regulatory T cell populations in controlling graft vs host disease***Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 2011.

NIGROVIC, P. A. et al. Genetic inversion in mast cell-deficient Wsh mice interrupts corin

and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. **American Journal of Pathology**, 2008.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Research**, 1960.

NURMATOV, U. B. et al. H1-antihistamines for primary mast cell activation syndromes: A systematic review. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2015.

ORINSKA, Z. et al. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. **Blood**, 2005.

OROZCO VALENCIA, A. et al. **Interleukin-2 as immunotherapeutic in the autoimmune diseases***International Immunopharmacology*, 2020.

PALCZEWSKI, K. **G protein-coupled receptor rhodopsin***Annual Review of Biochemistry*, 2006.

PANDEY, B. K. et al. Impact of site-specific PEGylation on the conformational stability and folding rate of the Pin WW domain depends strongly on PEG oligomer length. **Bioconjugate Chemistry**, 2013.

PARAMBATH, A. **Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol**. [s.l: s.n.].

PARDANANI, A. et al. Treatment of systemic mast cell disease with 2-chlorodeoxyadenosine. **Leukemia Research**, 2004.

PARDANANI, A. Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. **American Journal of Hematology**, 2019.

PASSAMONTI, F. et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. **The Lancet Oncology**, 2017.

PASSER, B. et al. Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β protein precursor. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2, n. 3–4, p. 289–301, 2000.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. **State of the art in PEGylation: The great versatility**

achieved after forty years of researchJournal of Controlled Release, 2012.

PETRA, A. I. et al. **Spectrum of mast cell activation disorders**Expert Review of Clinical Immunology, 2014.

PFISTER, D.; MORBIDELLI, M. **Process for protein PEGylation**Journal of Controlled Release, 2014.

PLESNER, B. Biophysical characterisation of PEGylated proteins and highly concentrated protein solutions. **Thèse**, 2010.

PLUM, T. et al. Human Mast Cell Proteome Reveals Unique Lineage, Putative Functions, and Structural Basis for Cell Ablation. **Immunity**, 2020.

POOLE, L. B. **The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry**Free Radical Biology and Medicine, 2015.

POULSEN, L. K. et al. **Beyond IgE-when Do IgE-Crosslinking and effector cell activation lead to clinical anaphylaxis?**Frontiers in Immunology, 2017.

PRUS, G. et al. **Analysis and Interpretation of Protein Post-Translational Modification Site Stoichiometry**Trends in Biochemical Sciences, 2019.

RAMKUMAR, S. et al. Chemical complexity of protein determines optimal *E. coli* expression host; A comparative study using Erythropoietin, Streptokinase and Tumor Necrosis Factor Receptor. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017.

RAVIKIRAN, B.; MAHALAKSHMI, R. **Unusual post-translational protein modifications: The benefits of sophistication**RSC Advances, 2014.

REBER, L. L. et al. **Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity**Mucosal Immunology, 2015.

REITER, A.; GEORGE, T. I.; GOTLIB, J. **New developments in diagnosis, prognostication, and treatment of advanced systemic mastocytosis**Blood, 2020.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. **Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents**Clinical and Experimental Immunology, 2016.

ROSSIGNOL, J. et al. **Recent advances in the understanding and therapeutic management of mastocytosis [version 1; peer review: 4 approved]**F1000Research, 2019.

ROY, K.-M. Thiols and Organic Sulfides. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. [s.l: s.n.].

RYAN, R. E. et al. Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: Implications for inflammation and metastasis. **Cytokine**, 2015.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. **Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies****Molecular and Cellular Biochemistry**, 2008.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. **Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance****Annual Review of Immunology**, 2004.

SALUJA, R. et al. **The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders****Molecular Immunology**, 2015.

SANTIAGO-RABER, M. L. et al. Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. **Journal of Experimental Medicine**, 2003.

SANTOS, J. H. P. M. et al. **Protein PEGylation for the design of biobetters: From reaction to purification processes****Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2018.

SAPRA, P. et al. Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model. **Clinical Cancer Research**, 2008.

SARV, T.; HÖRAK, P. Phytohaemagglutinin injection has a long-lasting effect on immune cells. **Journal of Avian Biology**, 2009.

SATHER, B. D. et al. Altering the distribution of Foxp3+ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **Journal of Experimental Medicine**, 2007.

SCHIMPL, A. et al. **IL-2 and autoimmune disease****Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2002.

SCHMETZER, O. et al. Murine and human mast cell progenitors. **European Journal of Pharmacology**, 2016.

SCHOCH, C. In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 2003.

SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates

between human regulatory and activated T cells. **Journal of Experimental Medicine**, 2006.

SHAMAS-DIN, A. et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2013.

SHARMA, S. et al. Deletion of Δ dblGata motif leads to increased predisposition and severity of IgE-mediated food-induced anaphylaxis response. **PLoS ONE**, 2019.

SHATROVA, A. N. et al. CD25 expression on the surface of Jurkat cells. **Cell and Tissue Biology**, 2015.

SHATZ, W. et al. Identification and characterization of an octameric PEG-protein conjugate system for intravitreal long-acting delivery to the back of the eye. **PLoS ONE**, 2018.

SHELBURNE, C. P. et al. Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. **Blood**, 2003.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. **Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases** **Genes and Development**, 2004.

SHINOURA, N. et al. Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. **Cancer Research**, 1999.

SHOKRZADEH, M.; MODANLOO, M. An overview of the most common methods for assessing cell viability. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, 2017.

SIBILANO, R.; FROSSI, B.; PUCILLO, C. E. **Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways** **European Journal of Immunology**, 2014.

SIEBENHAAR, F. et al. **Mast Cells as Drivers of Disease and Therapeutic Targets** **Trends in Immunology**, 2018.

SILVA, D. A. et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. **Nature**, v. 565, n. 7738, p. 186–191, 2019.

SOLMS, A. et al. Direct comparison of two extended half-life PEGylated recombinant FVIII products: a randomized, crossover pharmacokinetic study in patients with severe hemophilia A. **Annals of Hematology**, 2020.

SONBOL, M. B. et al. Comprehensive review of JAK inhibitors in myeloproliferative

neoplasms. **Therapeutic Advances in Hematology**, 2013.

SOROKIN, A. V.; KIM, E. R.; OVCHINNIKOV, L. P. Proteasome system of protein degradation and processing. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 13, p. 1411–1442, 2010.

SOTLAR, K. et al. CD25 Indicates the Neoplastic Phenotype of Mast Cells. **The American Journal of Surgical Pathology**, 2004.

SPRUNG, M. M. A summary of the reactions of aldehydes with amines. **Chemical Reviews**, 1940.

STAUBER, D. J. et al. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2788–2793, 2006.

STEINHART, Z.; ANGERS, S. **Wnt signaling in development and tissue homeostasis** *Development (Cambridge, England)*, 2018.

STOTT, K. et al. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: Implications for neurodegenerative diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1995.

SZABA, F. M. et al. TNF α and IFN γ but Not Perforin Are Critical for CD8 T Cell-Mediated Protection against Pulmonary *Yersinia pestis* Infection. **PLoS Pathogens**, 2014.

TATARKIEWICZ, J. et al. **New antihistamines – Perspectives in the treatment of some allergic and inflammatory disorders** *Archives of Medical Science*, 2019.

TAWARA, K. et al. HIGH expression of OSM and IL-6 are associated with decreased breast cancer survival: Synergistic induction of IL-6 secretion by OSM and IL-1 β . **Oncotarget**, 2019.

TEODOSIO, C. et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010.

THAL, D. M. et al. **Structural insights into G-protein-coupled receptor allostery** *Nature*, 2018.

TIAN, E.; HOFFMAN, M. P.; TEN HAGEN, K. G. O-glycosylation modulates integrin and FGF signalling by influencing the secretion of basement membrane components.

Nature Communications, 2012.

TKACZYK, C. et al. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. **Molecular Immunology**, 2002.

TROBAUGH, D. W. et al. Altered effector functions of virus-specific and virus cross-reactive CD8⁺ T cells in mice immunized with related flaviviruses. **European Journal of Immunology**, 2010.

TSAI, M. et al. **Using mast cell knock-in mice to analyze the roles of mast cells in allergic responses in vivo** **Chemical Immunology and Allergy**, 2005.

TSAI, M.; GRIMBALDESTON, M.; GALLI, S. J. Mast cells and immunoregulation/immunomodulation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2011.

VALENT, P. **Mast cell activation syndromes: Definition and classification** **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2013.

VALENT, P. et al. **Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts** **Theranostics**, 2020.

VARRICCHI, G. et al. **Physiological Roles of Mast Cells: Collegium Internationale Allergologicum Update 2019** **International Archives of Allergy and Immunology**, 2019.

VERDINE, G. L.; HILINSKI, G. J. Stapled peptides for intracellular drug targets. **Methods in Enzymology**, v. 503, p. 3–33, 2012.

VIRÁG, D. et al. **Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications** **Chromatographia**, 2020.

WAGNER, A.; SOUZA, S. DE; CRUVINEL, W. D. M. Immune System – Part II Basis of the immunological response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

WALKER, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. **New insights into the role of mast cells in autoimmunity: Evidence for a common mechanism of action?** **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2012.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. **Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins** **Nature Biotechnology**, 2006.

WALSH, G. M. **Anti-inflammatory properties of antihistamines: An update** *Clinical and Experimental Allergy Reviews*, 2005.

WONG, C. P. et al. Identical β Cell-Specific CD8 + T Cell Clonotypes Typically Reside in Both Peripheral Blood Lymphocyte and Pancreatic Islets . **The Journal of Immunology**, 2007.

WOODFOLK, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E. **The immune response to intrinsic and extrinsic allergens: determinants of allergic disease.** *International archives of allergy and immunology*, 2002.

WUEST, S. C. et al. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. **Nature Medicine**, 2011.

XIAO, F. et al. Oncostatin M inhibits myoblast differentiation and regulates muscle regeneration. **Cell Research**, 2011.

XU, J. et al. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. RC118, 2001.

YACOUB, A.; PROCHASKA, L. Ruxolitinib improves symptoms and quality of life in a patient with systemic mastocytosis. **Biomarker Research**, 2016.

YAMASAKI, S.; SAITO, T. **Progress in allergy signal research on mast cells: Signal regulation of multiple mast cell responses through Fc ϵ RI** *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008.

YANG, H. W. et al. An investigation of the distribution and location of mast cells affected by the stiffness of substrates as a mechanical niche. **International Journal of Biological Sciences**, 2018.

YANG, J. et al. Granzyme B is an essential mediator in CD8 T cell killing of theileria parva-infected cells. **Infection and Immunity**, 2019.

YOSHIMURA, A. et al. Mouse oncostatin M: An immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. **EMBO Journal**, 1996.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. **SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation** *Nature Reviews Immunology*, 2007.

YOSHIMURA, S. H.; HIRANO, T. **HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments?** *Journal of Cell Science*, 2016.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. **The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008.

YOUNGBLOOD, B. et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature*, 2017.

YU, Y. et al. Non-IgE mediated mast cell activation. *European Journal of Pharmacology*, 2016.

ZHANG, D.; ZHAO, Q.; WU, B. Structural studies of G protein-coupled receptors. *Molecules and Cells*, 2015.

ZHAO, H. et al. Novel prodrugs of SN38 using multiarm poly(ethylene glycol) linkers. *Bioconjugate Chemistry*, 2008.

ZHERNAKOVA, A.; WITHOFF, S.; WIJMENGA, C. **Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases** *Nature Reviews Endocrinology*, 2013.

ZHOU, J. S. et al. Mast cell deficiency in Kit^{W-sh} mice does not impair antibody-mediated arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 2007.

ZHU, L. et al. N-Terminus and Lysine Side Chain pKa Values of Melittin in Aqueous Solutions and Micellar Dispersions Measured by ¹⁵N NMR. *Biochemistry*, 1995.

ZIA, F. et al. Alginate-Poly(Ethylene) Glycol and Poly(Ethylene) Oxide Blend Materials. In: **Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, Biotechnology and Materials Science**. [s.l: s.n.].

ZIEGLER, A. et al. The cationic cell-penetrating peptide CPPTAT derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: Optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 138–148, 2005.

ZOLOTAREVSKY, Y. et al. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology*, v. 123, n. 1, p. 163–172, 2002.

CAPÍTULO 3

Atividade biológica do produto IL-2PEGpep5 em
Mastócitos e célula leucêmica

3. INTRODUÇÃO

3.1. Os mastócitos (MCs)

O biólogo Alemão Paul Ehrlich foi o primeiro a descrever os mastócitos, no ano de 1978, reportando como células granulares e as maiores responsáveis pelos altos níveis de histamina no corpo, que participavam nas patologias dos processos alérgicos e inflamatórios nos tecidos (EHRlich, 1877). Logo após este tempo, os mastócitos (ou também denominados como os MCs) foram mais claramente caracterizados como um membro importante das células imuno-associadas, chaves iniciadoras na resposta imune que participam como moduladores alérgicos, anafiláticos e células efetoras na fase inicial aguda das reações inflamatórias da hipersensibilidade tipo I, em humanos, igual como em outros mamíferos (AMIN, 2012; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014).

Sob condições fisiológicas normais, as funções dos MCs incluem a regulação da secreção e permeabilidade epitelial-vascular, peristaltismo e bronco-constricção, fluxo sanguíneo e coagulação (KRYSTEL-WHITEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016; MAURER et al., 2003). Entre os já caracterizados processos de resposta imunológica a partir dos MCs, se destacam o papel fundamental do recrutamento e ativação de glóbulos brancos como linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, e sua participação das interações neuro-imunes e em funções de reparo tecidual, como a cicatrização de feridas e alguns tipos de fibroses (CHEN et al., 2001; HENZ et al., 2001; HUGHES et al., 2017; ORINSKA et al., 2005).

O mecanismo de resposta imune a partir dos MCs depende de um alto rango de receptores superficiais presentes na sua membrana externa, permitindo assim, gerar respostas a diferentes estímulos. Deste modo, a formação dos MCs começa na medula óssea, a partir das células hematopoiéticas imaturas, como o primeiro passo, logo e em resposta a sinalização do fator de células-tronco (*c-kit*), os MCs são ativados. Outra característica importante é a alta afinidade da ligação com a imunoglobulina E (IgE) com o receptor FcεRI, que é um forte indutor a respostas imunológicas (DRABER et al., 2016; GALLI et al., 2005), embora a sua função de crescimento e expansão celular seja regulada pela expressão do receptor tirosina quinasa trans-membrana Kit (CD117) (BABOLEWSKA; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, 2012).

Estes tipos de células derivam exclusivamente de um único progenitor ou linhagem celular específica para a sua viabilidade (GURISH; AUSTEN, 2012; HORNY; SOTLAR; VALENT, 2014; PLUM et al., 2020; VALENT et al., 2020), sendo não dependente de uma divisão celular (CHEN et al., 2005; KITAMURA; ITO, 2005; SCHMETZER et al., 2016). Os MCs também podem ser ativados pela via de sinal dos receptores *Toll-Like* (TLRs) presentes na membrana, ou pela presença de neuropeptídeos, proteases ou citocinas. Um certo número de citocinas presentes no meio extracelular, como são IL-2, IL-3, IL-4, IL-13 e IL-33, podem atuar como moléculas sinalizadoras nos processos regulatórios, promovendo estímulos no desenvolvimento da resposta imune (HERSHKO et al., 2011; KELLY-WELCH et al., 2003; YU et al., 2016). Do mesmo modo, os MCs podem ser acionados por outro tipo de mediadores presentes no microambiente, como é o caso da histamina. Além deste composto orgânico, as modificações epigenéticas do DNA podem induzir, na maioria dos casos, as alterações do fenótipo celular e influenciar na sua função, seja como amplificadores ou supressores da resposta imune inata e/ou adquirida (DURAND et al., 1994; GALLI; TSAI, 2010; MUKAI et al., 2018; SALUJA et al., 2015).

Posterior a maturação dos mastócitos, as células são realocadas através do sistema cardiovascular para os diferentes tecidos e órgãos, como são o pulmão e sistema gastrointestinal, constituindo assim, uma das células participantes na primeira linha de defesa do organismo (DAHLIN; HALLGREN, 2015; YANG et al., 2018). Como característica importante também a ser considerada, são as propriedades biológicas dos MCs e sua capacidade de contribuir com uma infinidade de eventos de proteção e geração de respostas contra processos de angiogênese e exacerbação da inflamação, incluindo infecções por patógenos, devido a sua grande distribuição ao longo do organismo (COLLINGTON; WILLIAMS; WELLER, 2011). Por outro lado, uma outra função mencionada para os MCs se dá pela estimulação de diversas atividades em outros grupos de células do sistema imunológico, como são as células monocleares, macrófagos e células dendríticas (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). No entanto, devido à sua funcionalidade versátil, os MCs podem tornar-se precursores no desenvolvimento das doenças autoimunes e patologias de caráter alérgico e inflamatório (WALKER; HATFIELD; BROWN, 2012).

Outro aspecto importante na ativação dos mastócitos procede na secreção de grânulos pré-formados, processo denominado como a desgranulação. Estes grânulos podem ser estocados no citoplasma de 50 a 200 por célula (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). Assim, o processo de exocitose granular desencadeia ativação e a presença de precursores como a histamina, incluindo proteases, vasoativos intermediários, acompanhados por outros mediadores imunológicos, como citocinas inflamatórias que, por sua vez, podem ser pré-armazenadas ou sintetizadas pelas próprias células. Este mecanismo metabólico é frequentemente seguido por um influxo extracelular de íons de cálcio Ca^{2+} , como elemento essencial do processo. Alguns estudos reportam que os íons de cálcio Ca^{2+} estão associados ao deslocamento e regulação da função celular dos mastócitos e, além disso, foi demonstrado que o influxo dos íons de cálcio Ca^{2+} para o exterior da célula permite modular a mobilidade espontânea em direção aos estímulos mediados por antígenos (Figura 20).

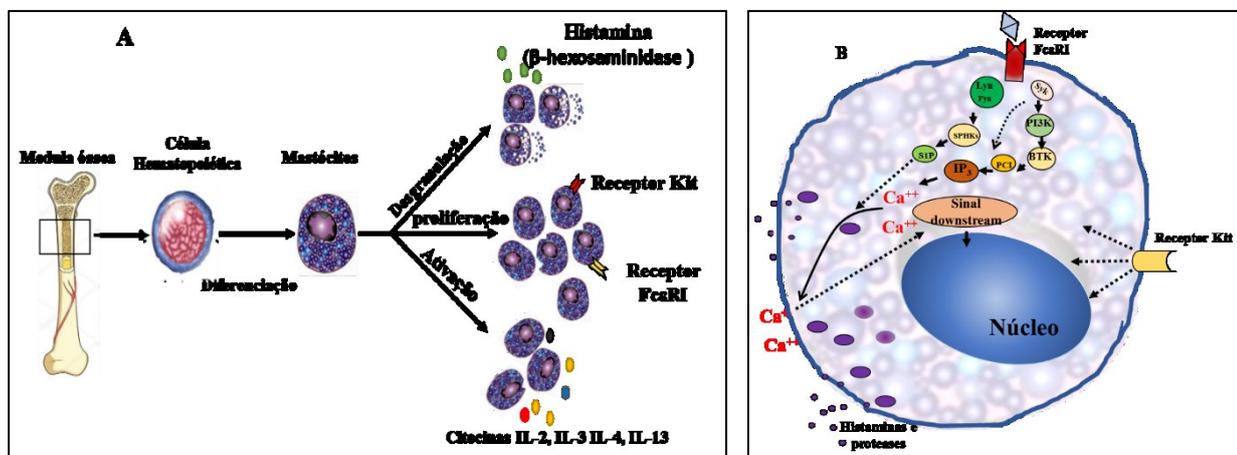


Figura 20. (A) esquema representativo da formação dos mastócitos, diferenciação e função. (B), vias de transcrição a partir do estímulo por IgE (receptor FcεRI) ou citocinas (receptor Kit) e canal de fluxo de íons cálcio adaptado de (GERMIC et al., 2019) e (SIEBENHAAR et al., 2018)

3.1.1 Patologias alérgicas e inflamatórias formadas a partir dos MCs

Nas últimas décadas, os mastócitos foram considerados como células com um alto potencial reativo e que expressam um grande número de receptores com especificidade

para vários tipos de estímulos, contribuindo tanto para homeostases quanto para a manifestação de patologias imunológicas nos humanos.

Estudos realizados em linhagens de camundongos nocaute com deficiência na sinalização no receptor *c-kit* ($KIT^W KIT^{W/W-V}$ e C57BL $KIT^W KIT^{W-sh/W-sh}$) (TSAI et al., 2005), mostraram ter um bloqueio permanente no desenvolvimento dos MCs, limitando sua presença nos tecidos quando comparados com a linhagem parental. Em outros estudos relacionados utilizando a linhagem WBB6F1- $Kit^{W/W-V}$ de camundongo como modelo, que possui uma proteína truncada Kit não expressa na superfície celular, foi observado um número reduzido de neutrófilos e basófilos (CHERVENICK; BOGGS, 1969; DOENER et al., 2013; NIGROVIC et al., 2008; ZHOU et al., 2007). Em contraste, a linhagem C57BL/6- $KIT^{W-sh/W-sh}$, que possui uma mutação pontual na sua estrutura proteica, apresentou um aumento no número, tanto dos neutrófilos como dos basófilos, causando uma desordem autoimune (GRIMBALDESTON et al., 2005). Também em outros estudos, se tem mostrado uma importante função do fator de transcrição GATA-1 na maturação e desgranulação dos MCs. O GATA-1 tem sido descrito como uma proteína associada com o receptor FcεRI, sinalizando uma via intracelular, após ligação com a proteína IgE e em resposta aos processos pré-inflamatórios. Assim, nestes estudos, a diminuição da atividade do GATA-1 leva a uma redução da proliferação, expressão e desgranulação dos mastócitos *in vitro*, assim como uma redução da expressão do receptor FcεRIα. Entretanto, os resultados *in vivo* mostraram que a diminuição do GATA-1 manteve os níveis normais de mastócitos no tecido homeostático, aumentando a presença de outras células imunes, como as CD4 + Th2 e iMMC9, induzidas por antígeno e aumento das reações mediadas por mastócitos dependentes de IgE (SHARMA et al., 2019). Sob esse cenário, os mastócitos vêm revelando um papel protagônico na formação, distribuição celular e no recrutamento de outras células que atuam nas respostas anafiláticas e pró-inflamatórias.

Também se pode descrever que a ativação dos mastócitos pode ser altamente variável e dependente dos fatores intrínsecos ou extrínsecos (WOODFOLK; PLATTS-MILLS, 2002). Dentro dos fatores intrínsecos, encontram-se as alterações de característica biológica e funcional dos MCs, causados principalmente pelas descontroladas respostas

celulares, denominadas como a síndrome de ativação de mastócitos (MCAS) (AFRIN et al., 2017). Além disso, uma excessiva proliferação celular pode resultar em outras patologias crônicas, como a mastocitose sistêmica (SM) ou cutânea (CM) (ABID; MALONE; CURCI, 2016; LE et al., 2017). No caso dos fatores extrínsecos, estes são mediados pela interação da imunoglobulina E (IgE) com o receptor FcεRI (POULSEN et al., 2017), deficiências ou alterações estruturais neste marcador molecular nos mastócitos podem eventualmente ser traduzidos em sinais incorretos, através de vias específicas e dependentes da imunoglobulina IgE, conduzindo assim, ao desenvolvimento inadequado das reações alérgicas (YAMASAKI; SAITO, 2008). Por último, os elementos exógenos, como antígenos e os ambientais inócuos, jogam um papel importante como os fatores que promovem a ativação deste tipo de respostas imunológicas indesejáveis (REBER et al., 2015; TSAI; GRIMBALDESTON; GALLI, 2011).

O desenvolvimento dos mastócitos anormais pode ser classificado como primário ou secundário, dependendo de sua forma de ativação (AKIN, 2014; PETRA et al., 2014). Por um lado, a ativação primária acontece por alterações genéticas nas células existentes, principalmente em seus receptores, induzindo a uma excessiva expansão clonal ou proliferação dos MCs, levando a um acúmulo irregular nos tecidos, incluindo a pele, medula óssea e o trato gastrointestinal. Por outro lado, a ativação secundária pode ocorrer como um resultado indireto, decorrente da presença de outro tipo de doenças ou condição fisiológica negativa. Em humanos, podem levar facilmente a reações alérgicas iniciadas pela simples interação da imunoglobulina IgE e o receptor FcεRI, presente na membrana dos MCs e dependente de ativação (AKIN, 2017; COOKSON; GRATTAN, 2016; VARRICCHI et al., 2019). Existe também uma outra classe patológica denominada síndrome de ativação idiopática de mastócitos, causada pela ativação irregular não clonal dos mastócitos, cujo diagnóstico tem sido reportado em pacientes com frequentes e recorrentes episódios de alguns sintomas como a diminuição da pressão sanguínea, urticária, inchaço, problemas respiratórios, alérgicos e anafiláticos (AKIN; VALENT; METCALFE, 2010; CARDET; CASTELLS; HAMILTON, 2013; FRIERI, 2018).

3.1.2 Ativação Primária

3.1.2.1 Mastocitose

Por muitos anos, acreditou-se que a mastocitose era uma doença da pele. No entanto, (ELLIS, 1949) descreveu o primeiro caso de mastocitose e, nas próximas décadas, diferentes sub variantes de mastocitose foram reportadas, mostrando certas diferenças em casos clínicos e apresentando diferentes sintomas. A mastocitose pode ser apontada como um grupo heterogêneo de condições neoplásicas, caracterizadas pela expansão e acúmulo de mastócitos clonais com manifestações cutâneas ou sistêmicas. Com base na classificação atual da Organização Mundial da Saúde (OMS), a mastocitose pode ser dividida em sete subtipos: a mastocitose cutânea (CM); a mastocitose sistêmica indolente (ISM); a mastocitose sistêmica agressiva (ASM); a leucemia de mastócitos (MCL); o mastocitoma extra cutâneo e sarcoma de mastócitos; e, por último, a mastocitose sistêmica, como uma doença de linhagem hematológica clonal não mastocitária associada (SM-AHNMD), (AKIN; VALENT; METCALFE, 2010).

Como característica clínica, os eventos cutâneos apresentam-se unicamente no tecido epidérmico, sendo mais frequente em crianças, com algumas lesões vermelhas ou marrons, coceira e, em alguns casos, alto risco de reações alérgicas agudas (MATITO; CARTER, 2015). As mais comuns afeções dentro da mastocitose cutânea incluem a urticária pigmentosa, mastocitose cutânea difusa, mastocitoma e telangiectasia macularis eruptiva, principalmente nos adultos (BROCKOW, 2004; COSTA et al., 2011; LANGE et al., 2012; PARDANANI, 2019). Por outro lado, a mastocitose sistêmica caracteriza-se por afetar alguns órgãos, devido a um elevado número de acúmulo de mastócitos em determinados tecidos, como a medula óssea e os intestinos, desencadeando fortes respostas inflamatórias, sendo esta a síndrome mais frequente dentre a população adulta. Na maioria dos casos reportados em adultos, aproximadamente mais de 90% apresentou algum tipo de alteração autossomal a partir de mutações na região codificante do gene KIT (CD117), que expressa o receptor superficial tirosina quinase trans-membrana (CRUSE; METCALFE; OLIVERA, 2014). A mutação genética mais comum é a alteração pontual D816V, identificada dentro do exon 17 da sequência do gene KIT (AROCK et al., 2015). Por outro

lado, existem outros marcadores de superfície celular das populações de mastócitos monoclonais detectados em testes de diagnóstico, como são o CD2 e CD25, em conjunto com a expressão do CD117. Assim, a co-expressão destes dois receptores pode ser considerada como um critério na identificação de distúrbios derivados da proliferação clonal com atípica e morfologia pela ativação primária de mastócitos (CHERIAN et al., 2016; LANGE et al., 2014; SOTLAR et al., 2004).

3.1.3 Ativação secundária

3.1.3.1 Manifestações reativas

A síndrome de ativação secundária ou reativa dos mastócitos, por ser mediada pela presença da imunoglobulina E (IgE) específica decorrente de vários estímulos externos como físicos, estresse, infecções agudas ou crônicas; venenos ou por outra afeção inflamatória subjacente envolvendo mastócitos ou neoplasias (BONAMICHI-SANTOS; CASTELLS, 2016; VALENT, 2013). Geralmente, os pacientes com este tipo de patologia apresentam números normais de mastócitos nos tecidos. No entanto, o aumento dos níveis observados em alguns pacientes seja causado por outro tipo de resposta de hiperplasia mastocitária (FRIERI, 2018; FRIERI; PATEL; CELESTIN, 2013). A ação começa através do receptor policatiônico MRGPRX2 ancorado na membrana dos mastócitos, pelo qual é possível detectar e responder a uma variedade de estímulos como os neuropeptídeos, opioides (morfinas) e os fármacos catiônicos (LAFLEUR et al., 2020; MEIXIONG et al., 2019; NAVINÉS-FERRER et al., 2018). O receptor MRGPRX2, ou também conhecido como o receptor acoplado à proteína G relacionada dos mastócitos, é um receptor transmembrana de sete domínios (heptahelicoidal), que pertence à família rodopsina classe A presentes nos humanos (PALCZEWSKI, 2006; THAL et al., 2018; ZHANG; ZHAO; WU, 2015). Assim, este receptor, após ser ativado por estímulo, será capaz de induzir a desgranulação direta e reações anafiláticas. Estudos mostraram que o RNA mensageiro do MRGPRX2 está presente em diferentes tecidos que compreendem: adiposo, esôfago, pulmões, trato urinário e em altos níveis na epiderme, ausente em outros tipos de órgãos como o rim, fígado, ovário ou o pâncreas (FAGERBERG et al., 2014). Da mesma forma, os mastócitos também possuem receptores de reconhecimento a diferentes padrões de antígenos, como os receptores complemento e os receptores IgG trans-membrana, que podem agir em determinado momento como sentinelas circundantes prestes a ativar algum

processo inflamatório no organismo (MALBEC; DAËRON, 2007; TKACZYK et al., 2002).

Em um contexto geral, os mastócitos são células granulares secretoras multifuncionais que exercem sua atividade biológica como unidades imunomediadoras positivas ou negativas, contribuindo tanto no sistema homeostático imunológico como no efeito na geração de respostas nos processos alérgicos e inflamatórios (BULFONE-PAUS et al., 2017). A maioria destas ações corresponde à expressão e sinalização de um determinado número de receptores presentes na membrana celular, sendo estes dependentes ou/e independentes da ativação das células mastocitárias (HSU; NEILSEN; BRYCE, 2010; SIBILANO; FROSSI; PUCILLO, 2014).

Assim, a diversidade de expressão de diferentes receptores nos mastócitos, podem ser consideradas como moléculas que cumprem um papel essencial, podendo ser alvos específicos a serem explorados para futuros tratamentos terapêuticos, direcionados a modular tanto a ativação como impedindo a ação celular incorreta resultante da função dos MCs. Atualmente, existem vários produtos farmacológicos utilizados que acredita-se ter um efeito na estabilidade dos mastócitos, que podem ser orientados para uso em tratamentos clínicos para certos tipos de doenças crônicas inflamatórias (MOLDERINGS et al., 2016). O uso de anti-histamínicos como são zafirlinca, cetirizina, mizolastina; e medicamentos de nova geração como desloratadina, fexofenadina e levocetirizina, evidenciaram ter propriedades antialérgicas e anti-inflamatórias, além de estabilizadoras dos MCs (TATARKIEWICZ et al., 2019; WALSH, 2005). Esta medicação atua como antagonista do receptor de membrana H1, interferindo na recepção da histamina nas células, atenuando os sintomas (CATALDI et al., 2014; NURMATOV et al., 2015). Por outro lado, existem fármacos que interferem tanto na ativação como na proliferação e viabilidade dos mastócitos, tais como o fumarato de cetotifeno, imatinibe e cladribina (este último comumente utilizado para tratar algumas leucemias), podem ser considerados como os mais próximos na redução das afeções ocasionadas pelas patologias mastocitárias (DROOGENDIJK et al., 2006; PARDANANI et al., 2004; SCHOCH, 2003). Há outras alternativas e um exemplo claro são os tratamentos físicos, como uso da luz ultravioleta B de banda estreita e psoraleno que, combinados, resultam em uma fototerapia ultravioleta A, em que pacientes com mastocitose cutânea tratados com este tipo de método mostram

ter uma melhora principalmente na aparência dos sintomas cutâneos, a redução da coceira, embora sejam em curtos períodos, já que um tempo depois das terapias as lesões aparecem de forma gradual, reincidindo novamente os sintomas (BRAZZELLI et al., 2016).

Apesar de, hoje em dia, existirem estas alternativas para tratar as doenças derivadas das desordens dos mastócitos, esses tipos de tratamento têm sido pouco satisfatórios para tratar lesões causadas pela doença da mastocitose (CARTER et al., 2019; ROSSIGNOL et al., 2019) e ainda estamos longe de um tratamento realmente efetivo, que esteja disponível para o tratamento contra as doenças autoimunes e inflamatórias, sendo que os pré-existentes ajudam a ter um controle das doenças. No entanto, reações adversas dos medicamentos e tratamentos afetam bastante a qualidade de vida dos pacientes diagnosticados com algum tipo destas doenças mastocitárias (REITER; GEORGE; GOTLIB, 2020).

Nesse contexto, temos como foco principal o desenvolvimento de uma prova de conceito para uma construção bioquímica, na qual ligamos a interleucina 2 (IL-2) com o peptídeo apoptótico pep5, como descrito no item 2.3 do capítulo 2, utilizando como receptor o marcador IL-2R alfa (CD25), que apresenta afinidade para a interleucina 2 (IL-2) presente nas células granulares mastocitárias. Estudos mostram que este receptor é expresso em 93% dos pacientes diagnosticados com mastocitose sistêmica (TEODOSIO et al., 2010), embora seu papel ainda não esteja bem definido nestas células secretoras. Assim, baseados nestes diagnósticos clínicos, nós podemos utilizar esse tipo de receptor como ferramenta para selecionar exclusivamente estas células granulares mastocitárias com alterações genômicas, de modo a produzir um efeito de depleção celular.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da construção química da interleucina-2 humana IL-2PEGpep5 em mastócitos e célula leucêmica.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito da construção química da interleucina-2 humana IL-2PEGpep5 em linhagens HMC 1.1, HMC 1.2 e a célula leucêmica Jurkat;
- Determinar os níveis de expressão dos receptores IL-2R, alfa beta e gama em linhagens HMC 1.1, HMC 1.2 e a célula leucêmica Jurkat;
- Determinar os níveis de expressão dos genes, CCND1, CCND2, Bal2-I, CISH e OSM nas linhagens HMC 1.1, HMC 1.2;
- Determinar a ativação da proteína pTAT5 e Erk após estímulo com IL-2.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 *Linhagens celulares Mastocitárias*

3.3.1.1 *Linhagem Celular Humana de Mastócitos HMC 1.1 e HMC 1.2*

A linhagem celular humana de mastócitos, referenciada como a HMC-1, é uma linha de mastócitos derivada a partir de um paciente diagnosticado com leucemia MC. Este tipo celular é considerado como uma célula independente de fator de crescimento, devido às alterações na sequência peptídica do receptor tirosina quinase (KIT), que convertem esta molécula sinalizadora num estado constitutivamente fosforilado e ativo, levando à proliferação e crescimento rápido celular e independente do fator de crescimento. Como características chaves desta linhagem de mastócitos também são capazes de produzir histamina, triptase, heparina e perfil de antígeno de superfície celular. Foram reportados dois tipos de subclones com base nos mastócitos HMC-1, que são o HMC-1.1 e HMC-1.2, caracterizados por apresentar mutações pontuais diferentes no receptor KIT. O HMC-1.1 tem uma mutação KIT V560G, enquanto o HMC-1.2 tem duas mutações KIT (V560G e D816V). As células HMC-1 apresentam muitas outras anormalidades moleculares, mas principalmente limitações na sinalização pela ausência de expressão do receptor FcεRI e sua escassez de grânulos.

Para determinar a atividade e efeito do IL-2PEGpep5 em nossos experimentos, utilizamos, então, as linhagens de mastócitos identificadas como HMC-1.1 (SCC067) e HMC-1.2 (SCC062) da empresa Merck Millipore[®]. Brevemente, estas linhagens celulares foram mantidas em 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomomicina com uma concentração final de 25µg/mL Fungizone[®] (Gibco, Carlsbad, CA), para evitar contaminação com micoplasma, logo incubadas em estufa suplementada com o 5% de CO² a 37°C. O meio foi removido e trocado com o meio fresco, a cada 2 a 3 dias, mantendo uma viabilidade de 2 x10⁶ células/mL até seu uso. Estas células foram fornecidas pelo *Department of Biochemistry and Molecular Immunology* da Uniklinik RWTH Aachen University, onde também foram realizados os experimentos.

3.3.1.2 Linhagem Celular Humana de Mastócitos Rosa (wt) e D816V

Além das linhagens celulares mastocitárias, previamente descritas no item 3.3.1.1, utilizamos também as linhagens identificadas como Rosa KIT^{wt} e KIT D816V. A célula Rosa KIT^{wt} é uma unidade derivada da linhagem de mastócitos humanos, dependente do fator de células tronco (CD117), que expressa um completo e funcional receptor para imunoglobulina E (IgE) a diferença das células HMC-1. Por outro lado, a linhagem D816V é um clone transfectado da linhagem parental Rosa KIT^{wt} humana, que permite que esta célula seja independente de ativação pela via do receptor do fator de células tronco (CD117). A linhagem D816V possui um tipo de mutação específica que constitui uma troca de um ácido aspártico por uma valina, na posição 816 da sequência peptídica do receptor KIT, permitindo assim, uma sinalização constitutivamente ativa, levando a altos níveis de proliferação celular.

Para determinar a ativação a partir do estímulo com IL-2 em células mastocitárias, utilizamos, então, as linhagens Rosa (wt) e D816V. Brevemente, estas linhagens celulares foram mantidas em 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina com uma concentração final de 25µg/mL Fungizone® (Gibco, Carlsbad, CA), para evitar contaminação por micoplasma, logo em seguida, foram incubadas em estufa suplementada com o 5% de CO² a 37°C. O meio foi removido e trocado com meio fresco, a cada 2 ou 3 dias, mantendo uma viabilidade de 2 x10⁶ células/mL até seu uso. Estas células foram fornecidas pelo *Department of Biochemistry and Molecular Immunology* da Uniklinik RWTH Aachen University, onde também foram realizados os experimentos.

3.3.2.1 Linhagem Celular Leucêmicas Humanas

A K562 é uma linhagem celular estabelecida *in vitro* isolada de um paciente diagnosticado com a doença de leucemia mieloide crônica. Como principal fenótipo desta célula é a ausência dos marcadores da imunoglobulina B e receptores para o vírus Epstein-Barr

(EBV). Estas células, também em estágio inicial, podem desenvolver características parecidas aos eritrócitos, granulócitos e monócitos. De outra parte, as células Jurkat correspondem a um tipo de célula T derivadas de linfomas celulares, isolada a partir do sangue periférico de um paciente de 14 anos, identificado com leucemia linfoblástica aguda. Um atributo fundamental desta linhagem celular é sua capacidade de produzir a interleucina-2 para sua própria ativação.

Para determinar a atividade e efeito da construção IL-2PEGpep5 em células leucêmicas, utilizamos, então, as linhagens identificadas como K-562 (CCL-243) e Jurkat-Clone E6-1 na empresa ATCC®. Brevemente, estas linhagens celulares foram mantidas em 30 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina com uma concentração final de 25µg/mL Fungizone® (Gibco, Carlsbad, CA), para evitar contaminação por micoplasma, logo em seguida, foram incubadas em estufa suplementada com o 5% de CO² a 37°C. O meio foi removido e trocado com meio fresco, a cada 2 ou 3 dias, mantendo uma viabilidade de 2 x 10⁶ células/mL até seu uso. Estas células foram fornecidas pelo *Department of Biochemistry and Molecular Immunology* da Uniklink RWTH Aachen University, onde também foram realizados os experimentos.

3.3.2. Determinação dos níveis de expressão do receptor CD25 (α) por Citometria de fluxo-FACS

Para determinar os níveis de expressão dos receptores com afinidade para a interleucinas-2 (IL-2), foram quantificados valores para o marcador CD25 (α), nas linhagens HMC 1.1, HMC 1.2 e célula Jurkat. Desta forma, para as duas linhagens utilizadas nesta análise, foram crescidas de modo a atingir uma densidade celular de 3,5 x 10⁶ células/mL ao início dos experimentos. Assim, logo após crescimento de 48 horas, 50 µL de cultura celular foi colocado em 5mL de PBS 1%. Logo, as amostras foram quantificadas utilizando o programa de análise de viabilidade celular (CASY), que utiliza como método um sistema de contagem de células multicanal de campo elétrico. Após medição, as culturas foram diluídas até atingir uma densidade celular de 3,5 x 10⁶ células/mL para cada cultura.

Posteriormente, foram crescidas até 48 horas. Em seguida, 0,4 mL das culturas foram colocadas em 4 mL de FACS buffer, continuando com a centrifugação usando os parâmetros de 1000 rpm a 4°C, durante 5 minutos. O pellet formado então foi ressuspensionado em 45µL de anti-CD25- PE identificado com o código (PC61.5) *eBioscience*TM da companhia *Thermo Fisher Scientific*. Em seguida, as amostras contendo o anticorpo, foram incubadas por 30 minutos a 16 °C. Logo após este tempo, as amostras foram lavadas com 4 mL de FACS buffer e centrifugadas a 1000 rpm a 4°C, por 5 minutos. Finalmente, o pellet formado foi ressuspensionado em 200 µL de FACS buffer, para posterior leitura no citômetro.

Por outro lado, para a cultura celular leucêmica Jurkat, foi também avaliada a utilização do composto Fitohemaglutinina (PHA) como indutor da expressão do receptor IL-2R α (CD25). A Fito-hemaglutinina, ou também denominado PHA, é uma glicoproteína que apresenta uma potente atividade de aglutinação celular mitogênica. Esta proteína pode ligar-se à membrana das células T, promovendo determinadas atividades metabólicas, incluindo a divisão celular (NOWELL, 1960; SARV; HÖRAK, 2009), constituindo um estimulante adequado para a indução da expressão de receptores celulares IL-2R (CD25) (SHATROVA et al., 2015).

3.3.3 Determinação da Viabilidade celular pelo programa CASY

Para determinar o número de células viáveis, após tratamento de 72 horas com a construção IL-2PEGpep5, utilizamos o programa de análise de viabilidade de celular (CASY) que utiliza um sistema de contagem de células multicanal de campo elétrico. O programa CASY quantifica células que passam através de um poro de medição exposto em um campo elétrico de baixa tensão. Com base no tamanho e na condutividade das células conhecidas, um sinal de resistência é gerado e anotado no sistema. Por conseguinte, as células vivas geram sinais de alta resistência causados por sua estrutura de membrana celular inalterada e, as células depletadas, originam resistência menor por ação do aumento da permeabilidade da membrana. Assim, estas células podem ser medidas pelo tamanho de

seus núcleos. Portanto, este método permite discriminar de forma precisa entre as células vivas, mortas e resíduos orgânicos presentes em uma amostra (Fig. 21).

De forma resumida, os experimentos começaram utilizando as linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2, assim, estas linhagens foram crescidas por 48 horas e, posteriormente, foram diluídas de modo a obter uma densidade celular de $3,5 \times 10^6$ células/mL para cada cultura. Logo após diluição, as culturas foram distribuídas em placas de 98 wells em alíquotas de $100\mu\text{L}$ de cultura em triplicata da seguinte forma: amostra 1-controle, amostra 2- cultura + $200\text{ng}/\mu\text{L}$ de IL-2 e amostra 3- cultura + $200\text{ng}/\mu\text{L}$ de IL-2PEGpep5.

No caso da linhagem HMC 1.2, foi testada mais uma amostra utilizando um inibidor celular conhecido (Ruxolitinib) em uma concentração final de 1mM , para comparar a depleção de nossa construção. Estes experimentos assim foram repetidos três vezes, para obtenção de uma significância científica.

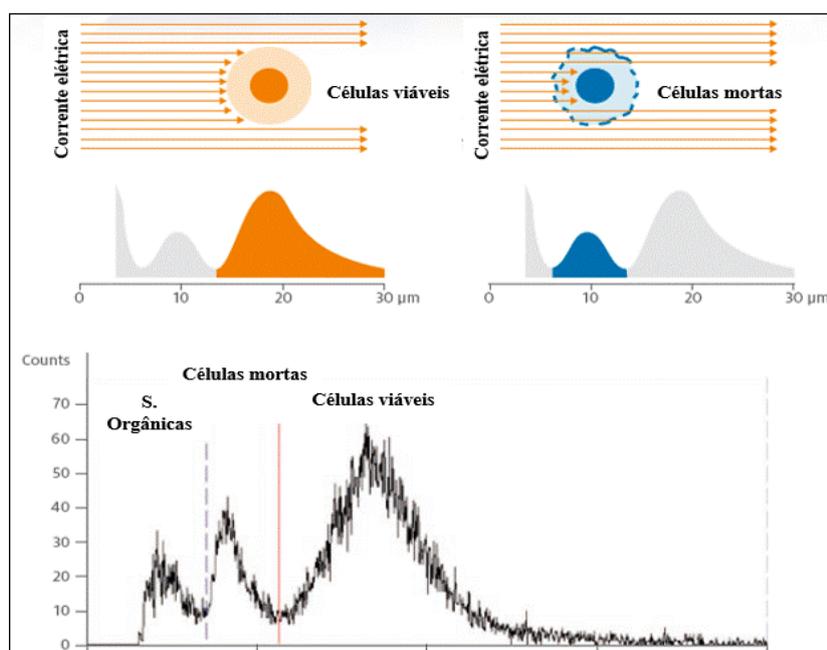


Figura 21. Sistema de quantificação de células pelo programa CASY. Diferenciação de células vivas, mortas e resíduos orgânicos presentes em uma amostra. Fonte website <http://Casyprogram.com>.

3.3.4 Determinação da viabilidade celular pelo método do Ensaio de Citotoxicidade XTT

Para determinar o número de células viáveis, após tratamento de 72 horas com a construção IL-2PEGpep5, utilizamos o kit do teste de proliferação celular XTT identificado com o número de catálogo (30-1011K) fornecido pela empresa ATCC™. Este ensaio de

proliferação celular é um método eficiente que mede a sensibilidade de diferentes linhagens celulares após exposição a algum tipo composto. O XTT é um composto químico que apresenta uma coloração ligeiramente amarela que, quando reduzido, torna-se de cor laranja brilhante, devido à formação do produto formazan, um composto derivado da redução do XTT a partir da atividade metabólica celular (Figura 22).

De forma resumida, os experimentos começaram utilizando a linhagem Jurkat-Clone E6-1, crescida por 48 horas, com uma diluição de 1 a 10^6 células/mL. Logo após 24 horas de crescimento, os reagentes A e B do kit de proliferação celular XTT foram misturados em uma proporção de 1:50. Após mistura, foram colocados 50 μ L deste composto para cada poço das amostras presentes na placa. Então, a placa contendo as amostras foi incubada durante 2 horas, a 37°C, em estufa suplementada com 5% de CO₂. Após este tempo, tomaram-se as leituras do espectro de absorvência, utilizando um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 576nm. A diferença das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2 a linhagem leucêmica Jurkat-Clone E6-1 foi medida por este método, devido a sua alta capacidade de proliferação, sendo requerido um método mais sensível para observar diferenças entre as amostras tratadas e não tratadas.

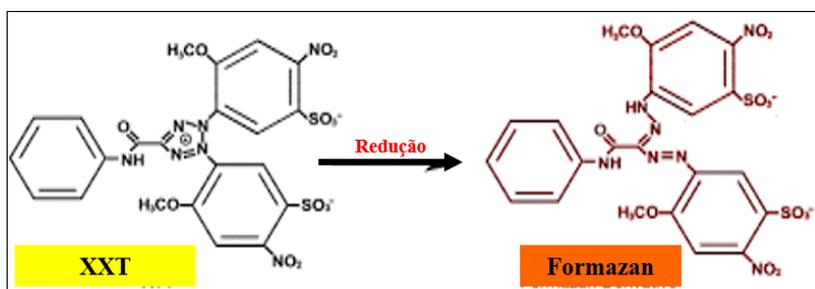


Figura 22. Formação do composto de formazan a partir da redução do XTT. Adaptado de (SHOKRZADEH; MODANLOO, 2017).

3.3.5 Determinação de níveis de expressão dos genes para os receptores *IL-2Ra*, *IL-2Rb* e *IL-2Rg* pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

De modo a conferir a presença dos receptores trans-membrana com afinidade para interleucina-2 (IL-2) nas linhagens celulares HMC 1.1, HMC 1.2 e Jurkat-Clone E6-1, utilizamos o método de cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). Este método está desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa consiste em uma reação

de transcrição de fase reversa, onde serão selecionados RNAs com poliadenilação como iniciadores na formação da cadeia de DNA complementar (cDNAs). E a segunda etapa incide em uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) para amplificação do cDNA-alvo. O resultado pode ser visualizado em forma de gráfica em tempo real, dispensando assim, o uso da eletroforese. Os dados são apresentados em valores numéricos, estimando os níveis de expressão genômica de genes alvo presentes nas amostras avaliadas.

Para início dos experimentos, foram utilizadas as linhagens celulares HMC 1.1 e HMC 1.2. Estas linhagens, então, foram crescidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina com uma concentração final de 25 µg/mL Fungizone® (Gibco, Carlsbad, CA), por 48 horas, até atingir uma densidade de 6×10^6 células/mL. Após, as linhagens foram colocadas em incubação a 37°C, em estufa suplementada com 5% de CO₂. Depois deste tempo, o pellet celular das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2 foi coletado através de centrifugação, utilizando os parâmetros de 1000 rpm, 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram tratadas com o Kit de reagentes para purificação de RNA *miRNeasy*, fornecido pela empresa Qiagen© para o isolamento dos RNAs totais.

A partir do RNAs totais purificados das amostras das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2, logo após crescimento de 48 horas, procedeu-se à obtenção da cadeia de DNA complementar (cDNA) pelo método de reação em cadeia da polimerase de fase reversa RT-PCR para síntese de cDNA de fita simple (*Omniscript Reverse Transcriptase*). Assim, esta reação de transcrição foi realizada usando os seguintes parâmetros de reação: 14 µL de RNA purificado +H₂O normalizado para uma quantidade de RNA de 1000ng/µL, 2 µL de tampão 10x-RT, 1 µL de mix de dNTPs 5 mM, 1 µL de oligo-randômico para anelamento em caudas com poli A e 1 µL de enzima *Omniscript Reverse Transcriptase* para um volume final de 20 µL. Como instrumento para incubar a reação, utilizou-se o termociclador com gradiente da marca *Eppendorf AG Mastercycler® Nexus*, utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de aquecimento 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação 15

segundos a 95°C, anelamento e extensão 60 segundos a 72 °C e 1 ciclo de esfriamento tempo indefinido a 4 °C.

Logo e a partir das cadeias de DNA complementar (cDNAs) obtidos, procedeu-se à amplificação e quantificação dos mesmos através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificação das sequências genômicas dos genes: IL-2Ra, IL-2b e IL-2g. Estes oligonucleotídeos foram desenhados (direto e reverso) a partir das sequências codificantes reportadas no banco de dados *Uniprot* com os códigos P01589, P14784 e P31785 para os genes IL-2Ra, IL-2b e IL-2g, respectivamente, cuja sequência nucleotídica está descrita na Tabela 1. Assim, os cDNAs purificados obtidos na primeira reação foram utilizados para esta segunda reação, usando os seguintes parâmetros: 2µL de cDNAs, 1µL de iniciador direto (*Foward*), 1 µL do iniciador recerso (*reverse*) e 6 µL do kit *Taq PCR Master Mix* fornecido pela empresa Qiagen©.

Tabela 1. Sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos para reação em cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).

Nome do gene	Iniciadores direto (<i>Forward</i>) (5'→3')	Iniciadores reverso (<i>Reverse</i>) (5'→3')	Tamanho (pb)
IL-2Rα	GTGGGGACTGCTCACGTTC	CCCGCTTTTTATTCTGCGGAA	19-21
IL-2Rβ	CAGCGGTGAATGGCACTTC	GGCATGGACTTGGCAGGAA	19-19
IL-2γ	GTGCAGCCACTATCTATTCTCTG	GTGAAGTGTTAGGTTCTCTGGAG	23-23
CCND1	GCCCTCGGTGTCCTACTTC	AGGAAGCGGTCCAGGTAGTT	19-20
CCND2	ACCTTCCGCAGTGCTCC	CCCAGCCAAGAAACGGT	17-17
Bcl2-I1	ACTCTTCCGGGATGGGGTAA	AGGTAAGTGCCATCCAAGC	20-20
CISH	GCTGTGCATAGCCAAGACCTT	CTGGCATCTTCTGCAGGTGTT	21-21
OSM	GCTGCTCAGTCTGGTCCTTG	CCCTGCAGTGCTCTCTCAGT	20-20

Como instrumento para incubar a reação, utilizou-se o termociclador para PCR em tempo real, da marca Rotor-Gene Q MDx, da empresa Qiagen©, utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de aquecimento de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação 30 segundos a 95°C, anelamento e extensão de 2 minutos a 72 °C e 1 ciclo de esfriamento tempo indefinido a 4 °C. Por último, os dados obtidos a partir da amplificação dos genes dos receptores IL-2Ra, IL-2b e IL-2g, foram normalizados utilizando o gene da enzima gliceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), que mantém uma expressão constitutiva como controle para uma correta medição de expressão.

3.3.6 Determinação de níveis de expressão dos genes CCND1, CCND2, Bcl2, CISH e OSM pelo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

Para tentar elucidar se existe ativação de vias moleculares induzidas, após tratamento com interleucina-2 (IL-2) nas linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2, nós utilizamos a técnica de reação em cadeia de quantificação de DNA em tempo real, para avaliar os níveis de expressão dos genes CCND1, CCND2, Bcl2, CISH e OSM. Por um lado, o produto dos genes CCND1 e CCND2 estão envolvidos na regulação durante a transição G1/S do ciclo celular, enquanto, o produto do gene Bcl2 está envolvido na regulação da morte celular, especificamente na inibição da ativação das proteínas que induz a apoptose como as caspases. O produto do gene CISH participa na regulação negativa de citocinas que sinalizam através da via JAK-STAT5, e o produto do gene e OSM é a oncostatin M, uma citocina multifuncional que faz parte da subfamília da interleucina-6 produzida pelas células T ativadas e macrófagos. Estudos reportam que a citocina (OSM) está envolvida no aparecimento tanto na fase aguda como na fase crônica das doenças inflamatórias, exercendo principalmente uma atividade de supressão em células leucêmicas, bloqueando o fator inibidor de leucemia (LIF) (TAWARA et al., 2019).

Para início dos experimentos, utilizaram-se as linhagens celulares HMC 1.1 e HMC 1.2. Estas linhagens, então, foram crescidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA) e

estreptomomicina com uma concentração final de 25µg/mL Fungizone® (Gibco, Carlsbad, CA), por 48 horas, até atingir uma densidade de $4\sim 5 \times 10^6$ células/mL. Após, as linhagens foram colocadas em incubação a 37°C, em estufa suplementada com 5% de CO². Depois deste tempo, o pellet celular das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2 foi coletado através de centrifugação, utilizando os parâmetros de 1000 rpm, 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram tratadas com o Kit de reagentes para purificação de RNA *miRNeasy* fornecido pela empresa Qiagen© para o isolamento dos RNAs totais.

A partir do RNAs totais purificados das amostras das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2 e logo após crescimento de 48 horas, procedeu-se à obtenção da cadeia de DNA complementar (cDNA) pelo método de reação em cadeia da polimerase de fase reversa RT-PCR para síntese de cDNA de fita simple (*Omniscript Reverse Transcriptase*). Assim, esta reação de transcrição foi realizada usando os seguintes parâmetros de reação: 14µL de RNA purificado +H₂O normalizado para uma quantidade de RNA de 1000ng/µL, 2 µL de tampão 10x-RT, 1 µL de mix de dNTPs 5 mM, 1 µL de oligo-randômico para anelamento em caudas com poli A e 1 µL de enzima *Omniscript Reverse Transcriptase* para um volume final de 20 µL. Como instrumento para incubar a reação, utilizou-se o termociclador com gradiente da marca *Eppendorf AG Mastercycler® Nexus*, utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de aquecimento 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação 15 segundos a 95°C, anelamento e extensão 60 segundos a 72 °C e 1 ciclo de esfriamento tempo indefinido a 4 °C.

Logo e a partir das cadeias de DNA complementar (cDNAs) obtidos, procedeu-se à amplificação e quantificação dos mesmos, através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificação das sequências genômicas dos genes CCND1, CCND2, Bcl2, CISH e OSM. Estes oligonucleotídeos foram desenhados (direto e reverso) a partir das sequências codificantes reportadas no banco de dados *Uniprot* com os códigos P24385, P30279, Q92934, Q9NSE2 e P13725 para os genes CCND1, CCND2, Bcl2, CISH e OSM, respectivamente, cuja sequência nucleotídica está descrita na Tabela 1. Assim, os cDNAs purificados obtidos na primeira reação foram utilizados para esta segunda reação usando

os seguintes parâmetros: 2µL de cDNAs, 1µL de iniciador *Foward*, 1 µL do iniciador *Reverse* e 6 µL do kit *Taq PCR Master Mix* fornecido pela empresa Qiagen© por cada poço em triplicata.

Como instrumento para incubar a reação, utilizou-se o termociclador para PCR em tempo real, da marca Rotor-Gene Q MDx, da empresa Qiagen©, utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de aquecimento de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação 30 segundos a 95°C, anelamento e extensão de 2 minutos a 72 °C e 1 ciclo de esfriamento tempo indefinido a 4 °C. Por último, os dados obtidos a partir da amplificação dos genes dos receptores IL-2Ra, IL-2b e IL-2g, foram normalizados, utilizando o gene da enzima gliceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) que mantém uma expressão constitutiva como controle para uma correta medição de expressão.

3.3.6 Determinação da ativação da proteína pSTAT5 após tratamento com a interleucina -2 (IL-2) pelo método de Western Blotting

De modo a conferir a ativação via interação interleucina-2 (IL-2) - receptor na linhagem HMC 1.2, em um período de 1 hora, nós utilizamos o método qualitativo de determinação proteínas *Western Blotting*, para avaliar sua possível sinalização pela fosforilação da proteína pSTAT5.

Então, para este experimento, utilizou-se a linhagem celular HMC 1.2, que foi crescida em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA) e estreptomicina com uma concentração final de 25µg/mL Fungizone® (Gibco, Carlsbad, CA), por 48 horas, até atingir uma densidade de 6×10^6 células/mL e incubada a 37°C, em estufa suplementada com 5% de CO². Posterior a este tempo, a linhagem HMC 1.2 foi diluída até atingir uma densidade de 1×10^6 células/mL para ser tratada com a interleucina -2 (IL-2) em diferentes tempos, até alcançar 1 hora de tratamento, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Períodos de incubação da linhagem HMC 1.2 com interleucina-2 (IL-2).

Tempo (Minuto)	Amostra	Tempo de coleta (Minuto)
0	Controle	60
1	IL-2-1hora	60
2	IL-2-30 Min	32
3	IL-2-15 Min	18
4	IL-2- 5 Min	9
6	IL-2-1 Min	7

Assim, o pellet celular de cada amostra foi coletado através de spinning, por 15 segundos, em microcentrífuga e ressuspendido em 40 μ L de tampão de lise celular, contendo os seguintes compostos: 909,7 μ L de tampão PSB, 50 μ L de NP₄O 10%, 10 μ L de Na-Doc 10%, 20 μ L de NaVO₄, 10 μ L de PMSF, 0,5 μ L de *Aprotininh* Blue e 2 μ L de *Leupeptin* Green para um volume final de 1000 μ L. Logo após, colocou-se 10 μ L de tampão de amostra para eletroforese de SDS-PAGE, seguido de aquecimento a 95°C, por 5 minutos.

Para determinar a fração das proteínas detectadas nas amostras, foi utilizado o gel de poliacrilamida de duas fases. Para a preparação do gel, utilizamos os seguintes parâmetros para a fase inferior: 6,7mL de acrilamida/bis 30%, 5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M com pH de 8,8, 8,01 mL de água destilada, 200 μ L de SDS 10%, 100 μ L de PSA 10% e 20 μ L de TEMED para um volume final de 20 mL e uma concentração de 10% de poliacrilamida. Para a fase superior, foram utilizados: 1,32 mL de acrilamida/bis 30%, 2,52 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M com pH de 6,8, 6 mL de água destilada, 100 μ L de SDS 10%, 50 μ L de PSA 10% e 20 μ L de TEMED para um volume final de 10 mL e uma concentração de 4%

de poliacrilamida. Posterior a este processo, procedeu-se à detecção das proteínas alvo utilizando o método de *Western Blotting*. Para tal fim, as proteínas presentes no gel da eletroforese foram transferidas para uma membrana de PVDF, da seguinte forma: primeiro foi tomado um fragmento da membrana PVDF de 8,5 por 6,5 cm de dimensão e seis fragmentos de papel *Whatmann*, com as mesmas dimensões (8,5 x 6,5 cm). Logo após, o fragmento da membrana PVDF foi incubado em metanol e os seis fragmentos de papel *Whatmann* em tampão de transferência, por 10 minutos. Em seguida, o gel da eletroforese foi depositado junto com a membrana PVDF e seis fragmentos de papel *Whatmann* foram colocados, três ao lado do gel e três ao lado da membrana, acoplados à base de transferência.

Posteriormente, este complexo foi colocado na cuba da eletroforese e foi iniciada a corrida de transferência por 1 hora. Após esse tempo, foram removidos cuidadosamente os seis fragmentos de papel *Whatmann* junto com o gel; a membrana foi lavada, 3 vezes, com água destilada e incubada em leite, por 1 hora, sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com água destilada e incubada com o anticorpo primário overnight. Posterior a esse período, a membrana foi novamente lavada, 3 vezes, com água destilada, cada lavagem por 5 minutos. Finalmente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário por 2 horas. Para revelar o gel, foi utilizado um fotodocumentador de quimiluminescência, da marca *Biotech R&D Laboratories*, onde foi observada a fração de proteínas detectadas na membrana PVDF.

3.3.7 Análise estatística

Os dados experimentais foram apresentados como a média e desvio padrão (barra de erro), em forma de histogramas, para os ensaios de viabilidade com as linhagens HMC 1.1, HMC 1.2 e Jurkat célula leucêmica. Para estes mesmos ensaios, foi aplicado o método de Kruskal-Wallis de comparação entre grupos para cada linhagem, comparando a viabilidade, tratamentos e linhagem celular. Também foi analisada estatisticamente a comparação de pares dos valores registrados para cada um dos tratamentos, utilizando o programa SPSS.

No caso dos ensaios de expressão genética dos genes para os receptores IL-2R (alfa, beta e gama) das linhagens HMC 1.1, HMC 1.2 e dos genes CCND1, CCND2, Bcl2-11, CISH e OSM nas linhagens HMC 1.1, HMC 1.2, foi considerada a normalização dos valores relativos de expressão, utilizando como controle a expressão do gene da enzima gliceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Assim, os dados foram apresentados como níveis de expressão relativa em porcentagem. Da mesma forma, os dados reportados para os receptores IL-2R α (CD25) nas linhagens celulares HMC 1.1, HMC 1.2 e Jurkat por detecção no citômetro de fluxo FACS, foram apresentados como porcentagem de expressão.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Efeito da IL-2 peguilada com o pep5 na viabilidade células das linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2

A ideia central do nosso trabalho foi provar de forma conceitual o efeito da construção molecular a partir da peguilação da interleucina 2 (IL-2) com o peptídeo apoptótico, denominado neste trabalho como pep5 em diferentes linhagens celulares, com possível expressão de receptores IL-2R. Assim, testamos, primeiramente, as linhagens celulares de mastócitos HMC 1.1 e HMC 1.2 em diferentes concentrações deste produto. Esses dados mostraram que a melhor eficiência apresentada do produto IL-2PEGpep5 foi em uma concentração de 200 ng/ μ L (dados não mostrados), após 72 horas de tratamento.

A partir desses dados, foram realizados experimentos utilizando essa concentração do produto comparados com a interleucina-2 em solitário. No caso da linhagem HMC 1.2, comparou-se também com o composto químico Ruxolitinib (Ruxo). Este é um inibidor celular de vias de sinalização Janus quinase (JAK 1 e JAK 2), usado comercialmente no tratamento de neoplasias hematopoiéticas multipotentes (mielofibrose primária). Desta forma, utilizou-se uma concentração de 1mM deste composto como controle positivo, permitindo-nos comparar um agente com atividade de depleção celular ativa. Desta forma, a partir de uma concentração de 200 ng/ μ L do produto IL-2PEGpep5 e 200 ng/ μ L de interleucina -2 em solitário, foram tratadas as linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2, por 72 horas de tratamento.

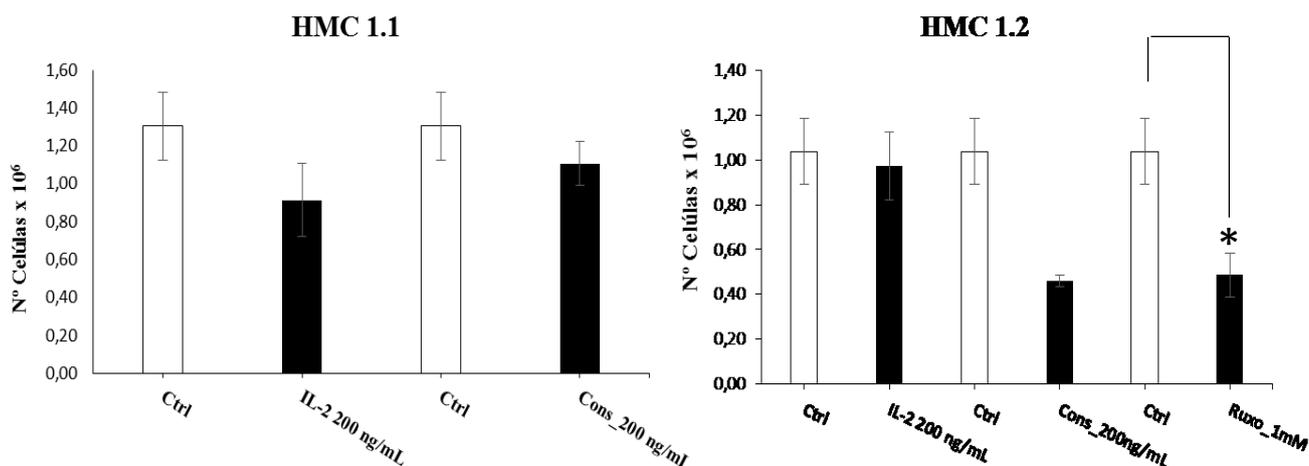


Figura 23. O efeito do produto IL-2PEGpep5, IL-2 e sem na linhagem de mastócitos HMC 1.1 e o efeito do produto IL-2PEGpep5, IL-2, Ruxolitinib (Ruxo) e sem na linhagem de mastócitos HMC 1.2. * (P< 0,05)

Na Figura 23, podemos observar a média e o desvio padrão calculado a partir de três experimentos em triplicata. Estes valores foram referenciados como a viabilidade celular das linhagens de mastócitos HMC 1.1 e HMC 1.2. A linhagem de mastócitos HMC 1.1 mostrou não ter uma diferença nas médias registradas, quando tratadas com IL-2PEGpep5 ($1,1 \times 10^6$ células/mL) e IL-2 ($0,91 \times 10^6$ células/mL), comparadas com amostra controle, ($1,3 \times 10^6$ células/mL) sendo esses valores não significativos entre os grupos. Por outro lado, a linhagem de mastócitos HMC 1.2 mostra ter uma diminuição das médias das amostras tratadas com IL-2PEGpep5 ($0,43 \times 10^6$ células/mL) e Ruxo ($0,52 \times 10^6$ células/mL). No entanto, isso não foi observado na amostra tratada com IL-2 em solitário ($0,99 \times 10^6$ células/mL), quando comparada com a amostra controle ($1,02 \times 10^6$ células/mL).

3.4.2 Expressão do receptor IL-2R Alfa nas linhagens celulares HMC 1.1 e HMC 1.2

Para compreender melhor a presença e expressão do receptor CD25, determinamos os níveis de expressão deste receptor nas linhagens de mastócitos HMC 1.1 e HMC 1.2, através da marcação com o anticorpo anti-CD25/PE e medidos por citometria de fluxo, após 48 horas de crescimento. No gráfico 24, observamos primeiramente que a linhagem HMC 1.1 apresenta um nível basal ou reduzido da expressão do receptor. Isto pode ser constatado quando comparamos a população celular total e a detecção da expressão do

receptor. No entanto, na linhagem HMC 1.2, os níveis de expressão do receptor representam um valor aproximado a 80% do total da população celular, conforme registrado nos valores detectados na análise do gráfico de citometria, comparado com a linhagem HMC 1.1.

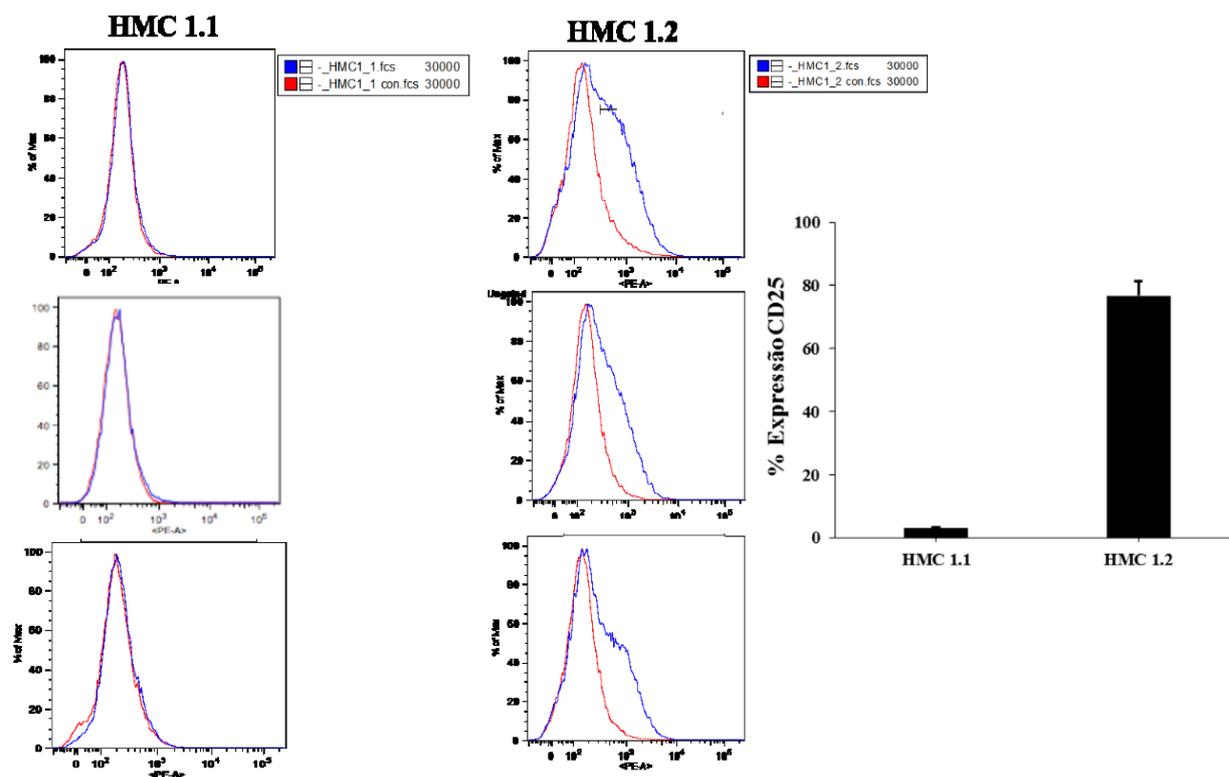


Figura 24. Determinação da porcentagem de expressão do receptor CD25 nas linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2. Em linha azul detecção de expressão do receptor CD25. Em linha vermelha porcentagem total de população celular.

3.4.3 Expressão dos receptores IL-2R nas linhagens celulares HMC 1.1 e HMC 1.2

O seguinte passo foi verificar a presença ou ausência dos receptores IL-2R Alfa, IL-2R Beta e IL-2R Gama nas linhagens de mastócitos HMC 1.1 e HMC 1.2. Assim, nós determinamos os níveis de expressão genética através da quantificação dos mRNAs como indicadores da expressão dos receptores para IL-2R presentes nas amostras. Na figura 25, observamos as diferentes porcentagens em três escalas diferentes e dependentes para cada nível de expressão do receptor. Desta forma, o gráfico descreve, após crescimento celular de 48 horas na linhagem HMC 1.2, uma porcentagem de expressão dos receptores para IL-2R (alfa, beta e gama) alta, quando comparada com a linhagem HMC 1.1, evidenciando,

principalmente, que o maior nível de expressão foi para o receptor beta (CD122) e menor nível de expressão para os receptores alfa e gama, quando normalizados com o controle.

No caso, para a linhagem HMC 1.1, mostrou ausência da expressão dos receptores IL-2R Alfa, IL-2R Beta. No entanto, apresentou um nível basal de expressão do receptor IL-2R Gama quando normalizado com o controle de expressão. Todos os dados reportados no gráfico foram o resultado da média de dois experimentos normalizados, utilizando o gene da enzima *glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase* (GAPDH), que mantém uma expressão constitutiva como controle para uma correta medição de expressão nas linhagens celulares, como descrito previamente no item 3.3.6.

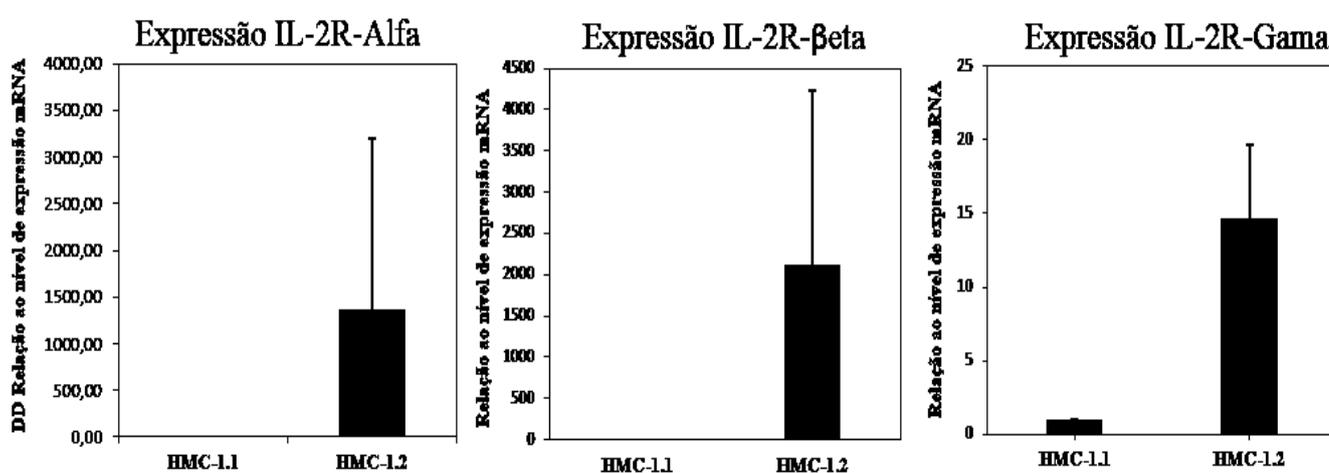


Figura 25. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os receptores IL-2R Alfa, IL-2R Beta e IL-2R Gama nas linhagens HMC 1.1 e HMC 1.2. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos.

3.4.4 Expressão dos genes *CCND1*, *CCND2*, *Bcl2*, *CISH* e *OSM* na linhagem HMC1.2

A partir da determinação de níveis de expressão dos *CCND1*, *CCND2*, *Bcl2*, *CISH*, nós tentamos desvendar as possíveis vias de ativação após interação da interleucina-2 (IL-2) com os receptores correspondentes presentes na linhagem celular de mastócitos HMC1.2. Os dados apresentados neste experimento são a média e o desvio padrão de 2 experimentos após 2, 4, 6 e 8 horas de indução com a interleucina- 2. Na Figura 26, veis reportados a partir da quantificação da expressão do mRNAs para os genes *CCND1*, *CCND2*, *Bcl2*, *CISH* e *OSM*.

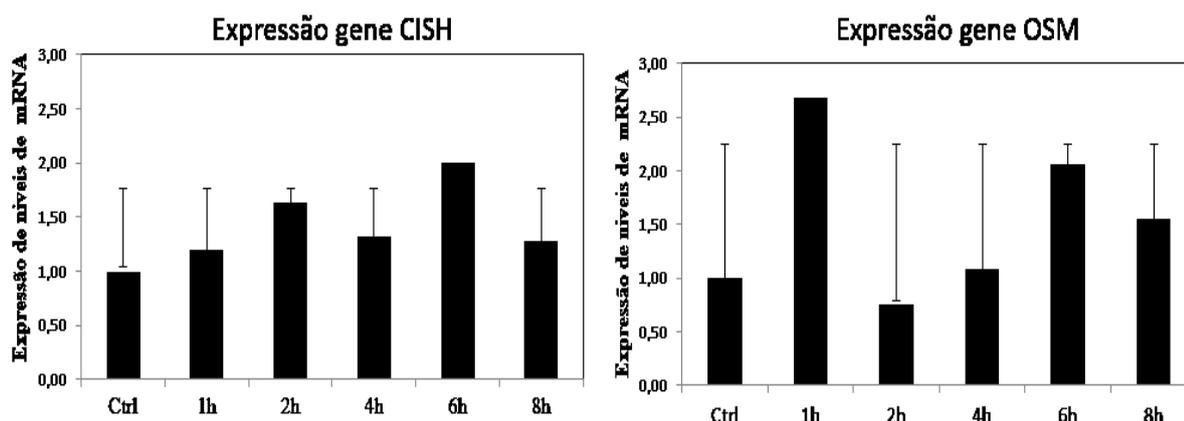


Figure 26. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os genes CCND1, CCND2 e Bcl2-11 na linhagem HMC 1.2. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos.

Os dados dos níveis de expressão mostram que, para o gene CCND2, não houve uma diferença nos níveis de expressão quando comparado com a amostra controle. Da mesma forma, ocorre para a expressão do gene CCND2, onde não teve diferença quando comparado com a amostra controle. Por outro lado, o nível de expressão relativo para o gene Bcl2-11 mostrou ter uma diferença, após 1 hora de indução com interleucina-2, duas vezes maior da expressão, quando comparado com a amostra controle. Porém, logo após esse tempo (1h), apresentou valores decrescentes, embora tenha apresentado um leve aumento a partir das 8 horas de indução com a interleucina-2. No entanto, para todos os grupos, os valores de expressão do gene Bcl2-11 foram caracterizados como baixos.

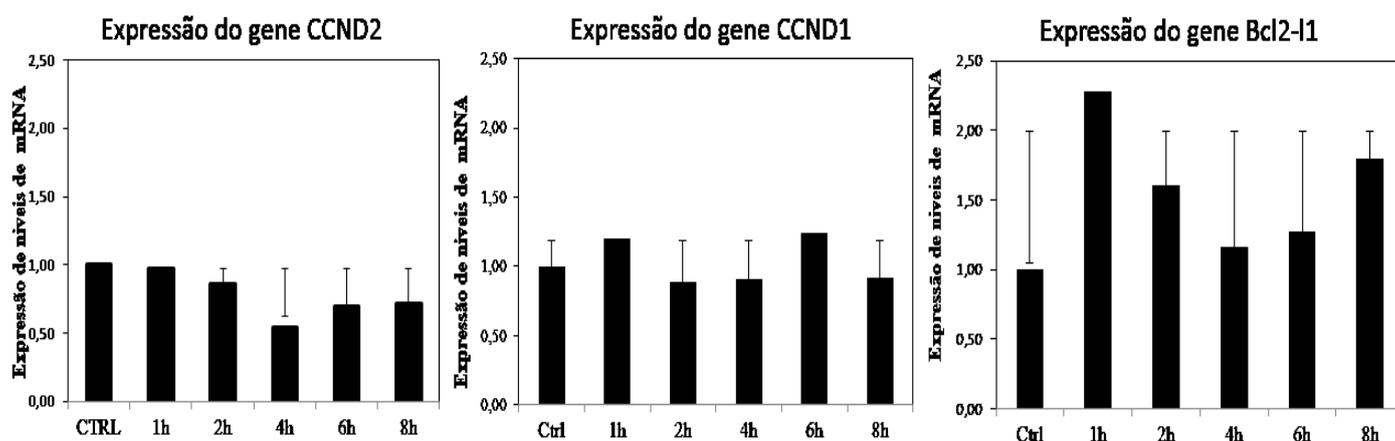


Figura 27. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os genes CCND1, CCND2 e Bcl2-11 na linhagem HMC 1.2. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos.

Por outro lado, na Figura 27, observamos, de forma descritiva, que o gene CISH apresentou valores de expressão das vezes maiores somente após 6 horas de indução com interleucina-2. Entretanto, nos outros tempos registrados de indução, não houve diferenças na expressão, quando comparados com a amostra controle. Para o gene OSM, teve um aumento de expressão três vezes maior aos níveis registrados, seguido de duas vezes maior na indução, após de 6 horas, quando comparado com o grupo controle. Estes dados representam a média e desvio padrão de 2 experimentos em triplicata.

3.4.5 Expressão dos genes CISH e OSM sob indução com IL-2 e Ruxolitinib na linhagem HMC 1.2 em 1 hora

Para constatar a ativação de vias moleculares, a partir da indução com a interleucina-2 e Ruxolitinib, nós utilizamos uma concentração de 200ng/μL da IL-2 e 1μM do composto Ruxolitinib comparados com a amostra controle em 1 hora de indução. Na Figura 28, mostram-se as médias e o desvio padrão de dois experimentos dos genes CISH e OSM. Como podemos observar no histograma, os valores referentes para a expressão do gene CISH, após 1 hora de indução com a interleucina -2, mostraram ter uma expressão de 3,8, valor aproximadamente quatro vezes maior do que o valor registrado para a amostra controle. Em constate, para a indução com o composto Ruxolitinib, o valor registrado da expressão foi de 1,0, sendo igual ao registrado para a amostra controle.

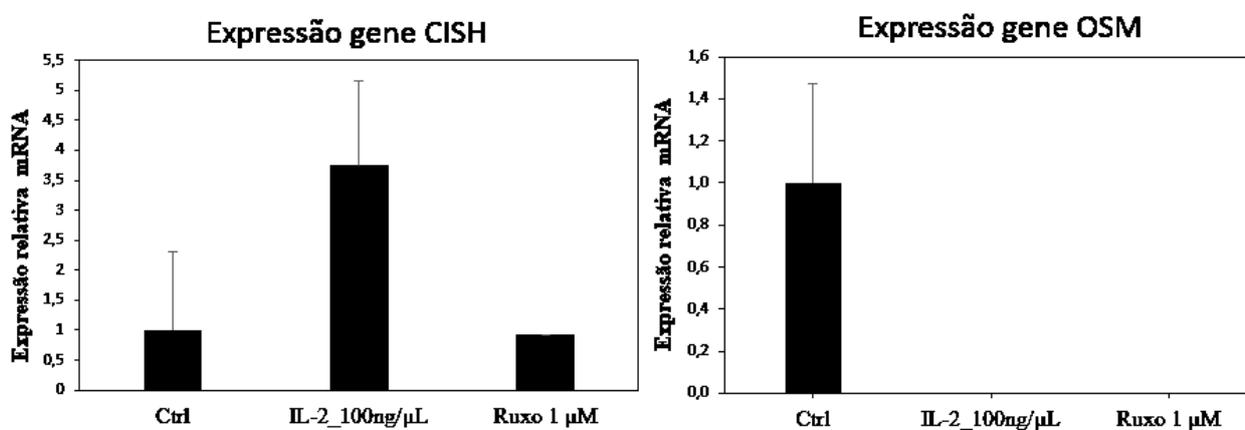


Figura 28. Relação dos níveis de expressão de mRNA indicados para os genes CISH e OSM na linhagem HMC 1.2 sob estimulação com IL-2 e Ruxolitinib em 1 hora. Dados obtidos a partir da média e desvio padrão de dois experimentos.

3.4.6 Ativação de STAT5 induzida por IL-2 em linhagens Humanas de mastócitos

De modo a verificar uma ativação e internalização da interleucina-2, estimamos a expressão da proteína pSTAT5 nas linhagens HMC 1.1, HMC 1.2, Rosa WT e D816V de mastócitos humanos, utilizando o método de western blotting e utilizando a expressão constitutiva da proteína GAPDH. Na Figura 29, foram detectadas as frações correspondentes à expressão das proteínas pSTAT5 e pERK, em ausência ou presença da IL-2. Podemos observar que, na linhagem HMC 1.2, houve uma alta expressão quando tratada por 1 hora com a IL-2 (+). Isto pode ser notado quando comparamos com amostra controle (-) da mesma linhagem.

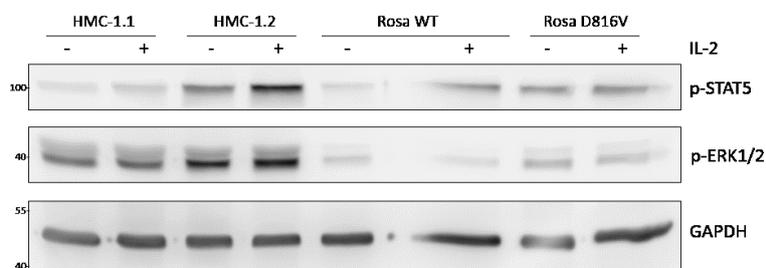


Figura 29. Expressão das proteínas pSTAT5 e pERK sob estimulação da interleucina-2 nas HMC 1.1, HMC 1.2, Rosa WT e D816V de mastócitos humanos linhagens, (+) representa presença da IL-2 e (-) representa ausência da IL-2.

Por outro lado, quando observada a expressão da proteína pERK na linhagem HMC 1.2, mostra ter o mesmo nível de expressão quando comparadas a amostra tratada com IL-2 e sem tratar com a IL-2. No caso da linhagem HMC 1.1, observamos que não houve diferenças na expressão, tanto na proteína pSTAT5 como a proteína pERK, quando tratada com IL-2 por 1 hora. Da mesma forma, para as linhagens Rosa WT e D816V, notamos que não existe diferenças na expressão da proteína pSTAT5 e a pERK, quando comparamos a amostra tratada e não tratada para cada linhagem com a IL-2 por 1 hora.

3.4.7 Ativação da proteína pSTAT5 na linhagem HMC 1.2 sob indução da IL-2 em intervalos de tempo

Após observar a ativação da expressão da proteína pSTAT5 na linhagem HMC 1.2 de mastócitos, verificamos os tempos relativos à ativação desta proteína, no decurso de 1 hora após estimulação com a interleucina-2. Na Figura 30, podemos observar a expressão constitutiva da proteína pSTA5 nos tempos 1, 5, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, quando comparados com a amostra controle. Estes dados mostram que, nos diferentes tempos avaliados, a expressão da proteína se mantém constante, sendo observado que o maior incremento da expressão incide nos tempos 5 e 15 minutos após estimulação. Por outro lado, se observa que, para a expressão da proteína pERK, os valores referentes a expressão se mantêm de forma constante, quando comparado com a amostra controle.

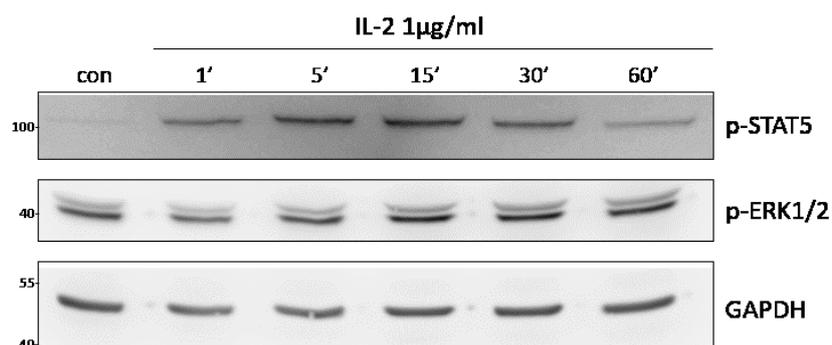


Figure 30. Expressão das proteínas pSTAT5 e pERK sob estimulação da interleucina-2 em diferentes intervalos de tempo (1', 5', 15', 30' e 60') minutos da linhagem HMC 1.2. (Con) amostra controle.

3.4.9 Expressão do receptor CD25 induzido por Fitohemaglutinina (PHA) na linhagem leucêmica Jurkat

Para verificar a expressão, ou não, do receptor CD25 na linhagem leucêmica Jurkat, realizamos uma avaliação prévia utilizando um marcador de detecção do anticorpo anti-CD25/PE, medido através de citometria de fluxo (dados não mostrados). Esses dados reportaram que houve uma expressão mínima deste receptor, mas de forma basal. Desta forma, decidimos amplificar sua expressão utilizando o composto fito-hemaglutinina (PHA) como agente indutor. Na figura 32, podemos observar a porcentagem de expressão do receptor CD25, induzido a partir de três diferentes concentrações de PHA 1µg/mL,

5 μ g/mL e 10 μ g/mL, respectivamente. Estes dados mostram que existe um aumento de expressão do receptor CD25 nas amostras da linhagem leucêmica tratadas com 5 μ g/mL e 10 μ g/mL de PHA, mas não observado na amostra tratada com 1 μ g/mL PHA, quando comparadas com amostra controle, após 48 horas de tratamento. Por outro lado, na figura 32a, observamos a análise gráfica por citometria de fluxo de todas as amostras tratadas com PHA (1 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e o controle), onde se mostra uma evidente diminuição da população de células leucêmicas vivas (quadro cor rosa), conforme aumento da concentração de PHA. Em contraste, na Figura 32, mostra-se o aumento de expressão do receptor CD25, em proporção ao aumento das concentrações do PHA nas amostras tratadas.

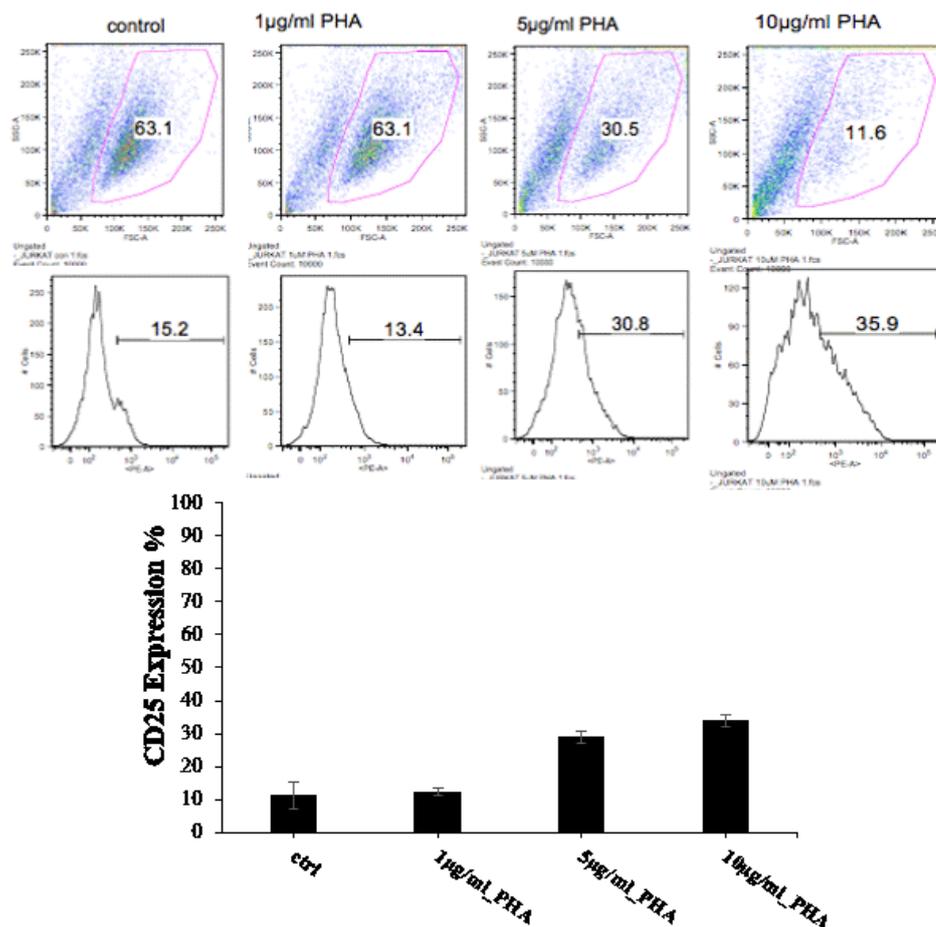


Figura 31. Detecção da expressão do receptor CD25 induzido pela fito-hemaglutinina (PHA) nas concentrações 1 μ g/mL, 5 μ g/mL e 10 μ g/mL após 48 horas de tratamento na linhagem leucêmica Jurkat, utilizando a técnica de citometria FACS. Valor médio de percentagem dos valores registrados para três leituras no citômetro de fluxo FACS.

3.4.10 Apoptose induzida na linhagem leucêmica Jurkat em diferentes concentrações de Fitohemaglutinina (PHA)

O seguinte passo foi avaliar a indução à morte celular via apoptose causada por diferentes concentrações de fitohemaglutinina (PHA) na linhagem leucêmica Jurkat. A partir de quatro amostras tratadas, com concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, foram avaliadas as taxas de apoptose. Na figura 33, mostra-se a porcentagem de indução à apoptose nas amostras analisadas por citometria de fluxo, onde podemos observar que, à medida que aumenta a concentração de PHA, há um incremento de forma exponencial das taxas de morte celular. Isto pode ser constatado quando comparamos as amostras tratadas com 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ e o respectivo controle. Da mesma forma, no esquema gráfico da citometria, na Figura 33, pode-se observar a transição de células viáveis para células depletadas compreendido nas áreas do quadro inferior esquerdo (Células vivas), e o quadro superior direito (células mortas).

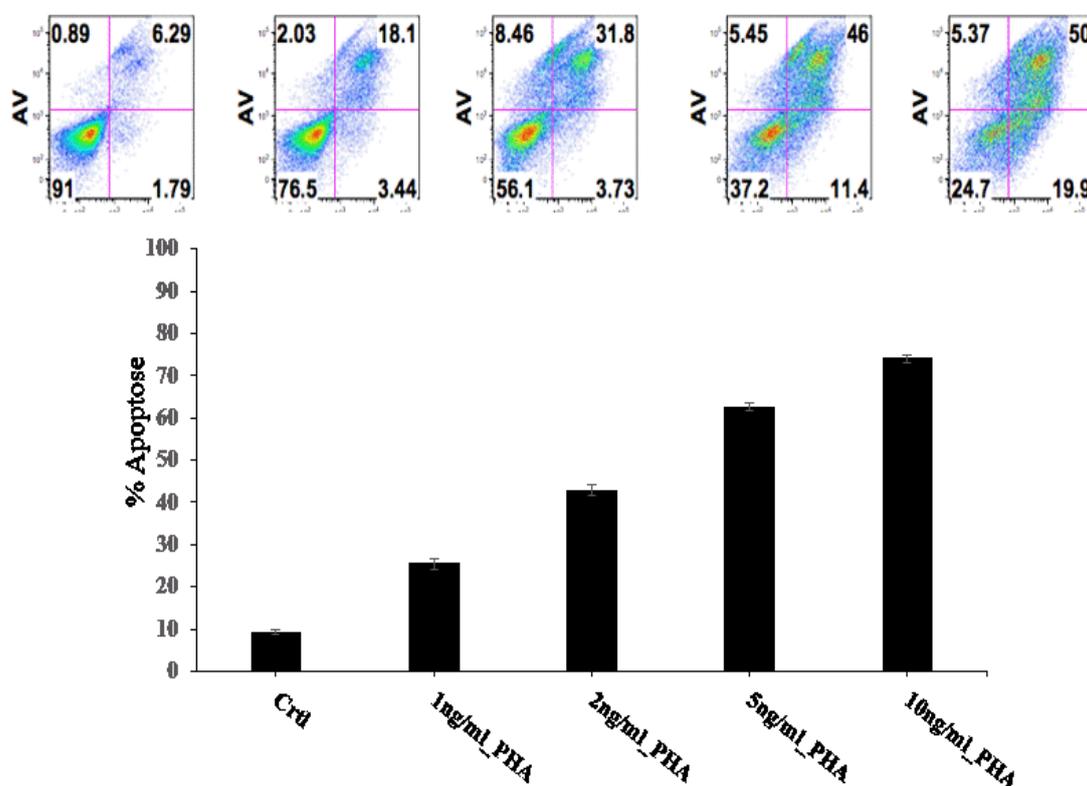


Figura 32. Detecção de apoptose induzida por Polihidroxicanoatos (PHA) nas concentrações 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ após 48 horas de tratamento na linhagem leucêmica Jurkat, utilizando a técnica de citometria FACS. Valor médio de porcentagem dos valores registrados para três leituras no citômetro de fluxo FACS.

3.5 DISCUSSÕES

Tendo em vista os dados observados ao longo do desenvolvimento desses experimentos, podemos considerar alguns aspectos importantes. Primeiro, em relação ao efeito da construção química através da pegulação da interleucina-2 (IL-2) e o peptídeo apoptótico pep5 em células mastocitárias, foi observado que, em 4 diferentes tratamentos, a viabilidade celular apresenta diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$) na linhagem HMC 1.2. Porém, isso não foi observado para a linhagem HMC 1.1, utilizando como método de análise o teste de comparação de Kruskal-wallis de amostras independentes. Portanto, não foi possível evidenciar algum tipo de supressão celular nesta linhagem. Por outro lado, comparando as variâncias entre os diferentes tratamentos na linhagem HMC 1.2, observamos que existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo Ruxo ($1\mu\text{M}$) e o grupo não tratado como controle. Entretanto, essa diferença significativa não foi notada nos grupos tratados com IL-2PEGpep5 (200 ng/mL) e IL-2 (200 ng/mL) em solitário, quando comparados com o grupo não tratado como controle na mesma linhagem.

Podemos considerar que, apesar de possuir diferenças aparentes na comparação de médias entre o grupo tratado com o produto IL-2PEGpep5 (200 ng/mL) e a grupo não tratado como controle, os valores de viabilidade não apresentam uma significância estatística, embora este método de análise também mostre uma tendência de valor significativo nesses resultados com um aumento do tamanho amostral entres estes grupos. Em alternativa, o método de análise estatístico indica que o composto ruxolitinib (Ruxo), em uma concentração de $1\mu\text{M}$, sugere ter uma influência nas taxas de viabilidade na linhagem HMC 1.2 no grupo tratado, podendo considerar-se uma supressão celular após 72 horas de tratamento. Cabe ressaltar que o composto de inibição celular ruxolitinib, conhecido comercialmente com o nome de Jakavi®, é um fármaco aprovado pela FDA, em novembro de 2011 (MASCARENHAS; HOFFMAN, 2012), utilizado como um medicamento inibidor seletivo das vias de sinalização JAK/STAT (SONBOL et al., 2013). O mecanismo de atuação deste composto (ruxolitinib) deve-se a sua alta afinidade pelo sítio catalítico de ligação da molécula de ATP no domínio quinase (JAK), inibindo igualmente sua função celular. Assim, como resultado desta ação, há uma diminuição da fosforilação da via de ativação STAT-3/5, Akt e ERK nas células tratadas.

Por outro lado, o ruxolitinib foi caracterizado como uma classe de medicamento com ação antineoplásica (LIMA et al., 2019) e antirreumatoide (BJØRN; HASSELBALCH, 2015), usado principalmente para o tratamento em pacientes com mielofibrose, uma doença considerada como um tipo de neoplasia de mieloproliferação, formando uma esplenomegalia como sintoma nas pessoas que a padecem (PASSAMONTI et al., 2017). Adicionalmente, este composto também mostrou ter uma resposta clínica positiva para certos tipos de leucemias mieloide (HARRISON et al., 2013). Podemos constatar nossos resultados com os estudos reportados sobre o efeito do composto ruxolitinib em mastócitos, onde foi mostrado uma atenuação da desgranulação e a produção de citocinas, como são Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (HERMANS et al., 2018), envolvidas nos processos inflamatórios decorrentes da atividade proliferativa das células mastocitárias (YACOUB; PROCHASKA, 2016), especificamente pela inibição das vias JAK1/JAK2-STAT5, que são ativadas após ligação do IgE com o receptor KIT (BAUMGARTNER et al., 2009; MORALES et al., 2010; SHELBURNE et al., 2003).

Complementarmente, observamos ser interessante que este composto possa ter um potencial terapêutico em afecções patológicas, tais como a mastocitose sistêmica e a mastocitose cutânea, como também em doenças crônicas de inflamação na pele, como é a dermatite atópica, devido à inibição das vias de ativação JAK/STAT mediadoras na expansão clonal dos mastócitos (BAO; ZHANG; CHAN, 2013). Em contraste, estas vias de sinalização estão presentes em células T regulatórias, que desempenham um importante papel nos processos de homeostase e de respostas do sistema imune (MOSS et al., 2004; NEGRIN, 2011). A diminuição deste tipo celular em pacientes diagnosticados com neoplasias mieloproliferativas, assim como em outros pacientes com doenças similares, pode, eventualmente, comprometer a estabilidade do sistema imune, levando ao aparecimento de severas respostas inflamatórias (SATHER et al., 2007). Estudos posteriores ao nível bioquímico são necessários para tentar desvendar uma melhor especificidade do produto ruxolitinib, sendo importante considerar estudos que envolvam formas análogas da molécula, de modo a não afetar as células regulatórias para futuros tratamentos de doenças derivadas da atividade anormal dos mastócitos, sem interferir na homeostase do sistema imunológico dos pacientes tratados.

Em relação ao produto IL-2PEGpep5, podemos afirmar que a amostra tratada com este produto mostrou uma atuação de supressão na linhagem HMC 1.2, visto quando comparamos os números de células viáveis deste grupo com o grupo não tratado como o controle, após 72 horas de tratamento. No entanto, essa mesma validade não foi encontrada estatisticamente, sugerindo aumentar o tamanho amostral deste grupo. Nesse cenário, podemos considerar importante ampliar o número de experimentos utilizando o produto IL-2PEGpep5 e, assim, confirmar o efeito causado após tratamento na linhagem de mastócitos HMC 1.2 com uma significância estatística. Por outro lado, estudos moleculares identificaram que 93% das pessoas diagnosticadas com mastocitose sistêmica reportam uma alta expressão do receptor CD25 (IL-2R α) (TEODOSIO et al., 2010), revelando uma característica específica de imunofenotipagem para esta doença. Importante lembrar que este marcador molecular é um dos três componentes do complexo proteico de alta afinidade IL-2R (STAUBER et al., 2006).

Assim, para este estudo, o produto proposto a partir da peguilação da interleucina -2 com o peptídeo apoptótico pep5, se perfilaria como uma alternativa potencial com alta especificidade terapêutica para pacientes com mastocitose sistêmica, mas ainda são necessários testes *in vitro* para confirmar sua verdadeira eficácia na redução da expansão clonal dos mastócitos precursores desta afecção. Em outros estudos, usando os cães como modelo animal, também foi identificado o receptor CD25 (IL-2R α) como um marcador para células tumorais de mastocitose canino e, em alguns casos, em mastócitos envolvidos na dermatite alérgica, mas não detectado em mastócitos presentes no tecido conjuntivo sem alterações (MEYER; GRUBER; KLOPFLEISCH, 2012). Em frente a estas condições patológicas, podemos propor que o produto peguilado IL-2PEGpep5 seria um notável candidato para realizar uma prova de conceito inicial *in vitro* em células tumorais de mastocitose isoladas a partir de tecido canino, seguido testes pré-clínicos em camundongos transplantados com tecido tumoral de mastocitose canino e subsequentes fases do progresso do produto. Uma vantagem no desenvolvimento de produtos farmacêuticos veterinários, em específico para animais de estimação, é o tempo estimado para aplicação. Começando desde a prova de conceito até a fase de aprovação e disponibilidade do novo produto no mercado, seriam 5 anos (HUNTER et al., 2011), tempo muito menor do que os processos para o desenvolvimento de produtos farmacológicos para uso em humanos

(FDA, 2018). Desta forma, estudos iniciais e prova de conceito com base no produto peguilado IL-2PEGpep5 seriam uma nova estratégia, pensando em uma aplicabilidade em curto prazo para uso em cães como animais estimação.

Um segundo aspecto importante neste trabalho foi a confirmação da expressão de receptores IL-2R (alfa, beta e gama) na linhagem HMC 1.2, porém, não encontrados na linhagem HMC 1.1. Por um lado, os resultados observados a partir da detecção de expressão mRNAs para estes receptores mostraram que na linhagem de mastócitos HMC 1.1 não seriam expressos, o que poderia explicar, provavelmente, que estas células não são afetadas pela atividade tanto da molécula da interleucina-2 como pelo produto peguilado IL-2PEGpep5, devido ao fato de não possuir o receptor com a afinidade para a interação com a molécula. Por outro lado, o receptor CD25 (IL-2R-alfa) apresentou uma alta expressão na linhagem de mastócitos HMC 1.2, mas com ausência da sua expressão em outras linhagens de mastócitos como a HMC 1.1, Rosa wt e D816V. Podemos encontrar uma diferença do receptor CD25 presente em células CD8, CD4, NK e Treg, nas quais este marcador parece não ter uma função de transcrição de sinal, devido à ausência de domínios intracelulares, sendo um elemento chave no recrutamento da interleucina-2 presente no meio extracelular. No entanto, nos mastócitos, o receptor CD25 pode exercer um papel regulatório, com uma estreita correlação no aparecimento das doenças mastocitárias, decorrentes da inadequada função dos mastócitos, independente da interação com a citocina IL-2 (NATOLI et al., 2018).

Nossos dados também sugerem que a linhagem HMC 1.2 apresenta uma expressão dos receptores IL-2R-Beta e IL-2R-gama. No entanto, nestes dois marcadores, em uma menor proporção do que o reportado para o receptor CD25. Interessante notar que a expressão IL-2R-Beta e IL-2R-gama na linhagem HMC 1.2, não apresenta uma descrição prévia para este tipo mastócito, considerando relevante este tipo de análise ainda pouco compreendida. Experimentos posteriores são necessários para ratificar a expressão destes dois tipos de receptores e suas possíveis vias de sinalização intracelular. Adicionalmente, este resultado pode confirmar também um possível efeito causado pelo produto peguilado IL-2PEGpep5 no grupo tratado da linhagem HMC 1.2, devido à presença dos três tipos de receptores, facilitando, assim, a interação com a interleucina-2.

Um terceiro aspecto importante neste trabalho é a identificação de proteínas intracelulares, envolvidas nos processos de proliferação celular e vias da transcrição de sinal a partir da ligação com interleucina-2. O produto de expressão dos genes CCND1 e CCND2 parecem não ter uma participação no processo de sinalização intracelular, após 1 hora de indução com a interleucina-2 na linhagem de mastócitos celular HMC 1.2.

Previamente descrito, a Ciclina D1 é o produto codificado pelo gene CCND1, considerado como um importante regulador do ciclo celular, com alvo específico na proteína B-catenina que, por sua vez, está envolvida no controle e constituição do sistema de adesão célula-célula, sendo essencial na formação de novos tecidos (CLEVERS; NUSSE, 2012; STEINHART; ANGERS, 2018). Entretanto, o gene CCND2 codifica a proteína regulatória Ciclina D2, que participa ativamente nos eventos mitóticos, especialmente na coordenação temporária da transição G1/S do ciclo celular, ambas ciclinas dependentes de ativação via quinases (INABA et al., 1992; SHERR; ROBERTS, 2004). Uma característica em comum dos produtos codificados a partir dos genes CCND1 e CCND2, é a possível indução à expressão por meio da transcrição de sinal de certos tipos de citocinas, logo após ligação com receptores específicos da membrana (BRASIER, 2008). No caso da Interleucina-2, não foi possível elucidar este tipo de sinalização na linhagem de mastócitos HMC 1.2, embora esta apresente os três tipos de receptores (IL-2R) com afinidade para esta citocina.

Neste estudo, também observamos uma provável expressão de genes envolvidos em processos de regulação do metabolismo celular na linhagem HMC 1.2 de mastócitos. Os genes Bcl2-11, com um tempo de indução de 8 horas com a interleucina-2, e os genes CISH e OSM, em um período de indução de 1 hora, em presença ou ausência da interleucina-2 e o composto Ruxo. Em primeiro lugar, o gene Bcl2-11 codifica uma proteína que pertence à família das Bcl-2 e estão envolvidas no controle da maioria dos tipos de morte celular, incluindo apoptose tanto na inibição (antiapoptótico) como na indução (pró-apoptótico), necrose e na autofagia (CHIPUK et al., 2010; YIP; REED, 2008). Em níveis baixos de expressão do gene Bcl2, reprime a indução de apoptose mediada pela sinalização do receptor FasR-ligante, enquanto em altos níveis de expressão do gene Bcl-2, promove a ação apoptótica mediada pelo receptor de morte FasR, bloqueando a expressão de genes

que codificam certos tipos de caspases (SHAMAS-DIN et al., 2013; SHINOURA et al., 1999; YOULE; STRASSER, 2008). Em outros estudos realizados em células T CD4 e CD8 de camundongo, foi reportado que a IL-2 pode ser um elemento estimulante a processos apoptóticos por si só (LENARDO, 1991). Entretanto, em nossos dados preliminares, vemos que esta citocina não atuaria como um tipo indutor para algum tipo de morte celular. Isto pode ser constatado quando observamos os níveis de expressão reportados para o gene Bcl2-11, apresentando unicamente uma expressão constitutiva em baixos níveis de expressão, ao longo das 8 horas de estimulação com a interleucina-2 na linhagem HMC 1.2 de mastócitos.

Também podemos observar uma indução, ou não, dos genes CISH e OSM, após estimulação por 1 hora com a interleucina-2 (IL-2). O produto do gene CISH contém um domínio SH2 e um domínio SOCS. Este último está predominantemente associado com a família das proteínas SOCS (KHOR et al., 2010; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007), proteínas supressoras de sinalização intracelular de citocinas. A proteína CIS codificada pelo gene CISH, exerce uma importante função na ativação das células T e na proliferação via citocina-indução (DELCONTE et al., 2016). As citocinas, como a IL-2 e a IL-7, podem controlar a expressão da proteína CIS, através da ligação com seus receptores, mediado pelo mecanismo de sinalização JAK/STAT (BEVINGTON et al., 2020; HU et al., 2014; LIN; LEONARD, 2000). Adicionalmente, a expressão desta proteína pode ser induzida em pouco tempo e, portanto, levar a uma rápida transcrição de sinal, especificamente pela ligação com o receptor IL-2R β , bloqueando a fosforização do dímero STAT5, impedindo sua ativação (AMAN et al., 1999). Uma elevada expressão do produto codificado pelo gene CISH, pode causar uma regulação negativa na sinalização do receptor de citocinas através da via JAK/STAT, e gerar a proliferação e sobrevivência independente de ativação STAT5 em células T (LI et al., 2000).

Em nossos estudos, podemos observar que a expressão do gene CISH é três vezes maior no grupo estimulado com a IL-2 do que o grupo sem estímulo e/ou o grupo estimulado com o composto Ruxo em um curto período (1h). Assim, podemos notar que é interessante que a IL-2, de forma rápida, causa uma sinalização intracelular e uma possível repressão no mecanismo de sinalização, via receptor IL-2R, considerando que a citocina IL-2 pode

sinalizar pelas rotas JAK1/STAT5 ou JAK2/STAT5 nos mastócitos e o produto do gene CISH regula alguma destas duas vias de sinalização.

Observando também a expressão do gene OSM que está estreitamente relacionado com o desenvolvimento das afeções inflamatórias (RYAN et al., 2015) e sua alta expressão, o torna um potente inibidor na diferenciação de mioblastos, principalmente pela ativação da via JAK1/STAT e um bloqueador do fator inibidor de leucemia (LIF) em células leucêmicas (XIAO et al., 2011) diferem de nossos resultados. A diferença destes estudos e de outros que descrevem que o gene OSM murino, como um gene prematuro, induzido por um subconjunto de citocinas, incluindo a IL2, IL3 e eritropoietina (EPO), em linhagens celulares mieloides e linfoides, através da via JAK/STAT5 (YOSHIMURA et al., 1996), nossos dados não mostraram uma expressão gênica do gene OSM, após estimulação com IL-2 e com o composto Ruxo, durante um intervalo de tempo curto (1 hora) na linhagem celular HMC 1.2 de mastócitos. Esses dados sugerem que, de alguma forma, a citocina IL-2 e o composto Ruxo não causariam eventualmente um estímulo na expressão do gene OSM, após incubação com estas duas moléculas e, assim, confirmado quando comparamos os valores de expressão destes dois grupos com o grupo sem estímulo na linhagem HMC 1.2 de mastócitos. Portanto, não haveria um bloqueio da via JAK/STAT5 durante este período.

Por outro lado, foi evidente também notar que a expressão do produto do gene pSTAT5 foi ativada rapidamente (a partir do 1 minuto), após estímulo com a citocina IL-2, mostrando um alto nível de ativação entre os minutos 5 a 15, durante um intervalo de 1 hora de incubação na linhagem HMC 1.2. Não obstante, esses mesmos níveis de expressão não foram observados nas linhagens HMC 1.1, Rosa wt e D816V de mastócitos, no mesmo período. Em contraste, o produto do gene pERK1/2 parece ser ativado de forma constitutiva e independente do estímulo com a citocina IL-2 na linhagem HMC 1.2, em baixos níveis de ativação nas linhagens HMC 1.1, Rosa wt e D816V. Podemos ressaltar que a interação e provável internalização da interleucina-2, se produz na linhagem HMC 1.2, já que foi a linhagem que apresentou altos níveis dos receptores IL-2R α e IL-2R β , em baixos níveis do receptor IL-2R γ , receptores afinidade para esta citocina. Além disso, notamos uma ativação rápida da via JAK/pSTAT5, após estímulo com a citocina IL-2, ratificando uma

vez a sua funcionalidade e possível potencial como molécula sinalizadora na linhagem HMC 1.2 de mastócitos.

Por outro lado, não foi considerado o produto peguulado IL-2PEGpep5 para estes experimentos de expressão gênica, devido à escassez de material para produzir a construção química e a um elevado custo de produção, limitando-nos a somente observar a atividade da IL-2 e do composto Ruxo, após diferentes períodos de indução à expressão dos genes na linhagem HMC 1.2, a qual mostrou mais relevância neste estudo. Finalmente, podemos sugerir a molécula IL-2 como um adequado modelo de molécula carregadora de pequenas moléculas, já que parece não alterar o metabolismo normal da linhagem HMC 1.2, e pode ser considerada para futuros estudos em células mastocitárias com receptores positivos para esta citocina.

Com base nos resultados obtidos a partir da linhagem celular leucêmica Jurkat, podemos observar, de uma forma parcial, que não houve um efeito na viabilidade celular, tanto no grupo tratado com a citocina IL-2 na concentração de 200 ng/ μ L, como no grupo tratado com a construção química através da peguilação da interleucina-2 (IL-2) e peptídeo apoptótico pep5, na concentração de 200 ng/ μ L, quando comparamos suas médias com o grupo controle. Adicionalmente, não existem diferenças significativas entre os grupos tratados e viabilidade ($p > 0,05$), utilizando como método de análise o teste de comparação de Kruskal-wallis de amostras independentes. Portanto, não foi possível evidenciar algum tipo de supressão nesta linhagem celular leucêmica. Uma provável razão de não observar um efeito após tratamento, se deve ao fato desta linhagem ter registrado uma baixa expressão do receptor IL-2R α . Isto pode ser verificado quando se observa a porcentagem de expressão após crescimento celular de 24, 48 e 72 horas, na linhagem leucêmica Jurkat, sem algum estímulo (dados não mostrados), sendo estes dados corroborados em outros estudos que usam a célula leucêmica Jurkat como modelo experimental (SHATROVA et al., 2015). Duas características não propriamente exclusivas, podemos levar em consideração, com base nos trabalhos descritos previamente, onde foi interessante notar que as células leucêmicas derivadas de pacientes com IL-2R α (+) não responderam a estímulos com a citocina IL-2, independente dos níveis da expressão do receptor IL-2R α (KAUSHANSKY, 2006). Assim, este tipo de marcador pode ter uma função diferente da

já descrita previamente, como um elemento membro que participa na formação do complexo proteico IL-2R de alta afinidade para a interleucina-2 (STAUBER et al., 2006). Esta outra função seria o recrutamento da IL-2 presente no ambiente para a trans-apresentação para outras células, favorecendo a interação célula-célula (IKEMIZU; CHIRIFU; DAVIS, 2012; NAKASE et al., 1993; WUEST et al., 2011). Uma outra particularidade do receptor IL-2R α é sua presença como molécula solúvel no soro sanguíneo. Estudos relacionados reportam um elevado número do sIL-2R presente em amostras de pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda (LMA)(NAKASE et al., 1992, 2012), que apresentam este receptor de forma livre no soro (sIL-2R). Portanto, atuaria como regulador negativo, que compete pela citocina IL-2 com as células CD8 ou células *Killer* (DLOUHY et al., 2017; LAI; LEUNG; LAI, 1991).

Existem alguns compostos derivados de plantas, como o PHA, que podem induzir a expressão de certos tipos receptores que, por sua vez, ativam mecanismos intracelulares em células do sistema imunológico. Como descrito no item 3.3.2, a fitohemaglutinina, ou denominado PHA, é uma glicoproteína que apresenta uma potente atividade de aglutinação celular mitogênica. O mecanismo de ação deste composto se deve à alta afinidade por uma variedade de receptores mitogênicos presentes na membrana das células T, promovendo a ativação e divisão celular, atuando como um ativador inespecífico (JIAO et al., 2019). Comparando nossos resultados com estes estudos, observamos um aumento da expressão do receptor IL-2R α na célula leucêmica Jurkat, quando estimulada com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA, após estimulação de 48 horas. Estes dados podem ser também confirmados com resultados obtidos em estudos anteriores, onde uma concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu a mais do que 30% da expressão do receptor IL-2R α na mesma célula leucêmica e em células PBMCs (JIAO et al., 2019; SHATROVA et al., 2015). Em contraste, observamos uma elevada taxa de morte celular por indução à apoptose, à medida que aumenta a concentração do composto PHA, durante as 48 horas do estímulo. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos em células PBMCs, ratificando, sim, este efeito observado (JIAO et al., 2019). Podemos considerar o PHA como um composto mediador em processos apoptóticos em células leucêmicas. A identificação de peptídeos intracelulares, ou mRNAs específicos para células leucêmicas, ou células CD8, após estímulo com PHA, seriam um elemento potencial para a construção de novas

biomoléculas que tenham um efeito indutor à morte celular via apoptose, como futuro tratamento para neoplasias hemolíticas e doenças inflamatórias autoimunes.

3.6 CONCLUSÕES

- As células mastocitárias desempenham um papel primordial na homeostase e foram caracterizadas como unidades chaves, mediadoras das respostas imunológicas e no controle das doenças autoimunes e inflamatórias. Nesse cenário, consideramos importante nosso estudo molecular, realizado para tentar avaliar o efeito causado pelo conjugado IL-2PEGpep5 como um bioproduto, como uma prova de conceito em linhagem de mastócitos e leucêmica.
- Como conclusão deste capítulo, podemos ver um efeito de supressão celular causado pelo tratamento de 72 horas, com conjugação química da interleucina-2 humana e o peptídeo apoptótico pep5, em uma concentração de 200 ng/ μ L na linhagem HMC 1.2. No entanto, não foi observado o mesmo efeito na linhagem HMC 1.1. Ainda são necessários mais experimentos para aumentar o tamanho amostral e obter uma validade científica dos dados reportados. Adicionalmente, quando estas duas mesmas linhagens tratadas com a interleucina-2 em solitário, não foram notadas algum estímulo, tanto na proliferação quanto na viabilidade celular.
- Interessante descrever que a linhagem de mastócitos HMC 1.2 expressa os três tipos de receptores para a IL-2R alfa, IL-2R beta e IL-2R gama, diferente da linhagem da HMC 1.1, que só expressou o receptor IL2R gama em nível basal, não foi observado a expressão dos outros dos marcadores. Os genes CCND1 e CCND2 parecem ser não ativados pelo estímulo com a interleucina-2, após uma hora de incubação, apesar da linhagem de mastócitos HMC 1.2 expressar os três tipos de receptores para esta citocina.
- O gene Bcl2-l1 apresentou, unicamente, uma expressão constitutiva em baixos níveis de expressão, ao longo das 8 horas de estimulação com a interleucina-2, na linhagem HMC 1.2 de mastócitos, de forma preliminar, consideramos que a IL-2 não atuaria como um indutor nesta linhagem de mastócitos.
- Observamos que a expressão do gene CISH é três vezes maior no grupo estimulado com a IL-2 do que no grupo sem estímulo e/ou o grupo estimulado com o composto

Ruxo em um curto período (1h). Assim, podemos notar que é interessante que a IL-2, de forma rápida, causa uma sinalização intracelular e uma possível repressão no mecanismo de sinalização via receptor IL-2R.

- A expressão do produto do gene pSTAT5 foi ativada rapidamente, começando desde o primeiro minuto após estímulo com a citocina IL-2, mostrando um alto nível de ativação entre os minutos 5 a 15, durante o tempo de 1 hora de incubação na linhagem HMC 1.2, embora os mesmos níveis de expressão não tenham sido observados nas linhagens HMC 1.1, Rosa wt e D816V de mastócitos no mesmo período.
- Não houve um efeito na viabilidade celular da linhagem leucêmica Jurkat, quando tratada com a citocina IL-2, na concentração de 200 ng/ μ L. Da mesma forma, não foi possível observar o efeito quando tratada com a construção química através da peguilação da interleucina-2 (IL-2) e peptídeo apoptótico pep5, na concentração de 200 ng/ μ L, em um tempo de 72 horas.
- Observamos um aumento da expressão do receptor IL2R alfa (CD25) na linhagem leucêmica Jurkat, quando estimulada por 48 horas com diferentes concentrações do composto PHA. No entanto, a medida que aumenta a concentração do composto PHA aumenta a taxa de morte celular por indução à apoptose.

3.7 REFERÊNCIAS

ABID, A.; MALONE, M. A.; CURCI, K. **Mastocytosis Primary Care - Clinics in Office Practice**, 2016.

ACTOR, J. K. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. In: **Introductory Immunology**. [s.l: s.n.].

AFRIN, L. B. et al. Characterization of Mast Cell Activation Syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, 2017.

AKIN, C. **Mast Cell Activation Disorders** **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, 2014.

AKIN, C. **Mast cell activation syndromes** **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2017.

AKIN, C.; VALENT, P.; METCALFE, D. D. Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A; LEWIS, J. Lymphocytes and the cellular Basis of Adaptive Immunity. **Molecular Biology of the Cell**, 2002.

AMAN, M. J. et al. CIS associates with the interleukin-2 receptor β chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. **Journal of Biological Chemistry**, 1999.

AMIN, K. **The role of mast cells in allergic inflammation** **Respiratory Medicine**, 2012.

AROCK, M. et al. **KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: Recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis** **Leukemia**, 2015.

ASCIERTO, P. A. et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: Results from phase I and II studies. **Journal of Clinical Oncology**, 2005.

BĄBOLEWSKA, E.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Mast cell inhibitory receptors. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, 2012.

BAH, A.; FORMAN-KAY, J. D. Modulation of intrinsically disordered protein function

by post-translational modifications. **Journal of Biological Chemistry**, 2016.

BAO, L.; ZHANG, H.; CHAN, L. S. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. **JAK-STAT**, 2013.

BARMAN, B. N.; CHAMPION, D. H.; SJOBERG, S. L. Identification and quantification of polyethylene glycol types in polyethylene glycol methyl ether and polyethylene glycol vinyl ether. **Journal of Chromatography A**, 2009.

BAUMGARTNER, C. et al. Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: Subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V. **American Journal of Pathology**, 2009.

BEVINGTON, S. L. et al. IL-2/IL-7-inducible factors pioneer the path to T cell differentiation in advance of lineage-defining factors. **The EMBO Journal**, 2020.

BJØRN, M. E.; HASSELBALCH, H. C. The impact of ruxolitinib treatment on inflammation-mediated comorbidities in myelofibrosis and related neoplasms. **Clinical Case Reports**, 2015.

BONAMICHI-SANTOS, R.; CASTELLS, M. **Mast Cell Activation Syndromes Current Treatment Options in Allergy**, 2016.

BOS, S. D. et al. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8⁺ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. **PLoS ONE**, 2015.

BRASIER, A. R. **Expanding role of cyclin dependent kinases in cytokine inducible gene expression** *Cell Cycle*, 2008.

BRAZZELLI, V. et al. Narrow-band UVB phototherapy and psoralen–ultraviolet A photochemotherapy in the treatment of cutaneous mastocytosis: a study in 20 patients. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, 2016.

BROCKOW, K. **Urticaria pigmentosa** *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2004.

BULFONE-PAUS, S. et al. **Positive and Negative Signals in Mast Cell Activation** *Trends in Immunology*, 2017.

CANDOTTI, F. et al. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: Clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. **Blood**, 2012.

CARDET, J. C.; CASTELLS, M. C.; HAMILTON, M. J. Immunology and clinical manifestations of non-clonal mast cell activation syndrome. **Current Allergy and Asthma Reports**, 2013.

CARTER, M. C. et al. Adverse reactions to drugs and biologics in patients with clonal mast cell disorders: A Work Group Report of the Mast Cells Disorder Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2019.

CATALDI, M. et al. Histamine receptors and antihistamines: From discovery to clinical applications. **Chemical Immunology and Allergy**, 2014.

CHAN, B. et al. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for Adenosine deaminase (ADA)-deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID). **Clinical Immunology**, 2005.

CHEN, C. C. et al. Identification of mast cell progenitors in adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005.

CHEN, R. et al. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. **Journal of Clinical Investigation**, 2001.

CHERIAN, S. et al. Expression of CD2 and CD25 on mast cell populations can be seen outside the setting of systemic mastocytosis. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, 2016.

CHERVENICK, P. A.; BOGGS, D. R. Decreased neutrophils and megakaryocytes in anemic mice of genotype W/W^v. **Journal of Cellular Physiology**, 1969.

CHIPUK, J. E. et al. **The BCL-2 Family Reunion** *Molecular Cell*, 2010.

CLARK, S. D. et al. Importance of extracellular loop one of the neuropeptide S receptor for biogenesis and function. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 130–138, 2010.

CLÉNET, M. L. et al. Peripheral human CD4+CD8+ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. **Scientific Reports**, 2017.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. **Wnt/ β -catenin signaling and disease** *Cell*, 2012.

COLLINGTON, S. J.; WILLIAMS, T. J.; WELLER, C. L. **Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues** *Trends in Immunology*, 2011.

COOKSON, H.; GRATTAN, C. An update on mast cell disorders. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, 2016.

COSTA, D. L. M. et al. Telangiectasia macularis eruptiva perstans: A rare form of adult mastocytosis. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, 2011.

COSTA, S. et al. **Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes** *Immunology*, 2019.

CRUSE, G.; METCALFE, D. D.; OLIVERA, A. **Functional deregulation of KIT: Link to mast cell proliferative diseases and other neoplasms** *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2014.

DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. **Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2014.

DAHLIN, J. S.; HALLGREN, J. **Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues** *Molecular Immunology*, 2015.

DAVIS, F. et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, 1977.

DAVIS, F. F. et al. Enzyme-Polyethylene Glycol Adducts: Modified Enzymes with Unique Properties. In: **Enzyme Engineering**. [s.l: s.n.].

DE ARAUJO, C. B. et al. A novel intracellular peptide derived from G1/S cyclin D2 induces cell death. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

DEHBASHI, M. et al. Integral membrane protein expression of human CD25 on the cell surface of HEK293 cell line: The available cellular model of CD25 positive to facilitate in vitro developing assays. **Biomolecular Concepts**, 2019.

DELCONTE, R. B. et al. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. **Nature Immunology**, 2016.

DEY, M. et al. **The evolving role of CD8+CD28- immunosenescent T cells in cancer immunology** **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

DILWORTH, M. V. et al. **Microbial expression systems for membrane proteins** **Methods**, 2018.

DLOUHY, I. et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor (sIL2-R), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF) are associated with adverse clinical features and predict poor outcome in diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia Research**, 2017.

DOENER, F. et al. Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions. **International Immunology**, 2013.

DOZIER, J. K.; DISTEFANO, M. D. **Site-specific pegylation of therapeutic proteins** **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.

DRABER, P. et al. Signal transduction and chemotaxis in mast cells. **European Journal of Pharmacology**, 2016.

DROOGENDIJK, H. J. et al. Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis: A phase II trial. **Cancer**, 2006.

DUFAIT, I. et al. Perforin and granzyme b expressed by murine myeloid-derived suppressor cells: A study on their role in outgrowth of cancer cells. **Cancers**, 2019.

DURAND, B. et al. Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34+ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3. **Blood**, 1994.

EFFROS, R. B. et al. **The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging** **Immunological Reviews**, 2005.

EHRlich, P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. **Archiv für Mikroskopische Anatomie**, 1877.

ELLIS, J. M. Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. **Archives of pathology**,

1949.

ELLMIEIER, W.; HAUST, L.; TSCHISMAROV, R. **Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013.

EVERDS, N.; BOLLINGER, A. P. Hematology of the mouse. In: **The laboratory mouse**. [s.l.: s.n.]. p. 331–347.

FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, 2014.

FDA. The Drug Development Process - Step 3: Clinical Research.

FELTON, J. M. et al. Mer-mediated eosinophil efferocytosis regulates resolution of allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2018.

FERRANDO-MARTÍNEZ, S. et al. IFN γ -TNF α -IL2-MIP1 α -CD107a+PRF1+ CD8 pp65-Specific T-Cell Response Is Independently Associated with Time to Death in Elderly Humans. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, 2014.

FERREIRA, I. G. et al. **Glycosylation as a main regulator of growth and death factor receptors signaling** *International Journal of Molecular Sciences*, 2018.

FONTANA, A. et al. **Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008.

FOSER, S. et al. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS). **Protein Expression and Purification**, 2003.

FRIERI, M. **Mast Cell Activation Syndrome** *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2018.

FRIERI, M.; PATEL, R.; CELESTIN, J. Mast cell activation syndrome: A review. **Current Allergy and Asthma Reports**, 2013.

FRIESE, M. A. et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8 + T cells in multiple sclerosis. **Nature Medicine**, 2008.

G., P.; F.M., V. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, 2012.

GALLI, S. J. et al. **Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent advances** **Annual Review of Immunology**, 2005.

GALLI, S. J.; TSAI, M. **Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity** **European Journal of Immunology**, 2010.

GENG, X. et al. **Interleukin-2 and autoimmune disease occurrence and therapy.** **European review for medical and pharmacological sciences**, 2012.

GENNERY, A. R.; CANT, A. J. **Diagnosis of severe combined immunodeficiency** **Journal of Clinical Pathology**, 2001.

GERMIC, N. et al. **Regulation of the innate immune system by autophagy: neutrophils, eosinophils, mast cells, NK cells** **Cell Death and Differentiation**, 2019.

GLAZER, E. S. et al. Phase II Study of Pegylated Arginine Deiminase for Nonresectable and Metastatic Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 2010.

GOLDBERG, A. L. **Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins** **Nature**, 2003.

GOZANI, O. et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. **Cell**, 2003.

GRIMBALDESTON, M. A. et al. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant kit^{W-sh/W-sh} mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. **American Journal of Pathology**, 2005.

GUPTA, B.; LEVCHENKO, T. S.; TORCHILIN, V. P. **Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides** **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005.

GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. **Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets***Immunity*, 2012.

HARRISON, C. et al. **Practical management of patients with myelofibrosis receiving ruxolitinib***Expert Review of Hematology*, 2013.

HATFIELD, P. M.; VIERSTRA, R. D. Protein degradation. In: **Plant metabolism**. [s.l: s.n.]. p. 26–36.

HAWIGER, J. **Cellular import of functional peptides to block intracellular signaling***Current Opinion in Immunology*, 1997.

HENSEL, J. A. et al. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. **Laboratory Investigation**, 2019.

HENZ, B. M. et al. **Mast cells as initiators of immunity and host defense***Experimental Dermatology*, 2001.

HERMANS, M. A. W. et al. The JAK1/JAK2- inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. **Clinical and Experimental Allergy**, 2018.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques Dedication**. [s.l: s.n.].

HERSHFIELD, M. S. et al. Treatment of Adenosine Deaminase Deficiency with Polyethylene Glycol–Modified Adenosine Deaminase. **New England Journal of Medicine**, 1987.

HERSHFIELD, M. S. PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: An update after 8.5 years. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 1995.

HERSHKO, A. Y. et al. Mast Cell Interleukin-2 Production Contributes to Suppression of Chronic Allergic Dermatitis. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 562–571, 2011.

HOFFMAN, A. S. The early days of PEG and PEGylation (1970s–1990s). **Acta Biomaterialia**, 2016.

HOLTSBERG, F. W. et al. Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase:

Effects of PEG formulations on its pharmacological properties. **Journal of Controlled Release**, 2002.

HORNY, H. P.; SOTLAR, K.; VALENT, P. **Mastocytosis: Immunophenotypical features of the transformed mast cells are unique among hematopoietic cells***Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2014.

HSU, C. L.; NEILSEN, C. V.; BRYCE, P. J. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. **PLoS ONE**, 2010.

HU, Z. et al. Polymorphisms in CISH gene are associated with persistent hepatitis B virus infection in Han Chinese population. **PLoS ONE**, 2014.

HUANG, W. et al. Maleimide–thiol adducts stabilized through stretching. **Nature Chemistry**, 2019.

HUGHES, E. L. et al. Mast Cells Mediate Early Neutrophil Recruitment and Exhibit Anti-Inflammatory Properties via FPR2/ALX. **British Journal of Pharmacology**, 2017.

HUNTER, R. P. et al. **Overview of the animal health drug development and registration process: An industry perspective***Future Medicinal Chemistry*, 2011.

IKEMIZU, S.; CHIRIFU, M.; DAVIS, S. J. **IL-2 and IL-15 signaling complexes: Different but the same***Nature Immunology*, 2012.

INABA, T. et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. **Genomics**, 1992.

IZAWA, T. et al. Fas-Independent T-Cell Apoptosis by Dendritic Cells Controls Autoimmune Arthritis in MRL/lpr Mice. **PLoS ONE**, 2012.

IZRAELSON, M. et al. **T cell immunity does not age in a long-lived rodent species***bioRxiv*, 2018.

J., B. The Role of Glycosylation in Receptor Signaling. In: **Glycosylation**. [s.l: s.n.].

JÄEGER, E. et al. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: Implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. **International Journal of Cancer**, v. 66, n. 2, p. 162–169, 1996.

JIAO, J. et al. Comparison of two commonly used methods for stimulating T cells. **Biotechnology Letters**, 2019.

JM, H.; RB., C. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2003.

JOHNSON, H. L. et al. Perforin competent CD8 T cells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. **PLoS ONE**, 2014.

JOSHI, N. S. et al. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. **Immunity**, 2007.

KAARTINEN, M. T. et al. Transglutaminase crosslinking of SIBLING proteins in teeth. **Journal of Dental Research**, 2005.

KALENIK, B. M.; GÓRA-SOCHACKA, A.; SIRKO, A. **B-defensins – Underestimated peptides in influenza combat***Virus Research*, 2018.

KAMINSKI, W. E. et al. **On the horizon: Flexible immune recognition outside lymphocytes***Immunobiology*, 2013.

KARLAFTIS, V. et al. **Importance of post-translational modifications on the function of key haemostatic proteins***Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2016.

KAUSHANSKY, K. **Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders***Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2006.

KELLY-WELCH, A. E. et al. **Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps***Science*, 2003.

KESSLER, B. M.; GLAS, R.; PLOEGH, H. L. **MHC class I antigen processing regulated by cytosolic proteolysis - Short cuts that alter peptide generation***Molecular Immunology*, 2002.

KHALILZADEH, R. et al. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 2003.

KHOR, C. C. et al. CISH and Susceptibility to Infectious Diseases . **New England Journal**

of Medicine, 2010.

KISSELEV, A. F. et al. The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3363–3371, 1999.

KITAMURA, Y.; ITO, A. **Mast cell-committed progenitors** **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005.

KOOPMANN, J. O.; HÄMMERLING, G. J.; MOMBURG, F. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 80–88, 1997.

KOPP, J. et al. Boosting recombinant inclusion body production—from classical fed-batch approach to continuous cultivation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2019.

KOYAMA-NASU, R. et al. The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. **Oncogene**, 2013.

KOZAKI, I.; SHIMIZU, K.; HONDA, H. Disulfide linked hetero dimeric peptide arrays for screening functional peptides inside cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020.

KOZLOWSKI, A.; MILTON HARRIS, J. Improvements in protein PEGylation: Pegylated interferons for treatment of hepatitis C. **Journal of Controlled Release**, 2001.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. **Mast cell: A multi-functional master cell** **Frontiers in Immunology**, 2016.

KUMAR, S. et al. Ex vivo antigen-pulsed PBMCs generate potent and long lasting immunity to infection when administered as a vaccine. **Vaccine**, 2017.

KUYKENDALL, J. R.; KUYKENDALL, N. S. Aldehydes. In: **Comprehensive Toxicology: Third Edition**. [s.l: s.n.].

LAFLEUR, M. A. et al. MRGPRX2 activation as a rapid, high-throughput mechanistic-based approach for detecting peptide-mediated human mast cell degranulation liabilities. **Journal of Immunotoxicology**, 2020.

LAI, K. N.; LEUNG, J. C. K.; LAI, F. M. M. Soluble interleukin 2 receptor release, interleukin 2 production, and interleukin 2 receptor expression in activated T-lymphocytes in vitro. **Pathology**, 1991.

LAIDLAW, B. J.; CRAFT, J. E.; KAECH, S. M. **The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory** *Nature Reviews Immunology*, 2016.

LANDRY, J. J. M. et al. The genomic and transcriptomic landscape of a hela cell line. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 2013.

LANGE, M. et al. **Diffuse cutaneous mastocytosis: Analysis of 10 cases and a brief review of the literature** *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012.

LANGE, M. et al. Does the aberrant expression of CD2 and CD25 by skin mast cells truly correlate with systemic involvement in patients presenting with mastocytosis in the skin? **International Archives of Allergy and Immunology**, 2014.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 2018.

LE, M. et al. **Natural history and treatment of cutaneous and systemic mastocytosis** *Postgraduate Medicine*, 2017.

LEE, H. et al. N-terminal site-specific mono-PEGylation of epidermal growth factor. **Pharmaceutical Research**, 2003.

LEICHERT, L. I.; JAKOB, U. Protein thiol modifications visualized in vivo. **PLoS Biology**, 2004.

LENARDO, M. J. Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. **Nature**, 1991.

LI, G. Z. et al. Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts. **Polymer Chemistry**, 2010.

LI, S. et al. Cytokine-induced Src homology 2 protein (CIS) promotes T cell receptor-

mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells. **Journal of Experimental Medicine**, 2000.

LI, X.; XIAO, B.; CHEN, X. S. **DNA Methylation: a New Player in Multiple Sclerosis** **Molecular Neurobiology**, 2017.

LIMA, K. et al. Reversine exhibits antineoplastic activity in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Scientific Reports**, 2019.

LIN, J. X.; LEONARD, W. J. **The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines** **Oncogene**, 2000.

LIU, R. et al. PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis. **Nucleic Acids Research**, 2018.

LU, X.; ZHANG, K. **PEGylation of therapeutic oligonucleotides: From linear to highly branched PEG architectures** **Nano Research**, 2018.

LUBBERS, R. et al. **Production of complement components by cells of the immune system** **Clinical and Experimental Immunology**, 2017.

LYAPUN, I. N.; ANDRYUKOV, B. G.; BYNINA, M. P. **HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks** **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, 2019.

MALBEC, O.; DAËRON, M. **The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation** **Immunological Reviews**, 2007.

MANN, M.; JENSEN, O. N. **Proteomic analysis of post-translational modifications** **Nature Biotechnology**, 2003.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. **Defining memory CD8 T cell** **Frontiers in Immunology**, 2018.

MASCARENHAS, J.; HOFFMAN, R. Ruxolitinib: The first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. **Clinical Cancer Research**, 2012.

MATITO, A.; CARTER, M. Cutaneous and systemic mastocytosis in children: A risk factor for anaphylaxis? **Current Allergy and Asthma Reports**, 2015.

MAURER, M. et al. **What is the physiological function of mast cells? Introduction***Experimental Dermatology*, 2003.

MAURO, V. P. **Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations***BioDrugs*, 2018.

MEIXIONG, J. et al. Activation of Mast-Cell-Expressed Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors Drives Non-histaminergic Itch. **Immunity**, 2019.

MERO, A. et al. Covalent conjugation of poly(Ethylene glycol) to proteins and peptides: Strategies and methods. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.].

MEYER, A.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. CD25 Is Expressed by Canine Cutaneous Mast Cell Tumors but not by Cutaneous Connective Tissue Mast Cells. **Veterinary Pathology**, 2012.

MOLDERINGS, G. J. et al. **Pharmacological treatment options for mast cell activation disease***Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2016.

MORALES, J. K. et al. **Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway***Genes and Immunity*, 2010.

MORGAN, N. G. et al. **Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus***IUBMB Life*, 2014.

MOSMANN, T. R. et al. Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1987.

MOSS, R. B. et al. **Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: Therapeutic implications***Expert Opinion on Biological Therapy*, 2004.

MUKAI, K. et al. **Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors***Immunological Reviews*, 2018.

MÜNZ, C. **Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation***Trends in Immunology*, 2016.

NAIR, D. P. et al. **The Thiol-Michael addition click reaction: A powerful and widely**

used tool in materials chemistry *Chemistry of Materials*, 2014.

NAKASE, K. et al. Diagnostic and clinical importance of interleukin-2 receptor alpha chain expression on non-T-cell acute leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, 1992.

NAKASE, K. et al. Interleukin-2 receptor alpha chain on acute myelocytic leukemia cells is involved in cell-to-cell interactions. **Leukemia Research**, 1993.

NAKASE, K. et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor in acute myeloid leukemia: Correlation with poor prognosis and CD4 expression on blast cells. **Cancer Epidemiology**, 2012.

NATOLI, G. et al. CD25 Activities Independent – Cells Discriminated By IL-2 Two Functionally Distinct Subsets of Mast Two Functionally Distinct Subsets of Mast Cells Discriminated By IL-2–Independent CD25 Activities. **DCSupplemental The Journal of Immunology by guest on May The Journal of Immunology The Journal of Immunology**, 2018.

NAVINÉS-FERRER, A. et al. MRGPRX2-mediated mast cell response to drugs used in perioperative procedures and anaesthesia. **Scientific Reports**, 2018.

NEGRIN, R. S. **Role of regulatory T cell populations in controlling graft vs host disease** *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 2011.

NIGROVIC, P. A. et al. Genetic inversion in mast cell-deficient Wsh mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. **American Journal of Pathology**, 2008.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Research**, 1960.

NURMATOV, U. B. et al. H1-antihistamines for primary mast cell activation syndromes: A systematic review. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2015.

ORINSKA, Z. et al. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8⁺ T-cell recruitment. **Blood**, 2005.

PALCZEWSKI, K. **G protein-coupled receptor rhodopsin** *Annual Review of Biochemistry*, 2006.

PANDEY, B. K. et al. Impact of site-specific PEGylation on the conformational stability and folding rate of the Pin WW domain depends strongly on PEG oligomer length. *Bioconjugate Chemistry*, 2013.

PARAMBATH, A. **Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol**. [s.l: s.n.].

PARDANANI, A. et al. Treatment of systemic mast cell disease with 2-chlorodeoxyadenosine. *Leukemia Research*, 2004.

PARDANANI, A. Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology*, 2019.

PASSAMONTI, F. et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *The Lancet Oncology*, 2017.

PASSER, B. et al. Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β protein precursor. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 2, n. 3–4, p. 289–301, 2000.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. **State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research** *Journal of Controlled Release*, 2012.

PETRA, A. I. et al. **Spectrum of mast cell activation disorders** *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014.

PFISTER, D.; MORBIDELLI, M. **Process for protein PEGylation** *Journal of Controlled Release*, 2014.

PLESNER, B. Biophysical characterisation of PEGylated proteins and highly concentrated protein solutions. *Thèse*, 2010.

PLUM, T. et al. Human Mast Cell Proteome Reveals Unique Lineage, Putative Functions, and Structural Basis for Cell Ablation. *Immunity*, 2020.

POOLE, L. B. **The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry**Free Radical Biology and Medicine, 2015.

POULSEN, L. K. et al. **Beyond IgE-when Do IgE-Crosslinking and effector cell activation lead to clinical anaphylaxis?**Frontiers in Immunology, 2017.

PRUS, G. et al. **Analysis and Interpretation of Protein Post-Translational Modification Site Stoichiometry**Trends in Biochemical Sciences, 2019.

RAMKUMAR, S. et al. Chemical complexity of protein determines optimal *E. coli* expression host; A comparative study using Erythropoietin, Streptokinase and Tumor Necrosis Factor Receptor. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017.

RAVIKIRAN, B.; MAHALAKSHMI, R. **Unusual post-translational protein modifications: The benefits of sophistication**RSC Advances, 2014.

REBER, L. L. et al. **Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity**Mucosal Immunology, 2015.

REITER, A.; GEORGE, T. I.; GOTLIB, J. **New developments in diagnosis, prognostication, and treatment of advanced systemic mastocytosis**Blood, 2020.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. **Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents**Clinical and Experimental Immunology, 2016.

ROSSIGNOL, J. et al. **Recent advances in the understanding and therapeutic management of mastocytosis [version 1; peer review: 4 approved]**F1000Research, 2019.

ROY, K.-M. Thiols and Organic Sulfides. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. [s.l: s.n.].

RYAN, R. E. et al. Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: Implications for inflammation and metastasis. **Cytokine**, 2015.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. **Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies**Molecular and Cellular Biochemistry, 2008.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. **Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance***Annual Review of Immunology*, 2004.

SALUJA, R. et al. **The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders***Molecular Immunology*, 2015.

SANTIAGO-RABER, M. L. et al. Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. **Journal of Experimental Medicine**, 2003.

SANTOS, J. H. P. M. et al. **Protein PEGylation for the design of biobetters: From reaction to purification processes***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018.

SAPRA, P. et al. Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model. **Clinical Cancer Research**, 2008.

SARV, T.; HŐRAK, P. Phytohaemagglutinin injection has a long-lasting effect on immune cells. **Journal of Avian Biology**, 2009.

SATHER, B. D. et al. Altering the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **Journal of Experimental Medicine**, 2007.

SCHIMPL, A. et al. **IL-2 and autoimmune disease** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002.

SCHMETZER, O. et al. Murine and human mast cell progenitors. **European Journal of Pharmacology**, 2016.

SCHOCH, C. In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 2003.

SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **Journal of Experimental Medicine**, 2006.

SHAMAS-DIN, A. et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2013.

SHARMA, S. et al. Deletion of Δ dblGata motif leads to increased predisposition and

severity of IgE-mediated food-induced anaphylaxis response. **PLoS ONE**, 2019.

SHATROVA, A. N. et al. CD25 expression on the surface of Jurkat cells. **Cell and Tissue Biology**, 2015.

SHATZ, W. et al. Identification and characterization of an octameric PEG-protein conjugate system for intravitreal long-acting delivery to the back of the eye. **PLoS ONE**, 2018.

SHELBURNE, C. P. et al. Stat5 expression is critical for mast cell development and survival. **Blood**, 2003.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. **Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases****Genes and Development**, 2004.

SHINOURA, N. et al. Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. **Cancer Research**, 1999.

SHOKRZADEH, M.; MODANLOO, M. An overview of the most common methods for assessing cell viability. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, 2017.

SIBILANO, R.; FROSSI, B.; PUCILLO, C. E. **Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways****European Journal of Immunology**, 2014.

SIEBENHAAR, F. et al. **Mast Cells as Drivers of Disease and Therapeutic Targets****Trends in Immunology**, 2018.

SILVA, D. A. et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. **Nature**, v. 565, n. 7738, p. 186–191, 2019.

SOLMS, A. et al. Direct comparison of two extended half-life PEGylated recombinant FVIII products: a randomized, crossover pharmacokinetic study in patients with severe hemophilia A. **Annals of Hematology**, 2020.

SONBOL, M. B. et al. Comprehensive review of JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms. **Therapeutic Advances in Hematology**, 2013.

SOROKIN, A. V.; KIM, E. R.; OVCHINNIKOV, L. P. Proteasome system of protein degradation and processing. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 13, p. 1411–1442, 2010.

SOTLAR, K. et al. CD25 Indicates the Neoplastic Phenotype of Mast Cells. **The American Journal of Surgical Pathology**, 2004.

SPRUNG, M. M. A summary of the reactions of aldehydes with amines. **Chemical Reviews**, 1940.

STAUBER, D. J. et al. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2788–2793, 2006.

STEINHART, Z.; ANGERS, S. **Wnt signaling in development and tissue homeostasis** *Development (Cambridge, England)*, 2018.

STOTT, K. et al. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: Implications for neurodegenerative diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1995.

SZABA, F. M. et al. TNF α and IFN γ but Not Perforin Are Critical for CD8 T Cell-Mediated Protection against Pulmonary *Yersinia pestis* Infection. **PLoS Pathogens**, 2014.

TATARKIEWICZ, J. et al. **New antihistamines – Perspectives in the treatment of some allergic and inflammatory disorders** *Archives of Medical Science*, 2019.

TAWARA, K. et al. HIGH expression of OSM and IL-6 are associated with decreased breast cancer survival: Synergistic induction of IL-6 secretion by OSM and IL-1 β . **Oncotarget**, 2019.

TEODOSIO, C. et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010.

THAL, D. M. et al. **Structural insights into G-protein-coupled receptor allostery** *Nature*, 2018.

TIAN, E.; HOFFMAN, M. P.; TEN HAGEN, K. G. O-glycosylation modulates integrin and FGF signalling by influencing the secretion of basement membrane components. **Nature Communications**, 2012.

TKACZYK, C. et al. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. **Molecular Immunology**, 2002.

TROBAUGH, D. W. et al. Altered effector functions of virus-specific and virus cross-reactive CD8⁺ T cells in mice immunized with related flaviviruses. **European Journal of Immunology**, 2010.

TSAI, M. et al. **Using mast cell knock-in mice to analyze the roles of mast cells in allergic responses in vivo** **Chemical Immunology and Allergy**, 2005.

TSAI, M.; GRIMBALDESTON, M.; GALLI, S. J. Mast cells and immunoregulation/immunomodulation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2011.

VALENT, P. **Mast cell activation syndromes: Definition and classification** **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2013.

VALENT, P. et al. **Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts** **Theranostics**, 2020.

VARRICCHI, G. et al. **Physiological Roles of Mast Cells: Collegium Internationale Allergologicum Update 2019** **International Archives of Allergy and Immunology**, 2019.

VERDINE, G. L.; HILINSKI, G. J. Stapled peptides for intracellular drug targets. **Methods in Enzymology**, v. 503, p. 3–33, 2012.

VIRÁG, D. et al. **Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications** **Chromatographia**, 2020.

WAGNER, A.; SOUZA, S. DE; CRUVINEL, W. D. M. Immune System – Part II Basis of the immunological response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

WALKER, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. **New insights into the role of mast cells in autoimmunity: Evidence for a common mechanism of action?** **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2012.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. **Post-translational modifications in the context of**

therapeutic proteins *Nature Biotechnology*, 2006.

WALSH, G. M. **Anti-inflammatory properties of antihistamines: An update** *Clinical and Experimental Allergy Reviews*, 2005.

WONG, C. P. et al. Identical β Cell-Specific CD8 + T Cell Clonotypes Typically Reside in Both Peripheral Blood Lymphocyte and Pancreatic Islets . **The Journal of Immunology**, 2007.

WOODFOLK, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E. **The immune response to intrinsic and extrinsic allergens: determinants of allergic disease.** *International archives of allergy and immunology*, 2002.

WUEST, S. C. et al. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. **Nature Medicine**, 2011.

XIAO, F. et al. Oncostatin M inhibits myoblast differentiation and regulates muscle regeneration. **Cell Research**, 2011.

XU, J. et al. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. RC118, 2001.

YACOUB, A.; PROCHASKA, L. Ruxolitinib improves symptoms and quality of life in a patient with systemic mastocytosis. **Biomarker Research**, 2016.

YAMASAKI, S.; SAITO, T. **Progress in allergy signal research on mast cells: Signal regulation of multiple mast cell responses through Fc ϵ RI** *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008.

YANG, H. W. et al. An investigation of the distribution and location of mast cells affected by the stiffness of substrates as a mechanical niche. **International Journal of Biological Sciences**, 2018.

YANG, J. et al. Granzyme B is an essential mediator in CD8 T cell killing of theileria parva-infected cells. **Infection and Immunity**, 2019.

YIP, K. W.; REED, J. C. **Bcl-2 family proteins and cancer** *Oncogene*, 2008.

YOSHIMURA, A. et al. Mouse oncostatin M: An immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. **EMBO Journal**, 1996.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. **SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation** *Nature Reviews Immunology*, 2007.

YOSHIMURA, S. H.; HIRANO, T. **HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments?** *Journal of Cell Science*, 2016.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. **The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008.

YOUNGBLOOD, B. et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. **Nature**, 2017.

YU, Y. et al. Non-IgE mediated mast cell activation. **European Journal of Pharmacology**, 2016.

ZHANG, D.; ZHAO, Q.; WU, B. Structural studies of G protein-coupled receptors. **Molecules and Cells**, 2015.

ZHAO, H. et al. Novel prodrugs of SN38 using multiarm poly(ethylene glycol) linkers. **Bioconjugate Chemistry**, 2008.

ZHERNAKOVA, A.; WITHOFF, S.; WIJMENGA, C. **Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases** *Nature Reviews Endocrinology*, 2013.

ZHOU, J. S. et al. Mast cell deficiency in Kit^{W-sh} mice does not impair antibody-mediated arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, 2007.

ZHU, L. et al. N-Terminus and Lysine Side Chain pKa Values of Melittin in Aqueous Solutions and Micellar Dispersions Measured by ¹⁵N NMR. **Biochemistry**, 1995.

ZOLOTAREVSKY, Y. et al. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. **Gastroenterology**, v. 123, n. 1, p. 163–172, 2002.

CAPÍTULO 4

Atividade biológica do IL-2PEGpep5 murino e humano em
células T CD8

4. INTRODUÇÃO

4.1.1 Linfócitos T

Os linfócitos são glóbulos brancos que têm importantes funções imunológicas. As principais populações de linfócitos são células B, células T e células natural *Killer* (NK) (COSTA et al., 2019). Eles estão tipicamente associados, embora sem exclusividade, a respostas imunes adaptativas, sendo, em 2010, descritos pela primeira vez linfócitos que atuam no inato do sistema imune (WAGNER; SOUZA; CRUVINEL, 2010). O grupo de células T é um dos grupos mais importantes dos glóbulos brancos presentes no sistema imunológico. Estas células nascem a partir de células hematopoiéticas presentes na medula óssea. Após formação, migram para o timo, onde continuam os processos de maturação (ACTOR, 2019; LUBBERS et al., 2017). As células T desempenham um papel essencial nas respostas imunes adaptativas contra infecções e no desenvolvimento e controle de neoplasias. Estas células são estimuladas por pequenas moléculas denominadas citocinas, que promovem a ativação de outras células do sistema imunológico, assim como sua própria proliferação e diferenciação celular. Dentro dos grupos de células do sistema imunológico, existem várias subpopulações celulares que incluem: células T nativas, que possuem a habilidade de responder a antígenos não específicos; células T de memória, que provêm da ativação anterior do antígeno e mantêm a imunidade por longos períodos de tempo; e células T reguladoras (Treg), que conservam as respostas imunológicas sob controle em valores toleráveis (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS, 2002; KAMINSKI et al., 2013).

Desta forma, as respostas imunes dão início quando as células T nativas encontram e interagem com os antígenos ou ligantes, como estimuladores apresentados por um subgrupo celular denominado como células dendríticas (DCs), resultando na proliferação, diferenciação e produção de citocinas, como a interleucina 2 (IL 2) em células efectoras, que, por sua vez, distribuem-se para atuar na eliminação de organismos ou moléculas invasoras, por meio da produção de citocinas efectoras e mediadores citotóxicos, estimulando a geração de respostas (TROBAUGH et al., 2010). Por outro lado, após ativação das células efectoras, elas possuem curtos períodos de sobrevivência, apesar de uma proporção sobreviver, como células T de memória, que continuam como subconjuntos

heterogêneos com base na migração, localização do tecido e capacidade de autorrenovação (MARTIN; BADOVINAC, 2018). Todas estas células são dependentes a partir do sistema imunológico e seguem o mesmo programa de ativação ou proliferação, mas só podem sobreviver dentro das limitações impostas pelo organismo. Estudos realizados em camundongos adultos mostraram que o número total de linfócitos permanece constante e mostra uma tendência de retorno. Ou seja, um processo dependente da densidade celular que se aproxima sempre a uma distribuição estacionária de densidades populacionais. Este processo é denominado homeostase (IZRAELSON et al., 2018; RODRÍGUEZ-PEREA et al., 2016).

4.1.2 Células T efetoras e de diferenciação

No interior do sistema imune existem células especializadas, conhecidas como células T e B de memória, e células B efetoras de sobrevivência persistente, que secretam constitutivamente anticorpos de alta afinidade, consideradas como a estrutura do sistema de memória imunológica (SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004). As células T de memória compreendem as subpopulações de células T CD4 e CD8. Estas células podem, eventualmente, adquirir funções efetoras, de forma rápida, para suprimir células infectadas ou anormais, e/ou secretar citocinas e quimiocinas inflamatórias que possam inibir a invasão de organismos exógenos (LAIDLAW; CRAFT; KAECH, 2016; YOUNGBLOOD et al., 2017). De outra parte, as células T CD4 efetoras podem também auxiliar nas respostas das células B, aumentando a diferenciação de células T CD8, através da ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) ou secreção de citocinas específicas, como as interleucinas IL-2, IL-4 e IL -5 (SEDDIKI et al., 2006). Em alguns eventos, o sistema imune protetor pode ser mediado por um dos dois mecanismos de resposta do sistema imunológico, seja pela produção de anticorpos ou pela ativação de células T CD8 citotóxicas, dependendo do melhor tipo de resposta que precisa ser gerada (JOSHI et al., 2007).

4.1.2 Células T CD8⁺ citotóxicas

As células T CD8⁺ são conhecidas como células citotóxicas efetoras, em função de sua capacidade de induzir a morte celular através da liberação de grânulos citolíticos, ou indução de apoptose mediada pela ativação de receptores. Faz (EFFROS et al., 2005; IZAWA et al., 2012), que, por sua vez, sinaliza por meio do reconhecimento do antígeno em moléculas HLA de classe I, expressas em células apresentadoras de antígeno (APCs) (FRIESE et al., 2008). Estas células efetoras exercem sua função basicamente por dois mecanismos principais (DEY et al., 2019; ELLMEIER; HAUST; TSCHISMAROV, 2013). O primeiro por ataques citolíticos a células alvo, iniciados pelas células CD8⁺, após interação entre os receptores TCR das células CD8⁺ e o peptídeo na molécula MHC Classe I da célula alvo. Assim, estas células (CD8⁺) são estimuladas a incidir as células alvo, por meio da liberação de perforina, uma molécula que produz canais na membrana plasmática da célula alvo, induzindo à lise celular (DUFAIT et al., 2019; JOHNSON et al., 2014). Além disso, as células CD8⁺ podem secretar outros tipos de proteases, como as granzimas, que transpassam por canais da célula alvo, promovendo a apoptose celular (YANG et al., 2019). O segundo mecanismo é a secreção de moléculas sinalizadoras, como o interferon gama (IFN γ), fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucina-2 (IL-2), além de outras citocinas e quimiocinas, que promovem o recrutamento de outras células do sistema imune para lugares de possível infecção. Essas citocinas e quimiocinas induzem um efeito quimiotático, que incentiva a participação de células, principalmente mononucleadas para o local da infecção, levando à supressão do agente infeccioso e à excisão das células mortas (CLÉNET et al., 2017; FERRANDO-MARTÍNEZ et al., 2014; SZABA et al., 2014).

4.1.3 A ativação das células T CD8 e as doenças autoimunes

As doenças decorrentes da autoimunogenecidade são afeções caracterizadas como complexas atividades, que levam à perda de tolerância imunológica a autoantígenos e respostas imunológicas anormais e sem controle contra células e tecidos saudáveis (ZHERNAKOVA; WITHOFF; WIJMENGA, 2013), promovendo rapidamente um

aumento e produção de células imunes autorreativas ou o desenvolvimento de autoanticorpos, sendo ainda estes processos pouco compreendidos (AHMADI et al., 2017).

Em trabalhos repostados, documentam que as células T CD8 apresentam um papel crítico no desenvolvimento das doenças autoimunes, como reportado para a diabetes. Estes estudos mostram que, no início precoce da hiperglicemia, as células T CD8 são as células infiltradas no pâncreas, mais abundantes durante da inflamação (insulite), afetando principalmente as células β (MORGAN et al., 2014). Assim, clones autorreativos de células CD8 foram encontrados no sangue periférico, apresentando a própria especificidade de antígeno que as células T CD8, que se infiltram no pâncreas e originam a doença (WONG et al., 2007). Assim como na diabetes, o papel das células CD8 tem sido evidenciada em outras doenças autoimunes, como a esclerose múltipla, que sugere que as células T CD8 mostram perfis de metilação em diferentes lugares do DNA (LI; XIAO; CHEN, 2017). Considerando que o processo de metilação do DNA cumpre uma função crítica na esclerose múltipla, principalmente pela regulação de genes alvo, foi evidente que 95% dos pacientes diagnosticados com esclerose múltipla apresentaram regiões diferencialmente metiladas nas células T CD8, mostrando níveis de hipermetilação quando comparados aos grupos controles (APC2, HOXA2, HRNBP3, HEXDC e NTRK3). Dado que a função de metilação do DNA, em regiões promotoras dos genes, é a inibição à expressão de certos genes, é provável que esses genes hipermetilados possam silenciar as funções das células T CD8, promovendo-as a participar na patogênese (BOS et al., 2015). No entanto, o papel da hipermetilação do DNA em genes de células do sistema imunológico de pacientes com esclerose múltipla ainda é pouco entendido.

Em outros estudos, utilizando roedores como modelo de investigação, é revelado que a deficiência de células T CD8 favorece resistência ao desenvolvimento de Lúpus eritematoso sistêmico (SLE) nestes animais, sugerindo um atributo protagônico para este subgrupo de células T no progresso da doença.

Em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico, a progressão da doença se correlaciona com um aumento do número de células T CD8 circulantes, que expressam proteases como a perforina e granzima, promovidas pela ação das células dendríticas (DCs), ativadas a partir do interferon alfa (IFN- α). Após diferenciação das células T CD8 ativadas, podem

suprimir células alvo deficientes do receptor de superfície Fas e, eventualmente, células saudáveis (BLANCO et al., 2005). Em estudos relacionados, em camundongos portadores de uma mutação na proteína tirosina quinase MER, que causa a fagocitose e depuração de células apoptóticas, desenvolveram espontaneamente autoanticorpos anti-DNA, sendo este um fator determinante no diagnóstico da doença Lúpus eritematoso sistêmico (FELTON et al., 2018). Em contraste, camundongos com a tendência a desenvolver SLE e deficientes para o receptor IFN tipo I, reduziram o número de células T CD8 e doenças similares ao lúpus menos severo, mostrando que este tipo de receptor atua como mediador na proliferação das células T CD8 nesta doença (SANTIAGO-RABER et al., 2003).

Desta forma, como descrito nos trabalhos anteriormente citados, as células efetoras CD8 podem desenvolver as doenças autoimunes em distintos níveis, por meio da secreção desregulada de citocinas inflamatórias, perfis de diferenciação alterados, modificações genéticas e indução de apoptose inadequada das células normais, destacando o seu papel crítico na estabilidade e a homeostase dos órgãos e tecidos do organismo. Neste cenário, a identificação dos mecanismos pelos quais estas doenças aparecem e o desenvolvimento de imunoterapêuticos derivados das moléculas sinalizadoras, podem ser uma alternativa potencial em futuros tratamentos destes tipos de afeções.

4.1.4. Análise estatística

Os dados experimentais foram apresentados como a média e desvio padrão (barra de erro), em forma de histogramas tanto para os ensaios de isolamento de linfócitos totais (PBMCs), quanto para os ensaios de viabilidade na linhagem de células HEK-Blue. Os valores calculados para a população de células T CD8 foram representados como a média da porcentagem medida por citometria. Também para os ensaios células HEK-Blue, foi aplicado o método de Kruskal-Wallis de comparação entre grupos, comparando a viabilidade, tratamentos e linhagem celular e analisado estatisticamente a comparação de pares dos valores registrados para cada um dos tratamentos, utilizando o programa SPSS.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da construção química da interleucina-2 murina e humana IL-2PEGpep5.

4.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os linfócitos totais PBMCs, através do isolamento de baço e do sangue periférico de camundongos;
- Avaliar a atividade da biomolécula IL-2PEGpep5 murina, por meio quantificação de células CD8 de camundongo, após tratamento;
- Determinar os níveis de expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) em linhagem células T HEK-Blue;
- Avaliar a atividade da biomolécula IL-2PEGpep5 humana, por meio quantificação de viabilidade celular, após tratamento.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Determinação de linfócitos totais de camundongo

4.3.1.1 Teste ex vivo

Foram coletados sangue e baço de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem específica BALB/c e excedentes, obtidos do biotério de produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Os animais foram eutanasiados, sob as seguintes condições: administração via inalatória de isoflurano anestésico da empresa *BioChimico Industry*[®], em câmara de gás com exposição do animal e, verificando a perda da consciência do animal. Logo após este processo, o sangue foi, então, coletado por punção cardíaca e colocado em tubos eppendorf de 2 mL, contendo 0,1 mM de EDTA como anticoagulante. O baço foi retirado por incisão e colocado em uma solução de PBS 1%, para conservação e posterior tratamento para isolamento de linfócitos.

Desta forma, utilizamos 5 animais por experimento, em um total de 2 experimentos, sendo este número representativo para determinação de número de linfócitos totais PBMCs. Cada experimento foi realizado no intervalo de 15 dias ou mais, utilizando um único grupo para obtenção dos linfócitos do sangue e células de baço, de modo a caracterizar e manipular células CD8 derivadas desta linhagem de camundongo.

4.3.1.2 Isolamento de linfócitos *In vitro*

Para o isolamento de linfócitos, utilizamos as amostras de sangue periférico e de baço coletadas previamente, após eutanásia dos camundongos. Para obtenção das células de baço, foi macerado e peneirado em um separador celular de nylon, com tamanho de poros de 40µm. Logo em seguida, as amostras de sangue periférico e células de baço foram tratadas com solução de Ficoll (PM 400), com densidade de 1,078 g / mL e pH: 5,5-7,5, seguindo o protocolo de *Ficoll-Paque Plus*. O princípio deste método está baseado na separação pela diferença de densidade celular entre granulócitos, eritrócitos e células mononucleares (linfócitos e monócitos) (Figura 34).

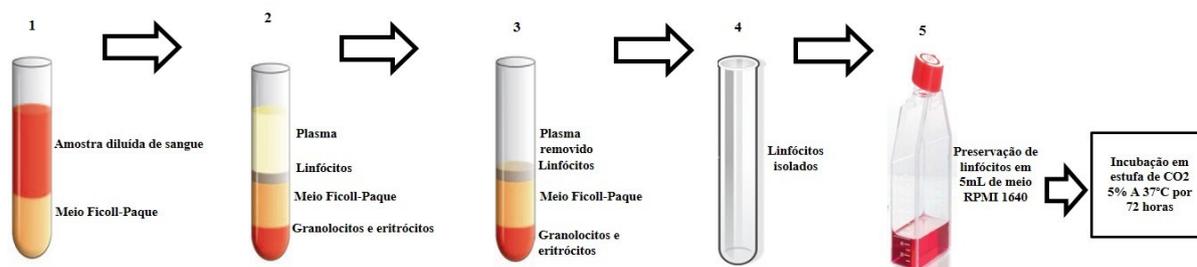


Figura 33. Isolamento de linfócitos totais utilizando o método Ficoll-Paque PLUS. (1) tubo de ensaio contendo 3 mL e 4 mL. (2). Após primeira centrifugação, observa-se separação em fases da amostra. (3) Remoção da fase superior para coleta dos linfócitos totais. (4) Isolamento e lavagem de linfócitos totais. (5) Preservação de linfócitos totais em meio RPMI1640.

4.3.2 Determinação da viabilidade celular pelo método de citometria para células T CD8 citotóxicas

4.3.2.1 Quantificação total de células T

Inicialmente, determinaremos o número de linfócitos totais presentes em sangue periférico e em células do baço, através da contagem de células por microscopia ótica em câmara Neubauer. O método de câmara de Neubauer (CNB) consiste numa área de contagem 1mm^2 , e subdividida em 9 quadrantes, cada um deles com uma área de $0,04\text{mm}^2$ ($1/25\text{mm}^2$). Desta forma, foram tomados 4 quadrantes aleatórios das laterais para fazer a contagem celular de linfócitos totais. Este número final será calculado utilizando a seguinte fórmula, linfócitos totais / $\mu\text{L} = (\text{linfócitos contados} \times \text{fator de diluição} \times 10) / 4$, obtendo o número total de linfócitos por amostra.

4.3.2.2 Ensaio de viabilidade

4.3.2.2.1 Determinação de subpopulações de células T CD8 pelo método de citometria de fluxo

Para determinar o efeito da construção química IL-2PEGpep5, utilizando como base a IL-2 murina, utilizamos as subpopulações de células T CD8, a partir de linfócitos PBMCs

isolados da linhagem de camundongo BALB/c, foi utilizado o método de citometria de fluxo. De forma resumida, utilizamos 0,4 mL de amostras de PBMCs separados do baço e do sangue periférico, que foram colocadas em 4 mL de tampão PBS para citometria (PBS 1x e 10% FBS), continuando com a centrifugação, usando os parâmetros de 1000 rpm, a 4°C, durante 5 minutos. Então, o pellet formado foi ressuspensionado em 50 µL de anti-CD8a-FITC, identificado com o código (100705) da empresa *BioLegend*[®]. Em seguida, as amostras, contendo o anticorpo, foram incubadas por 30 minutos, a 16 °C. Logo após este tempo, as amostras foram lavadas com 4 mL de tampão PBS para citometria e centrifugadas a 1000 rpm, a 4°C, por 5 minutos. Finalmente, o pellet formado foi ressuspensionado, em 200 µL de tampão PBS para citometria, para posterior leitura no citômetro.

4.3.3.1 Determinação da expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) na linhagem celular HEK-Blue

A linhagem HEK-Blue é uma célula derivada da linhagem celular HEK 293 humana, após transfeção com gene que expressa o receptor IL-2R e um gene repórter induzível denominado SEAP (fosfatase alcalina embrionária secretada), como resposta ao estímulo da IL-2, ou outro tipo de citocina. Esta célula produz uma cor azul, cuja intensidade é captada no comprimento de onda de 630 nanômetros. Assim, estas células foram cultivadas em frascos de 100 mL de meio e mantidas em preservação, em 30 mL de meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal 10% e antibiótico normocina, em uma concentração de 50 mg/mL. A densidade considerada para cultivo foi de 8 a 10 x 10⁶ células/mL, até seu uso.

Para determinar os níveis de expressão dos receptores para o receptor IL-2R alfa (CD25), foi crescida, de modo a atingir uma densidade celular de 7 x 10⁶ células/mL ao início dos experimentos. Assim, logo após crescimento de 48 horas, 50 µL de cultura celular foi colocada em 5mL de PBS 1%. Logo, as amostras foram quantificadas, utilizando o programa de análise de viabilidade celular (CASY), que utiliza como método um sistema de contagem de células multicanal de campo elétrico. Após medição, as culturas foram diluídas, até atingir uma densidade celular de 1 x 10⁶ células/mL de cultura. Posteriormente, foi crescida até 48 horas, e, em seguida, 0,4 mL das culturas foram

colocadas em 4 mL de FACS buffer, continuando com a centrifugação, usando os parâmetros de 1000 rpm, a 4°C, durante 5 minutos. Então, o pellet formado foi ressuspensionado em 45µL de anti-CD25- PE, identificado com o código (PC61.5) *eBioscience*TM, da companhia *Thermo Fisher Scientific*. Em seguida, as amostras contendo o anticorpo foram incubadas por 30 minutos, a 16 °C. Logo após este tempo, as amostras foram lavadas com 4 mL de FACS buffer e centrifugadas a 1000 rpm, a 4°C, por 5 minutos. Finalmente, o pellet formado foi ressuspensionado em 200 µL de FACS buffer, para posterior leitura no citômetro.

4.3.3.2 Determinação da viabilidade celular da linhagem celular HEK-Blue após tratamento com IL-2PEGpep5

Para determinar a viabilidade celular, a célula foi crescida, de modo a atingir uma densidade celular de $7-8 \times 10^6$ células/mL. Logo após este tempo de crescimento de 48 horas, 50 µL de cultura celular foi colocada em 5mL de PBS 1%, para quantificação e diluição, atingindo uma densidade de 1×10^6 , utilizando o método de *CASY program*. Em seguida, 100 µL da cultura foi colocada e distribuída em placas de cultura aderente, de modo a atingir um total de 15 poços, três por cada tratamento; incubação com IL-2 os grupos controle, 1 ng/µL de IL-2, 10 0ng/µL de IL-2 e 100 ng/µL de IL-2, tratamento com IL-2 e produto peguilado, controle, 10 ng/µL de IL-2, 10 0ng/µL de IL-2, 100 ng/µL de IL-2PEGpep5 (Cons), 200 ng/µL de IL-2PEGpep5 (Cons). Posteriormente, as amostras foram colocadas em incubação, a 37°C, em câmara suplementada, com CO2 5%, durante 24 horas. Logo após este tempo, as amostras foram retiradas e medidas no espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 630 nanômetros (nm).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Quantificação de Linfócitos Totais PBMCs de Camundongo

Após seleção de camundongos no biotério de experimentação e produção da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, para coleta dos tecidos, foram retirados sangue periférico e baço, para posteriormente serem feitas extração e isolamento de linfócitos totais destes dois tipos de tecidos. Portanto, foi estimado o número total de linfócitos, usando o método de contagem em câmara *Neubauer*. Os valores registrados para linfócitos totais para cada experimento, foram de $14,7 \times 10^6$ células por mL de sangue para o sangue periférico, enquanto para o baço, os valores foram de $16,68 \times 10^6$ células por mL de sangue (Figura 35A).

Considerando que os números normais de leucócitos (*WBC*) representam, aproximadamente, 2% do total das células do sangue em murinos (EVERDS; BOLLINGER, 2012), notamos que os valores obtidos na quantificação dos linfócitos totais do sangue periférico e do baço foram apropriados para realizar os testes de viabilidade e de citotoxicidade (Figura 35B).

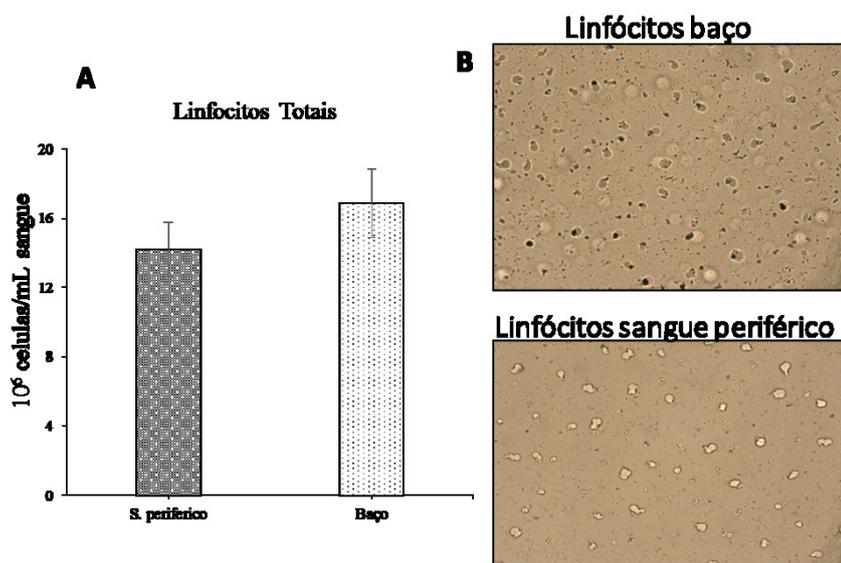


Figura 34. (A) Quantificação do número de linfócitos totais em isolados de sangue periférico e baço de camundongo. (B) Microscopia ótica das amostras isoladas de sangue periférico e baço de camundongo.

4.4.2 Quantificação da subpopulação de células CD8 de camundongo

Após isolamento de células PBMCs de camundongo, foram tomados 200 μ L da cultura, contendo 1×10^6 células de linfócitos totais de baço, e 1×10^6 células de linfócitos totais do sangue periférico, que foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD8 FITC, para detecção de subpopulações de células T CD8. Na figura 36, observamos os valores registrados em porcentagem de número de células presentes nas culturas, por meio da marcação específica, medidos por citometria de fluxo, os valores correspondem a 99% células T CD8 de isolados de baço, e 98,3% para células T CD8 isoladas do sangue periférico. Estes valores representam a média de 1 experimento em triplicata.

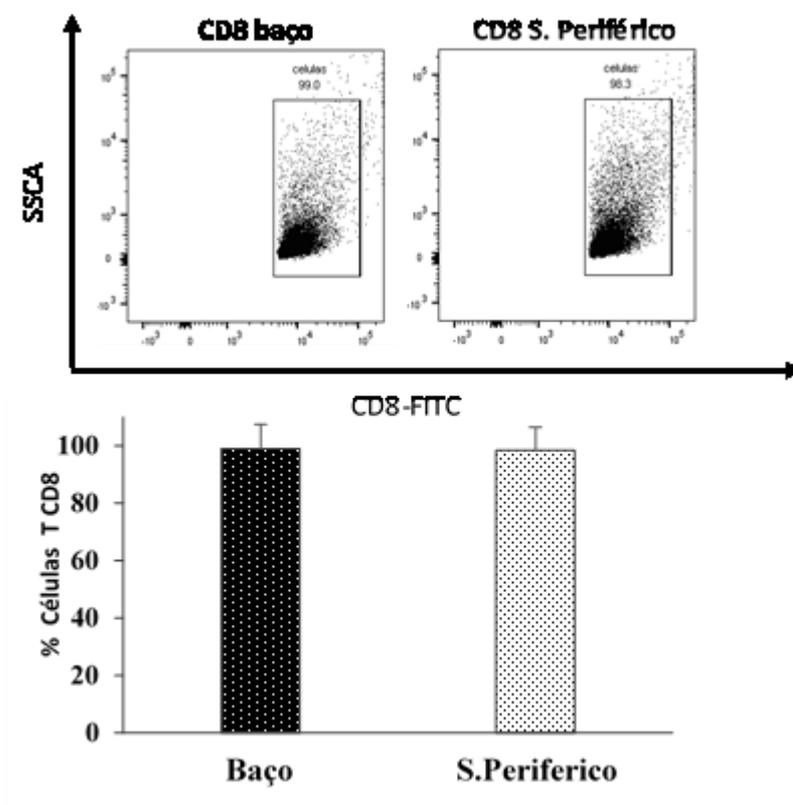


Figura 35. Porcentagem de número de células T CD8 presentes em culturas celulares de PBMCs de baço e do sangue periférico de camundongo.

4.4.3 Efeito da IL-2 peguilada com o pep5 na viabilidade em células CD8 de Camundongo

Posteriormente à quantificação de subpopulações de células T CD8 de baço e do sangue periférico, procedeu-se o tratamento das culturas com o produto peguilado, utilizando a interleucina-2 murina como base dessa construção química (IL-2PEGpep5), denominado aqui Cons, com uma concentração de 100 ng/mL, por um período de 24 horas após isolamento. Na Figura 37, podemos observar um valor de 74% de número de células T CD8, para o grupo de PBMCs isolados de baço tratadas com IL-2PEGpep5, e 85,5% para o grupo não tratado. Por outro lado, para o grupo de PBMCs isolados do sangue periférico, tratadas com IL-2PEGpep5, foi registrado um valor de 71,4 % e 78,1 % para o grupo não tratado. Estes valores representam a média e desvio padrão de 1 experimento em triplicata.

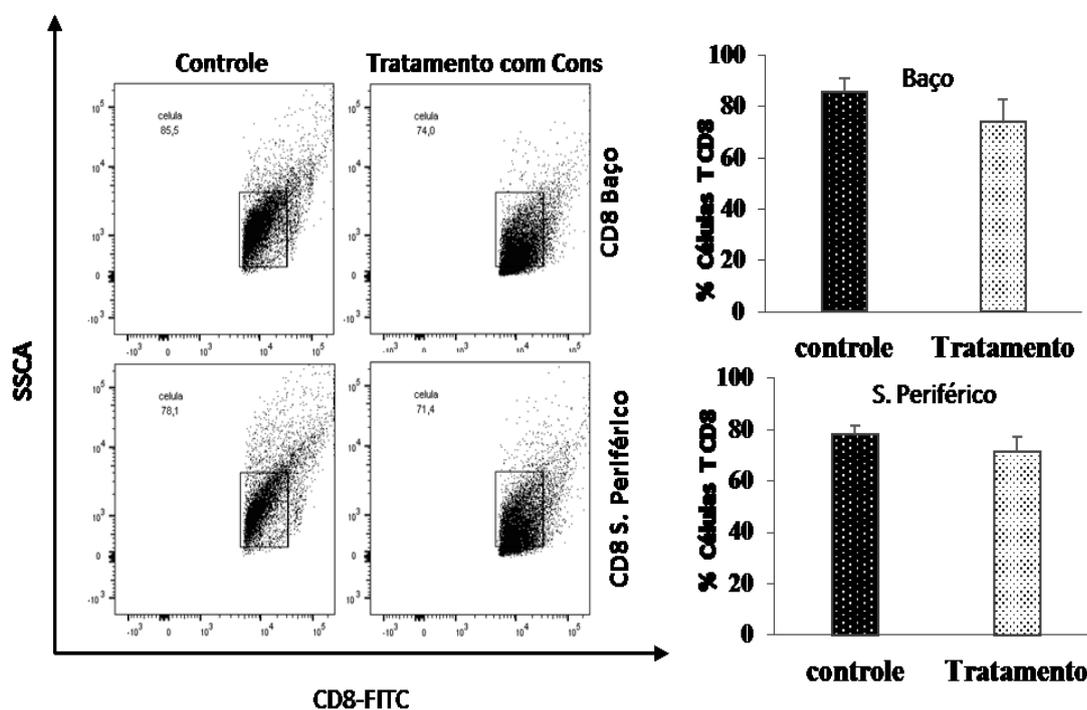


Figura 36. Porcentagem de número de células T CD8 presentes em culturas celulares de PBMCs de baço e do sangue periférico de camundongo, após tratamento de 24 horas com IL-2PEGpep5 e controle.

4.4.4 Expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) na linhagem celular HEK-BLUE

Para constatar a presença e expressão do receptor IL-2R alfa CD25, foram determinados os níveis de expressão deste receptor na linhagem HEK-Blue, por meio da marcação com o anticorpo anti-CD25/PE, medidos por citometria de fluxo, após 48 horas de crescimento celular. Na Figura 38, observamos os níveis de expressão do receptor IL-2R alfa (CD25) da linhagem HEK-Blue. O valor de expressão foi de 98 % e o número total de células foi de 99 %. Isto pode ser constatado quando comparamos a população celular total e o número de células detectadas com a expressão do receptor, conforme registrado na análise do gráfico de citometria.

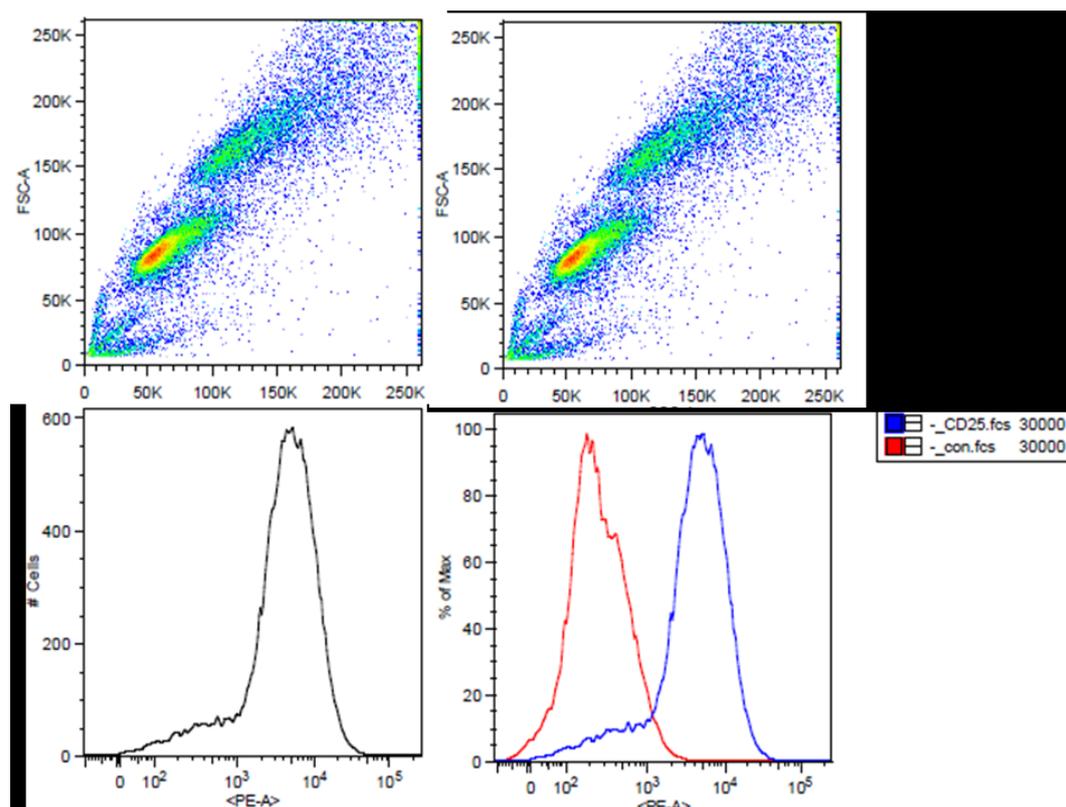


Figura 37. Porcentagem de expressão do receptor IL-2 alfa (CD25) em células HEK-Blue, quantificado por meio da marcação específica com anticorpo monoclonal anti-CD25/PE.

4.4.5 Efeito da IL-2 peguilada com o pep5 na viabilidade celular da linhagem HEK-BLUE

Com a finalidade de estudar o efeito da construção química através da peguilação da interleucina -2 humana, em células HEK- Blue com características de células T e derivadas da linhagem células HEK 293, estas células foram tratadas com o produto IL-2PEGpep5, por um período de 24 horas. O primeiro passo foi observar o nível de estímulo causado pela IL-2 nas células. Na figura 39A, observamos os valores registrados da média e desvio padrão da absorbância de três experimentos, após estímulo com IL-2, sendo um valor de 0,95 nm para o grupo controle; 1,3 nm para a concentração de 1ng/mL; 1,8 nm para a concentração de 10 ng/mL; e 2,38 para a concentração de 100 ng/mL de IL-2. O grupo tratado com a concentração de 100 ng/mL de IL-2 mostrou uma significância ao nível de ($p < 0,05$), pelo método de comparação de pares, sendo os outros grupos não significativos.

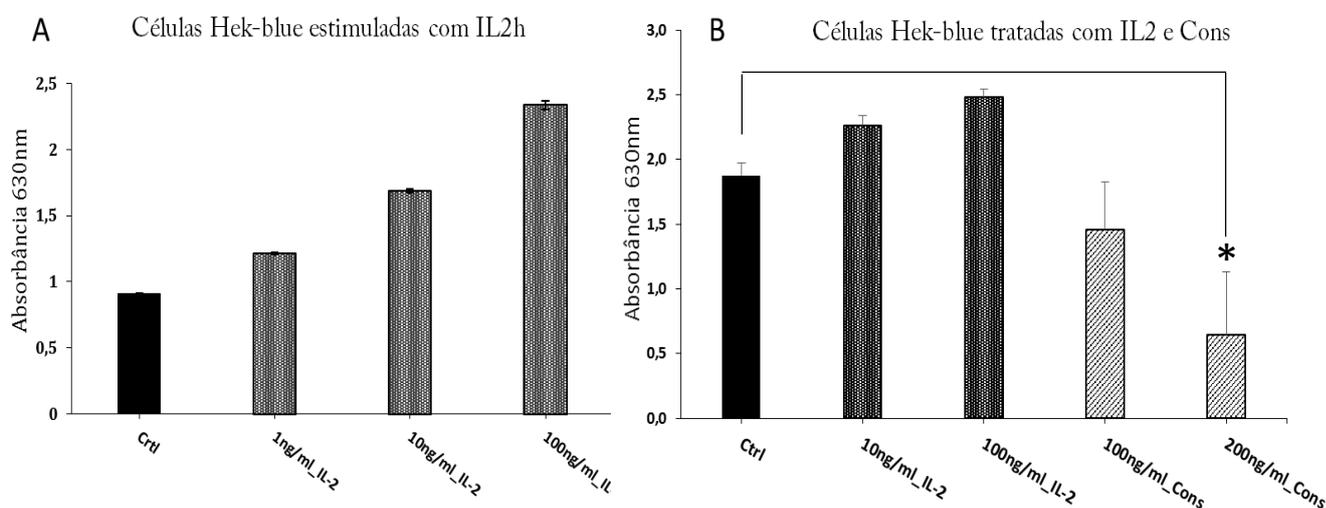


Figura 38. (A) quantificação da viabilidade celular da linhagem HEK-Blue após 24 horas de estímulo em diferentes concentrações de IL-2. (B), quantificação da viabilidade celular após 24 horas de incubação em diferentes concentrações de IL-2 e o produto IL-2PEG. * ($P < 0,005$)

Do mesmo modo, foi comparado em diferentes grupos o efeito causado pela IL-2 em solitário, em duas concentrações diferentes com o produto peguilhado, também utilizando duas concentrações distintas. Na Figura 39B, observamos os valores registrados da média e desvio padrão da absorbância de três experimentos, após estímulo com IL-2 e IL-2PEGpep5. Assim, foram registrados os valores de 1,8 nm para o grupo controle; 2,37 nm para a concentração de 10 ng/mL de IL-2; 2,55 nm para a concentração de 100 ng/mL de IL-2; 1,48 para a concentração de 100 ng/mL do IL-2PEGpep5 (Cons); e 0,71 para a concentração de 200 ng/mL do IL-2PEGpep5 (Cons). O grupo tratado com a concentração de 200 ng/mL de IL-2PEGpep5 mostrou uma significância ao nível de ($p < 0,05$) pelo método de comparação de pares, sendo os outros grupos não significativos.

4.5 DISCUSSÕES

Podemos considerar que o número de linfócitos totais PBMCs, isolados através do processo de separação de Fico-Paque, de um total de 1 mL de sangue da linhagem BALB/c de camundongo, representa 2% do total de leucócitos coletados em nossos experimentos. Isto pode ser confirmado quando comparamos os dados obtidos a partir do isolamento em outros estudos relacionados, onde se mostra que, em amostras entre 200 a 300 μ L de sangue de animais sadios, foram obtidos para cada camundongo, um valor aproximado de 3 a 5 x 10⁶ PBMCs por mililitro (mL) (KUMAR et al., 2017). Por outro lado, notamos que o número de células PBMCs isoladas a partir do baço (16,68 x 10⁶ células/mL) foi um pouco maior do que as células PBMCs isoladas do sangue periférico (14,7 x 10⁶ células/mL), não encontrando diferenças quando comparamos os valores médios.

Em outros estudos, utilizando as linhagens C57BL/6NCr, 129/SvHsd e BALB/cAnNCr de camundongo, foram quantificadas as porcentagens de células vivas da subpopulação de célula T CD8, onde se observou que fêmeas da linhagem C57BL/6NCr exibiram um elevado número de células, quando comparados com a linhagem BALB/cAnNCr (HENSEL et al., 2019). A diferença deste estudo, utilizando a linhagem BALB/c, é que, provavelmente, o número de células CD8 seja menor, embora nós não tenhamos conseguido isolar a subpopulação de células T CD8, dado que tivemos dificuldade na aquisição do material para realizar este processo. Podemos considerar como importante a utilização de outras linhagens, como a C57BL/6NCr, na qual pode-se isolar um maior número de células T CD8, aumentando o tamanho amostral, utilizando menor número de animais.

Os dados mostrados através da quantificação e porcentagem de número de células T CD8 marcadas, mostram manter uma viabilidade, após 24 horas de incubação. Isto pode ser constatado quando comparamos o valor inicial medido no citômetro, tanto para células isoladas do baço (99 %), como para as células isoladas do sangue periférico (98%). Cabe ressaltar que estes valores são uma estimativa preliminar, dado que foi realizado somente

um experimento, sem a quantificação exata do total de células T CD8 isoladas, para saber o número inicial de células utilizadas para cada tratamento.

Com relação aos dados obtidos em subpopulações de células T CD8, posterior ao tratamento com o produto IL-2PEGpep5 murino, consideramos que não houve uma diferença na detecção de células T CD8, quando comparamos os valores registrados para o grupo tratado com o peguilhado, em uma concentração de 100 ng/mL do baço (74%) e o grupo controle (85,5%). Da mesma forma, não houve uma diferença do número de células T CD8 detectadas por marcação, quando comparamos os valores registrados para o grupo tratado com o peguilhado, em uma concentração de 100 ng/mL do sangue periférico (71,4%) e o grupo controle (85,5%). Por outro lado, consideramos relevante citar que o produto conjugado IL-2PEGpep5 murino não foi verificado após reação de peguilação, devido à escassez disponível para realizar a verificação estrutural. Ainda é necessário realizar estudo para haver uma correta peguilação e ampliação dos experimentos, a fim de que os dados tenham uma validade científica.

A expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) foi evidente, já que a porcentagem de expressão representou 98%, valor semelhante à porcentagem do total de células avaliadas (99%), comprovando uma expressão em todas as células. A linhagem HEK-Blue é derivada de células HEK 293. Estudos experimentais, utilizando os métodos de qRT-PCR e de citometria de fluxo na HEK293, para avaliar quantitativamente os RNAs de CD25 e o nível de expressão de proteína, mostraram um aumento de 4,8 vezes o valor de mRNA, e um aumento de 76,2% nos níveis de proteína de CD25, ao comparar em outras linhagens celulares transfectadas com o gene de expressão e linhagens controle (DEHBASHI et al., 2019). Comparando com este estudo, confirmamos que a linhagem HEK-Blue seria um modelo adequado para ensaios experimentais decorrentes da avaliação do receptor IL-2R alfa (CD25).

Os dados reportados através dos ensaios de citotoxicidade na linhagem HEK-Blue, revelam, primeiramente, uma indução à sobre expressão celular, quando as amostras foram tratadas na concentração de 100 ng/mL de IL-2, sendo esse valor significativo no nível de

significância de ($p < 0,05$), analisado através do método estatístico de comparação de pares, confirmando o estímulo causado, após incubação com a molécula sinalizadora interleucina-2 (IL-2), sugerindo que outros receptores para IL-2 podem ser induzidos à expressão, dado que o receptor não é uma proteína de transcrição de sinal. Segundo, vemos que o produto IL-2PEG₅ causa um efeito de deletério nas células da linhagem HEK-Blue, em uma concentração de 200ng/L do produto, sendo este valor significativo no nível de significância de ($p < 0,05$), analisado através do método estatístico de comparação de pares, sugerindo que esta concentração leva a uma diminuição da viabilidade celular, posterior ao tratamento de 24 horas.

4.6 CONCLUSÕES

- Notamos que o número de células PBMCs, isoladas a partir do baço, foi de $16,68 \times 10^6$ células/mL. Entretanto, o número de células PBMCs isoladas do sangue periférico foi de $14,7 \times 10^6$ células/mL, não encontrando diferenças quando comparamos os valores médios destes dois tecidos.
- A quantificação, em termos de porcentagem de número de células T CD8, medidas pelo método de citometria de fluxo, após 24 horas de crescimento, parece manter uma sobrevivência celular, só diminuindo em 10% do valor inicial quantificado, tanto para as células isoladas do baço quanto para as células isoladas do sangue periférico.
- Os valores reportados para o grupo de células T CD8 do baço tratado com o peguilhado, em uma concentração de 100 ng/mL, foi de 74 %, e o grupo controle, 85,5%. Da mesma forma, o número de células T CD8 detectadas por marcação, quando comparamos os valores registrados para o grupo tratado com o peguilhado, em uma concentração de 100 ng/mL do sangue periférico, foi de 71,4 %, e o grupo controle, 78,1%, não havendo diferenças entre as médias dos grupos tratados e os grupos controle.
- Consideramos relevante citar que o produto conjugado IL-2PEG₅ murino não foi verificado após reação de peguilação, devido à escassez disponível de material para realizar a verificação estrutural. Por essa razão, será necessário realizar estudos para haver uma correta peguilação e ampliação dos experimentos, para obtenção de uma validade científica.
- Foi evidente a expressão de receptores IL-2R alfa (CD25) na linhagem de células T HEK-Blue, já que a porcentagem de expressão representou um valor de 98%, de um total de 99% de células detectadas através da citometria de fluxo.

- Houve uma indução à sobre expressão celular quando as amostras foram tratadas na concentração de 100 ng/mL de interleucina-2, sendo esse valor significativo no nível de significância de ($p < 0,05$).
- O produto IL-2PEGpep5 causou um efeito deletério nas células da linhagem HEK-Blue, em uma concentração de 200 ng/L do produto, quando comparado com o grupo controle, sendo este valor significativo ao nível de significância de ($p < 0,05$).

4.7 PERSPECTIVAS

O desenvolvimento deste projeto foi somente um primeiro passo para gerar uma prova de conceito, baseado na utilização da interleucina-2 como veículo, que possa direcionar ação do peptídeo apoptótico pep5 a células que são causadoras de doenças autoimunes e inflamatórias. As demonstrações e respostas preliminares por alguns grupos de células, abrem a porta para pesquisas futuras, nas quais possam haver melhorias em vários aspectos que não puderam ser considerados neste estudo, como: modificações estruturais, utilização de outros peptídeos com alta letalidade e a continuidade nos testes, tanto *in vitro* como *in vivo*, para tornar este produto uma molécula potencial não controle e tratamentos das doenças crônicas derivadas de alterações no processo de resposta imunológica, ou de índole autossomal recessiva em alguns pacientes. Futuramente, também podem ser considerados outros compostos que possam participar na construção de moléculas quiméricas, com alta especificidade para células causadoras de doenças autoimunes e inflamatórias, sendo possível aproveitar evidências mostradas neste trabalho.

Há o cenário em que cada vez mais pessoas são diagnosticadas com algum tipo de doença autoimune, como diabetes tipo I, artrite reumatoide, lúpus sistêmicos e doenças raras, como a mastocitose, causando um grave efeito na saúde das pessoas que as padecem. Nos últimos 50 anos, triplicou o número de casos reportados no mundo, com uma alta incidência no Brasil, afetando, aproximadamente, 5% da população. Apesar de, hoje em dia, existirem alguns tratamentos clínicos para combater estes tipos de doenças, eles ainda mostram numerosas reações severas em quase 40% dos pacientes já tratados. Quando os tratamentos são usados em combinação, mais da metade dos pacientes pode apresentar reações adversas. O propósito será seguir na busca para contribuição com imunoterapêuticos, a fim de tentar melhorar a qualidade de vida dos pacientes com estes tipos de afeções.

4.8 REFERÊNCIAS

ACTOR, J. K. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. In: **Introductory Immunology**. [s.l: s.n.].

AHMADI, M. et al. **Epigenetic modifications and epigenetic based medication implementations of autoimmune diseases Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.

AKIN, C. **Mast cell activation syndromes Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2017.

AKIN, C.; VALENT, P.; METCALFE, D. D. Mast cell activation syndrome: Proposed diagnostic criteria. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A; LEWIS, J. Lymphocytes and the cellular Basis of Adaptive Immunity. **Molecular Biology of the Cell**, 2002.

AMAN, M. J. et al. CIS associates with the interleukin-2 receptor β chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. **Journal of Biological Chemistry**, 1999.

BLANCO, P. et al. Increase in activated CD8⁺ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, 2005.

BOS, S. D. et al. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8⁺ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. **PLoS ONE**, 2015.

CATALDI, M. et al. Histamine receptors and antihistamines: From discovery to clinical applications. **Chemical Immunology and Allergy**, 2014.

CHAN, B. et al. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for Adenosine deaminase (ADA)-deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID). **Clinical Immunology**, 2005.

CHINEN, T. et al. An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function. **Nature immunology**, 2016.

CLÉNET, M. L. et al. Peripheral human CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. **Scientific Reports**, 2017.

COSTA, D. L. M. et al. Telangiectasia macularis eruptiva perstans: A rare form of adult mastocytosis. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, 2011.

COSTA, S. et al. **Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes Immunology**, 2019.

DAVIS, F. et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, 1977.

DAVIS, F. F. et al. Enzyme-Polyethylene Glycol Adducts: Modified Enzymes with Unique Properties. In: **Enzyme Engineering**. [s.l: s.n.].

DEHBASHI, M. et al. Integral membrane protein expression of human CD25 on the cell surface of HEK293 cell line: The available cellular model of CD25 positive to facilitate in

vitro developing assays. **Biomolecular Concepts**, 2019.

DUFAIT, I. et al. Perforin and granzyme b expressed by murine myeloid-derived suppressor cells: A study on their role in outgrowth of cancer cells. **Cancers**, 2019.

EFFROS, R. B. et al. **The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging****Immunological Reviews**, 2005.

EHRlich, P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. **Archiv für Mikroskopische Anatomie**, 1877.

ELLIS, J. M. Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. **Archives of pathology**, 1949.

ELLMIEIER, W.; HAUST, L.; TSCHISMAROV, R. **Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development****Cellular and Molecular Life Sciences**, 2013.

EVERDS, N.; BOLLINGER, A. P. Hematology of the mouse. In: **The laboratory mouse**. [s.l: s.n.]. p. 331–347.

FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, 2014.

FDA. The Drug Development Process - Step 3: Clinical Research.

FELTON, J. M. et al. Mer-mediated eosinophil efferocytosis regulates resolution of allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2018.

FERRANDO-MARTÍNEZ, S. et al. IFN γ -TNF α -IL2-MIP1 α -CD107a+PRF1+ CD8 pp65-Specific T-Cell Response Is Independently Associated with Time to Death in Elderly Humans. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, 2014.

FERREIRA, I. G. et al. **Glycosylation as a main regulator of growth and death factor receptors signaling****International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

FRIESE, M. A. et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8 + T cells in multiple sclerosis. **Nature Medicine**, 2008.

GENG, X. et al. **Interleukin-2 and autoimmune disease occurrence and therapy****European review for medical and pharmacological sciences**, 2012.

GENNERY, A. R.; CANT, A. J. **Diagnosis of severe combined immunodeficiency****Journal of Clinical Pathology**, 2001.

GERMIC, N. et al. **Regulation of the innate immune system by autophagy: neutrophils, eosinophils, mast cells, NK cells****Cell Death and Differentiation**, 2019.

GLAZER, E. S. et al. Phase II Study of Pegylated Arginine Deiminase for Nonresectable and Metastatic Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 2010.

HARRISON, C. et al. **Practical management of patients with myelofibrosis receiving ruxolitinib****Expert Review of Hematology**, 2013.

HATFIELD, P. M.; VIERSTRA, R. D. Protein degradation. In: **Plant metabolism**. [s.l: s.n.]. p. 26–36.

- HENSEL, J. A. et al. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. **Laboratory Investigation**, 2019.
- HENZ, B. M. et al. **Mast cells as initiators of immunity and host defense** **Experimental Dermatology**, 2001.
- HUANG, W. et al. Maleimide–thiol adducts stabilized through stretching. **Nature Chemistry**, 2019.
- HUNTER, R. P. et al. **Overview of the animal health drug development and registration process: An industry perspective** **Future Medicinal Chemistry**, 2011.
- IKEMIZU, S.; CHIRIFU, M.; DAVIS, S. J. **IL-2 and IL-15 signaling complexes: Different but the same** **Nature Immunology**, 2012.
- IZAWA, T. et al. Fas-Independent T-Cell Apoptosis by Dendritic Cells Controls Autoimmune Arthritis in MRL/lpr Mice. **PLoS ONE**, 2012.
- IZRAELSON, M. et al. **T cell immunity does not age in a long-lived rodent species** **bioRxiv**, 2018.
- JÄEGER, E. et al. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: Implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. **International Journal of Cancer**, v. 66, n. 2, p. 162–169, 1996.
- JIAO, J. et al. Comparison of two commonly used methods for stimulating T cells. **Biotechnology Letters**, 2019.
- JOHNSON, H. L. et al. Perforin competent CD8 T cells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. **PLoS ONE**, 2014.
- JOSHI, N. S. et al. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. **Immunity**, 2007.
- KAARTINEN, M. T. et al. Transglutaminase crosslinking of SIBLING proteins in teeth. **Journal of Dental Research**, 2005.
- KAMINSKI, W. E. et al. **On the horizon: Flexible immune recognition outside lymphocytes** **Immunobiology**, 2013.
- KARLAFTIS, V. et al. **Importance of post-translational modifications on the function of key haemostatic proteins** **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, 2016.
- KAUSHANSKY, K. **Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders** **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2006.
- KELLY-WELCH, A. E. et al. **Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections** **mapsScience**, 2003.
- ISSELEV, A. F. et al. The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3363–3371, 1999.
- KOPP, J. et al. Boosting recombinant inclusion body production—from classical fed-batch approach to continuous cultivation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2019.

- KOZAKI, I.; SHIMIZU, K.; HONDA, H. Disulfide linked hetero dimeric peptide arrays for screening functional peptides inside cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020.
- KUMAR, S. et al. Ex vivo antigen-pulsed PBMCs generate potent and long lasting immunity to infection when administered as a vaccine. **Vaccine**, 2017.
- KUYKENDALL, J. R.; KUYKENDALL, N. S. Aldehydes. In: **Comprehensive Toxicology: Third Edition**. [s.l: s.n.].
- LAI, K. N.; LEUNG, J. C. K.; LAI, F. M. M. Soluble interleukin 2 receptor release, interleukin 2 production, and interleukin 2 receptor expression in activated T-lymphocytes in vitro. **Pathology**, 1991.
- LAIDLAW, B. J.; CRAFT, J. E.; KAECH, S. M. **The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory** *Nature Reviews Immunology*, 2016.
- LE, M. et al. **Natural history and treatment of cutaneous and systemic mastocytosis** *Postgraduate Medicine*, 2017.
- LENARDO, M. J. Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. **Nature**, 1991.
- LI, G. Z. et al. Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts. **Polymer Chemistry**, 2010.
- LIMA, K. et al. Reversine exhibits antineoplastic activity in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Scientific Reports**, 2019.
- LIU, R. et al. PHD finger protein 1 (PHF1) is a novel reader for histone H4R3 symmetric dimethylation and coordinates with PRMT5-WDR77/CRL4B complex to promote tumorigenesis. **Nucleic Acids Research**, 2018.
- LU, X.; ZHANG, K. **PEGylation of therapeutic oligonucleotides: From linear to highly branched PEG architectures** *Nano Research*, 2018.
- LUBBERS, R. et al. **Production of complement components by cells of the immune system** *Clinical and Experimental Immunology*, 2017.
- LYAPUN, I. N.; ANDRYUKOV, B. G.; BYNINA, M. P. **HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks** *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2019.
- MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. **Defining memory CD8 T cell** *Frontiers in Immunology*, 2018.
- MORGAN, N. G. et al. **Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus** *IUBMB Life*, 2014.
- MOSMANN, T. R. et al. Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1987.
- MOSS, R. B. et al. **Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: Therapeutic implications** *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2004.
- MÜNZ, C. **Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation** *Trends in Immunology*, 2016.

NAIR, D. P. et al. **The Thiol-Michael addition click reaction: A powerful and widely used tool in materials chemistry** *Chemistry of Materials*, 2014.

NAKASE, K. et al. Diagnostic and clinical importance of interleukin-2 receptor alpha chain expression on non-T-cell acute leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, 1992.

NAKASE, K. et al. High serum levels of soluble interleukin-2 receptor in acute myeloid leukemia: Correlation with poor prognosis and CD4 expression on blast cells. **Cancer Epidemiology**, 2012.

NEGRIN, R. S. **Role of regulatory T cell populations in controlling graft vs host disease** *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 2011.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Research**, 1960.

PALCZEWSKI, K. **G protein-coupled receptor rhodopsin** *Annual Review of Biochemistry*, 2006.

PASSAMONTI, F. et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. **The Lancet Oncology**, 2017.

PASSER, B. et al. Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β protein precursor. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2, n. 3–4, p. 289–301, 2000.

POOLE, L. B. **The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry** *Free Radical Biology and Medicine*, 2015.

POULSEN, L. K. et al. **Beyond IgE-when Do IgE-Crosslinking and effector cell activation lead to clinical anaphylaxis.** *Frontiers in Immunology*, 2017.

PRUS, G. et al. **Analysis and Interpretation of Protein Post-Translational Modification Site Stoichiometry** *Trends in Biochemical Sciences*, 2019.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. **Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents** *Clinical and Experimental Immunology*, 2016.

RYAN, R. E. et al. Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: Implications for inflammation and metastasis. **Cytokine**, 2015.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. **Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance** *Annual Review of Immunology*, 2004.

SANTIAGO-RABER, M. L. et al. Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. **Journal of Experimental Medicine**, 2003.

SAPRA, P. et al. Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model. **Clinical Cancer Research**, 2008.

SARV, T.; HÖRAK, P. Phytohaemagglutinin injection has a long-lasting effect on immune cells. **Journal of Avian Biology**, 2009.

SATHER, B. D. et al. Altering the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **Journal of Experimental Medicine**, 2007.

SCHIMPL, A. et al. **IL-2 and autoimmune disease Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2002.

SHARMA, S. et al. Deletion of Δ dblGata motif leads to increased predisposition and severity of IgE-mediated food-induced anaphylaxis response. **PLoS ONE**, 2019.

SHOKRZADEH, M.; MODANLOO, M. An overview of the most common methods for assessing cell viability. **Journal of Research in Medical and Dental Science**, 2017.

SILVA, D. A. et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. **Nature**, v. 565, n. 7738, p. 186–191, 2019.

SONBOL, M. B. et al. Comprehensive review of JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms. **Therapeutic Advances in Hematology**, 2013.

SPRUNG, M. M. A summary of the reactions of aldehydes with amines. **Chemical Reviews**, 1940.

STAUBER, D. J. et al. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2788–2793, 2006.

STEINHART, Z.; ANGERS, S. **Wnt signaling in development and tissue homeostasis** *Development (Cambridge, England)*, 2018.

STOTT, K. et al. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: Implications for neurodegenerative diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1995.

SZABA, F. M. et al. TNF α and IFN γ but Not Perforin Are Critical for CD8 T Cell-Mediated Protection against Pulmonary Yersinia pestis Infection. **PLoS Pathogens**, 2014.

THAL, D. M. et al. **Structural insights into G-protein-coupled receptor allostery** *Nature*, 2018.

TIAN, E.; HOFFMAN, M. P.; TEN HAGEN, K. G. O-glycosylation modulates integrin and FGF signalling by influencing the secretion of basement membrane components. **Nature Communications**, 2012.

TROBAUGH, D. W. et al. Altered effector functions of virus-specific and virus cross-reactive CD8⁺ T cells in mice immunized with related flaviviruses. **European Journal of Immunology**, 2010.

TSAI, M.; GRIMBALDESTON, M.; GALLI, S. J. Mast cells and immunoregulation/immunomodulation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2011.

WAGNER, A.; SOUZA, S. DE; CRUVINEL, W. D. M. Immune System – Part II Basis of the immunological response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

WALSH, G. M. **Anti-inflammatory properties of antihistamines: An update** *Clinical and Experimental Allergy Reviews*, 2005.

WONG, C. P. et al. Identical β Cell-Specific CD8 + T Cell Clonotypes Typically Reside

in Both Peripheral Blood Lymphocyte and Pancreatic Islets . **The Journal of Immunology**, 2007.

WOODFOLK, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E. **The immune response to intrinsic and extrinsic allergens: determinants of allergic disease. International archives of allergy and immunology**, 2002.

WUEST, S. C. et al. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. **Nature Medicine**, 2011.

XIAO, F. et al. Oncostatin M inhibits myoblast differentiation and regulates muscle regeneration. **Cell Research**, 2011.

XU, J. et al. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. RC118, 2001.

YANG, J. et al. Granzyme B is an essential mediator in CD8 T cell killing of theileria parva-infected cells. **Infection and Immunity**, 2019.

YOSHIMURA, A. et al. Mouse oncostatin M: An immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. **EMBO Journal**, 1996.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. **SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation** *Nature Reviews Immunology*, 2007.

YOSHIMURA, S. H.; HIRANO, T. **HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments** *Journal of Cell Science*, 2016.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. **The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008.

YOUNGBLOOD, B. et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. **Nature**, 2017.

ZHANG, D.; ZHAO, Q.; WU, B. Structural studies of G protein-coupled receptors. **Molecules and Cells**, 2015.

ZHERNAKOVA, A.; WITHOFF, S.; WIJMENGA, C. **Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases** *Nature Reviews Endocrinology*, 2013.

5. ANEXO 1- Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9134 - 8870444/1 - Alexy Orozco Valencia

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5713-2/2	Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica Industrial	08/05/2017	02/06/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5776-5/5	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	07/07/2017	20/07/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/4	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	03/08/2017	11/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5737-4/1	Farmacodinâmica Avançada	06/09/2017	14/11/2017	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
TNA5801-1/8	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	28/05/2018	08/07/2018	120	8	100	A	N	Concluída
FBT5773-6/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	06/08/2018	14/10/2018	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5738-2/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	01/04/2019	15/07/2019	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	24
Estágios:			
Total:	0	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/03/2021

Impresso em: 19/04/2021 09:47:15

Data Máxima para Aprovação da

Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:

Primeira Matrícula em 06/04/2017

6. ANEXO 2- Certificado CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



CEUA/FCF 035.2019-P589

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo da conjugação da IL-2 com o peptídeo apoptótico pep5, no tratamento de doenças autoimunes**, registrada com o nº **589**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Alexy Orozco Valencia**, sob orientação do **Prof. Dr. Marco Antonio Stephano** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **03 de Maio de 2019**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/05/2019 a 30/04/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Número de animais	15
Sexo	Macho
Peso/Idade	4 semanas – 18 a 22g
Origem	Biotério FCF/USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

Ressaltamos que após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.

São Paulo, 03 de Maio de 2019.


Profa. Dra. Neusa Mariko Aymoto Hassimotto
 Coordenadora CEUA/FCF/USP

7. ANEXO -3 Artiguo publicado

International Immunopharmacology 81 (2020) 106296



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Interleukin-2 as immunotherapeutic in the autoimmune diseases

Alexy Orozco Valencia^{a,*}, Marcos Camargo Knirsch^a, Emer Suavinho Ferro^b, Marco Antonio Stephano^a^a Department of Pharmaceutical Biochemical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^b Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Interleukin 2 (IL-2)
IL-2R1 receptor
Autoimmune diseases
Therapeutic agent
Treatments

ABSTRACT

Interleukins, also called cytokines are secretory proteins that bind to specific receptors and play a critical role in the intercellular communication between cells of the immune system. Cytokines are mainly produced by T lymphocytes, macrophages and eosinophils. Among its functions are the activation and suppression of immune system responses, induction of cell division and regulation of memory cells. Interleukin 2 (IL-2) is a secretory monomeric glycoprotein composed of 149 amino acids containing a signal peptide of 20 amino acids. It is classified as a member of the type I cytokines family. IL-2 binds to its receptor (IL-2R receptor) with high affinity and its signaling function promotes the activation of various subtypes of lymphocytes during the process of cell differentiation to generate an immune or homeostatic response. The specificity of IL-2 depends on its binding to low, medium or high-affinity receptors. Interleukin 2 acts as a regulator of the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. There is a relationship between IL-2 and autoimmune diseases due to its influence in the differentiation of T helper cells, which in turn directly influence immunological response processes. Therefore, IL-2 is a key element in the control and treatment of those diseases. In recent years, many therapeutic agents based on biomolecules and recombinant chimeric proteins have been developed to treat different autoimmune diseases. In this review, we focus on the use of interleukin 2 as a versatile therapeutic agent, alone or associated with other molecules to increase the efficiency of autoimmune disease treatment.

1. Introduction

Interleukin 2 (IL-2) Interleukin 2 (IL-2) was the first type of immune system signaling molecule discovered. It was first isolated and described in 1976 and was initially named T cell growth factor (TCGF) [46,48]. It is a member of the type I cytokines family, a group of proteins that have pleiotropic action. IL-2 plays an important role as a growth factor that induces the proliferation of CD8⁺ and CD4⁺ T cells. It also has many other biological roles including the induction of the proliferation of Natural Killer cells (NK), the increment of cytolytic activity, the promotion of antibody production and B cell proliferation. Furthermore, it is essential for the induction of the "activation-induced cell death" (AICD), a role that is vital for homeostasis and for the elimination of putative and dangerous self-reactive cells. IL-2 also contributes to the development of CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells, which acts as a cell suppressor in the cell tolerance system.

The IL-2 is a glycoprotein produced predominantly by CD4⁺ helper T cells and stimulates the division of these cells in an autocrine pathway. Human IL-2 is a protein that contains 153 amino acid residues

with a total molecular weight of 15.5 kDa that includes a hydrophobic signaling sequence of 20 amino acids (Fig. 1). It is encoded by the gene IL2 that is located on locus 4q27 of chromosome 4. Crystallography and three dimensions analyzes of IL-2 evinced a compact tertiary structure composed of four core alpha-helices with an arrangement down-up-up, which is the main characteristic of type I cytokines family [10,38]. Mutagenesis studies, in which amino acid deletions and substitutions were introduced into IL-2, revealed that residues 1–20 (N-terminal region), 121–133 (C-terminal region) and two of the three cysteines (Cys 58 and Cys 105) are essential for the biological activity of human IL-2 [25].

In murine, the gene IL2 is located on chromosome 3 and encodes a biologically active IL-2 that consists of 169 amino acids polypeptide. Likewise, both human IL-2 and murine IL-2 exhibits a signaling sequence in the amino-terminal region of the protein. One of the major differences between human and murine IL-2 is the presence of a single structure formed by 12 successive glutamine residues in the N-terminal region of the matured murine IL-2. The coding sequences of human and murine IL-2 are substantially conserved, exhibiting a 75% nucleotide

* Corresponding author.

E-mail addresses: aloroazco@usp.br (A. Orozco Valencia), marcos.knirsch@alumni.usp.br (M. Camargo Knirsch), stephano@usp.br (M. Antonio Stephano).<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106296>

Received 14 December 2019; Received in revised form 4 February 2020; Accepted 5 February 2020

Available online 12 February 2020

8. ANEXO 4- Solicitação de patente



Comunicação de Criação

ID: CC-PI-2021-0021

Título Provisório: PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA APOPTÓTICA, COM AÇÃO SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO PARA TERAPÉUTICA DE DOENÇAS AUTOIMUNES E INFLAMATÓRIAS.

Modalidade de Proteção: Patente

Houve divulgação do conteúdo da criação? Não houve divulgação do conteúdo total ou parcial dessa criação. []

Existe expectativa de divulgação da criação? Sim, conforme material anexado. [07/05/2021]

A pesquisa foi desenvolvida em cooperação com instituições externas? [Anexo 2 - Quadro Resumo]

Senhor Coordenador,

Encaminho a esta Agência a Comunicação de Criação indicada acima para análise da viabilidade e providências cabíveis para o pedido de proteção.

Declaro ciência e concordância com os termos da Resolução USP N° 7.035, de 17 de dezembro de 2014, em especial com o seu artigo 7° e parágrafos.

Sigo à inteira disposição para eventuais esclarecimentos.

Alexy Osorio Valencia sp, 12/04/2021
 ALEXY VALENCIA (assinatura e data)

Campus USP e Unidade Acadêmica/Órgão*:

Departamento*:

Ciente, encaminhe-se à Coordenação da Agência USP de Inovação.

12/04/2021
 Chefe do Departamento (assinatura e data)

Nome completo*: Profa. Susana Marta Isay Saad

Departamento*: Departamento de Tecnologia Biotecnológico-Farmacêutica

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
 Diretor da Unidade/Órgão (assinatura e data)

Nome completo*: Prof. Humberto Gomes Ferraz
 Diretor da FCF/USP

Campus USP e Unidade Acadêmica/Órgão*: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Campus Butantã

9. Anexo 5- Concessão de Bolsa no Exterior

Dezernat für Internationale Hochschulbeziehungen

910200

Mr. Alexy Orozco Valencia
 Av. Prof. Mello de Moraes, 1235, Bloco C, apto 410
 55080 Sao Paulo
 Brazil

Letter of Confirmation – Advanced Research Opportunities Program

Dear Mr. Valencia,

We are pleased to let you know that you have been selected for a research project at RWTH Aachen University funded by the "Advanced Research Opportunities Program" (AROP). You will receive a monthly rate of 1.800 EUR for 8 months of your time at RWTH Aachen University and a travel grant of 1.000 EUR, amounting to an AROP scholarship of 11.800,00 EUR.

It will be paid to your German bank account named in the declaration of acceptance. If you do not have a German bank account it will be paid to you at the Bursary of RWTH Aachen (RWTH main building, Templergraben 55, opening hours: Mo-Fr. 9:00-12:00).

As a prerequisite for payment of the stipend, please fully complete and sign the enclosed acceptance form and send it back to us by May 17, 2020. The declaration of acceptance is required for the scholarship to be disbursed.

During the scholarship period, you are obliged to inform the University immediately of any changes to the details given in the application (address, bank details) as well as of any change or termination of the training or education program or of your stay abroad. Furthermore, you are obliged to inform RWTH Aachen University of any remuneration or funding received during your stay abroad.

Please Note: You may flexibly choose the time of your research stay at RWTH Aachen University in 2020 (as the situation permits) but it is yet unclear as of now if the scholarship amount can be transferred to 2021. We will keep you posted and are trying to solve this issue as soon as possible. Please let us know the exact time frame of your stay as soon as it can be defined.

If there is anything we can do for you in the meantime, please let us know.

Yours sincerely,

On behalf of the Rector
 The Chancellor
 p.p.a.



Birgit Thun-Vié

RWTHAACHEN
UNIVERSITY

The Rector

Department 2.0
 International Office

Division 2.4
 International Strategy

M.A.
 Birgit Thun-Vié
 PROMOS, UROP, UNITECH

Turnstraße 46
 52062 Aachen
 GERMANY

2. Floor, Room 201

Phone: +49 241 80-90687
 Fax: +49 241 80-92661

Birgit.Thun@
 zhv.rwth-aachen.de
 www.rwth-aachen.de/kurzlink

Reference: tb
 30.04.2020

10. Anexo 6 - Seleção de tecnologia promissória pelo ICB-USP

**EMERGE
SEARCH**

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

ESTE DOCUMENTO CERTIFICA QUE

ALEXY OROZCO

participou do processo do EMERGE Search ICB-USP entre novembro e dezembro de 2019 com a tecnologia "ImmunoLeukin - Imunoterapêutico para doenças autoimunes", tendo apresentado um Pitch dessa tecnologia no dia 12 de dezembro de 2019 no InovaBra

Luisa V. S. Guimarães

LUISA VERAS DE SANDES-GUIMARÃES
EMERGE



LUÍS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - USP

São Paulo, 29 de janeiro de 2020