UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FENNY HUI FEN TANG

Identificação de um novo motivo peptídico específico para a vasculatura cerebral e que diferencia as barreiras hematoenfálica e hematoretiniana

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

28/11/2018

FENNY HUI FEN TANG

Identificação de um novo motivo peptídico específico para a vasculatura cerebral e que diferencia as barreiras hematoenfálica e hematoretiniana

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, 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

Tang, Fenny Hui Fen Identificação de um novo motivo peptídico específico para a vasculatura cerebral e que diferencia as barreiras hematoenfálica e hematoretiniana / Fenny Hui Fen Tang. - São Paulo, 2019. 108 p.
Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Giordano, Ricardo Jose
1. heterogeneidade vascular. 2. barreira hematoencefálica. 3. barreira hemato-retiniana. 4. phage display. 5. peptídeo. I. T. II. Giordano, Ricardo Jose , orientador.

Dedico este trabalho aos meus pais Fung e I-Wen (*in memorian*), com todo meu amor e gratidão por tudo que fizeram por mim ao longo se suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr, Ricardo José Giordano, por ter me recebido em seu laboratório e confiado a mim a responsabilidade de um projeto de doutorado. Agradeço por todo apoio, ensinamentos e paciência, contribuindo de maneira importante para o meu amadurecimento científico e profissional.

Aos professores Dra. Maria Julia M. Alves e Dr. Walter Coli, por terem nos recebido em seu laboratório e compartilhado um pouco de conhecimento e sabedoria.

Ao professor Dr. Ivan Schumacher, pelo seu bom humor e dicas gastronômicas.

À Dra. Renata Pasqualini e Dr. Wadih Arap e seu grupo de pesquisa por terem me recebido tão bem e pela oportunidade de fazer parte de sua equipe durante o meu estágio de pesquisa no exterior, cuja experiência foi bastante enriquecedora.

Aos meus pais, Fung e I-Wen, meus exemplos de vida e inspiração, por terem me escolhido e oferecido todo amor, alegria, apoio e suporte incondicional. Sem vocês nada teria sido possível.

Ao meu companheiro de vida, amado, melhor amigo e confidente Rogério, por todo carinho e amor, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e por sempre acreditar em mim.

Às minhas amigas de laboratório e de vida Leila e Lilian. Leiloca, pelas conversas e desabafos, pelas viagens para o meio do nada, pelo apoio e carinho ao longo de todos os anos de amizade. Lilian, pelas conversas, risadas e fofocas, pela

confiança e suporte, por sempre me emprestar o celular e por sempre me fazer companhia.

Aos meus queridos amigos de laboratório, os quais fizeram os meus dias mais felizes e divertidos. Ao André, pelas conversas e por compartilhar conhecimento e sabedoria. À Jussara, pela paciência e pelos ensinamentos. Ao Carlos, pelas piadas nem sempre tão engraçadas. Ao Alexandre, por me ensinar a viver um dia de cada vez. À Laura e Verônica, pelas conversas. Ao Caio, por me ensinar a como não usar um microondas. Aos mais recentes, Heloíse, Luis, Luíza e Isabella, pelas conversas e pela discussão: era apenas uma caneca, mas era a minha caneca.

À equipe de laboratório, Maria Luiza, Célia e Alessandra. À Maria Luiza, pela amizade, risadas e pelo nosso humor peculiar. À Celinha, pelas conversas e conselhos de mãe. À Alessandra, pelo bom humor e disposição.

À Noemi e Gislene, pelos almoços, conversas e ensinamentos sobre microscopia eletrônica.

Por fim, agradeço à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tang, F.H.F. Identificação de um novo motivo peptídico específico para a vasculatura cerebral e que diferencia as barreiras hematoenfálica e hematoretiniana. 2018. 108p. Tese – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O conceito de heterogeneidade vascular é bem aceito pela comunidade cientifica, desempenhando papel essencial em processos fisiológicos e patológicos. Uma vez que os vasos sanguíneos são importantes na organogênese, diferenciação e morfogênese de tecidos e órgãos, torna-se interessante desvendar a diversidade vascular cerebral, identificando novos marcadores moleculares para este órgão tão importante. Utilizando tecnologia combinatorial de phage display in vivo, identificamos um novo motivo peptídico, na qual os aminoácidos Fenilalanina-Arginina-Triptofano (Phe-Arg-Trp; FRW) predominam. Este motivo peptídico é um ligante seletivo para vasos sanguíneos cerebrais e não se acumula em outros órgãos, incluíndo tecidos como intestinos e gônadas, que também apresentam barreiras endoteliais especificas. No entanto, mais surpreendente foi a observação de que o motivo FRW não se liga aos vasos sanguíneos da retina, o que implica em uma diferença até então desconhecida entre duas barreiras: a barreira hematoencefálica e a barreira hematoretiniana. Combinando phage display in vivo e microscopia eletrônica de transmissão, observamos a presença de partículas de fago ligadas à vasculatura cerebral em um nível supramolecular: aglomerados de fagos filamentosos expressando o motivo FRW foram visualizados ligados às regiões de contato entre as células endoteliais. Por fim, a utilização do peptídeo CFFWKFRWMC permite imageamento in vivo, demonstrando que novas ferramentas para estudar e visualizar o cérebro podem surgir deste motivo.

Palavras-chaves: heterogeneidade vascular, barreira hematoencefálica, barreira hemato-retiniana, *phage display*, peptídeo

ABSTRACT

Tang, F.H.F. Identification of a new specific peptide motif to the brain vasculature that differentiates between the blood –brain barrier and the blood-retinal barrier. 2018. 108p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The concept of vascular heterogeneity is well accepted by the scientific community, playing an essential role in physiological and pathological processes. Since blood vessels are important in organogenesis, differentiation, and morphogenesis of tissues and organs, it becomes interesting to unveil the cerebral vascular diversity, identifying new molecular markers for such important organ. Using in vivo phage display, we show that a new peptide motif that emerged from our combinatorial screening of the vasculature binds selectively to blood vessels in the brain *in vivo* but not to vessels in other organs. Peptides containing a conserved motif in which amino acids Phenylalanine-Arginine-Tryptophan (Phe-Arg-Trp; FRW) predominate could be visualized by transmission electron microscopy bound to the junctions between endothelial in all areas of the brain, including the optic nerve but not in other barrier containing tissues, such as intestines and testis. Remarkably, peptides containing the motif do not bind to vessels in the retina, implying an important molecular difference between these two vascular barriers. Furthermore, the peptide allows for in vivo imaging, demonstrating that new tools for studying and imaging the brain are likely to emerge from this motif.

Keywords: vascular heterogeneity, blood-brain barrier, blood-retina barrier, phage display, peptide

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| BHE | barreira hematoencefálica |
|---------|---|
| BHR | barreira hemato-retiniana |
| BMTP-11 | do inglês, bone metastasis-targeting peptidomimetic-11 |
| BSA | albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>) |
| Da | Daltons |
| DMEM | do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's medium |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| LB | meio de cultura lisogênico (do inglês, lysogeny broth) |
| MCCs | malformações cavernosas cerebrais |
| NGS | do inglês, next generation sequencing |
| pIII | proteína III do bacteriófago M13 |
| PBS | salina tamponada com fosfato (do inglês, phoshate buffered saline) |
| PCR | reação de polimerase em cadeia (do inglês, polymerase chain reaction) |
| PEG | polietilenoglicol |
| PFA | paraformaldeído |
| SDS | dodecil sulfato de sódio (do inglês, sodium dodecyl sulfate) |
| SV40 | vírus vacuolante símio 40 (do inglês, simian vacuolating virus 40) |
| TU | unidades transdutoras (do inglês, transducing unit) |

UNV unidade neurovascular

VEGF do inglês, vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
|----|--|-------------|
| | 1.1 Heterogeneidade vascular | 14 |
| | 1.2 Vasculatura cerebral | 17 |
| | 1.3 Phage display in vivo | 23 |
| 2. | OBJETIVO | 29 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| | 3.1 Biblioteca de Phage Display | 30 |
| | 3.2 Produção, purificação e titulação de fagos | 31 |
| | 3.3 Modelo animal | 31 |
| | 3.4 Biopanning in vivo para identificação de alvos moleculares da | vasculatura |
| | cerebral | 32 |
| | 3.5 Seleção de clones, PCR e sequenciamento para a determinaçã | io do |
| | peptídeo apresentado pelo fago (Método Sanger) | 32 |
| | 3.6 Sequenciamento em larga escala de fagos | 33 |
| | 3.7 Bioinformática | 35 |
| | 3.8 Imunofluorescência para fagos (tecidos cortados em criostato). | 35 |
| | 3.9 Imunofluorescência para fagos (amostras de retinas inteiras) | 36 |
| | 3.10 Quantificação in vivo de CFFWKFRWMC em órgão e tecidos | |
| | selecionados | 37 |
| | 3.11 Peptídeos sintéticos | 38 |
| | 3.12 Ensaio de competição <i>in vivo</i> | 38 |
| | 3.13 Alanine scanning | 38 |
| | 3.14 Cromatografia de afinidade | 41 |
| | 3.15 Espectrometria de massa | 42 |

| | 3.16 Ensaio de ligação de fagos in vitro | 42 |
|----|---|-----|
| | 3.17 Microscopia eletrônica de transmissão | 43 |
| | 3.18 Imageamento in vivo do fago FFWKFRWMC | 44 |
| | 3.19 Quantificação de fluorescência <i>ex vivo</i> | 44 |
| | 3.20 Estatística | 45 |
| 4. | RESULTADOS | 46 |
| | 4.1 Seleção de peptídeos ligantes à vasculatura cerebral | 46 |
| | 4.2 O peptídeo CFFWKFRWMC liga-se à vasculatura cerebral | 50 |
| | 4.3 O peptídeo CFFWKFRWMC liga-se aos vasos sanguíneos do nervo | |
| | óptico, mas não liga-se aos vasos sanguíneos da retina | 55 |
| | 4.4 Estrutura e função do peptídeo CFFWKFRWMC | 57 |
| | 4.5 Efeito do peptídeo sintético in vivo | 61 |
| | 4.6 Ensaios para identificação do receptor de CFFWKFRWMC | 62 |
| | 4.7 CFFWKFRWMC liga-se às junções de células endoteliais | 66 |
| | 4.8 CFFWKFRWMC como ferramenta para imageamento in vivo | 70 |
| 5. | DISCUSSÃO | 73 |
| 6. | CONCLUSÃO | 78 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 80 |
| 8. | ANEXOS | 91 |
| | I. Alinhamento de peptídeos únicos revelados por NGS | 92 |
| | II. Súmula curricular | 97 |
| | III. Artigo publicado | 100 |

1. INTRODUÇÃO

O cérebro é um dos órgãos mais complexos de um organismo e, em humanos, pode conter mais de 80 bilhões de neurônios, cada um destes podendo formar sinapses com até 1.000 outros neurônios. Um dos desafios da neurociência é entender como esta vasta rede neural opera e, por fim, produzir o pensamento e as impressionantes ações humanas. Embora existam esforços para explicar como diferentes regiões cerebrais funcionam, ainda não há uma teoria geral da função cerebral que seja universalmente aceito. Para isto, em abril de 2013, o ex-presidente americano Barack Obama anunciou o apoio de sua presidência ao projeto "*BRAIN Initiative*" (*Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies*, também conhecido como *Brain Activity Map Project*). A esta, seguiram-se outras iniciativas, como o "*Human Brain Project*" da União Europeia, que também procura unir a comunidade científica para avançarmos nosso conhecimento sobre este fascinante órgão. Tratam-se de propostas inovadoras e ambiciosas, que pretendem mapear a atividade de cada neurônio do cérebro humano para, enfim, desvendar o funcionamento deste órgão, ainda tão misterioso.

Assim como qualquer outro tecido ou órgão, o cérebro contem uma rede vascular excepcional. Isto porque, para manter toda a atividade neural, este órgão requer um suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, que é realizada através de uma vasta e bem regulada rede vascular de artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veia, que juntos podem atingir até aproximadamente 644 km de extensão (KISLE *et al.*, 2017). Sabe-se que esta rede vascular está intimamente conectada com as funções neurais (MADELAINE *et al.*, 2017; SHIM &, MADSEN, 2018; WITTKO-SCHNEIDER, 2014). Tendo em vista os esforços desenvolvidos no intuito de conhecer e desvendar o funcionamento cerebral, propusemos estudar a

heterogeneidade vascular cerebral, identificando marcadores específicos para este órgão. Estes conhecimentos poderão auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos moleculares cerebrais.

1.1 Heterogeneidade vascular

O endotélio, composto por células endoteliais que formam o revestimento interno dos vasos sanguíneos e linfáticos, desempenha um papel importante em muitas funções fisiológicas, incluindo a regulação do tônus vasomotor, o controle de tráfego de celular, a manutenção da fluidez sanguínea, a formação de novos vasos e, papel nas imunidades inata e adaptativa. Os fenótipos das células endoteliais são diferencialmente regulados no espaço e no tempo, dando origem ao fenômeno de heterogeneidade vascular (AIRD, 2007; OZAWA et al., 2008; PASQUALINI & RUOSLAHTI, 1996; ; RAJOTTE et al., 1998). A heterogeneidade vascular é um conceito bem aceito atualmente: a ideia de que os vasos sanguíneos são formados por uma parede homogênea de populações de células endoteliais foi substituída pela ideia de que os vasos sanguíneos são formados por populações de células que diferem entre si em diferentes órgãos e até mesmo dentro de um mesmo tecido. As células endoteliais possuem uma conexão íntima com o tecido adjacente, possuindo papel fundamental na organogênese; a heterogeneidade vascular é mais evidente em estágios posteriores do desenvolvimento de diversos órgãos (AZIZOGLU, et al., 2016; RAMASAM, 2016).

Células endoteliais podem variar em aspetos morfológicos, funcionais e em padrões de expressão, dando origem aos diferentes leitos vasculares de um organismo. Em termos de heterogeneidade morfológica, células endoteliais de diferentes leitos vasculares podem apresentar diferenças em relação ao tamanho, formato, espessura e orientação nuclear, além da presença de filamentos, vesículas e junções especializadas (AIRD, 2003; CASTRO et al., 2018). A heterogeneidade morfológica das células endoteliais está intimamente relacionada à heterogeneidade na função destas células. Por exemplo, células endoteliais da vasculatura cerebral estabelecem a barreira hematoencefálica (BHE), estrutura altamente seletiva que protege os neurônios de moléculas tóxicas e patógenos (ZENARO et al., 2017; HELMS et al., 2016). Esta propriedade de barreira baseia-se em um endotélio contínuo, no qual as células endoteliais são conectadas por junções aderentes e junções oclusivas especializadas, resultando em uma baixa taxa de transcitose e supressão da adesão de leucócitos (ZHAO et al., 2015). Além da permeabilidade, células endoteliais também diferem em sua capacidade de fornecer nutrientes aos tecidos: em órgãos com funções que consomem muita energia, as células endoteliais adaptam-se às demandas metabólicas ajustando a densidade de capilares sanguíneos e controlando a transferência de nutrientes (AIRD, 2005; Eelen et al., 2015). A heterogeneidade funcional das células endoteliais também exerce papel importante para o tráfego regulado e o direcionamento de células imunes: por exemplo, vênulas endoteliais altamente especializadas presentes em linfonodos expressam moléculas para o recrutamento e migração transendotelial de linfócitos (POTENTE & MÄKINEN, 2017). Em relação à heterogeneidade nos padrões de expressão, podemos encontrar diferenças no padrão de expressão de proteínas e RNA mensageiros, bem como diferenças em vias de sinalização entre as células endoteliais diferentes leitos vasculares especializadas (AIRD, de 2003). Heterogeneidade vascular também exerce papel importante em diversas doenças. Por exemplo, doenças inflamatórias dos vasos sanguíneos frequentemente afetam vasos ou leitos vasculares específicos (AIRD, 2012); certos tumores metastatizam preferencialmente através de leitos vasculares particulares e os sinais do microambiente tumoral determinam a heterogeneidade do vaso tumoral, o que influencia a capacidade de resposta às diversas terapias (POTENTE & MÄKINEN, 2017); malformações vasculares também podem se manifestar de uma maneira órgão-específico: malformações cavernosas cerebrais (MCCs), por exemplo, são anomalias vasculares de que afetam principalmente pequenos vasos sanguíneos do sistema nervoso central (SNC) (FISCHER *et al.*, 2013).

A heterogeneidade vascular tem sido demonstrada em diversos tecidos e órgãos, utilizando uma ampla variedade de ensaios (OZAWA *et al.*, 2008; PASQUALINI & RUOSLAHTI, 1996; ; RAJOTTE *et al.*, 1998). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão forneceram umas das primeiras descrições de diversidade fenotípica entre células endoteliais da microcirculação pulmonária de ratos (DEFOUW, 1988); ensaios de imunohistoquímica e hibridização *in situ* são utilizados para mapear a expressão de proteínas ou RNA mensageiro em leitos vasculares específicos (Joko *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2014) ; análises de *microarray* são utilizados para mapear a expressão gênica específica de diferentes populações de células endoteliais (HUANG *et al.*, 2018); utilizando bibliotecas de *phage display* de peptídeos *in vivo*, é possível selecionar peptídeos com migração específica para diferentes leitos vasculares (ARAP *et al.*, 2002; PASQUALINI & RUOSLAHTI, 1996; RAJOTTE *et al.*, 1998).

Através de uma seleção não invasiva do endotélio vascular, em condições fisiológicas e patológicas, a tecnologia de *phage display* tem desempenhado um papel essencial na identificação de receptores expressos seletivamente na vasculatura de diferentes órgãos e tecidos (RAJOTTE & RUOSLAHTI, 1999; TREPEL *et al.*, 2000; OZAWA *et al.*, 2008; GIORDANO *et al*, 2009; STAQUICINI, *et*

16

al., 2011), os quais são utilizados em estratégias de imageamento e terapias direcionadas com resultados promissores em estudos clínicos e pré-clinicos (BARNHART *et al.*, 2011; LORUSSO *et al.*, 2012; PASQUALINI *et al.*, 2015). Como exemplo, podemos citar: o peptídeo BMTP-11, ligante de receptores de interleucina-11, com resultados promissores para o tratamento de modelo de osteosarcoma humano (LEWIS *et al.*, 2017) e câncer de próstata em humanos (PASQUALINI *et al.*, 2015); o peptídeo adipotide (KOLONIN *et al.*, 2004) testado em ensaios com macacos do velho mundo, induz apoptose em vasos sanguíneos de tecido adiposo branco, resultando em rápida perda de peso e melhor resistência à insulina em macacos obesos (BARNHART *et al.* 2011); o peptídeo vasotide, com efeito inibidor de angiogênese na retina através na ligação seletiva a receptores de VEGF (VEGFR-1) e neuropilina-1 (NRP-1) em modelos de macaco com degeneração macular relacionada à idade (Sidman *et al.*, 2015).

1.2 Vasculatura cerebral

A sinalização dentro do sistema nervoso ocorre através de sinais químicos e elétricos, sendo dependente de um microambiente controlado. Um componente essencial para esse controle são as diversas barreiras existentes entre o sangue e o tecido neural, as chamadas barreiras hematoneurais (Garcia, *et al.*, 2004). Entre as principais barreiras hematoneurais podemos citar: a barreira hematoencefálica, a barreira de líquido cefalorraquidiano (ABBOTT *et al.*,2010), a barreira nervo-sanguínea e a barreira hematoretiniana (BHR) (CHOI & KIM, 2008).

Dentre estas interfaces citadas, a BHE é a principal barreira, sendo responsável por manter a homeostase do SNC através da: (a) estrita limitação da difusão passiva de substâncias polares a partir do sangue para o cérebro; (b)

mediação do transporte de nutrientes para o parênguima cerebral bem como do efluxo de metabólitos tóxico e xenobióticos do cérebro; e (c) da regulação da migração de células imunes circulantes (ABBOTT et al., 2010; BEGLEY & BRIGHTMAN, 2003; WOLBURG et al., 2009). Anatomicamente, a BHE é formada por um endotélio microvascular em associação com elementos perivasculares, tais como astrócitos, pericitos, neurônios e matriz extracelular (Figura 1A). A interação e a resposta coordenada à injúria de um destes elementos conduziram ao conceito de que esta estrutura multicelular integrada constitui um elemento funcional neurovascular (UNV). denominado unidade Uma vez barreira que а hematoencefálica faz a conexão entre a interface vascular e o sistema nervoso, ela é considerada a principal unidade neurovascular, estando intimamente ligada ao controle da função cerebrovascular (TAM & WATTS, 2010).

A barreira de líquido cefalorraquidiano é formada pelo líquido circulante entre os ventrículos cerebrais, encontrado no espaço subaracnóideo no cérebro e medula espinhal (entre as meninges aracnóide e pia-máter). Atua como um amortecedor para o córtex cerebral e a medula espinhal, bem como fornece nutrientes para o tecido nervoso e remove resíduos metabólicos do mesmo (Choi & Kim, 2008). O líquido cefalorraquidiano é secretado principalmente pelo plexo coroide, o qual contém células ependimárias contento grande número de junções oclusivas, formando a barreira sangue-liquórica (Figura 1B) (Sugiyama, *et al.*, 1999).

A barreira hematoretiniana pode ser dividida em duas regiões distintas: a camada externa, formada pelo o epitélio pigmentado da retina e camada interna, formada pelas células endoteliais especializadas dos vasos da retina, juntamente com os pericitos e prolongamentos dos astrócitos (Figura 1C). A camada externa é responsável por regular o movimento de solutos e nutrientes da coróide para o

espaço sub-retiniano. Já a camada interna, assemelha-se à barreira hematoencefálica, desempenhando papel essencial na proteção dos tecidos neurais contra substâncias tóxicas e na manutenção das funções da retina: a presença de junções oclusivas localizadas entre as células edoteliais medeiam a difusão altamente seletiva de moléculas do sangue para a retina, sendo essencial para manter a homeostase neste tecido (Schlosshauer & Steuer, 2005; Choi, *et al.*, 2007).



Figura 1. Exemplos de barreiras hemato-neurais. (A) Barreira hematoencefálica. Células endoteliais conectadas por junções oclusivas especializadas estão imersas em uma membrana basal e circundadas por prolongamentos de astrócitos e pericitos. Neurônios e microglia também são presentes na região perivascular. (B) Barreira do líquido cefalorraquidiano. Células ependimárias do plexo coroide são coesas através da presença de junções oclusivas especializadas, formando a barreira do líquido cefalorraquidiano. (C) Barreira hematoretiniana. Figura esquemática representando a localização da camada interna e da camada externa da barreira hematoretiniana. (Adaptado de CHOI & KIM, 2008).

A regulação das trocas de nutrientes entre sangue e cérebro, através da inibição da livre difusão de moléculas solúveis em água ocorre graças a presença de uma elaborada rede de junções aderentes (*adherens junctions*) (ENGELHARDT & SOROKIN, 2009), junções comunicantes (*gap junctions*) (PULZOVA *et al.*, 2009) e, principalmente, junções oclusivas (*tight junctions*), que interligam as células endoteliais.

As principais características fisiológicas das células endoteliais que constituem a BHE são a ausência de fenestras, a baixa atividade de pinocitose e a presença de diversas junções oclusivas de alta resistência; com isso, tais células exibem um fenótipo único caracterizado pela presença de junções oclusivas e pela expressão específica de sistemas de transporte polarizados (DONG, 2018). As junções oclusivas são compostas por uma combinação intrincada de proteínas transmembranas e citoplasmáticas ligadas ao citoesqueleto de actina que formam uma espécie de "lacre" entre as células, capazes de manter uma rápida atividade de modulação e regulação. Tais junções possuem três funções biológicas principais: formam uma barreira à difusão paracelular de substâncias polares pelo sangue; impedem a difusão lateral de lipídeos e proteínas integrais de membrana, mantendo assim a polarização celular e, participam de uma complexa plataforma de sinalização intracelular (LUISSINT et al., 2012). Estratégias terapêuticas de entrega de drogas para o SNC são, em grande parte, limitadas pelas junções oclusivas no nível das células endoteliais que constituem a BHE (DONG, 2018). Além das junções oclusivas, as junções aderentes também exercem um papel relevante na da circulação sanguínea cerebral: as junções aderentes permeabilidade desencadeiam o contato célula-célula, promovendo a maturação e manutenção destas. Juntas, as junções aderentes e oclusivas podem transferir sinais

20

intracelulares que controlam diversas funções das células endoteliais; a organização intercelular de junções, através do agrupamento de proteínas de adesão e sinalização é, portanto, um importante processo através do qual as células percebem sua posição (Keaney & Campbell, 2015). As organizações das junções oclusivas assim como a organização das junções aderentes variam dependendo da necessidade funcional dos vasos sanguíneos (Silvia & Engelhardt, 2015).

As células endoteliais desta barreira também expressam proteínas de membrana e receptores, que fornecem rotas seletivas de entrada de nutrientes polares, tais como transportadores de glicose (GLUT-1), íons (Na, K-ATPase e K) e algumas macromoléculas (receptores de insulina e tranferrina) e, rotas de saída de metabólitos potencialmente tóxicos e macromoléculas (PAOLINELLI et al., 2011). Tais células também expressam uma variedade de enzimas capazes de metabolizar moléculas indesejáveis, como por exemplo, toxinas. Logo, a troca de substâncias através da barreira hematoencefálica torna-se altamente regulada e limitada, e apenas moléculas lipofílicas ou muito pequenas (menores que 400 Da) conseguem efetivamente transpô-la. Mesmo pequenos metabólitos, tais como aminoácidos, glicose, nucleosídeos e vitaminas passam do sangue para o cérebro através do transporte mediado por carreadores (TAM & WATTS, 2010). Por esta razão, em muitos casos, a BHE impede o tratamento terapêutico de doenças do Sistema Nervoso Central, uma vez que uma grande maioria dos fármacos utilizados na clínica não consegue traspô-la. Torna-se importante, então, estudos que visam a descoberta de novos marcadores moleculares que auxiliem nos estudos e no desenvolvimento de agentes terapêuticos capazes de transpor as barreiras existentes. Descobrir um peptídeo ligante que seja capaz de reconhecer e ligar-se a receptores presentes nas células endoteliais da BHE pode auxiliar no desenvolvimento de drogas mais seletivas, aumentando a eficiência no transporte de drogas para o SNC e, simultaneamente, diminuindo a toxicidade sistêmica.

Embora as características mencionadas anteriormente sejam válidas para grande parte do SNC, a diversidade funcional do cérebro é refletida por diferenças regionais na função BHE. Estas diferenças não estão restritas apenas a regiões anatomicamente diferentes, mas podem aparecer ao longo do endotélio de um segmento vascular. Devido principalmente a razões técnicas (dificuldade de isolar células endoteliais de diferentes regiões do cérebro ou compartimentos vasculares), pouco se sabe ainda sobre a diversidade da vasculatura cerebral: o endotélio deste órgão é frequentemente considerado como uma população homogênea de células endoteliais (WILHELM, *et al.*, 2016). No entanto, esta simplificação pode levar a uma compreensão inadequada da função microvascular cerebral com consequências terapêuticas potencialmente significativas.

A identificação de marcadores vasculares órgão-específico tem progredido de forma lenta, devido principalmente à dificuldade em isolar populações puras de células endoteliais a partir de tecidos. Outra dificuldade encontrada refere-se ao fato de que células isoladas e cultivas podem perder seus traços tecido-específico quando mantidas em cultura e, além disso, o fenótipo das células endoteliais é instável e susceptível a mudanças quando são removidas de seu microambiente. Como forma de superar estas dificuldades, propusemos utilizar a metodologia do *Phage Display in vivo* para estudar a vasculatura cerebral. Uma das grandes vantagens em se utilizar esta metodologia reside na sua capacidade de identificar regiões de interação de proteínas e outras moléculas, sem a necessidade de se ter conhecimento prévio sobre a natureza desta interação.

Os peptídeos identificados ao longo deste estudo podem ser utilizados para identificar novos marcadores moleculares do endotélio cerebral. Isto porque os peptídeos ligantes de biomoléculas comumente apresentam semelhança de sequência ou estrutural com os ligantes naturais de seus receptores (GIORDANO *et al.*, 2001; ARAP *et al.*, 2002; CARDO-VILA *et al.*, 2010). Desvendar a diversidade vascular cerebral torna-se importante na medida em que os vasos sanguíneos são essenciais não apenas no suprimento de nutrientes e oxigênio de tecidos e células, mas também são importantes na organogênese, diferenciação e morfogênese de tecidos e órgãos, além de desempenhar função importante na manutenção da homeostase tecidual. Esse conhecimento pode, portanto, num futuro próximo, se traduzir em novas modalidades terapêuticas para as diversas doenças que acometem o Sistema Nervoso Central. Além disto, entender a heterogeneidade da vasculatura cerebral revelada pelo *phage display* poderá contribuir para uma melhor compreensão da função deste órgão, tão complexo e tão importante para o comportamento animal e humano.

1.3 Phage display in vivo

O phage display é uma técnica combinatorial bastante versátil que possibilita explorar diferentes interações moleculares e é frequentemente utilizada em pesquisas que visam interações de peptídeos contra diferentes alvos, identificando ligantes e a atividade biológica de diversas moléculas de interesse (SMITH & SCOTT, 1993; GIORDANO *et al*, 2001). Esses peptídeos ligantes servem então para identificar novos marcadores moleculares e, ao mesmo tempo, revelam detalhes moleculares importante das interações entre as moléculas em questão (KOIVUNEN *et al.*, 1999; SERGEEVA *et al.*, 2006; GIORDANO *et al.*, 2005).

Na técnica, uma sequência exógena é inserida em um gene codificador de proteína estrutural do capsídeo de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias). Tal sequência exógena pode ser codificadora de peptídeos, fragmentos de anticorpos, receptores ou enzimas. Uma biblioteca de *phage display* é um conjunto de bilhões de fagos, cada um possuindo uma sequência de DNA exógeno diferente e, portanto, apresentando um peptídeo ou proteína diferente na superfície do capsídeo (Figura 2).



Figura 2. Representação do sistema de phage display. Utilizando genoma de um fago filamentoso, sequências exógenas de DNA são inseridas na construção; a sequência inserida é representada como peptídeo fusionado à proteína III (pIII) do capsídeo viral.

Normalmente, bibliotecas de *phage display* de peptídeos apresentam sequências de pequenos peptídeos, que podem variar de seis a quinze aminoácidos e apresentam alta diversidade (geralmente, mais de 10⁹ diferentes peptídeos) (SMITH & SCOTT, 1993), o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico; peptídeos capazes de se ligar a moléculas-alvo *in vitro* ou em tecidos *in vivo* podem ser isolados (PASQUALINI & RUOSLAHTI, 1996; KOIVUNEN *et al.*, 1999), permitindo a identificação de alvos terapêuticos e fornecendo, ao mesmo tempo, informações importantes sobre a atividade biológica das moléculas e tecidos identificados. A metodologia permite ainda a realização de ensaios de seleção de

peptídeos contra diferentes alvos em diferentes situações. Por exemplo, ensaios de seleção de peptídeos (*biopanning*) podem ser realizados *in vitro* contra moléculasalvo aderidas em superfície (KOIVUNEN *et al.*, 1999), células que podem ou não ser estimuladas para alterar a expressão de receptores e em tecidos dissecados (GIORDANO *et al.*, 2001); em ensaio *in vivo*, pode-se injetar os fagos na circulação do animal ou paciente, com posterior retirada dos órgãos ou biopsias de tecidos de interesse para seleção dos fagos que expressaram peptídeos que interagiram com a vasculatura dos diferentes órgãos do organismo (PASQUALINI & RUOSLAHTI, 1996; ARAP *et al.*, 2002). Esta abordagem permite identificar moléculas que podem servir para o desenvolvimento de fármacos, vacinas, métodos diagnósticos e de outros insumos (SMITH, 1985; SCOTT & SMITH, 1990; GIORDANO *et al.*, 2009). Dentre os peptídeos identificados pela metodologia de *phage display* que já estão em estudos pré-clinicos avançados, podemos citar o peptídeo BMTP-11 (LEWIS *et al.*, 2017; PASQUALINI *et al.*, 2015), peptídeo adipotide (KOLONIN *et al.*, 2004) e o peptídeo vasotide (Sidman *et al.*, 2015).

In vivo, a aplicação da biblioteca de *phage display* por via intravenosa permite o estudo de marcadores expressos especificamente nos diferentes órgãos do organismo, uma vez que todo o endotélio é sondado: no organismo, os fagos expressando os diferentes peptídeos percorrem os vasos sanguíneos e, devido ao seu tamanho permanecem na circulação, possibilitando que a superfície das células endoteliais interaja com os peptídeos apresentados (Figura 3), fornecendo assim as informações a respeito da diversidade vascular de um tecido ou órgão e os possíveis endereços vasculares presentes no objeto de estudo ("endereçamento postal" dos diferentes órgãos) (OZAWA *et al.*, 2008; GIORDANO *et al.*, 2009). O "endereçamento postal" dos diferentes órgãos pode ser explorado e utilizado para o direcionamento de drogas, vetores gênicos e outros insumos, utilizando-se os próprios peptídeos identificados durante o processo de *biopanning*. A grande vantagem deste método sobre os outros métodos combinatórios estritamente químicos é que o isolamento de uma proteína ou peptídeo ligado a um fago é o suficiente para permitir uma completa caracterização do isolado: o vírus pode crescer sobre um meio e a sequência da proteína ou peptídeo apresentada pelo fago pode ser inferida a partir da sequência de DNA inserida na partícula viral (SMITH & SCOTT, 1993; RODI *et al.*, 2005).



Figura 3. *Phage display in vivo.* Peptídeos diferentes são expresso fusionados à pIII; uma vez na circulação sanguínea, os diferentes peptídeos realizam a sondagem do endotélio de diferentes órgãos e tecidos. (Adaptado de Tang *et al*, 2019)

A técnica do *phage display* permite não apenas a identificação de alvos moleculares, mas também fornece o peptídeo ligante que pode ser utilizado no desenvolvimento de terapias e métodos para diagnósticos. Isso se dá porque, de forma geral, os peptídeos selecionados frequentemente apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo e, com isso, podem ser explorados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, tais como o desenho racional de fármacos, terapias direcionadas, terapias gênicas, produção de vacinas, métodos diagnósticos, entre outras aplicações (ARAP *et al.*, 1998; HAJITOU *et al.*, 2006; SERGEEVA *et al.*, 2006; GIORDANO *et al.*, 2010). Peptídeos identificados por esta metodologia demonstram serem bons agentes para imageamento molecular devido ao seu pequeno tamanho, rápida remoção do sangue, falta de imunogenicidade e alta penetração e difusão nos tecidos (REUBI, 2003).

No caso de patologias no Sistema Nervoso Central, peptídeos selecionados podem além de atuar como fármacos, servir como carreadores de fármacos e, com isso, estes se tornam capazes de transpor a barreira hematoencefálica, onde podem exercer sua atividade terapêutica. Por exemplo, o peptídeo CRTIGPSVC identificado por *phage display in vivo*, interage seletivamente com a apo-transferrina (apo-Tf) para induzir alterações conformacionais alostéricas que funcionalmente "imitam" o ferro através de um mecanismo não-canônico mediado pelo ligante, possuindo a capacidade de atravessar a BHE em condições fisiológicas e patológicas (Staquicini *et al.*, 2011). Tal peptídeo foi utilizado em modelos de camundongos com glioblastoma, apresentando resultados promissores para o tratamento e diagnótico desta doença. É importante ressaltar que a metodologia do *phage display* permite

27

também a identificação de peptídeos que são internalizados pelos seus receptores específicos (ZURITA *et al.*, 2004; ARAP *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os esforços de pesquisadores em todo o mundo para desvendar o funcionamento cerebral, propusemos estudar a heterogeneidade vascular cerebral para entender melhor a intrincada relação entre nervos e vasos sanguíneos. Este projeto teve, portanto, como objetivos:

1. Identificar marcadores moleculares específicos para o endotélio cerebral. Utilizando a metodologia combinatorial de *phage display in vivo*, construir um mapa molecular da vasculatura cerebral, identificando peptídeos que se liguem preferencialmente na vasculatura deste órgão, fornecendo "endereços" vasculares através da identificação de peptídeos que estejam aderidos ao endotélio deste órgão.

 Avaliar possíveis aplicações biotecnológicas e terapêuticas para peptídeos identificados. Caracterização do sítio de interação de peptídeos selecionados e avaliar seu potencial para imageamento molecular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Biblioteca de Phage Display. A biblioteca de Phage Display CX8C (X representa qualquer aminoácido e C = cisteínas, que permite criar bibliotecas cíclicas) foi utilizada neste projeto e está disponível no laboratório do Dr. Ricardo J. Giordano (Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP). A biblioteca CX8C foi produzida pela Dra Jussara M. Sousa, utilizando-se o vetor fUSE55 e a metodologia desenvolvida por George Smith (SMITH & SCOTT, 1993) com modificações que permitiram uma maior eficiência e maior número de clones finais (MICHALOSKI *et al*, 2016). Em resumo, o vetor fuse55 foi preparado em larga escala utilizando kit de Maxiprep (QIAGEN), seguido por duas purificações utilizando for George S⁻/-

CACTCGGCCGACGGGGCTTGCNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGCGGGG CCGCTGGGGCCGAA-3' e 5'-TTCGGCCCCAGCGGC-3' (onde N = qualquer nucleotídeo e K = T ou G) foram convertidas em DNA de dupla fita utilizando enzima Klenow (New England Biolabs) e purificados utilizando coluna de Maxiprep P500 (QIAGEN). Em seguida, o vetor (1 mg) e os insertos de oligonucleotídeos (40 μg) digeridos com enzima de retrição BgII (New England Biolabs) foram ligados utilizando enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs). O produto da ligação foi purificado utilizando coluna de Maxiprep P500 (QIAGEN) e transformado em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* MC1061. A cultura de bactéria foi crescida por aproximadamente 20 horas (37°C sob agitação) e no dia seguinte, bacteriófagos (fagos) foram purificados do sobrenadante da cultura através de método utilizando PEG/NaCI. 3.2 Produção, purificação e titulação de fagos. Os fagos foram isolados e purificados do sobrenadante de cultura de bactéria (K91kan) utilizando o método de PEG/NaCl (GIORDANO et al., 2001). Para isso, a cultura de saturada durante a noite foi centrifugada a 6.000 x g, durante 30 minutos, 4ºC. O sobrenadante contendo os fagos em solução foi transferido para tubo contendo 16,7% PEG/3,3 M NaCl (15% do volume total) e incubado em gelo por 2 horas, seguido de etapa de centrifugação (6.000 x g, durante 30 minutos, 4°C). Após centrifugação, sobrenadante foi descartado e os fagos contidos no precipitado foram ressuspendidos em 1 mL de PBS 1x estéril (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl and 137 mM NaCl pH 7.4), seguido de incubação em agitador (250 RPM, 37°C, 15 minutos). Em seguida, a solução de PBS e fagos foi centrifugada (7.000 x g, 15 minutos), transferida para tubo contendo 15% de PEG/NaCl e incubada em gelo por 1 hora. Após incubação em gelo, amostra foi centrifugada (20.800 x g, 30 minutos), o sobrenadante descartado e o precipitado de fago foi ressuspendido em PBS e armazenado em geladeira. Os fagos foram titulados por diluição seriada em meio LB, por meio de infecção em E.coli K91kan, e semeados em LB-agar contendo tetraciclina (20 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL). O número de unidades transdutoras de bactéria (TU) foi calculado contando-se as colônias obtidas.

3.3 Modelo animal. O protocolo de manipulação animal foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Química USP e pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Novo México. Para a realização de experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos da linhagen BALB/c (Taconic) e C57BL/6 (Taconic), disponíveis no biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e camundongos BALB/c imunodeficientes atímicos (Charles River Laboratory). A linhagem de camundongo BALB/c e C57BL/6 são resultantes de

endocruzamentos, o que gera camundongos geneticamente idênticos entre si. Tal característica é importante para a realização do estudo, uma vez que elimina diferenças resultantes de eventuais diferenças genéticas e fisiológicas entre os camundongos. Os animais foram mantidos em ciclos de 12h claro/escuro, com acesso a água e alimentos ad libitum.

3.4 *Biopanning in vivo* para identificação de alvos moleculares da vasculatura cerebral. A biblioteca de fagos (10⁹ TU em 100 μL de meio DMEM) foi injetada pela veia da cauda do camundongo e após 30 minutos na circulação sanguínea, o animal foi perfundido através do coração com 20 mL de DMEM, tendo as diferentes regiões do cérebro (cerebelo, bulbo olfatório e hemisférios cerebrais) dissecadas. Os fagos ligantes presentes em cada região cerebral foram recuperados por infecção com *E.coli* K91kan (STAQUICINI *et al.*, 2011); cultivados e amplificados em meio LB contendo tetraciclina (20 μg/mL) e kanamicina (100 μg/mL) para os sucessivos ciclos de seleção. Foram realizados de três ciclos de seleção e, ao final do último ciclo, as amostras foram sequenciadas por duas metodologias distintas para identificação dos peptídeos apresentados pelos fagos. Na primeira metodologia, colônias individuais foram selecionadas para sequenciamento pelo método Sanger; na segunda metodologia, a amostra de fagos purificada após terceiro ciclo de seleção foi utilizada para sequenciamento em larga escala utilizando o equipamento Illumina MiSeq.

3.5 Seleção de clones, PCR e sequenciamento para a determinação do peptídeo apresentado pelo fago (Método Sanger). Ao final dos *biopanning*, os fagos obtidos foram semeados em placas de LB-ágar-tetraciclina-kanamicina e colônias individuais selecionadas e ressuspendidas em 50 µL de PBS. A região do DNA codificante para o inserto de peptídeo foi amplificada a partir de 2 µL desta

suspensão em reação de PCR, utilizando-se Taq DNA polimerase (Fermentas), dNTP (2,5 µM), tampão de Taq DNA polimerase 1x, 2 mM de MgCl₂ e 20 pmoles de cada oligonucleotídeos específicos 5'dos (senso um GCAAGCTGATAAACCGATACAATT-3' 5'е reverso CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3'), em termociclador por 35 ciclos (desnaturação (94°C) 15 segundos; anelamento (60°C) 20 segundos, extensão (72°C) 45 segundos). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2% e sequenciados utilizando o kit Big Dye® Cycle Sequencing (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante, no gual foram utilizados 8 pmoles do oligonucleotídeo reverso e 2 ul do produto de PCR diluído 1:2 em 25 ciclos de reação (desnaturação (95°C) 10 segundos; anelamento (55°C) 5 segundos, extensão (60°C) 1 minuto). As reações foram precipitadas pela adição de 1 µL de glicogênio 20 mg/mL, 1 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2, 25 µL de etanol absoluto gelado, seguida de incubação em gelo por 20 minutos. Após centrifugação a 4000 RPM por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 50 µL de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação por a 4000 RPM por 20 minutos a 4°C, descarte do sobrenadante e incubação por 1 minuto a 95°C. As amostras foram encaminhadas para o serviço de sequenciamento do Instituto de Química USP, que utiliza o sequenciador ABI PRISM® 3130XL GeneticAnalyzer /HITACHI (16 capilares, 50 cm).

3.6 Sequenciamento em larga escala de fagos. Para o sequenciamento em larga escala, a amostra de fagos precipitada e purificada após o terceiro ciclo de seleção foi submetida à reação de PCR para amplificar a região do gene pIII que codifica o inserto exógeno de DNA, utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela I). Foram utilizados quatro pares diferentes de oligonucleotídeos contendo de zero a três

bases degeneradas para adicionar a diversidade necessária para o seguenciamento do amplicon pela plataforma Illumina. Tais oligonucleotídeos também continham uma região flanqueadora correspondente à sequencia reconhecida pelo kit Nextera XT. Nesta reação de PCR, foram utilizados 10⁶ TU por reação de cada amostra (das diferentes regiões cerebrais) e a polimerase de alta fidelidade Kapa (Kapa Biosystems), seguindo recomendações do fabricante. O inserto foi amplicado realizando-se 15 ciclos de reação (desnaturação (95°C) 30 segundos; anelamento (55°C) 30 segundos, extensão (72°C) 1 minuto. Os produtos de PCR foram purificados utilizando colunas de purificação (QIAGEN) e os bar codes foram adicionados utilizando Nextera XT kit (Illumina) seguindo instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram então guantificados por gPCR (Kapa Biosystems library quantification kit) e, cada produto de PCR diluído para concentração final de 4 nM e reunidos juntos em uma única amostra. O DNA foi desnaturado através da adição de 0.2M NaOH e aquecimento a 95°C por 5 minutos e seguenciado no equipamento Illumina MiSeq utilizando MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). Leituras foram montadas utilizando PEAR (ZHANG et al., 2014) para extração e contabilização de sequências dos insertos: análise da sequência dos insertos foi realizada após verificação da montagem de dupla fita, remoção de sequências do vetor, checagem do tamanho do inserto (30 pares de base), verificação da presença de cisteínas nas duas extremidades da sequência e, por fim, apenas sequências com duas ou mais leituras foram analisadas.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizadas para primeira reação de PCR durante a preparação de amostras para sequenciamento em larga escala. Bases sublinhadas correspondem à região específica do vetor fUSE5, seguido à montante pelas bases degeneradas e regiões flanqueadores compatíveis com o Nextera XT.

| Oligonucleotídeo | Sequência |
|------------------|---|
| III-f5-Fw-0 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG <u>CATTGTCGGCGCAACTATCG</u> |
| III-f5-Fw-1 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGN <u>CATTGTCGGCGCAACTATCG</u> |
| III-f5-Fw-2 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNC <u>ATTGTCGGCGCAACTATCG</u> |
| III-f5-Fw-3 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNN <u>CATTGTCGGCGCAACTATCG</u> |
| III-f5-Rv-0 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG <u>CAAACCACAACGCCTGTAGC</u> |
| III-f5-Rv-1 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGN <u>CAAACCACAACGCCTGTAGC</u> |
| III-f5-Rv-2 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNN <u>CAAACCACAACGCCTGTAGC</u> |
| III-f5-Rv-3 | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNN <u>CAAACCACAACGCCTGTAGC</u> |

3.7 Bioinformática. Os peptídeos obtidos nos biopannings foram alinhados utilizando-se o programa Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) para a identificação de motivos comuns.

3.8 Imunofluorescência para fagos (tecidos cortados em criostato). Para localizar a distribuição do fago CFFWKFRWMC em diferentes órgãos, camundongos BALB/c foram anestesiados (Avertina 250 mg/kg) e o fago apresentando o peptídeo CFFWKFRWMC ou o fago controle Fd-tet (sem inserto) foi administrado na veia da cauda do camundongo (10⁹ TU em 100 µL de DMEM). Após 30 minutos de circulação, 50 µg de lectina obtida de tomate (*Lycopersicon esculentum*) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Vector Laboratories) (FALCON *et al.*, 2011) foi injetando na veia da cauda do camundongo e, após 2 minutos de circulação da lectina, os animais foram perfundidos pelo ventrículo esquerdo com 20
mL de PBS contendo 4% de paraformaldeído (PBS 4% PFA). Órgãos individuais (cérebro, retina, nervo ótico, gônada, pâncreas, baço, bexiga urinária, estômago, intestinos grosso e delgado, rim e fígado) foram coletados, fixados por 1-2 horas em PBS 4% PFA e incubados durante a noite em PBS contendo 30% de sacarose para criopreservação dos tecidos. No dia seguinte, os órgãos foram embebidos em meio de inclusão para congelamento utilizando composto O.C.T. (temperatura ótima para corte) (Killik Oct). Foram realizados cortes de tecido com 50 µm de espessura, os quais foram lavados três vezes com PBS e bloqueados por 2h com PBS contendo 5% de soro de jumento (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) e 0.3% Triton X-100. Após o bloqueio, tecidos foram incubados durante a noite com soro antibacterifago (Sigma-Aldrich) diluído 1:400 em PBS contendo 1% de soro de jumento (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) e 0.3% Triton X-100. No dia seguinte, tecidos foram lavados com PBS 0.3% Triton X-100 e submetidos à incubação com anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabra e conjugado com Dylight-594 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) diluído 1:300 em PBS 0.3% Triton X-100. Amostras foram preparadas com meio de montagem VECTASHIELD (Vector Laboratories) e examinadas em microscópio de epifluorescência (Nikon).

3.9 Imunofluorescência para fagos (amostras de retinas inteiras). Para montagem da retina inteira, os animais foram anestesiados e administrados intravenosamente com 10⁹ TU de fago CFFWKFRWMC ou Fd-tet (em 100 µL de PBS). Após 30 minutos de circulação sanguínea, os animais receberam 50 µg de lectina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Vector Laboratories) por via intravenosa. Os animais foram enucleados e as retinas dissecadas para imunodetecção de fagos. Como controle de acesso de partículas de fago no tecido, animais foram administrados intravenosamente 10⁹ TU de com fago CFFWKFRWMC e 10 minutos depois foi injetado 50 µg de Lectina conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Vector Laboratories) por via intravenosa. Estes animais foram enucleados sem perfusão e retinas dissecadas para preparação total da montagem. As retinas foram então fixadas com 4% paraformaldeído em PBS (1 hora) e bloqueadas durante 2 horas em 5% soro de jumento diluído em PBS contendo 1% Triton X-100. As retinas foram incubadas com soro anti-bacterifago (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS (1: 400) contendo 1% de soro de jumento e 1% de Triton X-100 durante a noite. Os tecidos foram corados durante 4 horas com anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabra e conjugado com Dylight-594 (1: 300) (Jackson Immunoresearch). As amostras foram montadas com VECTASHIELD (Vector Laboratories) e examinadas no microscópio DMi8-Leica.

3.10 Quantificação in vivo de CFFWKFRWMC em órgão e tecidos selecionados.

Para determinar a quantidade de fagos presentes em diferentes órgãos, camundongos BALB/c foram anestesiados (Avertina 250 mg/kg) e o fago expressando CFFWKFRWMC ou o fago controle Fd-tet (10⁹ TU em 100 µL de DMEM) foi injetado pela veia da cauda do camundongo. Após 30 minutos de circulação, o animal foi perfundido através do coração com 20 mL de meio DMEM e os diferentes órgãos e tecidos (cérebro ou partes cerebrais, músculo esquelético, rim, intestino delgado e fígado) dissecados individualmente. Cada amostra de órgão ou tecido foi coletada, pesada e homogeneizada utilizando homogeneizador de vidro Dounce. Os homogeneizados de tecidos foram ressuspendidos com 1 mL de meio DMEM suplementado com 5% de albumina de soro bovina (BSA) (DMEM 5% BSA) e centrifugados a 4000 por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 1 mL de meio DMEM 5% BSA e centrifugado novamente a 4000 por 5 minutos a 4°C. Cada homogeneizado de tecido foi então

incubado com 1 mL de bactéria *E. coli* K91kan na fase log (OD₆₀₀ ~2). Após infecção, diluições seriadas das infecções foram plaqueadas em triplicata em meio LB ágar contendo tetraciclina (20 μ g/mL) e kanamicina (100 μ g/mL), o qual permaneceu em estufa a 37º durante a noite. No dia seguinte, colônias individuais presentes em cada placa foram contabilizadas, fornecendo assim o número de unidades transdutoras de bactéria (TU).

3.11 Peptídeos sintéticos. Os peptídeos sintéticos foram sintetizados com um mínimo de 95% de pureza pela empresa Chinese Peptide Company (Hangzhou, China). Neste estudo, foram utilizados os seguintes peptídeos sintéticos: CFFWKFRWMC e CARAC (controle).

3.12 Ensaio de competição in vivo. Neste ensaio, os animais foram administrados com os peptídeos sintéticos CFFWKFRWMC ou CARAC (70 pmol ou 200 pmol por animal em 100 µL de PBS contendo 10% DMSO [v / v]). Após um minuto, os animais foram administrados por via intravenosa com 10⁸ TU de fago CFFWKFRWMC ou fago de controle Fd-tet (em 100 L de PBS). Após 30 minutos adicionais, os animais foram perfundidos através do coração com 20 mL de DMEM e os órgãos e tecidos individuais (cérebro, olho, fígado, rim, intestino delgado e pâncreas) foram coletados, pesados e homogeneizados com um homogeneizador de vidro Dounce. Os fagos presentes em cada amostra de tecido foram quantificados por contagem de colônias.

3.13 Alanine scanning. Partículas de fago exibindo variações pontuais de cada um dos resíduos de aminoácido da sequência CFFWKFRWMC foram produzidas através de mutagênese sítio dirigida como descrito na literatura (GIORDANO *et al.*, 2008). Em resumo, oligonucleotídeos sintéticos (Invitrogen) foram encomendados de forma a conter sequências com mutação para alanina de cada um dos resíduos de

aminoácido do CFFWKFRWMC (tabela 2). As sequências desses oligonucleotídeos possuem sítios de restrição da enzima BgII. Um oligonucleotídeo complementar à região 3' dos oligonucleotídeos também foi sintetizado. Para a formação de DNA dupla fita do inserto, cada par de oligonucleotídeo foi diluído em tampão TEN (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl) e deixados em água fervente por 5 minutos; o esfriamento das amostras ocorreu a temperatura ambiente. A qualidade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com brometo de etídeo e quantificado por espectrofotometria no equipamento *Nanodrop* 1000 (Thermo Scientific). O vetor fUSE55 purificado, foi digerido com enzima BgII (10U/µI, Fermentas) na proporção de 5U de enzima para cada 1 µg de vetor. O DNA digerido foi purificado com o sistema de extração de DNA em gel de agarose (QIA quick Gel Extractio kit, Qiagen), conforme instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo por espectrofotometria no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

As sequências dos insertos anelados foram clonadas no vetor fUSE55 previamente digerido com BgII; a relação inserto:vetor foi mantida em 1:1 (melhor condição checada em ensaios anteriores). Para a reação de ligação foi utilizado 50 ng de vetor fUSE55 digerido com BgII; 0,5 ng de inserto; 0,5 ul de T4 DNA ligase (5U/µI) e 1X tampão de ligação (NEB) em um volume total de 10 ul. A reação foi mantida na geladeira por 16 horas e utilizadas para transformação em células eletrocompetentes da cepa MC1061 de *E. coli* (MICHALOSKI *et al.*, 2016). Um total de 1 ul da ligação foi eletroporado (2,5kV) com 25 ul de bactéria competente. As eletroporações foram plaqueadas em placas LB Agar contendo antibiótico tetraciclina (40 ug/mI), as quais cresceram durante a noite em estufa de bactéria a 37 °C. As

colônias individuais obtidas foram ressuspendidas em 50 μl de PBS contendo 5% glicerol. A região do DNA codificante para o inserto de peptídeo foi amplificada em reação de PCR para fagos como descrito anteriormente (seção 3.5). Uma vez verificado a clonagem, foi utilizado 2 μl da solução de PBS 5% glicerol contendo as colônias para infecção com cepa k91kan de *E. coli* para a produção de fagos; tais amostras foram colocadas em meio LB com tetraciclina (20 μg/ml) e kanamicina (100 μg/ml) e mantido a 37°C, 300rpm, por 20 horas para produção de fagos. Os fagos foram isolados e purificados do sobrenadante de cultura de e precipitados pelo método de PEG/NaCI (GIORDANO *et al.*, 2001), e re-suspendidos em PBS (pH 7.4). Os fagos obtidos foram sequenciados e titulados por diluição seriada em meio LB, infecção em *E.coli* K91kan, e semeados em LB-agar contendo tetraciclina (20 μg/mL) e kanamicina (100 μg/mL). Uma vez produzidos todas as variantes de fago (10 variantes), cada um expressando uma mutação para alanina em um dos resíduos de aminoácido na sequência CFFWKFRWMC, estes foram utilizados para ensaio de imunofluorescência (seção 3.8).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para preparar as diferentes partículas de fago expressando os variantes para o ensaio de alanina scanning. Bases mutadas estão indicadas (sublinhados).

| Oligonucleotídeo | Sequência |
|------------------|--|
| AFFWKFRWMC-Fw | GGGCT <u>GCG</u> TTTTTTGGAAGTTTAGGTGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CAFWKFRWMC-Fw | GGGCTTGC <u>GCG</u> TTTTGGAAGTTTAGGTGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFAWKFRWMC-Fw | GGGCTTGCTTT <u>GCG</u> TGGAAGTTTAGGTGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFFAKFRWMC-Fw | GGGCTTGCTTTTTT <u>GCG</u> AAGTTTAGGTGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFFWAFRWMC-Fw | GGGCTTGCTTTTTTGG <u>GCG</u> TTTAGGTGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFFWKARWMC-Fw | GGGCTTGCTTTTTTGGAAG <u>GCG</u> AGGTGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFFWKFAWMC-Fw | GGGCTTGCTTTTTTTGGAAGTTT <u>GCG</u> TGGATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFFWKFRAMC-Fw | GGGCTTGCTTTTTTGGAAGTTTAGG <u>GCG</u> ATGTGCGGGGCCGCTG |
| CFFWKFRWAC-Fw | GGGCTTGCTTTTTTGGAAGTTTAGGTGG <u>GCG</u> TGCGGGGCCGCTG |
| CFFWKFRWMA-Fw | GGGCTTGCTTTTTTGGAAGTTTAGGTGGATG <u>GCG</u> GGGGCCGCTG |
| AFFWKFRWMC-Rv | |
| CAFWKFRWMC-Rv | |
| CFAWKFRWMC-Rv | |
| CFFAKFRWMC-Rv | |
| CFFWAFRWMC-Rv | CGGCCCCGCACATCCACCTAAA <u>CGC</u> CCAAAAAAAGCAAGCCCCGT |
| CFFWKARWMC-Rv | CGGCCCCGCACATCCACCT <u>CGC</u> CTTCCAAAAAAGCAAGCCCCGT |
| CFFWKFAWMC-Rv | |
| CFFWKFRAMC-Rv | CGGCCCCGCACAT <u>CGC</u> CCTAAACTTCCAAAAAAGCAAGCCCCGT |
| CFFWKFRWAC-Rv | CGGCCCCGCA <u>CGC</u> CCACCTAAACTTCCAAAAAAGCAAGCCCCGT |
| CFFWKFRWMA-Rv | CGGCCCC <u>CGC</u> CATCCACCTAAACTTCCAAAAAAGCAAGCCCCGT |

3.14 Cromatografia de afinidade. O peptídeo sintético CFFWKFRWMC e peptídeo controle (CARAC) foram obtidos comercialmente e acoplados, individualmente, em resina (Activated CH-Sepharose 4B). Para cada peptídeo acoplado na coluna foi passado, separadamente, extratos totais de proteínas de cérebro e de rim. Os extratos proteicos de cada órgão foram preparados com TBS, 50 mM NaCl, 2% NP-

40, 5 mM MgCl2, 5 mM CaCl2 e coquetel inibidor de protease; a concentração final dos extratos foi de 10 mg de tecido/ml. A eluição das proteínas da resina foi realizada com 1 M NaCl, 8M ureia e 1% SDS, nesta ordem. As amostras de cada eluição foram aplicadas em gel de 9% poliacrilamida e o mesmo corado com corante coomasie coloidal.

3.15 Espectrometria de massa. As bandas proteicas observadas no gel foram recortadas e picadas para, em seguida, passarem por processo de descoloração do gel, utilizando solução de descoloração contendo 50% (v/v) de acetonitrila e 25 mM de bicarbonato de amônio (AmBic). Após descoloração, os fragmentos de gel foram tratados com solução de redução (20 mM ditiotreitol em 50 mM AmBic), solução de alquilação (55 mM de iodoacetamida em 50 mM de Ambic) e posteriormente lavadas com 25 mM de AmBic. As amostras foram digeridas com tripsina (20 ng/ul). A ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (5% [v/v] ácido fórmico [96%] e, 50% [v/v] acetonitrila). As proteínas foram eluídas do gel utilizando diferentes soluções de eluição: solução de eluição I (1% [v/v] ácido fórmico [96%] em 60% [v/v] metanol), solução de eluição II (1% [v/v] ácido fórmico [96%] em 50%[v/v] acetonitrila) e solução de eluição III (solução 100% acetonitrila). A solução final, contendo todas as soluções eluídas, foi concentrada em concentrador a vácuo. Para a análise, as amostras foram ressuspendidas e dessalinizadas com auxílio do ZipTip, eluídas com 50% (v/v) de acetonitrila e, para análise, aplicadas em placa de MALDI.

3.16 Ensaio de ligação de fagos in vitro. Para este ensaio, 1ug de proteína recombinante (glutamina sintentase, cadeias leve A de clatrina, cadeias leve B de clatrina ou cadeias pesada de clatrina) e BSA (controle) foram imobilizados em poços de placa de 96 poços, overnight, 4ºC. No dia seguinte, as proteínas não

ligantes à placa são removidas e os poços são bloqueados com solução PBS 3%BSA, 2 horas, temperatura ambiente. Após bloqueio, poços são incubados com 10⁹ partículas de fago CFFWKFRWMC ou fago controle Fd-tet, separadamente. Após incubação, é realizado etapa de lavagem dos poços para remoção de fagos não ligantes (9 vezes, com 200 ul de PBS). Depois da lavagem, poços foram incubados com 200 ul de bactéria k91 na DO=1,8 por 30 minutos, temperatura ambiente. Em seguida, realizada três diluições e cada diluição plaqueadas em meio LB sólido contendo tetraciclina e kanamicina; placas foram levadas à estufa 37°C, overnight. No dia seguinte, colônias são contabilizadas, fornecendo assim o número de unidades transdutoras de bactéria (TU).

3.17 Microscopia Eletrônica de Transmissão. Camundongos BALB/c foram anestesiados com Avertina e administrados por via intravenosa com 10⁹ TU de fago CFFWKFRWMC ou do fago controle Fd-tet. Após 30 minutos de circulação, os animais foram perfundidos pelo ventrículo esquerdo com 20 mL de solução (2,5% glutaraldeído:4% paraformaldeído em tampão 0,1M fosfato monobásico/dibásico [pH 7.4]). Amostras de tecido foram processadas seguindo protocolo para ensaio de MET, com modificações (ALMEIDA-SOUZA, 2016). Pedaços do cérebro foram dissecados e pós-fixados em solução fixadora durante a noite, seguido por fixação com 1% (m/v) de tetróxido de ósmio (OsO4) e contrastado com 0.5% acetato de uranila. Após etapas de fixação, tecidos foram submetidos a processo de desidratação com acetona em quantidade crescente (50%, 70%. 85%, 100%) e então embebidos em resina (Epon-S12 Substitute Cat#14900) por 48 horas a 60°C. Cortes semifinos foram realizados e corados com 1% azul de metileno e visualizados em microscópio de luz para seleção de áreas contendo vasos sanguíneos. Cortes ultrafinos com navalha de diamante foram realizados nas áreas contendo vasos sanguíneos vasos sanguíneos com setema de signante foram realizados nas áreas contendo vasos sanguíneos.

sanguíneos e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Amostras foram analisadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL (modelo JEM1011, JEOL/Massachusetts/USA) operado a 80 kV. Imagens foram capturadas com Gatan (modelo 785 ES1000W Erlangshen camera, Gatan, USA). O experimento e captura das imagens foram realizados no Instituto Adolfo Lutz, no laboratório de Virologia.

3.18 Imageamento *in vivo* do fago CFFWKFRWMC. Partículas de fago (CFFWKFRWMC, Fd-tet e RGD) foram marcadas com marcador infravermelho IRDye 800CW NHS ester (LI-COR) como descrito (DOBROFF *et al.*, 2016). Em resumo, 3 µl do marcador IRDye 800CW (20 mg/mL) foi incubado com 5x10¹¹ TU de fago em 1 mL de PBS durante a noite, sob agitação. No dia seguinte, foi realizado a purificação, de acordo com o protocolo de purificação de fagos utilizando PEG/NaCl. Após purificação, amostras são tituladas para saber a concentração de fagos em cada amostra e administrados em camundongos BALB/c imunodeficientes atímicos. Os animais foram anestesiados e cada animal recebeu 2x10¹⁰ TU de fago (CFFWKFRWMC, Fd-tet ou RGD) por via intravenosa. Os animais foram acompanhados ao longo de 30 minutos após administração intravenosa de fagos. Imagens foram adquiridas e analisadas no equipamento IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer).

3.19 Quantificação de fluorescência ex vivo. Animais foram anestesiados, cada um recebendo 2x10¹⁰ TU de fago marcado com IRDye 800CW NHS ester (LI-COR) (CFFWKFRWMC ou Fd-tet) por via intravenosa. Após 30 minutos, os animais foram perfundidos através do coração com 20 ml de DMEM e órgãos selecionados (cérebro, retina e fígado) foram coletados e as imagens adquiridas no equipamento Odyssey Infrared Imaging Scanner.

3.20 Estatística. Todos os dados numéricos foram expressos como média ± erro padrão da média. A significância estatística dos conjuntos de dados foi analisada utilizando ANOVA de duas vias ou ANOVA de uma via (software Prism GraphPad). Os valores de P inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Seleção de peptídeos ligantes à vasculatura cerebral

Com o objetivo de selecionar e identificar peptídeos específicos para as diferentes áreas da vasculatura cerebral (bulbo olfatório, hemisférios cerebrais e cerebelo), utilizamos a metodologia do *phage display in vivo*. Para isto, a biblioteca de peptídeos CX8C (onde C representa o aminoácido cisteína e X qualquer aminoácido aleatório) foi administrada por via intravenosa em camundongos e após 30 minutos, os animais foram eutanasiados por perfusão cardíaca pelo ventrículo esquerdo para remoção de fagos não ligantes e o cérebro foi removido para recuperar os fagos ligantes através de infecção com cultura de bactéria. Os fagos recuperados e amplificados foram reinjetados em novos animais, realizando-se três ciclos de seleção (Figura 4).



Figura 4. Fluxograma representando biopanning in vivo realizado no projeto. A biblioteca de fagos (CX8C) foi injetada por via intravenosa no camundongo; os fagos permaneceram na circulação sistêmica do animal por 30 minutos e em seguida, o animal foi perfundido para a remoção dos fagos livres e as diferentes partes do cérebro dissecadas e homogeneizadas, seguido de adição de cultura de bactéria para recuperação dos fagos presentes no tecido. Os fagos foram então amplificados e utilizados em um novo ciclo de seleção. (Adaptado de Tang *et al*, 2019)

Como durante o primeiro ciclo de seleção muitos dos fagos são únicos (provêm da biblioteca primária, que contém uma ou algumas cópias de cada peptídeo), nós não quantificamos o número de fagos ligantes desta etapa, para evitar a perda destes peptídeos únicos. A partir do segundo e terceiro ciclo de seleção, uma fração da cultura de bactéria infectada por fagos foi utilizada para o quantificar o número de fagos ligantes na vasculatura cerebral por contagem de colônias (a partir do segundo cilclo de seleção, os peptídeos já foram amplificados e adicionados em múltiplas cópias, permitindo sua quantificação e sem perda de

diversidade). De fato, podemos observar que em todas as regiões analisadas, foi obtido um enriquecimento no número de fagos recuperados entre o terceiro e o segundo ciclo de seleção: enriquecimento de 14 vezes nos hemisférios cerebrais e 23 vezes na região do bulbo olfatório e do cerebelo (Figura 5). Tais resultados demonstram uma seleção positiva de peptídeos ligantes nas diferentes regiões analisadas.



Figura 5. Phage display *in vivo* na vasculatura cerebral. A biblioteca de phage display CX8C foi administrada por via intravenosa em camundongos e os fagos ligantes às diferentes áreas da vasculatura cerebral foram recuperados por infecção bacteriana. Os gráficos indicam o número fagos ligantes recuperados em cada ciclo de seleção em unidades transdutoras (TU) por massa de tecido (mg). No primeiro ciclo de seleção o número de colônias não foi contabilizado para evitar perda de peptídeos com sequências únicas (*). Barras representam desvio padrão da quantificação realizado em triplicata.

Para identificar as sequências dos peptídeos selecionados ao longo do *biopanning*, o sequenciamento inicial de 64 colônias pelo método de Sanger revelou que diversas sequencias de DNA encontradas em todas as três regiões cerebrais analisadas continham um motivo conservado de um resíduo de carga positiva flanqueada por resíduos de aminoácidos aromáticos (Phe e Trp) em ambas as pontas (Figura 6). A presença deste motivo conservado nas três regiões analisadas foi um resultado bastante interessante, visto que o segundo e o terceiro ciclo de seleção foram realizados de forma independente nas diferentes regiões cerebrais.

| Bulbo olfatório Cerebelo | | | Hemisférios | | |
|--------------------------|---|-------------------------|-------------|------------------------------|----|
| FFWKFRWM | 6 | FWWKYVYR | 1 | YSFLTSDF | 1 |
| FSRKFRWM | 2 | VYHG <mark>FRW</mark> R | 1 | FFDAIEFR | 1 |
| VWVSFRWS | 4 | RYID <mark>FRW</mark> S | 1 | GLAVGTAD | 1 |
| VWFN <mark>FRY</mark> V | 1 | VWVD <mark>FHW</mark> V | 2 | LYVN <mark>FAW</mark> R | 10 |
| IWSR <mark>FMW</mark> T | 1 | VWVS <mark>FHW</mark> V | 2 | YLNWRWSV | 1 |
| HGSGDRRP | 1 | IWVDFRWK | 4 | SVNLVFGS | 1 |
| IGVHLIGV | 1 | FWYGMRWW | 1 | VYMY<mark>FGW</mark>F | 1 |
| | | FWYS <mark>YRW</mark> I | 1 | FFVF <mark>PRW</mark> Y | 2 |
| | | RYSAWKWW | 1 | FFAD <mark>FRW</mark> Y | 5 |
| | | WRALNYSP | 1 | MWVAWRWV | 1 |
| | | GSDGEVGR | 1 | YFYN <mark>YRW</mark> W | 1 |
| | | | | VWANFRWQ | 6 |
| | | | | VWMNYRWV | 1 |

Figura 6. Sequenciamento de colônias recuperadas das diferentes regiões cerebrais pelo método de Sanger. No total, 64 colônias individuais foram selecionadas após o terceiro ciclo de seleção para sequenciamento da região do DNA codificante para o peptídeo. Números representam a frequência de cada peptídeo encontrado em sua respectiva região. Em destaque o motivo FRW.

Em seguida, aprofundamos nossas analises dos peptídeos selecionados através da realização do sequenciamento em larga escala (*next generation sequencing*, NGS) de todos os fagos presentes nas amostras do segundo e do terceiro ciclo de seleção de cada uma das regiões analisadas. De um total de 3.074 peptídeos únicos identificados, 1,021 peptídeos (ANEXO I) compartilham o motivo [FYW]-X-X-[FYW][ARKH][FYW] (Figura 7). Deste total, 432 (42%) peptídeos apresentaram o tripeptídeo Phe-Arg-Trp (que será designado como motivo FRW) em suas sequências.



Figura 7. Alinhamento do conjunto total de peptídeos únicos (N=1,021 sequências únicas) revela o motivo consenso FRW.

Tendo em mãos os resultados das análises dos sequenciamentos (tanto pelo método de Sanger como pelo NGS), decidimos escolher o fago expressando o peptídeo CFFWKFRWMC como representante do motivo FRW, visto que este peptídeo foi um dos mais abundantes nas análises de sequenciamento.

4.2 O peptídeo CFFWKFRWMC liga-se à vasculatura cerebral

O fago CFFWKFRWMC foi produzido e purificado em larga escala, juntamente com o fago controle sem inserto Fd-tet (este não apresenta nenhum peptídeo exógeno em seu capsídeo). Visando estudar o padrão de migração e distribuição *in vivo* nos diferentes órgãos e tecidos murinos, o fago CFFWKFRWMC e o fago controle Fd-tet foram administrados, separadamente, em camundongos BALB/c por via intravenosa. Após 30 minutos na circulação sanguínea, os animais foram perfundidos e diferentes órgãos foram dissecados e processados para imunofluorescência. Nos tecidos provenientes do cérebro, podemos observar que o fago CFFWKFRWMC liga-se à superfície de células endoteliais de vasos sanguíneos de diferentes calibres (Figura 8A), apresentando um padrão de marcação pontual: a distribuição do fago CFFWKFRWMC não é regular ao longo de um vaso sanguíneo, acumulando-se em apenas em algumas regiões dos vasos. Não foi observado interação com os vasos sanguíneos quando mesma dose de fago controle Fd-tet foi administrada no animal. Apesar de a sequência CFFWKFRWMC ter sido isolada da região do bulbo olfatório, ao quantificar seu o padrão de distribuição nas diferentes regiões cerebrais (bulbo olfatório, hemisférios cerebrais e cerebelo), observamos que este peptídeo se liga ao vasos do cérebro como um todo, não apresentando uma região com maior afinidade (Figura 8B).





В



Figura 8. (A) O fago CFFWKFRWMC ou o fago controle Fd-tet (10⁹ TU) foram administrados por via intravenosa em camundongos e a sua presença em vasos sanguíneos cerebrais foi visualizada através da utilização de soro antibacteriofágo (vermelho). Visualização dos vasos sanguíneos (verde) realizada através da utilização de lectina de tomate *(Lycopersicon esculentum)* conjugada com FITC. **(B)** Quantificação por contagem de colônia (TU) de fagos ligantes nas diferentes regiões cerebrais analisadas (N=4 animais para cada grupo).

Para determinar se o fago CFFWKFRWMC liga-se especificamente aos vasos sanguíneos cerebrais, nós analisamos a sua distribuição em outros tecidos: quando o fago CFFWKFRWMC foi administrado em camundongos BALB/c, não foi possível detectar marcação para fago em tecidos provenientes de rim, pâncreas, intestinos grosso e delgado, gônadas, estômago e bexiga urinária (Figura 9). Vale ressaltar que, tanto o fago CFFWKFRWMC como o fago controle Fd-tet, apresentam marcação positiva em tecidos hepáticos, uma vez que este órgão apresenta sistema reticulo-endotelial, com alta atividade fagocitária de substâncias presentes no sangue.



Figura 9. Distribuição do fago CFFWKFRWMC em diferentes órgãos. Imagens obtidas através de ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-bacteriófago (vermelho) e lectina de tomate *(Lycopersicon esculentum)* conjugada com FITC (verde). Barras de escala: 100 µm.

O mesmo resultado foi observado em ensaio de quantificação por contagem de colônias: quando comparamos a ligação do fago CFFWKFRWMC com a ligação do fago controle Fd-tet em diferentes órgãos (cérebro, rim, fígado, pâncreas, intestino delgado, baço e retina), podemos observar que no cérebro o fago CFFWKFRWMC apresentou ligação significativa, enquanto nos demais órgãos analisados, a sua ligação foi não significativa (Figura 10).



Figura 10. Quantificação da ligação de fagos em diferentes tecidos por contagem de colônia. Para contabilizar a variabilidade devido a diferenças nas áreas vasculares dos tecidos, a ligação do fago (em TU / mg) foi normalizada em relação ao fago controle Fd-tet. Barras representam médias \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes (N=2 animais e N=4 retinas) plaqueados em triplicada. Teste estatístico utilizado: ANOVA de 2 fatores; N.S. não significativo; ***, P ≤ 0.001.

4.3 O peptídeo CFFWKFRWMC liga-se aos vasos sanguíneos do nervo óptico, mas não se liga aos vasos sanguíneos da retina

Ao analisar a distribuição do fago CFFWKFRWMC em amostras da retina e no nervo óptico, observamos um resultado bastante interessante: o fago CFFWKFRWMC não apresentou ligação nos vasos sanguíneos da retina, enquanto que nos vasos sanguíneos do nervo óptico foi possível detectar a presença do fago CFFWKFRWMC (Figura 11). É interessante observar que estes são os mesmos vasos sanguíneos, que ao saírem do nervo óptico e entrarem na retina, perdem o marcador molecular para CFFWKFRWKC.



Figura 11. Detecção do fago CFFWKFRWMC em vasos sanguíneos do nervo ótico e do cérebro. Enquanto vasos sanguíneos do cérebro e do nervo óptico apresentam marcação de fagos, vasos sanguíneos da retina não apresentam marcação. Camadas vasculares da retina (R); Camada Nuclear Exterior (CNE) não vascular e, portanto, invisível; coróide (C), com setas ao longo de sua extesão; esclera (E); lente (L); músculo liso (ML); humor vítreo (HV).

Experimentos adicionais utilizando montagem de retinas inteiras (no qual todo o tecido da retina é removido do globo ocular e utilizado nos ensaios de imunofluorescência) confirmaram o mesmo resultado: o fago CFFWKFRWMC consegue chegar aos vasos sanguíneos da retina (condição no qual animal foi administrado com fago CFFWKFRWMC, mas não submetido a processo de perfusão cardíaca para remoção de fagos não ligantes), porém não é capaz de se acumular neste tecido, uma vez que perdemos a marcação do fago após o animal passar por processo de perfusão cardíaca (Figura 12).



Figura 12. Imunomarcação de fago em amostras de retinas inteiras. Animais foram administrados por via intravenosa com quantidades iguais de fago CFFWKFRWMC ou fago controle Fd-tet sob duas condições distintas: após administração dos fagos, animais foram perfundidos (+) com solução fixativa para remoção de fagos não ligantes presentes na circulação sanguínea ou não perfundidos (-). Setas indicam marcação positiva para fagos.

4.4 Estrutura e função do peptídeo CFFWKFRWMC

Para identificar os resíduos de aminoácidos essenciais para a interação entre o fago expressando o peptídeo CFFWKFRWMC e a vasculatura cerebral, realizamos ensaios de alanina *scanning*. Neste ensaio, realizamos a substituição individual de cada um dos resíduos de aminoácidos da sequência CFFWKFRWMC por uma alanina, obtendo assim, um total de 10 diferentes construções de fago (Tabela 3). **Tabela 3.** Versões mutadas do fago apresentando peptídeo CFFWKFRWMC foram geradas através de mutação sitio dirigida na sequência de DNA que codifica para este peptídeo.

| Sequência original | Sequência mutada | | |
|--------------------|---------------------|--|--|
| | | | |
| | A FFWKFRWMC | | |
| | C A FWKFRWMC | | |
| | CF A WKFRWMC | | |
| | CFF A KFRWMC | | |
| CFFWKFRWMC | CFFWAFRWMC | | |
| | CFFWK A RWMC | | |
| | CFFWKF A WMC | | |
| | CFFWKFR A MC | | |
| | CFFWKFRW A C | | |
| | CFFWKFRWMA | | |

Tendo em mãos as 10 construções possíveis, realizamos ensaios in vivo no qual cada construção foi administrada individualmente em camundongos BALB/c e, após 30 minutos na circulação sanguínea, animais foram perfundidos pelo ventrículo esquerdo com solução fixativa e o cérebro de cada animal dissecado e analisado por imunofluorescência para detectar a presença de fago na amostra de tecido (Figura 13). O direcionamento dos fagos à vasculatura cerebral mostrou ser dependente do motivo FRW, uma vez que mutagêneses sítio dirigida neste motivo afetam a capacidade do fago em se ligar aos vasos sanguíneos cerebrais. Deve-se notar que a sequência CFFWKFRWMC escolhida contém, possivelmente, um segundo motivo conservado FFW (CFFWKFRWMC), embora não contenha um resíduo positivo na posição central. Dentro destes dois motivos, mutações que substituíram resíduos de Phe \rightarrow Ala ou Trp \rightarrow Ala aboliram completamente a ligação do fago aos vasos sanguíneos cerebrais, enquanto que mutações no resíduo central do motivo afetaram a ligação do fago, mas não aboliram completamente a capacidade deste em se ligar à vasculatura cerebral. Tais resultados indicam que a primeira e a terceira posição, as quais possuem resíduos de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas são essenciais para a ligação, enquanto a segunda posição (frequentemente ocupada por resíduos de carga positiva) é mais permissiva. Além disso, os resultados sugerem que para que haja ligação do fago CFFWKFRWMC, o peptídeo deve estar em sua conformação cíclica, uma vez que a capacidade de ligação é perdida quando uma das cisteínas é substituída por alanina.



Figura 13. Mutação pontual de cada um dos resíduos de aminoácido da sequência CFFWKFRWMC para alanina. Ensaio de alanina *scanning* revela importância de cada resíduo na ligação do fago aos vasos sanguíneos cerebrais. Amostra de cérebro foram processados pra imunifluorescência utilizando anticorpo anti-bacteriófago (vermelho) e lectina de tomate conjugada com FITC (verde). Setas indicam marcação positiva para fagos.

4.5 Efeito do peptídeo sintético in vivo

Para confirmar que a ligação do fago CFFWKFRWMC aos vasos sanguíneos cerebrais é mediada única e exclusivamente pela sequência peptídica inserida em seu capsídeo, realizamos ensaios de competição *in vivo* utilizando peptídeo CFFWKFRWMC sintético. Antes de serem administrados com fago (CFFWKFRWMC ou controle Fd-tet), camundongos BALB/c foram previamente inoculados com peptídeo sintético CFFWKFRWMC ou peptídeo sintético controle (Figura 14). Ao interagir com o receptor, o peptídeo sintético compete com o fago pelo sitio de ligação no receptor, inibindo a ligação do fago no tecido.



Figura 14. Esquema representando o ensaio de competição. Animais foram previamente administrados com peptídeo sintético CFFWKFRWMC ou peptídeo sintético controle CARAC (70 e 200 pmol de cada peptídeo) e, posteriormente administrados com 10⁸ TU de fago CFFWKFRWMC ou fago Fd-tet, separadamente. Número de fagos ligantes em cada tecido analisado foi guantificado através da contagem de colônias.

Análises dos resultados por contagem de colônia demonstram que a administração prévia do peptídeo sintético cognato inibe a ligação do fago CFFWKFRWMC ao cérebro, sem maiores efeitos em demais tecidos. O peptídeo sintético CARAC não apresentou efeito significante (Figura 15).



Figura 15. Ensaio de competição utilizando peptídeo sintético. Animais foram administrados com peptídeos sintéticos (CFFWKFRWM ou CARAC) anteriormente à administração de fago. Fagos recuperados em cada tecido (em TU/mg) foram normalizados em relação ao fago controle Fd-tet. Barras representam médias \pm erro padrão da média de plaqueamentos realizados em quadruplicata (N=1 animal por condição, sendo N=2 retinas ou metades de cérebro e fígado). Teste estatístico utilizado: ANOVA de 1 fator; N.S. não significante; ***, P ≤ 0.0005.

4.6 Ensaios para identificação do receptor de CFFWKFRWMC

Na tentativa de identificar o receptor de CFFWKFRWMC, recorremos a metodologias clássicas de bioquímica, como cromatografia de afinidade e espetrometria de massa. Para tal, extratos de proteína total foram preparados a partir de amostras de cérebro e rim. Tais extratos foram incubados separadamente em colunas contendo resina previamente acoplada com peptídeo sintético CFFWKFRWMC ou CARAC, seguido de etapas de lavagem e eluição das proteínas ligantes (Figura 16).



Figura 16. Fluxograma representando o ensaio de cromatografia de afinidade. Extratos de proteína total foram preparados a partir de tecidos de cérebro e rim. Tais extratos foram incubados separadamente em colunas contendo resina previamente acoplada com peptídeo sintético CFFWKFRWMC ou CARAC. Após incubação, proteínas ligantes à resina foram eluídas com solução de cloreto de sódio, ureia e dodecil sulfato de sódio (SDS).

Cada fração das diferentes eluições foi analisada em gel de poliacrilamida, no qual foram identificadas cinco bandas proteicas de interesse (Figura 17). Tais bandas foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e processadas para analise por espectrometria de massa.



Figura 17. Identificação do receptor de CFFWKFRWMC na vasculatura cerebral. Cromatografia de afinidade utilizando extratos de rim ou cérebro, em resinas de sepharose-CFFWKFRMWC ou Sepharose-CARAC (controle). As resinas foram lavadas e eluídas com NaCl 1M, Ureia 8M e SDS 1%. Cada amostra de eluição foi analisada em gel de SDS-PAGE e as bandas proteicas indicadas (setas) foram analisadas por espectroscopia de massa para identificar as proteínas presentes. PM= peso molecular.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa de processamento Protein Pilot Software. A análise por este software nos forneceu duas proteínas como principais candidatas: glutamina sintetase (*accession* GLNA_MOUSE) e cadeia leve de clatrina (*accession* CLCA_MOUSE). A glutamina sintetase é uma enzima que desempenha um papel essencial no metabolismo do nitrogênio por catalisar a condensação de glutamato e amônia para formar glutamina é expressa pelos astrócitos, as células mais abundantes do sistema nervoso central

e as que possuem as maiores dimensões. Já a clatrina é uma proteína que desempenha um importante papel no processo de formação de vesículas membranares no interior das células eucariontes, organizada em uma estrutura denominada "trisquélion", a qual possui três pernas, cada uma com uma cadeia polipeptídica pesada e uma leve.

A partir das informações obtidas pelas analises dos dados de espectrometria de massa, obtivemos comercialmente as seguintes proteínas: glutamina sintetase, cadeia pesada de clatrina, cadeia leve A de clatrina e cadeia leve B de clatrina. Para verificar se algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massa é o receptor de CFFWKFRWMC, tais proteínas foram utilizadas em ensaios de ligação de fagos *in vitro*, (Figura 18). Neste ensaio, cada uma das proteínas comerciais foi imobilizada individualmente em poços de placa de 96 poços e incubadas com fago CFFWKFRWMC ou fago controle Fd-tet. Após incubação, os poços foram submetidos a processo de lavagem com PBS para remoção dos fagos não ligantes e, o número de fagos ligantes é contabilizado através da contagem do número de colônias.





Analisando o resultado obtido no ensaio de ligação de fagos *in vitro* (Figura 19), observamos que não houve uma ligação significativa do fago CFFWKFRWMC

em nenhuma das proteínas candidatas analisadas, principalmente quando comparamos os valores obtidos em relação ao controle negativo BSA. Com isso, não foi possível validar as proteínas reveladas pela técnica de espectrometria de massa (glutamina sintetase e cadeia leve de clatrina) como receptores de CFFWKFRWMC. Acreditamos que tais proteínas apareceram nas análises devido a sua abundância no tecido cerebral, em especial a glutamina sintetase, enzima altamente expressão por astrócitos, que são as células mais abundantes do sistema nervoso central.



Figura 19. Ligação do fago CFFWKFRWMC às proteínas recombinantes. As proteínas candidatas e o BSA (controle) foram imobilizados em placa e incubados com os fagos CFFWKFRWMC e Fd-tet (controle, sem inserto). Após lavagem, os fagos ligantes foram quantificados por contagem de colônia. Barras representam desvio padrão da quantificação realizada em triplicata.

4.7 CFFWKFRWMC liga-se às junções de células endoteliais

Como não foi possível identificar o receptor de CFFWKFRWMC pelos métodos bioquímicos tradicionais, decidimos caracterizar a interação do motivo peptídico em células endoteliais cerebrais através de uma análise supramolecular,

utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), identificando e caracterizando a região de interação entre o fago CFFWKFRWMC e seu respectivo receptor.

Partículas de fago derivados da classe M13 são facilmente identificadas em imagens de microscopia eletrônica de transmissão, devido à sua morfologia longa e filamentosa. Com isso, administramos separadamente o fago CFFWKFRWMC e o fago controle (Fd-tet) em camundongos e processamos amostras de tecido cerebral para a técnica de MET. Nos animais administrados com o fago CFFWKFRWMC, observamos estruturas semelhantes a tufos formados por filamentos eletrodensos longos e finos, os quais estão em contato em regiões de junção entre duas células endoteliais (Figura 20A). Estes tufos possuem a morfologia (longos e finos) e o tamanho (~1,000 nm) esperado para uma partícula de fago (Figura 20B).



Figura 20. CFFWKFRWMC liga-se a junções endoteliais. (A) Imagens mostram área contendo aglomerado de fagos em uma região de contato entre duas células endoteliais. (B). Estimativa do tamanho das partículas de fago. CE = célula endoteliai; L = lúmen; F = bacteriófagos; CJ = complexo juncional.

Vale observar que os filamentos estão aderidos à junção das células endoteliais através de uma de suas extremidades; tal resultado vai de acordo com a estrutura da construção de nossa biblioteca de fagos, no qual os peptídeos exógenos foram fusionados à proteína pIII, presente em uma das extremidades do capsídeo proteico da partícula viral (Figura 21).



Figura 21. Esquema ilustrando o resultado observado nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

A formação destes tufos indicando que múltiplas partículas de fago se acumulam nas fendas entre as junções das células endoteliais é um resultado compatível com os dados obtidos anteriormente em análises por microscópio de epifluorescência, no qual detectamos marcações pontuais de fagos ao longo dos vasos sanguíneos cerebrais (Figura 22). Tais aglomerados de fagos não foram observamos em amostras provenientes de animais tratados com fago controle Fdtet.



Figura 22. Imunofluorescência detectando aglomerados do fago CFFWKFRWMC em regiões correspondentes às fendas formadas entre junções de células endoteliais cerebrais.

4.8 CFFWKFRWMC como ferramenta para imageamento in vivo

Para verificar se a sequência peptídica CFFWKFRWMC pode ser utilizada como uma ferramenta para imageamento *in vivo*, realizamos a marcação de fagos (CFFWKFRWMC, Fd-tet e RGD-4C) com corante fluorescente próximo ao infravermelho. Desta forma, ao injetar tais partículas marcadas em camundongos, podemos acompanhar através de equipamento específico para imageamento (IVIS Spectrum Imaging Core) a biodistribuição dos fagos nos diferentes órgãos de um animal ao longo do tempo. Cinco minutos após a administração dos fagos, um forte sinal de epi-fluorescência foi detectado no cérebro de animais administrados com fago CFFWKFRWMC, o sinal de epi-fluorescência aumenta e permanece após 30 minutos de acompanhamento (Figura 23). Nenhum sinal significativo de epi-fluorescência foi detectado no cérebro do animal administrado como o fago controle Fd-tet.



Figura 23. Imagens de detecção de fluorescência infravermelha de animais administrados por via intravenosa com fagos (CFFWKFRWMC, Fd-tet ou RGD-4C) marcados com corante infravermelho IRDye 680RD. Imagens adquiridas em diferentes cursos de tempo mostrando o acúmulo de fluorescência no fígado (acúmulo não específico) e em áreas do cérebro. Barra de calibração da escala de cores deepifluorescência para as imagens é fornecida (direita).

Também realizamos análises do sinal de epi-fluorescência em órgão e tecidos *ex vivo*: animais administrados com fago CFFWKFRWMC apresentaram sinal significativo no cérebro, enquanto o fígado e a retina não apresentaram sinal significativo, quando comparados com o sinal obtido em animais administrados com fago Fd-tet (Figura 24).


Figura 24. Quantificação *ex vivo* da fluorescência infravermelha detectada nos diferentes órgãos. Após administração do fago (CFFWKFRWMC ou Fd-tet) marcado com corante infravermelho, órgãos foram dissecados e analisados. Fluorescência relativa foi realizada com base no fago controle Fd-tet. Barras representam médias ± erro padrão da média de duplicatas de imagens de fluorescência infravermelha (N=1 animal por condição, com N=2 retinas ou metades de cérebro e fígado). Teste estatístico utilizado: Anova de 1 via; N.S., não significativo; ****, P≤ 0.0001.

5. DISCUSSÃO

Uma maior compreensão da heterogeneidade vascular cerebral é uma etapa importante e necessária para o desenvolvimento de novas terapias eficazes que envolvam o SNC. Por isto, os estudos apresentados nesta tese são um passo importante nesta direção: por exemplo, a doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade extremamente debilitante e para a qual não existe cura ou métodos diagnóstico eficientes, havendo necessidade de melhor compreensão dos mecanismos moleculares desta doença para que novas estratégias terapêuticas visando a redução dos danos neurológicos e de convivência social possam ser desenvolvidas. A integridade estrutural da BHE é diretamente influenciada pelo envelhecimento, visto que os fenótipos endoteliais sofrem grandes alterações ao longo da vida, influenciando diretamente a ativação da via amiloidogênica, reduzindo a depuração ou elevando à produção do peptídeo Aβ no cérebro (NELSON et al., 2016; ZENARO et al., 2017). Tendo em vista que a integridade da barreira hematoencefálica é fator importante na DA, e vários estudos sugerem que o seu comprometimento é fator muito relevante no início da doença (ZLOKOVIC, 2011), será interessante avaliar o potencial teranóstico do motivo FRW em doenças neurodegenerativas como o DA. Como o peptídeo se liga a junções endoteliais do cérebro, mas não de outros vasos com barreira, uma possibilidade interessante é que com a perda da integridade da BHE, o peptídeo não se ligue mais. De fato, estudos recentemente realizados pelos pesquisadores do "Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative" demonstraram através de um meta-estudo com mais de 7.700 imagens de cérebros de pacientes com Alzheimer avançado, que mudanças vasculares dentro do cérebro são um marcador precoce da doença, que antecedem os sinais mais avançados de demência e formação de placas (ITURRIA-MEDINA e col., 2016). Por isso, a importância de demonstramos a aplicação do peptídeo FRW in vivo, como será discutido mais adiante.

É interessante enfatizar que o motivo FRW foi seletivo para os vasos sanguíneos do cérebro, não apresentando ligação em vasos sanguíneos em outros órgãos e tecidos que também apresentam barreiras endoteliais específicas separando o sangue circulante e o tecido adjacente. Nos testículos, podemos encontrar a coexistência de junções oclusivas, desmossomos e junções comunicantes especializados que criam um microambiente único para a finalização da meiose e subsequente desenvolvimento de espermátides em espermatozoides via espermiogênese (DOLORES & CHENG, 2015); nos intestinos, a barreira é essencial contra substâncias nocivas e patógenos do meio externo, sendo composta por camada de muco, camada epitelial e camada da lâmina própria subjacente, bem como presença de junções oclusivas que conectam as células epiteliais intestinais e regulam a permeabilidade paracelular (KÖNIG *et al.*, 2016). Em resumos, demonstramos que existem diferenças moleculares importantes entre estas barreiras.

A observação de que o fago exibindo a sequência CFFWKFRWMC não apresentou ligação em vasos sanguíneos na retina foi um resultado bastante surpreendente, pois implica em uma diferença anteriormente desconhecida entre duas barreiras hematoneurais: a barreira hematoencefálica e a barreira hematoretiniana. Historicamente, é de amplo conhecimento que a barreira hematoretiniana apresenta propriedades semelhantes à barreira hematoencefálica, sendo ambas as barreiras responsáveis pela manutenção do ambiente do tecido neural através da regulação das concentrações de íons, permeabilidade à água, entrega de aminoácidos e açúcares. (CAMPBELL & HUMPHRIES, 2012). Além disso, existe uma semelhança notável entre os processos imunológicos na BHE e na BHR: as células envolvidas ambas as barreiras proporcionam "locais imunológicos privilegiados", regulados pelo sistema imune através de mecanismos semelhantes ambas as barreiras participam na repulsão / atração e transmigração de leucócitos do sangue para o tecido nervoso de maneira análoga (SCHLOSSHAUER & STEUER, 2005). Por isso, é de grande importância identificamos e caracterizarmos o receptor molecular do motivo FRW, para entendermos melhor as diferenças moleculares entre estas barreiras. Analisando dados na literatura, encontramos diferentes níveis de expressão de claudinas entre estas duas barreiras. As claudinas são uma família de proteínas que são os componentes mais importantes das juncões oclusivas. exercendo papel fundamental na seletividade е permeabilidade do tecido (IRUDAYANATHAN et al., 2016). Ao menos 24 famílias de claudinas foram identificadas; cada tecido expressa predominantemente um subconjunto de claudinas, de acordo com sua a função fisiológica, Como os dados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram a região de interação do peptídeo CFFWKFRWMC (região de contato entre duas células endoteliais), um candidato interessante como receptor deste peptídeo pode ser uma claudina: mais especificamente a claudina-5 e a claudina-3. A claudina-5 é mais abundante em junções oclusivas entre células endotelias do cérebro e a claudina-3 é expressa em junções oclusivas da BHE, mas ausente em junções oclusivas da BHR (LUO, 2011). Estudos futuros poderão responder esta questão.

Pelo fato da identificação do receptor do peptídeo CFFWKFRWMC ser ainda uma questão que permanece em aberto, utilizamos microscopia eletrônica de transmissão e fomos capazes de visualizar o acúmulo de partículas de fago em regiões fendas intercelulares formadas entre junções de células endoteliais cerebrais, fornecendo um direcionamento para os estudos de identificação do receptor: provavelmente o peptídeo CFFWKFRWMC liga-se a proteínas ou moléculas associadas às junções oclusivas entre células endoteliais do cérebro (STAMATOVIC *et al.*, 2016). De acordo com o nosso conhecimento, este é primeiro trabalho que combina técnicas de *phage display in vivo* e microscopia eletrônica de transmissão, sendo o primeiro resultado mostrando a localização de partículas de fago *in vivo*.

Vale comentar que nossos estudos foram realizados inicialmente na linhagem de camundongos albinos BALB/c. Por esta razão, nos perguntamos se mutações específicas desta linhagem de camundongo poderiam ser responsáveis pela diferença de ligação do fago CFFWKFRWMC entre os vasos sanguíneos da retina e do cérebro. Por isso, repetimos os experimentos de migração de fago com a linhagem de camundongos C57BI/6J, visualmente competente, obtendo resultados semelhantes. Portanto, a diferença de ligação do fago exibindo peptídeo CFFWKFRWMC nos vasos sanguíneos na retina e do cérebro é provavelmente decorrente de diferenças moleculares entre as células endoteliais das barreiras hematoneurais destes dois tecidos, e não devido a mutações genéticas ou deficiências fisiológicas na retina (como desdobramentos da retina, células inflamatórias autofluorescentes e degeneração de fotoreceptores) de camundongos da linhagem BALB/c (BELL *et al.*, 2015). Até onde sabemos, este é potencialmente o primeiro alvo molecular presente na barreira hematoencefálica e que não está presente nos vasos sanguíneos da retina.

Com relação à estrutura e função da sequência CFFWKFRWMC, observamos que alguns resíduos de aminoácidos são mais importantes para a ligação do fago à

vasculatura cerebral do que outros resíduos. Mais especificamente, nossos resultados demonstram que a primeira e a terceira posição do motivo FRW, as quais possuem resíduos de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas são essenciais para a ligação, enquanto a segunda posição é mais permissiva. Além disso, observamos que a conformação cíclica do peptídeo é importante na ligação do fago aos vasos sanguíneos cerebrais, indo de acordo com resultados vistos da literatura de que a ligação dissulfeto parece ser crítica para estabilização da conformação e aumentar eficiência de ligação entre peptídeo e receptor (COLOMBO, *et al.*, 2002; KOIVUNEN *et al.*, 1995).

Por fim, a utilização de peptídeos para o desenvolvimento de fármacos apresenta uma séria de vantagens, tais como fácil obtenção por síntese guímica, alta especificidade e baixa toxicidade, tornando-se alternativa viável para terapêuticas utilizando pequenas moléculas (OTVOS, 2008; LAU & DUNN, 2018). Por isso, os resultados dos ensaios de inibição utilizando o peptídeo sintético cognato são importantes. O fato de o peptídeo sintético ter inibido a ligação do fago CFFWKFRWMC à vasculatura cerebral, confirma que o mesmo é bioativo. Em ensaio "proof-of-concept", demonstramos que o peptídeo CFFWKFRWMC pode ser utilizado para imageamento in vivo. Em resumo, demonstramos nesta tese o potencial teranóstico deste peptídeo como uma ferramenta não invasiva de imageamento in vivo, indicando que o peptídeo CFFWKFRWMC apresenta um potencial significativo para terapias direcionadas e imageamento molecular no cérebro (YAO et al. ,2016). Juntos, estes resultados indicam ser possível o desenvolvimento de versões peptideomiméticas (sintéticas) para propostas terapêuticas; versões peptideomiméticas de CFFWKFRWMC permitiriam uma melhor avaliação de sua possível interação com a vasculatura cerebral.

6. CONCLUSÃO

Nestes estudos, demonstramos mais uma vez a versatilidade da tecnologia do phage display para varrer vasculaturas em busca de marcadores moleculares expressos seletivamente nos vasos sanguíneos de diferentes órgãos e tecidos. Identificamos e caracterizamos o motivo FRW (representado pelo peptídeo CFFWKFRWMC) como um ligante específico para vasculatura cerebral, mas não de outros tecidos contendo uma barreira endotelial especializada, demonstrando a existência de diferenças moleculares importantes entre as diferentes barreiras endoteliais encontradas nos organismos. Análises quantitativas (ensaios de quantificação por contagem de colônias) е qualitativas (ensaios de imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão) indicaram а seletividade do peptídeo CFFWKFRWMC em células endoteliais da barreira hematoencefálica, enquanto que células endoteliais da barreira hemato-retiniana não apresentaram tal ligação, sugerindo uma importante diferença molecular entre estas duas barreiras hemato-neurais. Esta diferença poderá ser explorada como importante alvo terapêutico e diagnóstico para doenças humanas.

Estudos de estrutura e função do peptídeo CFFWKFRWMC utilizando ensaio de alanina scanning reforçaram a importância dos dois resíduos aromáticos na ligação aos vasos sanguíneos (primeiro e segundo resíduo do motivo FRW), ao mesmo tempo em que indicaram a permissividade do resíduo central (comumente um resíduo com carga positiva) para a ligação entre fago e vasos sanguíneos cerebrais. Juntos, o ensaio de competição in vivo utilizando peptídeo sintético cognato e o ensaio de imageamento in vivo utilização partículas de fago marcadas formas possibilidade utilizar sintéticas peptídeo demonstram а de do

CFFWKFRWMC como uma ferramenta para imageamento molecular e desenvolvimento de terapias direcionadas para o cérebro e sistema nervoso central.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R.Y., Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of Disease 37: 13–25.

Aird, W.C. Endothelial cell heterogeneity, **Critical Care Medicine**, 31(4):S221-S230, April 2003.

AIRD, W.C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 3: 1392–1406, 2005.

Aird, WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circ Res**, 100(2):158-73, Feb 2, 2007.

Aird, W.C. Endothelial cell heterogeneity. **Cold Spring Harb. Perspect. Med**, 2, a006429, 2012.

Almeida-Souza, F. *et al.* Morinda citrifolia Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO pro¬duction and death of Leishmania amazonensis amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. **Nitric Oxide**, 58:51-8, 2016.

Arap, W., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. **Science**, 279: 377-380, 1998.

Arap W., Kolonin M.G., Trepel M., *et al*: Steps toward mapping the human vasculature by phage display. **Nat Med**, 8:121–127, 2002.

Arap, M.A *et al.* Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. **Cancer Cell**, 6:275–284, 2004.

Azizoglu, D.B. *et al.* Blood vessel crosstalk during organogenesis-focus on pancreas and endothelial cells. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 5(5):598-617, 2016

Bábíčková J, Tóthová Ľ, Boor P, Celec P. In vivo phage display--a discovery tool in molecular biomedicine. **Biotechnol Adv**, 31(8):1247-59, 2013.

Barnhart, K.F. *et al.* A peptidomimetic targeting white fat causes weight loss and improved insulin resistance in obese monkeys. **Sci Transl Med**, 3:108ra112, 2011.

Begley DJ, Brightman MW: Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. **Prog Drug Res**, 61:39–78, 2003.

Bell, B. A., *et al.* The BALB/c mouse: Effect of standard vivarium lighting on retinal pathology during aging. **Experimental eye research**, 135, 192-205, 2015.

Campbell M., Humphries P. The Blood-Retina Barrier. Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers. Advances in Experimental Medicine and Biology. 763:70-84, 2012.

Cardo-Vila, M. *et al.* From combinatorial peptide selection to drug prototype (II): Targeting the epidermal growth factor receptor pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 5118-5123, 2010.

Castro P.R., *et al.* Cellular and Molecular Heterogeneity Associated with Vessel Formation Processes. **Biomed Res Int**, 6740408, 2018

Choi, Y.K., Kim, J.H., Kim, W.J., Lee, H.Y., Park, J.A., Lee, S.W., Yoon, D.K., Kim, H.H., Chung, H., Yu, Y.S., Kim, K.W. AKAP12 regulates humanblood-retinal barrier

formation by downregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha. **J. Neurosci**. 27, 4472-4481, 2007.

Choi, Y.K., Kim, K.W. Blood–neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. **BMB Rep**, 41, 345–352, 2008.

Colombo, G. *et al.* Structure-Activity Relationships of Linear and Cyclic Peptides Containing the NGR Tumor-homing Motif. **The Journal of Biological Chemistry**, 277, 47891-47897, 2002.

DeFouw D.O. Structural heterogeneity within the pulmonary microcirculation of the normal rat. **Anat Rec**, 221: 645–654, 1988.

Dobroff, A.S., *et al.* Towards a transcriptome-based theranostic platform for unfavorable breast cancer phenotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 113:12780–12785, 2016.

Dolores, D.M. & Cheng C.Y. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. **Endocrine reviews**, vol. 36,5: 564-91, 2015.

Dong, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. **Theranostics**, vol. 8,6 1481-1493, 2018.

Eelen G., de Zeeuw P., Simons M., Carmeliet P.. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. **Circ Res**, 116(7):1231-44, 2015

Engelhardt, B. & Sorokin, L. The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Semin Immunopatho**, 31:497–511, 2009.

Falcon, B.L. *et al.* Increased vascular delivery and efficacy of chemotherapy after inhibition of platelet-derived growth factor-B. **Am. J. Pathol**, 178:2920-30, 2011.

Fischer, A., Zalvide, J., Faurobert, E., Albiges-Rizo, C. & Tournier-Lasserve, E. Cerebral cavernous malformations: from CCM genes to endothelial cell homeostasis. **Trends Mol. Med.**, 19, 302–308 2013.

Garcia, C.M., Darland, D.C., Massingham, L.J., D'Amore, P.A. Endothelial cellastrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. **Brain Res. Dev.** 152, 25-38, 2004.

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

Giordano, R.J. *et al.* Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. **Chem. Biol.**, 12, 1075-1083, 2005.

Giordano, R.J. *et al.* Targeted induction of lung endothelial cell apoptosis causes emphysema-like changes in the mouse. **J Biol Chem**, 283:29447-60, 2008.

Giordano, R.J., Edwards, J.K., Tuder, R.M., Arap, W., Pasqualini, R. Combinatorial Ligand-directed Lung Targeting. **Proceedings of the American Thoracic Society**, Vol 6: 411-415, 2009.

Giordano, R. J. *et al.* From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): Targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 5112-5117, 2010.

Guo, S. *et al.* Assays to examine endothelial cell migration, tube formation, and gene expression profiles. **Methods Mol Biol**, 1135:393-402, 2014.

Hajitou, A. *et al.* A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. **Cell**,125: 385-398, 2006.

Helms H.C. *et al.* In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. **J Cereb Blood Flow Metab**, 36(5):862-90, 2016.

Huang, X. *et al.* Diversity in human placental microvascular endothelial cells and macrovascular endothelial cells. **Cytokine**, 111:287-294, 2018.

Irudayanathan, F.J., Trasatti, J.P., Karande, P., Nangia, S. Molecular Architecture of the Blood Brain Barrier Tight Junction Proteins–A Synergistic Computational and In Vitro Approach. J. Phys. Chem. B, 120, 77–88, 2016.

Jat, P. S., Noble, M. D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., and Kioussis, D. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:5096-5100, 1991.

Joko, T., Shiraishi, A., Kobayashi, T., Ohashi, Y., Higashiyama, S. Mechanism of Proliferation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. **Cornea**. 36 Suppl 1:S41-S45, 2017.

Keaney, J. & Campbell, M. The dynamic blood-brain barrier. **FEBS J**, 282(21):4067-79, 2015.

Kisler, K., Nelson, A.R., Montagne, A. & Zloko,vic, B.V. Cerebral blood fow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurosci**, 18, 419– 434, 2017. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. **Biotechnology**, 13(3):265-70, 1995.

Koivunen, E. *et al.* Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. **Nat. Biotechnol.**, 17:768-74, 1999.

Kolonin, M.G., Saha, P.K., Chan, L., Pasqualini, R., Arap, W. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. **Nat Med**, 10(6):625-32, 2004.

König, J. *et al.* Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. **Clinical and translational gastroenterology**, 7(10), e196, 2016.

Langley, R. R., Ramirez, K. M., Tsan, R. Z., Van Arsdall, M., Nilsson, M. B., and Fidler, I. J. Tissue-specific microvascular endothelial cell lines from H-2K(b)-tsA58 mice for studies of angiogenesis and metastasis. **Cancer Res**, 63, 2971-2976, 2003.

Lau, J.L., Dunn, M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Dunn Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 26:2700–2707, 2018.

Lewis V.O. *et al.* BMTP-11 is active in preclinical models of human osteosarcoma and a candidate targeted drug for clinical translation. **Proc Natl Acad Sci U S**, 114(30):8065-8070, 2017.

Lorusso D. *et al.* Phase II study of NGR-hTNF in combination with doxorubicin in relapsed ovarian cancer patients. **Br J Cancer**, 107:37–42, 2012.

Luissint A.C., Artus C., Glacial F., Ganeshamoorthy K., Couraud P.O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated. **Fluids and Barriers of the CNS**, 9:23, 2012.

Luo, Y. Differential Expression of Claudins in Retinas during Normal Development and the Angiogenesis of Oxygen Induced Retinopathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 52, No. 10, 2011.

Madelaine, R. *et al.* MicroRNA-9 Couples Brain Neurogenesis and Angiogenesis. **Cell reports**, 20:1533-1542, 2017.

Michaloski, J.S., Redondo, A.R., Magalhães, L.S., Cambui, C.C., Giordano, R.J. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. **Sci Adv**, 2:e1600611, 2016.

Nelson, A.R., Sweeney, M.D., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, 1862(5):887-900, 2016.

Ozawa, M.G. *et al.* Beyond receptor expression levels: the relevance of target accessibility in ligand-directed pharmacodelivery systems. **Trends Cardiovasc Med**, 18:126-32, 2008.

Otvos, L.Jr. Peptide-based drug design: here and now. **Methods Mol Biol**, 494:1-8, 2008.

Pasqualini R., Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraryies. **Nature**, 380:364–366, 1996.

Pasqualini, R. *et al.* Targeting the interleukin-11 receptor α in metastatic prostate cancer: A first-in-man study. **Cancer**, 121:2411-2, 2015.

Paolinelli, R., Corada M., Orsenigo F., Dejana E. The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? **Pharmacological Research**, 63: 165–171, 2011.

Potente, M. & Mäkinen, T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease, **Nature Reviews | Molecular Cell Biology**, 18(8):477-494. Aug 2017.

Pulzova, L., Bhide, M.R., Andrej, K. Pathogen translocationacross the blood-brain barrier. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 5: 203–213, 2009.

Rajotte D., Arap W., Hagedorn M., *et al.* Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. **J Clin Invest**, 102:430–437, 1998.

Rajotte D., Ruoslahti E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. **J Biol Chem**, 274:11593–11598, 1999.

Ramasamy, S.K. *et al.* Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 32:649-675, 2016.

Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Endocr Rev**, 24:389–427, 2003.

Rodi, D.J., Mandava, S., Makowski, L. Filamentous Bacteriophage Structure and Biology. **Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery**, 1-61, 2005.

Schlosshauer, B. & Steuer, H. The Blood-brain Barrier and the Outer Blood-retina Barrie, **Medicinal Chemistry Reviews** - Online (Discontinued) 2: 11, 2005.

Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. **Science**, 249, 386-90, 1990.

Sidman, R.L. *et al.* The peptidomimetic Vasotide targets two retinal VEGF receptors and reduces pathological angiogenesis in murine and nonhuman primate models of retinal disease. **Science translational medicine**, vol. 7,309, 2015.

Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Adv Drug Deliv Rev**, 58:1622-54, 2006.

Silvia, T. & Engelhardt, B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. **Journal of cell biology**, vol. 209,4: 493-506. 2015.

Shim J.W. & Madsen J.R. VEGF Signaling in Neurological Disorders. Int J Mol Sci, 19(1):275. 2018

Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, 228, 1315-7, 1985.

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

Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. **Tissue barriers**, 4(1), e1154641, 2016.

Staquicini, F.I. *et al.* Systemic combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. **J Clin Invest**, 121:161-73, 2011.

Sugiyama, Y., Kusuhara, H., Suzuki, H. Kinetic and biochemical analysis of carriermediated efflux of drugs through the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: importance in the drug delivery to the brain. **J. Control. Release**, 62, 179-186, 1999.

Tam, S.J., Watts, R.J. Connecting Vascular and Nervous System Development: Angiogenesis and the Blood-Brain Barrier. **Annu. Rev. Neurosci**., 33:379–408, 2010.

Tang, F.H.F, Staquicini, F.I., Teixeira, A.A.R., Michaloski, J.S., Namiyama, G.M., Taniwaki, N.N., Setubal, J.C., da Silva, A.M., Sidman, R.L., Pasqualini, R., Arap, W., Giordano R.J. A ligand motif enables differential vascular targeting of endothelial junctions between brain and retina. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116(6):2300-2305, 2019.

Trepel, M., Arap, W., Pasqualini, R. Exploring vascular heterogeneity for gene therapy targeting. **Gene Ther**, *7*, 2059-60, 2000.

Wilhelm, I., Nyúl-Tóth, Á., Suciu, M., Hermenean, A., Krizbai, I.A. Heterogeneity of the blood-brain barrier. **Tissue Barriers**, 4:e1143544, 2016.

Wittko-Schneider I.M., Schneider F.T., Plate, K.H. Cerebral angiogenesis during development: who is conducting the orchestra? **Methods Mol Biol**;1135:3-20, 2014.

Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P: Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. **Cell Tissue Res**, 335:75–96, 2009.

Yao, V. *et al.* Ligand-targeted theranostic nanomedicines against cancer. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, 240, 267-286, 2016.

Zenaro, E., Piacentino, G., Constantin, G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, 107:41-56, 2017.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A. PEAR: a fast and accurate Illumina paired-end read merger. **Bioinformatics**. 30:614–620, 2014.

Zhao, Z., Nelson, A.R., Betsholtz, C. & Zlokovic, B.V. Establishment and dysfunction of the blood–brain barrier. **Cell**, 163:1064–1078, 2015.

Zlokovic, B.V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. **Nat Rev Neurosci**, 3;12(12):723-38, 2011.

Zurita, A.J *et al.* Com binatorial screenings in patients: the interleukin-11 receptor alpha as a candidate target in the progression of human prostate cancer. **Cancer Res**, 64:435–439, 2004.

8. ANEXOS

Supplementary Data Alignment File

Next generation sequencing of all phage recovered from each brain area. A total of 838,448 reads were obtained by Illumina using the MiSeq platform (see online methods for details). The paired-end reads were assembled, inserts trimmed and only sequences with two or more reads were used for further analysis (Dias-Neto *et al., PLoS One.* **4**(12):e8338, 2009). The remaining 803,072 reads (hemispheres 391,523 reads, olfactory bulb 216,213 reads, cerebellum 195,336 reads) encoded a total of 3,074 unique peptides. Peptides were then filtered using the motif [FYW][ARKH][FYW], resulting in 1,021 peptides.

Alignment file of 1021 peptides containing the [FYW][ARKH][FYW] motif:

| SWYSYRWI | VWVHFRWI | YFIRYRWM | IYLFFRYI |
|----------|----------|-----------|-----------|
| MYHNFAWY | YDNFRWIK | FFWKFGWM | SWMHFRWI |
| YYAFFRWH | IWASWRFW | VWFNFRFA | VYVFWRYV |
| IYSFFAWR | RYIDFRWA | FFWKFRRM | LYVNFAWW |
| FFWMFRWI | VYVGWRWS | FFLQFRWF | SWCNWRWE |
| SWFDFRWH | VWFKFRYV | FYIHYKWF | SYSNWHWW |
| VYLDFKWQ | VYLNWRWG | VWADFRWY | VYNFFRWV |
| VWVSYRWV | IYVAFRWR | IYVAYKWI | RYSGFRWA |
| IYFQYHWV | LYVAFKWV | FFYMFRWT | FFQDFRWW |
| TWVNFRYV | YFAAWRWG | WYELYRWT | LYVNFAWQ |
| VFWKFRWM | YFAAWRWW | VYILYRWI | YVGFRWLM |
| FYWKFRWM | RHIDFRWS | FFWRFRWM | VRHNFRYL |
| LYANFAWR | RLNFRWVI | FWVDFRYT | MWCSFRWI |
| VWVSYRWS | GYVYFRWV | FFLHFRWF | YLNWRWSV |
| VWHSYRWP | YFWNFRWW | LYVDFAWR | MWVAWRWV |
| YFDWHYVR | YFWKFRWM | GWVSFRWS | WYGFRYLA |
| MYSAWKWV | VFADFRWY | WWQFFRWV | YCAAWRWW |
| FYSGFRWR | YSGFRYFD | FYHGFRWR | IYLGFRYY |
| HWAGYRWV | GYRDYHWR | VWMNYRWA | FWHSYRWI |
| YWFAFRYS | VWVSFRWC | MFDNVFRY | LYVNFAWV |
| EWVSFRWS | IWVDFRWT | FFSDFRWY | IWFNFRYV |
| FYVHFRWL | FWDNFRWQ | MYDLFRWR | IWIDFRWK |
| YFAYFRWV | VWSYFRWV | RYVLFRWV | IWVVFRWK |
| IWFGFRWK | VWVDFHWL | YFYNYRWW | FFAFPRWY- |
| LYVIFAWR | YYVDWRYE | DYVNFAWR | VFVSFRWW |
| FWKDWRWV | SLSDFRWH | MWFAFRWV | VWFDYRWR |
| VWIWWRWV | LWLRYRFM | WDGFRYWA | AWFNFRYV |
| SYVYFRWV | YFYNYRWV | FFADFRWH | FFWNFRWR |
| LSVNFAWR | FFWKFRWV | MFFRFRWW | LWVAWRWV |
| TYYRFMRS | VSVSFRWS | LWRGFRWI | YFSAWRWW |
| RWSMFRWY | YWSMFRWS | NYRDYHWR | VYSAYHWL |
| WFGRFRWW | VWVSFRWG | VYYSWKWD | YYRLFAWR |
| AYRHWKWV | FFADYRWR | RCSAWKWW | NWSNFRWY |
| RYTGFRWE | FYSRYRWR | MYSEYRWS | FAFHVQGQ |
| IWSNWRWV | VWRNYRWV | YAIWHWEP | AYSHWKWV |
| RYAAFHWW | FWVWYRWM | LYVSFAWR | VWVSFRWN |
| VWVGFHWV | VLMNYRWV | FYRYFSWV- | LYLNFAWR |
| VWVDFHWS | RYSAWKWS | RYAGFAWH | VYVNFAWR |
| FYDRFKWV | YWSMFRWE | FWYSFRWI | VWFNFRWK |
| VYRHWKWV | LWRGFRYY | VWANFRWI | VWWKYVYR |
| FYPVFRWW | FWYRWRFY | VCVDFHWV | VWFHFRYM |

| 'M | F'WASYRWF' |
|---|--|
| 10 | FYAGFRWV |
| ~ /L | WYDSFRWT |
| IT | IFADFRWY |
| IO | VWANFRWY |
| W | VI.NFRVVV |
| TV | |
| 7T | |
| VT | IIGFFIWV |
| | |
| VI | |
| | TYYRFMWN |
| "E"P | FFWKYRWM |
| /Y | F'F'YDF'HWV |
| /V | IWVDF'RWM |
| /V | E'WVSWRE'W |
| /L | SWSDFRWY |
| /R | VFIRFRWL |
| 'HYV | TYYRFLWS |
| IY | RYSAWKWV |
| (WV | FYSVFRWS |
| FISTD | WYSGWKWI |
| W | VYQGFHWE |
| W | FYVGFKWR |
| W | VWANFRWP |
| /I | IWVDFHWK |
| /I | SWRNWRWV |
| IS | VWMSFRWS |
| IS | VWFAFRYL |
| V | IYMRFAWS |
| | |
| W | FWWRYVYR |
| W 70V | FWWRYVYR LYFGYRWV |
| IW PQV IV | FWWRYVYR LYFGYRWV |
| ₩ ₽QV ₩ | FWWRYVYR LYFGYRWV VYKFFKWW- FYAGYRWM |
| W FQV IV W | FWWRYVYR LYFGYRWV VYKFFKWW- FYAGYRWM FFAEFRWY |
| W PQV IV W IV IV | FWWRYVYR LYFGYRWV VYKFFKWW- FYAGYRWM FFAEFRWY |
| W PQV IV IV IY IY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FFAEFRWY FYFNFAWV |
| W——— ?QV—— ?W——— ?W——— IV——— ?Y——— ?Y——— | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV FYFNFAWV HWAGYRWW |
| W YQV IV IV IY YY IW IW | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV HWAGYRWW VWMNFRWV |
| W YQV IV IV IY IY W IW | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV HWAGYRWW VWMNFRWV VSMNYRWV |
| W PQV IV IV IY IY IW IW | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV HWAGYRWW VWMNFRWV VSMNYRWV FFWNFRWM |
| W PQV IV IV IY IY IW IV IE | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV HWAGYRWW VWMNFRWV VSMNYRWV FFWNFRWM VYANFAWW |
| W PQV IV IV IY IY IW IV IE IVI | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV HWAGYRWW VWMNFRWV VSMNYRWV FFWNFRWM |
| W PQV IV IV IY IY IW IV IV IV IVI IVI | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W VQV W W W W W W W1 Y1 W1 W1 W1 W1 W1 W1 | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY W W W YY W YY W YY W YY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY W | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YW YY YY YY YY YY WW WW WW WU WU YU YU <td>FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV </td> | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W PQV W | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAFFRWY FYFNFAWV VWMNFRWV VSMNYRWV FFWNFRWM IFVQFHWV IYIGYRWW SWMHFRWW SFAAWRWW LYVNFAWR |
| W YQV YV YY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YYR YYR | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY W W W W W W W W W W W W WF WF WF WF WF WF WF WF WQ W | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY YY W YY W YY W YY W YY YY YY YY YY YY YYR YYR YQ W YW YYR YYR | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY YY W W W W W W W W W W W W WF YR YR YYR YYR W WQ W YS | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY W W W W W W W W W W W W W YR YR YR YR YR YYR YQ W YZ YZ | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV VWMNFRWV VSMNYRWV VSMNYRWV |
| W PQV W | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV VWMNFRWV VSMNYRWV VSMNYRWV |
| W YQV YV YY YYR YYR YY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV VWMNFRWV VWMNFRWV VSMNYRWV |
| W YQV YV YY YYR YYR YYR YY | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV |
| W YQV YV YY YY W YY W YY W YY YY YY YYR YYR YYR YQ YYR YY YY- | FWWRYVYR LYFGYRWV FYAGYRWM FYAGYRWM FYFNFAWV VWMNFRWV VWMNFRWV VYANFAWW |

| FWLRYRFM |
|-----------|
| VGANFRWQ |
| FYSGFRWL |
| TWVDFRWT |
| YFWNFRWO |
| FWTNFRWV |
| |
| |
| |
| VILDFRIS |
| SFADFRWY |
| HYIDF'RWR |
| YSDWHFFP |
| FFSRYRWY |
| AYYIFHWV |
| EYLLYHWV |
| LYAGFRWL |
| FYSGFAWR |
| VYFAFHYV |
| WFRDFRWY |
| WYGFRYWV |
| FRFFISTD |
| YFTAWRWW |
| VWMNYRWW |
| |
| |
| |
| |
| MWVSFRWS |
| VWANF'RWS |
| FYVRFRFV |
| FFTSWRWW |
| WVNFRFQV |
| IYLDWAWV |
| SYHDFRYW |
| LFINYRWV |
| FCADFRWY |
| FWHSYRYY |
| RYSDYRWW |
| FYSVFRWW |
| VCMNYRWV |
| SI.RNWRWE |
| |
| |
| |
| |
| VFWRFKWF |
| SIRDIRWR |
| AYHGF'RWR |
| FYSYFRYI |
| HANWHWEP |
| IWWKYVYR |
| VYSGFRWI |
| IWANFRWQ |
| FYIGYRWW |
| YVHFRWEV |
| FYTSFKWS |
| FFTDFRWY |
| VWMNYRWT |
| RYTGFHWV |
| |
| |
| |
| VWVYF'HWV |

| SYYRFMWS | AWMNYRWV |
|------------|-------------|
| RYFSFRWQ | VYHGFRWS |
| SWMHFRWK | TWVDFRWK |
| MWWSFRYV | FFYDFHWE |
| SYRHWKWV | FKYMSAVW |
| FWSDFRWH | LYHHFRWS |
| FWANFRWH | VWVSFRWS |
| GWMNYRWV | YFAAWRWS |
| | |
| | EEMKEBIW |
| | |
| | |
| | |
| | VIHSFRWF |
| VISGERWM | VWINFRWQ |
| WFYNYRWH | YIDFRFVL |
| VWANFRWE | MYVNFAWR |
| VWSLFRWA | LYVGFKWW |
| LYVNFRWL | LWLRFRWD |
| FFWKFRGM | FFWKFRWS |
| YVDYRYVI | FYVSWRWY |
| YFAYTPWN- | VWRDFRWK |
| SWSEFRWH | LYDNFAWR |
| FFADFRWN | YFASWRWW |
| YSGFRWFE | IYHGFRWR |
| GIAAGFAF | VYLEYRWL |
| RYTGFRWI | YLAAWRWW |
| VWMNYRWH | IYINYHYS |
| VWESFRWS | SWFEFRWR |
| FWWKYVYM | |
| | VWHSYRWS |
| | |
| | |
| | |
| CENKEDRM | |
| | |
| VYHGFRWG | YWAGYRWW |
| LWVPFRWV | FRWKYVYR |
| E'WISE'HWE | YF'NF'RWVH |
| WFTYFRWV | YFDFRYAL |
| VWMNYRWM | VWGSFRWS |
| LYFDWAWT | VYVRWHWA |
| FWWKYVYR | CFAAWRWW |
| YSRFRWTV | SWMHFRWA |
| VYYGFRWS | RYSSFRWQ |
| FYAGYRWV | VYEMYRWR |
| LWVSFRWF | VYAGYRWV |
| LYVHFAWR | VYHGFRWR |
| VAYAFGFG | FLADFRWY |
| LYIGWRFI | VYSGFRWK |
| IYRIWRWI | RYIDFRWK |
| YWFMFRYT | YYSLWAWR |
| VYHVFRWW | NWFMYRFF |
| FVSEVRWI | |
| | |
| | |
| | אניעדעאאריי |
| | |
| FIGLKM2A | |
| | |
| YFATWRWW | VWVSFRWW |
| LYINF'AWR | DYVNFRWR |
| WYVAFRYT | WSDFKWFA |

| LWASWRFW |
|------------|
| VWVIFRWS |
| YFADFRWY |
| VYSVFRWH |
| LWYSWHWV |
| SYYGYAWR |
| FYSOFAWH |
| AYI.KF'RWI |
| TYLDFRWV |
| VWVSFRWR |
| |
| |
| |
| |
| |
| FFADFRWQ |
| YVGFRYYV |
| IWVRWRWE |
| FFDDFRWY |
| VWANFRWL |
| WWIRFRFV |
| VCVSFRWS |
| FWIMYRYV |
| VRVSFRWS |
| VYLKFRWL |
| AYRYWKWV- |
| VYRNWHWG |
| WFAYMRWF- |
| IYTSFKWY |
| VYHFFRFI- |
| VWSNFRYV |
| YYWKYRWL |
| VWRNFRYE |
| YYSGFHWS |
| TYI.SWHYV |
| HYLSFRWV |
| SWSDFRWS |
| |
| |
| WEDWDWCK |
| |
| |
| |
| |
| KILGFKWA |
| VFSMWHWT |
| VWPNF'RWQ |
| PNGLFAWA |
| LWANFRWQ |
| NWANFRWQ |
| VYWDYRWI |
| VWVDFRWV |
| FFYDFRWK |
| RYIVFRWS |
| GYFAWHWV |
| LFYDFHWV |
| YFIMFRWI |
| RYIDFRWP |
| SYYGYAWI |
| HFAAWRWW |
| HYIDFRWS |
| NWVDFRWK |
| |

| MYLNFKWY |
|------------|
| GYIDFRWS |
| FYLHFRYV |
| FWYSYRWS |
| VWINYRWV |
| QYYGFRWV |
| WYGFRYWA |
| FYSGFHWK |
| FYFRFRWF |
| IYAFYRWV- |
| AWVLFRWY |
| LCVNFAWR |
| FFAHFRWY |
| YVSWHYVL |
| YANWHWEP |
| LYFGFRWS |
| RWMHFRWI |
| RWYEFRWI |
| IWMNYRWV |
| VWLNFRYV |
| LYGNFAWR |
| FYAGYRWA |
| FFWKFRWR |
| WSNWAYYD |
| IWSRYRYT |
| YYARFAWR |
| VWYNFRYV |
| SYCDYHWR |
| IYAHFAWV |
| RYIDFRWY |
| TYYRFMWS |
| FFVRYRWF |
| AYRHWKWA |
| AWHNFRYL |
| FYSAFRYV |
| MYLNFAWR |
| FWAGWRFW |
| RFIDFRWS |
| VYQDFKWS |
| EYLLFAWR |
| TWYRFAWD |
| VRMNYRWV |
| VWFQFRF1 |
| IWVDFRWW |
| VCHGFRWR |
| VYAMYRWS |
| WVGFRYVY |
| F'WLDF'HWA |
| E'WYEWRYF |
| VYRGFRWR |
| VWVDF'RWQ |
| YF'AAWRWC |
| FFWEFRWM |
| LYVTFAWR |
| QYWRFRWV |
| LYVNFAWS |
| FYDAFRWY |
| MWWRYRYY |
| WYSLFRYV |
| FWWGFHWD |

| LYVNFRYV | - |
|-----------|---|
| NWSNFRWV | - |
| VWYSYRWI | - |
| FYAGYRWL | - |
| IYLLFKWY | - |
| IFADFRWY | - |
| VWMHYRWV | - |
| VFHGFRWR | - |
| FFADFRWF | - |
| LFWKFRWM | - |
| IYVTFRWE | - |
| VYWHFKWF | - |
| VWVDFRYV | - |
| VYVSFRWF | - |
| YYFRYRWS | _ |
| VYSVFRWS | _ |
| BYTGFRWA | _ |
| | |
| | - |
| | - |
| | - |
| | - |
| | - |
| AIIRFMW5 | - |
| RIIDFRWR | - |
| IWVNFRWK | - |
| VWADFHWV | - |
| VWASF'RWQ | - |
| LWAMWRWY | - |
| VWAYFRWQ | - |
| VWANFRWV | - |
| VWVSYHWR | - |
| WLNFRWAI | - |
| TYIYFRYV | - |
| LFVNFAWR | - |
| VWGRYRWV | - |
| VYSAYRWF | - |
| HWAGYRWR | - |
| VWADFRWQ | - |
| NTLWYRWL | - |
| FFCKFRWM | - |
| TWSPYAWN | - |
| LWVAFRWA | - |
| FYVSFRWI | - |
| VWMNYRWS | - |
| VYFKFAWV | - |
| YFNFRFHI | - |
| VWRMFRWF | - |
| YANWHWES | - |
| LYRFYRWS- | - |
| VWVDFHWK | - |
| VWPYFRWV | - |
| VYAWWHWA_ | - |
| VWMTYRWV | _ |
| YWI.FRVV | - |
| | - |
| | |
| | - |
| BVTDEDME | - |
| TWUDEDWV | - |
| | - |
| 91KDIUMK | - |

| RYIDFRWT |
|-----------|
| VWLDFHWV |
| |
| |
| FFANFRWY |
| LYRLYRWD |
| VWFNWRWE |
| THE |
| TIEGFRWL |
| ICVDFRWK |
| IWRNWRWE |
| VVAFRWFV |
| |
| VWVSFHWV |
| AWRLFKWT |
| KYLNYAWR |
| FIWKFRWM |
| |
| IWFGFRWW |
| LYSSFRYY |
| RYTGFRWT |
| |
| KISDFKWS |
| LNVNFAWR |
| VWVSFHWS |
| FFWKFKWM |
| |
| IIVSFAWI |
| RYTGFRWK |
| VWVCFRWS |
| VYTGVRWW |
| |
| GYSNFRWQ |
| LYAGFHWR |
| VWRLFRWS |
| VWCNEDWO |
| |
| FYARFKWW |
| FFWKFRWH |
| WINFHYVT |
| FEADYDWY |
| FFADIRWI |
| YSAAWRWW |
| HYTGFRWA |
| VGMNYRWV |
| VUICEDIM |
| |
| YANWHWGP |
| IYLSFRWL |
| SWPDFRWH |
| |
| LIVGIKWL |
| VWWRFQFF |
| RHTGFRWA |
| VWMDYRWV |
| CUMUEDEN/ |
| SWMULKWV |
| SYRDYHWW |
| YVMWRWIP |
| VWT.RYRWV |
| |
| DWKEFRWV |
| LWVSFRWS |
| FFWKFRCM |
| |
| |
| VWANF'RWQ |
| VWRSFRWI |
| VWVDFRWK |
| TVIVEDINI |
| |
| WFIGFRWW |
| LYFNFAWR |
| YYVSFHFV |
| |
| EVVAVDGV |

| | CINT |
|------------|------|
| IAIFHA | 211 |
| VYLRYHWR | |
| SWRNWRWE | |
| FYSNYKWO | |
| | |
| | |
| FWGRFRWA | |
| VWVDFHWI | |
| SWSDFRWR | |
| AWANFRWO | |
| WVSFRWTL | |
| NVEAECWD | |
| | |
| MYVSFRWK | |
| YYRLFAWV | |
| VYGFFAFG | |
| FYSGFRWS | |
| | |
| | |
| VYHVFRWK | |
| YYNFRFVW | |
| SWSDFKWH | |
| FFANFRWO | |
| | |
| | |
| VWAHFRWQ | |
| IWVDF'RWQ | |
| FFADFRWV | |
| FFWKFRWK | |
| GYSNFRWY | |
| VEWNEDWD | |
| | |
| VYVSFRYL | |
| FFWKFRWY | |
| VLANFRWQ | |
| VWMSYRWV | |
| I.WFDYRWV | |
| | |
| | |
| FWYSYRWI | |
| SYVDFRWV | |
| RYINFRWS | |
| VWAGFRWV | |
| | |
| | |
| VWVSFRWK | |
| IWHQFRYA | |
| VWFYFRYV | |
| VYSGFRWA | |
| FWFNFRYV | |
| | |
| | |
| LYRGWKWE | |
| SYVNFAWR | |
| FYIEFKWM | |
| SWMYFRWI | |
| FFWKFRWM | |
| | |
| | |
| FYSDFAWF | |
| LWSEWRWW | |
| IWSQWRYW | |
| FWSSFRWV | |
| | - |
| | |
| VYTSFKWS | |
| VWFRFGHA | |
| IYMSFKWS | |
| FFFRFRWV | |
| T.WT.RFKWV | |
| | |

| FAYSVKGV |
|-----------|
| FYAHFRYV |
| YYARWKWW |
| GYSAWKWW |
| SWIHFRWI |
| FYLHWKWV |
| NWLSFRWV |
| IWVDFRYV |
| |
| RYIEFRWS |
| FFSKFRWM |
| |
| SWMGFRW1 |
| |
| |
| |
| T.AAKEYMD |
| |
| |
| |
| FVCOFRWM |
| |
| |
| |
| TVVRFMI.S |
| |
| |
| FFWKFRWI |
| FYGAYHWT |
| VWVDFHWV |
| IYVNFAWG |
| |
| VWVDFHWA |
| LYVRFKWD |
| VYESFAWR |
| LYVNFAWI |
| SFWKFRWM |
| EWLLYRWY |
| GYSNFRWS |
| VYLRFKWL |
| YFAAWRWR |
| FFLKFRWM |
| WYGFRYWT |
| PYSNFRWV |
| IWVEFRWK |
| VWVHYRWQ |
| GYHGFRWR |
| FWVVYRYW |
| YYSNFRWV |
| AYIGFHWL |
| VWVKFKWL |
| YLYAFAST |
| AYRHWKWL |
| SYVSFHWF |
| VWLDFHWA |
| VWDNFRWQ |
| VGVSFRWS |
| FYAAWRWW |
| VWFNFRYV |

| YFADFRWQ |
|-----------|
| PCFAYGCQ |
| VYVSFRWA |
| MWHNFRYL |
| FYYGYRWM |
| RYSAWKWW |
| FWASWRFW |
| YYEAFRYT |
| I.YIDFRWS |
| SHRDVHWR |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| VWFNFRYM |
| VCANFRWQ |
| FWYSYRWW |
| IYFRFQWV |
| SWSDFRWH |
| FYVNFRWE |
| LWWKYVYR |
| SYVSYRWL |
| FFFNFRWF |
| MWEDWRWK |
| FFADFRWP |
| AWRSYRWW |
| VWWHWRWR |
| YFYNYRWR |
| LWHYEGLE- |
| FWANFRWV |
| RYIDFRWS |
| FFWTFRWM |
| OYFYFRWV |
| MWRSFRWT |
| VWVNFRWR |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| YIGWRWVR |
| VWVSFRWH |
| |
| IWVDFRWN |
| VWMNYRWG |
| TYYRFMWG |
| AYRNWKWV |
| FYVGFRWT |
| IWWGFHWD |
| FFADFRWR |
| VFAFIADL- |
| SLMHFRWI |
| VWTNFRWQ |
| FFADFRWC |
| VWLSFRFF |
| YFAAWHWT |
| FSAHAYHW |
| FDVCVDWT |

| FYTGYRWV |
|------------|
| GYVSFRYF |
| IWVDFRWK |
| VWMNYRWV |
| IWVAFRWK |
| IWYSYRWI |
| FRFGSGFG |
| YFDFHWAA |
| AWVSFRWS |
| FFAGFRWY |
| FWANFRWY |
| VVDVFKWS |
| |
| |
| |
| |
| |
| VWVSFRW1 |
| YYVAWKWM |
| SWVDF'RWK |
| SWSDFRWN |
| WSNFRWVI |
| VWMNYRWL |
| VWASWRFW |
| DWMNYRWV |
| FFWKFRWT |
| VYVQFAWV |
| VYGDWRWQ |
| VWMYYRWV |
| IWVDFHWV |
| FWYSYRWR |
| VWMDFHWV |
| FFWKFRWI |
| IWFDFRWK |
| FFADFRWY |
| VWVOFRWI |
| VWVDFHWG |
| FFVDFPWD |
| |
| |
| |
| I VGF NWD |
| |
| WREYRWWV |
| VWF'NF'RYE |
| DWANF'RWQ |
| YFCNFRWR |
| FFWKFKWT |
| IYFRFGWR |
| YFTRFRWV |
| TWHSWKWW |
| FQWRFRWW |
| FFADFRWW |
| VWANFRWH |
| AYVSFRWR |
| NYAFYHWS- |
| YWWDFRYF |
| FFGDFRWY |
| FCWKFRWM |
| YINYRFYO |
| SWRNWRWA |
| RYIDFRWT |
| |

| -AWINFRYV |
|---------------|
| SYIDFRWS |
| -LWVAFRWI |
| -FWVDFHWV |
| -FYVGFKWW |
| -FFPDFRWY |
| -SYDHFHWS |
| -DYISFRWL |
| WLNFRWEI |
| -CWMHFRWI |
| -IWVDFRWS |
| -VWTNYRWV |
| IWGDFRWK |
| -FWSSYRFY |
| -FFADFRWD |
| -SWSDFRWM |
| -AWVDFHWV |
| YAFDNCFE |
| YYLGFRYF |
| -VYMAYRWD |
| -VWMNYRWE |
| YYVDYRWL |
| -VWVHYRWR |
| IFMDWHWL |
| -SYFGFRWY |
| -VYYGFRWR |
| -VWVDFHWF |
| -FWANFRWQ |
| -VWAGFRWA |
| -FFAYFRWY |
| -VYVLYHWE |
| -FFWQFRWM |
| VYNYYHWS |
| NFSFRFAD |
| -VWAIFRWQ |
| ·IWVDFRWV |
| SNSFYRWS |
| QYVSYRWS |
| ·LYFDYRWV |
| ·LYAGYRWV |
| FFWKFGWI |
| VIFGIRWF |
| |
| |
| VVIDVKIV |
| |
| |
| -FWVSVRWK |
| VIVSEBWS |
| TIVNFAWT |
| T.YVNYAWR |
| -GWANFRWO |
| -VWVDFRWA |
| -VWRPFHWV |
| YYVNFRYI |
| -FFRKFRWM |
| -VWASFRWS |
| IYIDYHFE |
| -AYRHWKWW |

| -VWVNFRWQ |
|---------------|
| FFYKFRYR |
| -FFADFRWS |
| -LWQDFRYW |
| -WYAGFRWY |
| TFAFSDMR- |
| -FFVDFRWQ |
| -LWVAFRWS |
| -RYTGFRWV |
| -VRANFRWQ |
| -LYVNFAWH |
| -FYSRYKWQ |
| WYVFRYWA |
| -TWHLYRWR |
| -LWWSFRYV |
| -VYFNYRWF |
| -TWADFRWV |
| -FLANFRWH |
| FFWKFMWM |
| -VWVGFRWS |
| -FWILFRWV |
| LMTYAWPT |
| -VWFDFRWK |
| -IWMHFRWI |
| -FYACYRWV |
| -IYVRFRYL |
| -FYVGYRWV |
| -IWVDFRWH |
| FVHWRWFA |
| -FWYSYRWV |
| -LWVAFRWM |
| -LYLNFKWY |
| -VWANFRWK |
| FFWKFWWM |
| -LWKDWRWV |
| -VWYNFRWM |
| -RYFDFRWS |
| -YFWNFRWL |
| -VWVSFRWI |
| -VWMKYRWV |
| -RYIDFRWI |
| -SYYLYRWR |
| -WYVAYRWT |
| -VWGNFRWQ |
| -FYVNFAWR |
| -YFAAWRWM |
| -WWRDYAWR |
| -FYANFAWW |
| -RYVSYHWW |
| -IWWSWRWV |
| -VWVNYRWV |
| -FFAGYRWV |
| -WYSAWKWW |
| -VYYSFRWA |
| FFWKFSWM |
| -GYIAWRWV |
| -VLVDFHWV |
| -TWTDFRWQ |
| -VYTRFAWV |
| -FSADFRWY |

| LYINFRWA |
|----------|
| VWVNFRWS |
| FWVDFRWK |
| IYFRFAWY |
| VWVSFRWT |
| VWLSFRWS |
| VWVRFRWS |
| VWVAFRWI |
| TWTKWRWQ |
| VYVGFKWW |
| LWSFFKWV |
| LYVNFRWR |
| ILVDFRWK |
| NWSNFRWQ |
| YIAAWRWW |
| YFAVWRWW |
| LYLGYRWR |

Anexo II – Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome: Fenny Hui Fen Tang

Data de nascimento: 22 de novembro de 1988

Naturalidade: São Paulo, São Paulo

Formação acadêmica

| 2013-2019 | Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica) |
|-----------|--|
| | Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil |
| | Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano |
| | Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) |
| 2016 | Estágio de pesquisa no exterior |
| | University of New Mexico, Novo México, Estados Unidos da América |
| | Supervisão: Dr. Renata Pasqualini |
| 2011-2012 | Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura) |
| | Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil |
| 2008-2011 | Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) |

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Artigo publicado em periódicos

Tang, F.H.F, Staquicini, F.I., Teixeira, A.A.R., Michaloski, J.S., Namiyama, G.M., Taniwaki, N.N., Setubal, J.C., da Silva, A.M., Sidman, R.L., Pasqualini, R., Arap, W., Giordano R.J. A ligand motif enables differential vascular targeting of endothelial junctions between brain and retina. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116(6):2300-2305, 2019.

Prêmios

2016 - SBBq AWARD, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.

2012 - SBBq AWARD, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.

Apresentação de trabalhos em eventos

Tang, F.H.F., Staquicini, F.I. Teixeiraa, A.A.R., Michaloski, J.S., Namiyama, G.M., Taniwaki, N.N., Setubal, J.C., da Silva, A.M., Sidman, R.L., Pasqualini, R., Arap, W., and Giordano, R.J. Spatio-functional heterogeneity of CNS vasculature revealed by a novel endothelial-junction targeting peptide. Gordon Research Conference on Endothelial Cell Phenotypes in Health and Disease. 2018.

Tang, F.H.F., Teixeiraa, A.A.R., Michaloski, J.S., da Silva, A.M., Pierry, P.M., Labate, C.A. and Giordano, R.J. Towards the brain vascular map. XLV Reunião Anual da SBBq. 2016.

Tang, F.H.F., Michaloski, J.S., Giordano, R.J. The Cerebral Vascular Diversity and Identification of Vascular Targets Capable of Crossing the Blood Brain Barrier. XLI Reunião Anual da SBBq. Estudo da diversidade vascular cerebral. 2012.

<u>Tang, F.H.F.</u>, Michaloski, J.S., Giordano, R.J. Identificação de alvos vasculares capazes de transpor a barreira hematoencefálica e estudo da diversidade vascular cerebral. 19º SIICUSP. 2011.

Monitoria em disciplina

2013. QBQ0316 – Bioquímica experimental. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP.

Palestra ministrada

18/11/2014. Estudo da diversidade vascular cerebral por *Phage Display.* Ciclo de Seminários dos Pós-Graduandos e Pós-Doutores do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Anexo III – Artigo publicado



A ligand motif enables differential vascular targeting of endothelial junctions between brain and retina

Fenny H. F. Tang^a, Fernanda I. Staquicini^{b.c}, André A. R. Teixeira^a, Jussara S. Michaloski^a, Gislene M. Namiyama^d, Noemi N. Taniwaki^d, João C. Setubal^a, Aline M. da Silva^a, Richard L. Sidman^{e,1}, Renata Pasqualini^{b.c}, Wadih Arap^{b,f}, and Ricardo J. Giordano^{a,1}

^aDepartment of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; ^bRutgers Cancer Institute of New Jersey, Newark, NJ 07103; ^cDivision of Cancer Biology, Department of Radiation Oncology, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103; ^dElectron Microscopy Laboratory, Institute Adolfo Lutz, São Paulo, SP 01246-000, Brazil; ^eDepartment of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115; and ^fDivision of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ 07103

Contributed by Richard L. Sidman, December 3, 2018 (sent for review June 4, 2018; reviewed by Matthew Campbell and Patricia A. D'Amore)

Endothelial heterogeneity has important implications in health and disease. Molecular markers selectively expressed in the vasculature of different organs and tissues are currently being explored in targeted therapies with promising results in preclinical and clinical studies. Noteworthy is the role that combinatorial approaches such as phage display have had in identifying such markers by using phage as nanoparticles and surrogates for billions of different peptides, screening noninvasively the vascular lumen for binding sites. Here, we show that a new peptide motif that emerged from such combinatorial screening of the vasculature binds selectively to blood vessels in the brain in vivo but not to vessels in other organs. Peptides containing a conserved motif in which amino acids Phenylalanine-Arginine-Tryptophan (FRW) predominate could be visualized by transmission electron microscopy bound to the junctions between endothelial cells in all areas of the brain, including the optic nerve, but not in other barriercontaining tissues, such as intestines and testis. Remarkably, peptides containing the motif do not bind to vessels in the retina, implying an important molecular difference between these two vascular barriers. Furthermore, the peptide allows for in vivo imaging, demonstrating that new tools for studying and imaging the brain are likely to emerge from this motif.

blood-brain barrier | blood-retina barrier | brain endothelial cells | peptide | phage display

ascular endothelial heterogeneity has central implications in health and disease (1). Receptors selectively expressed in the vasculature of different organs and tissues are currently being explored in ligand-directed strategies for targeted imaging and therapy, with promising results in preclinical and clinical settings (2-5). Phage display has played an essential role in the identification of such receptors by screening noninvasively the vascular endothelium of different organ and tissues, in physiological and pathological conditions (i.e., tumor vessels) (6-8) (Fig. 1 A and B). The brain is a highly vascularized organ (9) shielded from most blood-borne molecules by a specialized blood-brain barrier (BBB) constituted by endothelial cells that are further enveloped by a layer of pericytes and astrocytes (9, 10). The BBB allows only the passage of gases, water, and small lipophilic molecules from blood into the brain parenchyma. Since brain endothelial cells are linked to one another by tight junctions, nutrients and waste products have to be shuttled across endothelial cell cytoplasm by a complex series of specialized transport systems (9-11). Remarkably helpful as this selectivity is for normal brain function, the BBB is a crucial obstacle for entry of therapeutic molecules in CNS diseases (8, 9, 12). Therefore, understanding molecular signatures unique to these barriers represents a key step toward development of novel treatment strategies (12). Several BBB markers have been identified in health and disease (13-16), all of which are ubiquitously expressed throughout the CNS. Nevertheless, the blood-retina barrier (BRB) and the

blood-spinal barrier, commonly considered as part of the BBB (9, 11, 15, 17), have not been studied to the same extent and represent unique gateways for targeted development of regionally specific therapies for CNS disorders (18).

Results and Discussion

Here, we combined in vivo phage display technology with nextgeneration sequencing (NGS) to discover and exploit molecular signatures associated with the vasculature of the mouse brain (Fig. 1A). Phage display selection can be used to probe the vascular lumen of blood vessels in vivo, and to identify native ligand-receptor interactions that may be undetectable by tissuedestructive approaches such as genomics and proteomics. Thus, our screening strategy goes beyond molecular expression and takes into consideration tissue architecture and ligand-receptor accessibility (7). Our original screening here has been designed to select peptide sequences that target blood vessels serving different anatomical regions of the brain (Fig. 1B). A cyclic CX8C (X8, any eight residues; C, cysteine) phage library displaying $\sim 10^{10}$ unique sequences (19, 20) was administered i.v. into a single mouse (round I of selection), and, after 30 min of systemic circulation, phage particles bound to blood vessels in different brain regions (cerebellum, olfactory bulb, and hemispheres)

Significance

Endothelial barriers are essential components of blood vessels and particularly important in brain and retina, which are protected by barriers so efficient that almost all metabolites have to be actively transported across them. We provide evidence that short peptides containing a motif rich in amino acids with aromatic and positively charged side chains target specifically blood vessels of the brain but not of other tissues. Using electron microscopy, phage could be visualized bound to the endothelial junction of these vessels, demonstrating how these two techniques can be combined to identify a supramolecular phage target in vivo. Surprisingly, this peptide motif does not bind to vessels in the retina, implying a previously unknown molecular difference between these endothelial junctions.

Author contributions: F.H.F.T. and R.J.G. designed research; A.A.R.T., J.S.M., G.M.N., and N.N.T. performed research; F.I.S., J.C.S., A.M.d.S., and R.P. contributed new reagents/ analytic tools; R.L.S., R.P., W.A., and R.J.G. analyzed data; and R.L.S., R.P., W.A., and R.J.G. wrote the paper.

Reviewers: M.C., Trinity College Dublin; and P.A.D., Schepens Eye Research Institute of Massachusetts Eye & Ear.

The authors declare no conflict of interest.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: richard_sidman@hms.harvard.edu or giordano@iq.usp.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10. 1073/pnas.1809483116/-/DCSupplemental.



Fig. 1. Identification of a peptide motif that targets brain blood vessels. (*A*) Phage display library selection identifies peptides targeting blood vessels. In the CX8C phage library, the ligand peptides are fused to minor capsid protein III (pIII) assembled at one end of the virion. (*B*) Phage display in vivo scheme. (*C*) Number of phage particles (TU normalized per milligram of tissue) recovered in each round of selection per brain region. The number above each bar indicates phage enrichment in round III relative to round II; #, round I was not quantified, to minimize loss of unique peptides. (*D*) Alignment of the total pool of unique peptides (n = 1,021) reveals the consensus motif FRW. (*E*) Phage CFFWKFRWMC or negative control Fd-tet phage (10⁹ TU) were administered i.v. into mice, and phage bound to blood vessels in brain hemispheres is visualized with antibacteriophage sera (red) and blood vessels with FITC-conjugated *Lycopersicon* (Tomato) *esculentum* lectin (green). (Scale bars: 100 µm, unless otherwise indicated.) (*F*) Quantification by colony count of phage bound to fast the mouse brain (n = 4). (*G*) Effect on phage homing caused by different Ala mutations within the FRW motif. Bars represent means \pm SEM from triplicates. (Scale bars: 100 µm.)

were recovered and amplified separately. Following the first round of selection, each phage pool was then readministered i.v. in successive mice for the next round of selection. After three rounds of i.v. selection, we observed marked phage enrichment in all brain regions, including 23-fold to the olfactory bulb, 14fold to the brain hemispheres, and 23-fold to the cerebellum from selection rounds II to III (Fig. 1*C*). Initial analysis by Sanger DNA sequencing revealed that several selected DNA sequences encoding targeting peptides to different brain regions contained a prevalent ligand motif rich in aromatic amino acid residues [Phenylalanine (Phe) and Tryptophan (Trp)] along with a recurrent positively charged residue in between them (*SI Appendix*, Fig. S1). This finding was unexpected, considering that the subsequent rounds II and III of selection were performed independently, and yet a unique dominant motif has emerged from the individual screenings, a result indicative of ligand selection. Next, NGS of all phage-displayed peptides (21) recovered in each round of selection identified 1,021 distinct targeted peptides sharing the pattern [FYW]-X-X-[FYW][ARKH][FYW] (Fig. 1D) (*SI Appendix, Supplementary Data Alignment File*).



Fig. 2. CFFWKFRWMC peptide is specific for intracranial brain vasculature but not retinal vessels. (A) Targeted CFFWKFRWMC-displaying phage bound to blood vessels in different tissues visualized by immunofluorescence with antibacteriophage antisera (red) and FITC-conjugated *L. esculentum* lectin (green). (Scale bars: 100 μ m.) (*B*) Quantification by colony count of phage bound to blood vessels in different tissues. To account for variability due to differences in tissue vascular areas, phage binding (in transducing units per milligram) was normalized relative to the control phage (Fd-tet). Bars represent means \pm SEM from two independent experiments (each with *n* = 2 animals, and *n* = 4 retinas) and triplicate plating for colony count. Statistical test used two-way ANOVA. N.S., not significant; ****P* \leq 0.001. (C) Peptide competition assay. Animals were injected with synthetic peptides (CFFWKFRWMC or a control peptide) before phage administration. Phage homing (in transducing units per milligram) was normalized relative to the control phage (Fd-tet). Bars represent means \pm SEM from quadruplicate plating for colony count (*n* = 1 animal per condition, with *n* = 2 retinas or brain and liver halves). Statistical test used one-way ANOVA. ****P* \leq 0.0005. (*D*) Immunofluorescence detection of phage CFFWKFRWMC bound to the optic nerve and brain, while the eye's retinal and choroidal blood vessels are negative. Vascular layers of the inner retina (R) and nonvascular (therefore invisible) outer nuclear layer (ONL) are shown. The monolayered nonvascular (and also invisible and unlabeled) retinal pigment epithelium lies immediately internal to the choroid (*C*), which is indicated with arrows along segments of its length. The sclera (S), lens (L), smooth muscle (SM), and vitreous humor (VH) are also indicated. (Scale bars: 100 μ m, except where noted.) (*E*) Immunofluorescence detection of phage in retina whole mounts from mice injected with phage. Arrows indicate positive phage staining. (Scale bars: 10

Of note is the presence of aromatic amino acids flanking a positively charged residue, of which 432 (42%) of unique ligand peptides contained a tripeptide Phe–Arginine–Trp (Phe-Arg-Trp) (herein denominated as the FRW motif).

Index phage particles displaying CFFWKFRWMC were selected as a representative of the FRW motif class because it was one of the most abundant ligand peptides identified (SI Appendix, Table S1). Either targeted CFFWKFRWMC-displaying phage or control phage (insertless Fd-tet) was administered i.v. into mice, and phage bound to the vasculature was visualized by immunofluorescence and quantified by bacterial infection and transducing unit (bacterial colony) count. We observed that CFFWKFRWMCdisplaying phage particles bind to endothelial cell surfaces of small and larger blood vessels in all areas examined within the brain (Fig. 1 E and F), whereas no binding to the vasculature above background was observed with the control phage. Interestingly, we observed an uneven staining of the vasculature with a consistent "spotty" pattern, and, while most if not all vessels were positive for phage staining, some vessels displayed a more robust staining than others (Fig. 1E, high-magnification image). Targeting seemed dependent on the FRW motif, since site-directed mutagenesis with alanine (Ala) scanning markedly abrogated phage binding in vivo. One should note that our chosen index peptide may perhaps contain two putatively targeting motifs (displayed sequence CFFWKFRWMC, underline indicates the two motifs), although the first one lacks a positively charged residue. In-tandem assays consisting of site-directed ligand motif mutagenesis plus i.v. targeting in vivo with CFFWKFRWMC revealed that either Phe to Ala or Trp to Ala completely abolished brain homing, while mutations in the middle residues of both motifs diminished but did not entirely abolish binding to brain blood vessels (Fig. 1G, arrows, and SI Appendix, Fig. S2). These results suggest that the first and third motif positions carrying amino acid residues with aromatic side chains are essential for binding, while the second position (often occupied by the positively charged residues) is more permissive. Interestingly, although, among the selected peptides, only 62 unique peptides out of 1,021 (6.1%) (*SI Appendix, Supplementary Data Alignment File*) contained an Ala in between the two hydrophobic residues (FAW), one of them (CLYVNFAWRC) was among the most abundant isolated in the biopanning along with phage CFFWKFRWMC (*SI Appendix*, Table S1). Together, these results suggest that presence of a positively charged residue either between the aromatic residues or adjacent to the motif is important for high-affinity binding.

To determine whether binding of phage CFFWKFRWMC is specific to brain blood vessels, we analyzed its presence in other tissues. No phage was detected by immunofluorescence in small intestine, kidney, pancreas, gonads, spleen, stomach, bladder and large intestine (Fig. 2A), results that were again confirmed by colony counting (Fig. 2B). Both targeted and control insertless phage nonspecifically accumulated at similarly high levels in the liver, suggesting no preferential binding of either phage to the hepatic vasculature (Fig. 2B and SI Appendix, Fig. S3), an observation entirely consistent with the collective previous experience with reticuloendothelial system (RES)-rich control organs such as liver and spleen (6). To further confirm our observations and that targeting to blood vessels was mediated by the peptide, we performed a competition experiment. Animals were first inoculated i.v. with synthetic peptide CFFWKFRWMC (70 and 200 pmol) or a control peptide before phage administration. We observed that the preadministration of the cognate synthetic peptide inhibited phage homing to brain only, but not to other tissues (Fig. 2C and SI Appendix, Fig. S4). The control peptide had no significant effect. Phage homing to liver was not affected by the synthetic peptide, again suggesting no specific targeting of the hepatic vasculature.



Fig. 3. CFFWKFRWMC peptide targets brain endothelial junctions. (A) TEM images of brain from a mouse receiving i.v. targeted CFFWKFRWMC-displaying phage (10¹⁰ TU) (100-nm section). Left (magnification 10,000×) shows lumen (L) and junction (JC) of two endothelial cells (EC1 and EC2). The typical morphology of filamentous phage (P) is indicated (arrow). Right depicts a higher magnification (60,000×) highlighting the junction between two endothelial cells. (Scale bars: 200 nm.) (B) Calculated length of the phage tufts. Circle in dashed lines indicates 1,000-nm diameter centered at the base of the endothelial junction. (Scale bar: 20 nm.) (C) Schematic illustration of the observed phage tufts in 100-nm thin sections. (D) Immunofluorescence detection of targeted CFFWKFRWMC-displaying phage bound to cell clefts formed by junctions and branches of endothelial cells of blood vessels in the brain. (E) Schematic illustration of the clefts of endothelial cells formed along the longitudinal axis of the blood vessels.



Fig. 4. CFFWKFRWMC peptide as a tool for imaging in vivo. NIR imaging of mice given a single i.v. dose of targeted CFFWKFRWMC-displaying phage, negative control Fd-tet, or αv integrin-binding RGD-4C-phage conjugated to NIR dye IRDye 680RD. Images were acquired in different time courses and show NIR fluorescence accumulation in the liver (nonspecific RES trapping) and brain areas. Epifluorescence color scale calibration bar for the images is on the right.

The fact that the cognate synthetic peptide inhibits phage homing to the brain indicates it might be possible to develop improved synthetic peptidomimetic versions for theranostic purposes. Peptidomimetic versions of CFFWKFRWMC should not be taken up the liver and would allow for better assessment of its possible interaction with liver vasculature. Together, these results confirm that binding of phage CFFWKFRWMC is mediated by the peptide and is specific to brain blood vessels.

However, we have also observed that phage CFFWKFRWMC does not bind to retinal blood vessels, an intriguing result confirmed by both colony count and immunostaining (Fig. 2 B-E). In contrast, targeted phage binding was also detected in blood vessels of the optic nerve (Fig. 2D), which carry blood immediately preceding the optic nerve vessel branches that enter the retina. Further experiments with whole retinas also confirmed this observation. Moreover, when the experiment was repeated and animals were not perfused to remove unbound circulating phage, we detected phage particles in the retina, confirming that phage CFFWKFRWMC reaches the retina but does not accumulate in this tissue (Fig. 2E). Since these studies were initially performed in the albino BALB/c mouse strain, we asked whether retinal mutations specific to this mouse strain could be responsible for the blood vessel differences between retina and the rest of the brain. We therefore repeated the experiments with the visually competent C57BL/6J mouse strain, with similar results. The lack of interaction of CFFWKFRWMC-displaying phage particles with blood vessels in the retina are, therefore, unlikely to be due to inherited genetic mutations carried by these animals or physiological deficiencies in the retina, and are likely caused by molecular differences between these CNS vascular territories. This is a striking result considering that the bloodretina barrier is believed to have very similar properties to the BBB (10, 11). To our knowledge, this is potentially a previously unknown BBB molecular target that is not present in the blood vessels of the retina; moreover, the ligand FRW motif may differentially target BBB from the BRB.

To gain insight into receptor expression and location, we have next performed transmission electron microscopy (TEM) studies. M13-derived phage particles can be easily identified by their long filamentous morphology (22). Indeed, in mice receiving CFFWKFRWMC-displaying phage, we observed tufts formed by long thin electron-dense filaments bound to and accumulated at the junctions between endothelial cells in the brain (Fig. 3A). These tufts have the expected morphology and \sim 1,000-nm size of phage particles (Fig. 3B), and were unlike any other cellular structure found in mouse brain or other tissues. These filaments were bound to the cell junction by one end of the phage, in agreement with fusion of peptide CFFWKFRWMC to the pIII coat proteins located at one end of the virion filament (Figs. 1A and 3C). The tuft pattern also indicates that multiple phage particles are bound to and accumulated at the endothelial cell junctions (Fig. 3C), explaining the strong dotted signal observed by epifluorescence microscopy. These TEM results are, therefore, in agreement with the immunofluorescence staining pattern in which phage seems to accumulate in a spotted pattern, often next to blood vessel junctions or branches (Fig. 3D). Indeed, phage binding seems to follow the intercellular clefts formed by the endothelial cells elongated and joined to one another along the axis of the blood vessels (Fig. 3E) (23). The endothelial cells form a layer closest to the lumen in blood vessels, and, in the brain, are well known to have very tight intercellular junctions. It is likely that CFFWKFRWMC binds to proteins or other molecules associated with these cell-cell tight junctions (11). Whether peptide CFFWKFRWMC binds directly to molecules present at the endothelial junctions or to cell surface receptors, which then move along the membrane for endocytosis, resulting in formation of phage tufts at the cell junctions, will need to be addressed by further studies.

Finally, real-time visualization in vivo is essential for understanding normal biological processes as well as for the development of novel diagnostic methods for human diseases. To show that the FRW motif can be used to image the brain in vivo, phage were labeled with a near-infrared (NIR) fluorescent dye and administered i.v. into BALB/c nude mice (24). Strong brain epifluorescence was detected in mice treated with NIR dye-labeled phage CFFWKFRWMC or RGD-4C (sequence CDCRGDCFC, an αv integrin-binding double-cyclic motif) (Fig. 4). No epifluorescence was observed with the NIR dye-labeled negative control phage (Fd-tet) and with phage CFFWKFRWMC in the retina (ex vivo) (SI Appendix, Fig. S5). Most importantly, phage carrying the FRW motif accumulated longer in the mouse brain, resulting in strong epifluorescent signals that lasted for more than 30 min, compared with phage particles displaying the RGD-4C targeting peptide.

In summary, we have selected and identified a ligand peptide motif that targets endothelial cell junctions present in blood vessels of the brain part of the CNS, but not the retina, suggesting a molecular difference between the BBB and the BRB, two important blood–CNS barriers. Targeted small peptidomimetics containing an FRW motif may serve as a theranostic developmental drug lead for translational applications for CNS diseases.

Methods

Animals. All experiments were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Utilization Committees of the Chemistry Institute of the University of São Paulo and the University of New Mexico Health Science Center. We used female BALB/c and C57BL/6J mice (The Jackson Laboratory) maintained at the animal facility of the Institute of Chemistry and Pharmacy School of the University of São Paulo and female immunodeficient BALB/c athymic mice (Charles River Laboratory) maintained at the animal facility of the University of New Mexico Health Science Center. Animals were kept on a 12-h light/dark cycle. Rodent chow and water were available ad libitum.

Phage Library Construction. The cyclic phage display (CX8C) library used in the study was built as previously described (20). For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Synthetic Peptides. Peptides were synthesized and purified by HPLC to a purity greater than 95% by Chinese Peptide Company. Two peptides were used in this study: peptide CFFWKFRWMC and peptide CARAC (referred to as control) (25).

Identification of Brain-Targeting Peptides by Phage Display in Vivo. To isolate peptides targeting the brain, animals received the CX8C phage library [10⁹ transducing units (TU)] by i.v. injection. After 30 min in circulation, mice were perfused with 20 mL of DMEM, and phage bound to tissue were recovered by tissue homogenization followed by bacterial infection, amplified, and used for two more rounds of selection. After the final round, random bacterial colonies were selected for DNA sequencing to identify phage coding peptides targeting each brain area. For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Phage Sequencing. Sanger sequencing was performed at the sequencing facility at the Institute of Chemistry, University of São Paulo, as previously described (20, 25). High-throughput DNA sequencing was performed using the MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles) on an Illumina MiSeq equipment at the Center for Advanced Technologies in Genomics at Institute of Chemistry, University of São Paulo. For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Validation of Phage Homing in Vivo. Phage homing in vivo to different tissues and organs was performed by colony count and immunofluorescence as described (2). In brief, phage was injected i.v. into mice, and, after 30 min of circulation, animals were perfused through the heart, and phage bound to blood vessels was detected by immunofluorescence using bacteriophage antisera or quantified by bacterial infection followed by colony counting. For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Site-Directed Mutagenesis of CFFWKFRWMC Phage Particles. Mutant phage particles displaying alanine-scanning variants of CFFWKFRWMC were prepared by site-directed PCR mutagenesis as described (2). For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

- 1. Aird WC (2012) Endothelial cell heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Med 2: a006429.
- Giordano RJ, et al. (2008) Targeted induction of lung endothelial cell apoptosis causes emphysema-like changes in the mouse. J Biol Chem 283:29447–29460.
- 3. Barnhart KF, et al. (2011) A peptidomimetic targeting white fat causes weight loss and improved insulin resistance in obese monkeys. *Sci Transl Med* 3:108ra112.
- Lorusso D, et al. (2012) Phase II study of NGR-hTNF in combination with doxorubicin in relapsed ovarian cancer patients. Br J Cancer 107:37–42.
- Pasqualini R, et al. (2015) Targeting the interleukin-11 receptor α in metastatic prostate cancer: A first-in-man study. *Cancer* 121:2411–2421.
- Arap W, et al. (2002) Steps toward mapping the human vasculature by phage display. Nat Med 8:121–127.
- Ozawa MG, et al. (2008) Beyond receptor expression levels: The relevance of target accessibility in ligand-directed pharmacodelivery systems. *Trends Cardiovasc Med* 18: 126–132.
- Staquicini FI, et al. (2011) Systemic combinatorial peptide selection yields a noncanonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. J Clin Invest 121:161–173.
- Tam SJ, Watts RJ (2010) Connecting vascular and nervous system development: Angiogenesis and the blood-brain barrier. Annu Rev Neurosci 33:379–408.
- Park-Windhol C, D'Amore PA (2016) Disorders of vascular permeability. Annu Rev Pathol 11:251–281.
- 11. Díaz-Coránguez M, Ramos C, Antonetti DA (2017) The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res* 139:123–137.
- Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcão A (2014) Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. Eur J Pharm Biopharm 87:409–432.

TEM. Animals were injected i.v. with 10^{10} TU of CFFWKFRWMC phage or control Fd-tet phage. After 30 min, they were perfused through the heart with fixative solution (2.5% glutaraldehyde:4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate monobasic/dibasic buffer, pH 7.4). Brain tissues were postfixed with 1% (wt/vol) osmium tetroxide (OsO₄), and 0.5% uranyl acetate was used as contrast. Ultrathin sections (100 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a transmission electron microscope (model JEM1011; JEOL) operating at 80 kV. For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Imaging in Vivo with CFFWKFRWMC Phage. Phage particles were labeled with IRDye 800CW and used for imaging in vivo as described (24). NIR fluorescent images were acquired serially over 5- to 30-min time periods and analyzed using the IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer). For ex vivo fluorescence quantification, retina, brain, and liver were dissected and analyzed with an Odyssey Infrared Imaging Scanner. For details, see *SI Appendix, SI Materials and Methods*, refs. 1–8.

Statistics. All numerical data are expressed as mean \pm SEM. We analyzed data sets for significance, with one-way ANOVA or two-way ANOVA (Prism GraphPad software). *P* values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Data Availability. The authors declare that all data supporting the findings in this study are available within the article and *SI Appendix* or from the corresponding author on reasonable request.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Maria L. Baldini and Celia Ludio A. Braga for technical assistance. This study was supported by Research Grants 2009/ 54.806-8 and 2014/21.177-9 (to R.J.G.) from São Paulo Research Foundation and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). F.H.F.T. was supported by a fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Finance Code 001. A.M.d.S., J.C.S., and R.J.G. received Research Fellowship Awards from CNPq. The funders had no role in study design, data collection, analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. Nat Med 19:1584–1596.
- Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM (2016) The blood-brain barrier. Handb Clin Neurol 133:39–59.
- Wilhelm I, Nyúl-Tóth Á, Suciu M, Hermenean A, Krizbai IA (2016) Heterogeneity of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers* 4:e1143544.
- Librizzi L, et al. (2018) Cerebrovascular heterogeneity and neuronal excitability. Neurosci Lett 667:75–83
- Campbell M, Humphries P (2012) The blood-retina barrier: Tight junctions and barrier modulation. Adv Exp Med Biol 763:70–84.
- Marchiò S, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R (2016) Brain endothelial cell-targeted gene therapy of neurovascular disorders. *EMBO Mol Med* 8:592–594.
- Beppler J, et al. (2016) Negative regulation of bacterial killing and inflammation by two novel CD16 ligands. Eur J Immunol 46:1926–1935.
- Michaloski JS, Redondo AR, Magalhães LS, Cambui CC, Giordano RJ (2016) Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. Sci Adv 2:e1600611.
- Dias-Neto E, et al. (2009) Next-generation phage display: Integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis. *PLoS One* 4:e8338.
- Souza GR, et al. (2006) Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. Proc Natl Acad Sci USA 103:1215–1220.
- Adamson RH (1993) Microvascular endothelial cell shape and size in situ. Microvasc Res 46:77–88.
- Dobroff AS, et al. (2016) Towards a transcriptome-based theranostic platform for unfavorable breast cancer phenotypes. Proc Natl Acad Sci USA 113:12780–12785.
- Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W (2001) Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. Nat Med 7:1249–1253.