

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAX INGBERMAN



**Produção de anticorpos monoclonais para o
receptor α de estrógeno humano (hER α)**

CURITIBA

2011

MAX INGBERMAN

Produção de anticorpos monoclonais para o receptor α de estrógeno humano (hER α)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata.

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Ingberman, Max

Produção de anticorpos monoclonais para o receptor α de estrógeno humano (hER α). / Max Ingberman. – Curitiba, 2011.
63 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Estrogenos 2. Anticorpos monoclonais 3. Mamas - Cancer I. Título II. Zanata, Silvio Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

"Produção de anticorpos monoclonais para o receptor α de
estrógeno humano (hER α)"

por

MAX INGBERMAN

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Silvio Zanata (presidente)

Prof.ª. Dr.ª. Larissa Magalhães Alvarenga

Prof. Dr. Juliano Bordignon

Prof.ª. Dr.ª. Adriana F. Mercadante
Membro suplente

Curitiba, 22 de março de 2011.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo carinho e apoio incondicional.

À minha família por toda a paciência enquanto eu estava presente e a paciência ainda maior por quando eu não estava presente.

Ao meu orientador, professor Silvio Marques Zanata, pela confiança, pelas oportunidades, discussões e conhecimento que me passou além de toda atenção e amizade nos últimos anos.

À professora Adriana Frolich Mercadante por todo o suporte tanto com conhecimentos como com amizade e aquela palavra amiga nos momentos de crise.

À professora Elaine Machado Benelli por toda ajuda com o planejamento de biologia molecular no início do projeto.

Ao grande amigo Vitor Souza, pela amizade e toda ajuda imprescindível com correções e trabalho gráfico.

A todos os alunos do Laboratório de Neurobiologia, que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos colegas e amigos do laboratório que permitiram que a execução desse trabalho transcendesse a esfera puramente acadêmica.

Aos alunos de iniciação científica Luciano Braga e Gabriela Miraglia por todo suporte durante a parte experimental na qual se envolveram.

Aos amigos Breno e Celso, que sempre apoiaram o trabalho e ajudaram com todos os recursos disponíveis.

Aos alunos do laboratório de matriz extracelular e o próprio laboratório, por toda ajuda além de equipamentos e reagentes emprestados.

À pesquisadora Felicia Peterson Cavalher do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo material cedido e atenção.

Ao pesquisador Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas do Fiocruz Paraná, pela atenção, camundongos e linhagens de células para fusão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela disponibilidade para sequenciar os meus plasmídeos.

À CAPES, CNPq e SETI/UGF pelo apoio financeiro.

“There are no such things as incurables;
there are only things for which man has not
found a cure. “

Bernard Mannes Baruch

RESUMO

O câncer de mama é um mal que acomete mais de 49.000 mulheres anualmente no Brasil. Na decisão terapêutica para esse tipo de tumor, é importante a definição de alguns parâmetros ligados a proteínas presentes ou não no carcinoma. Dentre essas proteínas, destaca-se o receptor α de estrógeno (hER α). A detecção do receptor de estrógeno é feita através de imunohistoquímica e para essa técnica são usados anticorpos monoclonais anti hER α . Uma vez que o Brasil ainda é totalmente dependente da importação desse insumo, a obtenção de linhagens de hibridomas secretores desses anticorpos torna-se uma questão de soberania. No presente trabalho, foi elaborado todo o processo e ferramentas necessários para a obtenção dos hibridomas. Partindo-se do RNA total de células produtoras desse receptor, foi produzido cDNA a partir do qual o fragmento codificante para hER α foi clonado em plasmídeo para produção de proteína recombinante em sistema heterólogo em *E. coli*. Essa proteína foi fusionada a uma cauda de histidina que foi utilizada na sua purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado. O peptídeo purificado foi utilizado como antígeno na imunização de camundongos Balb/C. Animais que apresentaram uma boa resposta imunológica frente ao antígeno de interesse foram eutanasiados e tiveram o seu baço removido para a realização dos ensaios de fusão. Os esplenócitos dissociados foram fusionados a células de linhagens de mieloma através da utilização de polietilenoglicol com o objetivo de se obter hibridomas secretores de anticorpos monoclonais de interesse. Durante o período do trabalho nenhum hibridoma estável foi obtido, no entanto foram desenvolvidas todas as ferramentas necessárias para a obtenção do insumo.

Palavras-chave: hER α , receptor de estrógeno, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Breast cancer is a disease that affects more than 49,000 women annually in Brazil. To achieve a therapeutic decision for this type of tumor, it is important to define some parameters linked to proteins present or absent in the carcinoma. Among those proteins, the estrogen receptor α (hER α) is highlighted. The detection of estrogen receptor α is made by immunohistochemistry and, for this technique, monoclonal antibodies against hER α are used. Since Brazil is still completely dependent on imports of this material, obtaining hybridoma lines that produce those antibodies becomes an issue of sovereignty. In this study, the whole process and tools necessary to obtain those hybridomas was developed. Starting from the total RNA of cells that produce the receptor, cDNA was produced. The encoding sequence for hER α was cloned into a plasmid from which the recombinant protein was produced in heterologous system in *E. coli*. This protein was fused to a histidine tag that was used for its purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. The purified peptide was used as antigen to immunize Balb/C mice. Animals that showed a good immune response against the antigen of interest were euthanized and had their spleen removed for fusion assay. The dissociated splenocytes were fused to myeloma cell lines by using polyethyleneglycol in order to obtain hybridomas secreting monoclonal antibodies of interest. During the study, no stable hybridoma was obtained, however have been developed all the tools necessary to obtain the desired material.

Key words: hER α , estrogen receptor, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, recombinant proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – MAPA DA MORTALIDADE POR CÂNCER DA MAMA NO BRASIL POR ESTADO	1
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DAS DIFERENTES VIAS ATIVADAS POR ESTRÓGENO.....	4
FIGURA 3 - DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS RECEPTORES α E β	5
FIGURA 4– ASPECTO IMUNOHISTOQUÍMICO DE TECIDO TUMORAL DE MAMA COM POSITIVIDADE PARA RECEPTOR DE ESTRÓGENO.....	6
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS	9
FIGURA 6 -DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS RECEPTORES α E β DIFERENCIANDO OS DOMÍNIOS FUNCIONAIS E A TAXA DE HOMOLOGIA NAS DIFERENTES REGIÕES	11
FIGURA 7 - ALINHAMENTO DO mRNA CODIFICANTE PARA HER α COM OS INICIADORES R2REINTMXEL E R5RERTPCRMX (SEQÜÊNCIA COMPLEMENTAR INVERSA).....	13
FIGURA 8 - ALINHAMENTO DO mRNA CODIFICANTE PARA HER α COM O INICIADOR F1REMXEL	14
FIGURA 9 - ALINHAMENTO DO mRNA CODIFICANTE PARA HER α COM O INICIADOR R1REABMXEL (SEQÜÊNCIA COMPLEMENTAR INVERSA)	15
FIGURA 10 - ALINHAMENTO DO mRNA CODIFICANTE PARA HER α COM O INICIADOR R2REINTMXEL (SEQÜÊNCIA COMPLEMENTAR INVERSA).....	15
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO A/B RECOMBINANTE DE HER α ..	21
FIGURA 12 – DIAGRAMA DE SELEÇÃO COM MEIO CONTENDO HAT	27
FIGURA 13 - TESTE DE INTEGRIDADE DE RNA. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1,5% DO RNA EXTRAÍDO DE MCF7.....	29
FIGURA 14 - TESTE cDNAS 7 E 8 (QUADRO 1).....	31
FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE INSERTO F1R1.GEL DE AGAROSE 1% EM TAE.....	33
FIGURA 16 - AJUSTE FINO DA REAÇÃO DE PCR PARA F1R2	34
FIGURA 17 - PRODUÇÃO DE INSERTO F1R2, GEL PREPARATIVO	35
FIGURA 18 - DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PET28A.....	35
FIGURA 19 - DIGESTÃO DO INSERTO F1R1	36
FIGURA 20 - DIGESTÃO DO INSERTO F1R2	37
FIGURA 21 - PCR DE COLÔNIA F1R1.....	39
FIGURA 22 - PCR DE COLÔNIA F1R2.....	40
FIGURA 23 - ENSAIO DE DIGESTÃO PARA VETOR CONTENDO INSERTO CODIFICANTE PARA O DOMÍNIO A/B.....	41
FIGURA 24 - ENSAIO DE DIGESTÃO PARA VETOR CONTENDO INSERTO CODIFICANTE PARA O RECEPTOR INTEIRO.....	41

FIGURA 25 - GEL DAMINI-EXPRESSÃO DA PORÇÃO A/B	43
FIGURA 26 - GEL DAMINI-EXPRESSÃO DO RECEPTOR INTEIRO.....	44
FIGURA 27 - ABORDAGENS INICIAIS PARA A PURIFICAÇÃO DE F1R1 CONJUGADA A CAUDA DE HISTIDINA	46
FIGURA 28 - PURIFICAÇÃO DA PORÇÃO A/B CONJUGADA A CAUDA DE HISTIDINA.	47
FIGURA 29 - PURIFICAÇÃO DO RECEPTOR INTEIRO CONJUGADO COM CAUDA DE HISTIDINA	49
FIGURA 30 – PRIMEIRO <i>WESTERN BLOT</i> PARA ESCOLHA DE ANIMAIS PARA FUSÃO.....	50
FIGURA 31 - SEGUNDO <i>WESTERN BLOT</i> PARA ESCOLHA DE ANIMAIS PARA FUSÃO	51
FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PERDA RANDÔMICA DE CROMOSSOMOS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – Adenosina monofosfato
AP-1 - Proteína ativadora 1
ATCC - American Type Culture Collection
ATP – Adenosina trifosfato
bp – Pares de base
cDNA – DNA complementar
D.O. – Densidade óptica
DEPC – Dietil policarbonato
DDK – Coroa dinamarquesa (a moeda da Dinamarca)
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
E. coli - *Escherichia coli*
ER – Receptor de estrógeno
F1R1 – inserto de DNA codificante para porção A/B do receptor α de estrógeno humano
F1R2 - inserto de DNA codificante para o receptor α de estrógeno humano inteiro
FDA – Food and drug administration
hER – receptor de estrógeno humano
HPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HRP – Peroxidase do rábano
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
IH – Imunohistoquímica
INCA – Instituto nacional de câncer
IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa – Kilodalton
Mab – anticorpo monoclonal
Meio LB - Meio Luria-Bertani
min –minuto(s)
mRNA – RNA mensageiro
NCBI – National Center for Biotechnology Information
Ni - Níquel

NTA – Ácido nitrilotriacético

PBS – Phosphate Buffer Saline

PBST – Phosphate Buffer Saline Tween-20

PCR – Reação de cadeia da polimerase

PEG - Polietilenoglicol

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

qsp – Quantidade suficiente para

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAr – RNA ribossomal

RPM – Rotações por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

RT-PCR – Reação de transcritas reversa seguida de um PCR

SDS – dodecil sulfato de sódio

TBST – Tris Buffer Saline Tween-20

T_m – Temperatura média de anelamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CÂNCER DE MAMA.....	1
1.1.1	Epidemiologia	1
1.1.2	Receptores de estrógeno e terapia endócrina	3
1.1.3	Dako biotechnology	7
1.1.4	Mercado brasileiro	7
1.2	HIBRIDOMAS E ANTICORPOS MONOCLONAIS	8
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL.....	9
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
3	JUSTIFICATIVA	10
4	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1	ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM.....	10
4.1.1	Desenho dos iniciadores	11
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA	15
4.3	REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR).....	16
4.4	OBTENÇÃO DOS INSERTOS	16
4.5	OBTENÇÃO DE VETORES	17
4.5.1	Digestão dos insertos e vetores	17
4.5.2	Ensaio de ligação	17
4.5.3	Transformação em <i>E. coli DH5α</i>	17
4.6	VERIFICAÇÃO DOS VETORES OBTIDOS	18
4.6.1	PCR de colônia.....	18
4.6.2	Ensaio de digestão	19
4.6.3	Sequenciamento.....	19
4.7	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	20
4.7.1	Transformação bacteriana.....	20
4.7.2	Produção de antígeno recombinante	20
4.7.3	Purificação do antígeno recombinante	21
4.8	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	23
4.9	EXTRATO CELULAR (MCF7).....	24
4.10	ENSAIOS DE WESTERN BLOT	25
4.11	OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS.....	25
4.11.1	Cultivo de células de mieloma.....	25
4.11.2	Obtenção de esplenócitos do animal imunizado	25
4.11.3	Ensaio de fusão	26

4.11.4	Seleção dos hibridomas	26
4.11.5	Manutenção dos hibridomas	28
4.11.6	Varredura dos hibridomas	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1	EXTRAÇÃO DE RNA	29
5.2	RT-PCR	30
5.3	OBTENÇÃO DOS INSERTOS	31
5.3.1	Insertos do domínio A/B	31
5.3.2	Insertos do receptor inteiro	33
5.4	OBTENÇÃO DOS VETORES	35
5.4.1	Digestão do plasmídeo	35
5.4.2	Digestão F1R1	36
5.4.3	Digestão F1R2	36
5.4.4	Transformação em <i>E. coli DH5α</i> com pET28a-domínio A/B (F1R1)	37
5.4.5	Transformação em <i>E. coli DH5α</i> com pET28a-receptor inteiro (F1R2)	37
5.5	VERIFICAÇÃO DOS VETORES OBTIDOS	38
5.5.1	PCR de colônia	38
5.5.2	Ensaio de digestão	40
5.5.3	Sequenciamento	42
5.6	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	42
5.6.1	Transformação usando <i>E. coli</i> BL21 (DE3) STAR	42
5.6.2	Produção do antígeno recombinante	43
5.6.3	Purificação do antígeno recombinante	44
5.7	SELEÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA FUSÃO	49
5.8	OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS	51
6	CONCLUSÃO	53
	Perspectivas	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO 1: ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOACIDOS DO RECEPTOR INTEIRO HUMANO E MURINO	58
	ANEXO 2: ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOACIDOS DA PORÇÃO A/B (PRIMEIROS 180 AMINOACIDOS) DOS RECEPTORES HUMANO E MURINO	59
	ANEXO 3: MAPA DO VETOR PET28A (NOVAGEN)	60
	ANEXO 4: SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO CONTENDO O RECEPTOR INTEIRO ALINHADO COM A SEQÜÊNCIA DE REFERÊNCIA	61
	ANEXO 5: SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO CONTENDO A FRAÇÃO A/B DO RECEPTOR ALINHADO COM A SEQÜÊNCIA DE REFERÊNCIA	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

1.1.1 Epidemiologia

No Brasil, em 2010, foram estimados pelo INCA 49.240 novos casos de câncer de mama (28,1% do total de novos casos de neoplasia em mulheres) sendo que destes, 9.500 casos na região Sul (Figura 1). Apesar de a taxa de sobrevivência após cinco anos ser de 61% no âmbito mundial, no Brasil a taxa de mortalidade para esse tipo de câncer ainda é alta principalmente pelo diagnóstico da doença geralmente ocorrer em estágios avançados (INCA, 2009).

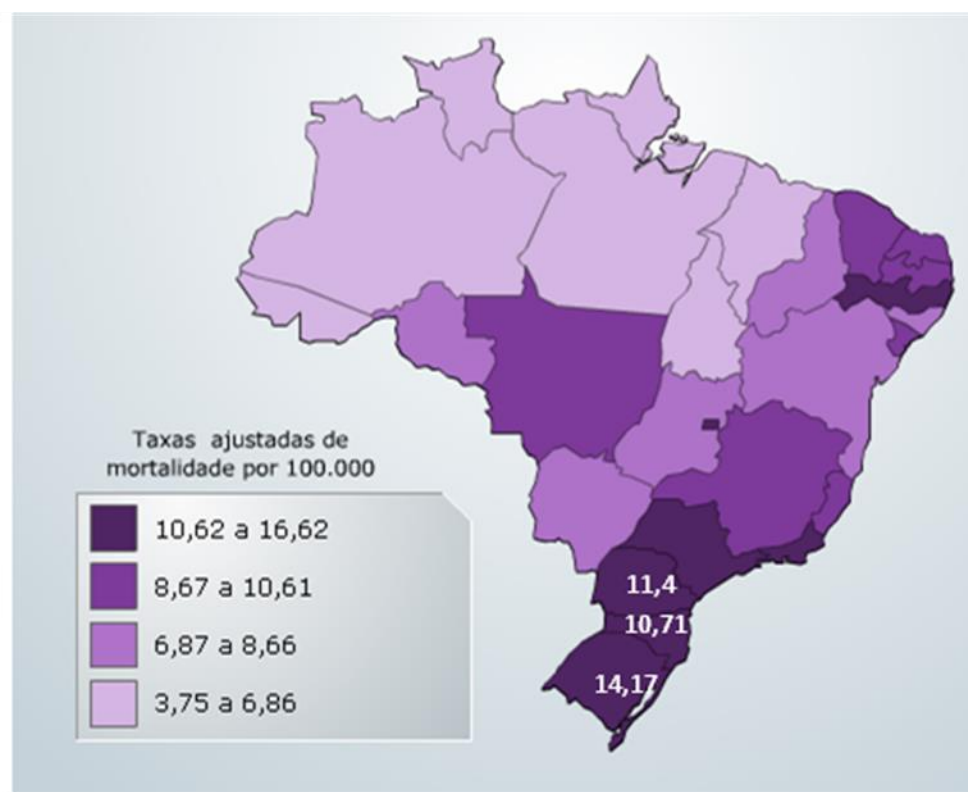


Figura 1 – Mapa da mortalidade por câncer da mama no Brasil por estado. (adaptado de <http://mortalidade.inca.gov.br>)

Analisando os dados do IBGE de evolução da esperança de vida média no país (Gráfico 1), nota-se um aumento da expectativa de vida no Brasil através das décadas. Esse crescimento não pode ser tomado como uma constante, mas, no entanto, a expectativa em 2003 era de 71,3 anos. Usando como base a expectativa

japonesa de 81 anos na mesma época, ainda podemos esperar um aumento projetado para 80 anos até 2040 (www.ibge.gov.br). Nesse cenário, não se pode deixar de notar que a mulheres tendem a ter uma expectativa de vida maior que a dos homens.

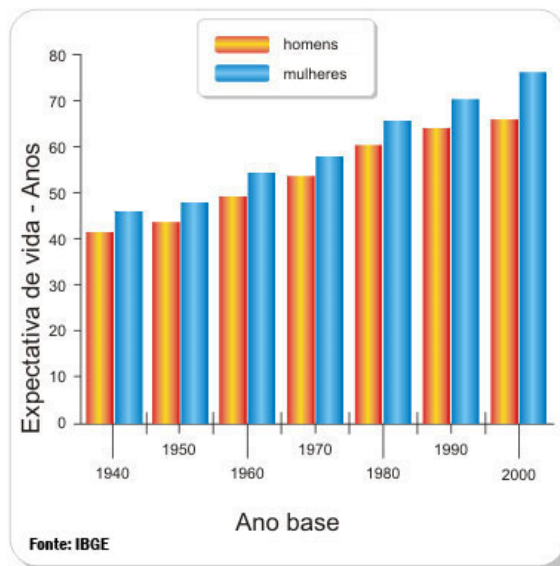


Gráfico 1 - Evolução da expectativa de vida no Brasil entre os anos 1940 e 2000.
(www.ibge.gov.br)

A probabilidade de desenvolver câncer de mama aumenta consideravelmente em relação à idade (Gráfico 2) (GIARDIELLO et al., 2000). Considerando esses dados juntamente com o crescimento vegetativo da população que, de acordo com o censo 2010, teve uma taxa de 1,17 na primeira década deste século, pode-se esperar um aumento no número bruto de casos nas próximas décadas.

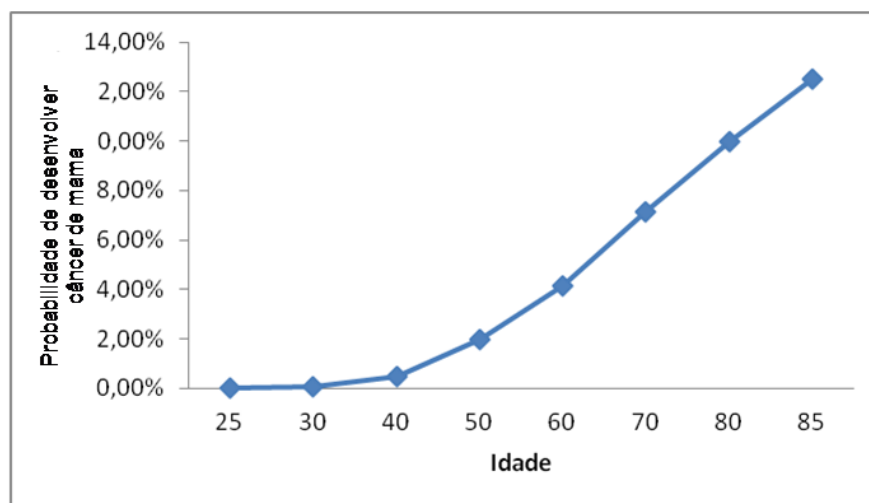


Gráfico 2 – Probabilidade de que uma mulher desenvolva câncer de mama em diferentes idades.

1.1.2 Receptores de estrógeno e terapia endócrina

A terapia endócrina para o câncer de mama começou há mais de 100 anos com a prática da ooforectomia (retirada cirúrgica dos ovários). Ela foi proposta primeiramente por Schinzinger em 1889, enquanto procedimento prático, foi descrita pela primeira vez por Beatson em 1896 e defendida como terapia adjuvante por Boyd a partir de 1900. Esse procedimento foi o primeiro indicativo de que hormônios esteróides produzidos pelos ovários eram um fator determinante em diversos casos de câncer de mama e portanto se tornou a primeira terapia conceitualizada na oncologia, mesmo que muito antes que os agentes terapêuticos fossem conhecidos. (LOVE, 2002; SCHIFF *et al.*, 2005; SHAO & BROWN, 2004)

Inicialmente era aceita a idéia de que como mulheres na menopausa tinham um prognóstico melhor, a retirada do ovário poderia causar um envelhecimento precoce nas mulheres (dado que já se conhecia sobre o efeito da ooforectomia em mulheres que não tinham tumores de mama) melhorando assim o prognóstico (SOMMER; FUQUA, 2001; LOVE, 2002; SHAO; BROWN, 2004; SCHIFF *et al.*, 2005).

Com a identificação e clonagem do receptor α de estrógeno, uma proteína não glicosilada de 66kDa, por Green e colaboradores em 1986 e do β por Kuiper e colaboradores em 1996, foi estabelecido que a maioria senão todos os efeitos biológicos e fisiológicos dos hormônios estrogênicos estão ligados à esses receptores tanto em casos patológicos quanto em organismos saudáveis. (SCHIFF *et al.*, 2005)

Terapias para câncer de mama que apresentam o receptor de estrógeno como alvo evoluíram hoje para tratamentos com drogas relativamente seguras como os inibidores de aromatase (Anastrozol e Letrozol) ou os “anti estrógenos” como o Tamoxifeno e o Fulvestrant, sendo o Tamoxifeno a terapia mais usada atualmente (SHAO; BROWN, 2004).

É importante compreender que a terapia endócrina é baseada na característica da indução de proliferação das células quando estimuladas por hormônios esteróides. Entende-se que uma vez retirado o estímulo proliferativo causado pelo reconhecimento do hormônio por determinados receptores (através de ooforectomia ou drogas) há uma diminuição na taxa de proliferação celular.

hER α e hER β . Estes receptores possuem alto grau de homologia com relação ao sítio de ligação ao DNA e os domínios de interação com seus ligantes. Além disso, estes receptores podem formar heterodímeros. Entretanto os hERs produzem sinais distintos quando estimulados. Por exemplo, ER β não potencializa o fator de transcrição nuclear AP-1 (proteína ativadora 1) quando complexado com estradiol, enquanto ER α o faz. Isto sugere que ER α e ER β podem exercer diferentes funções na regulação gênica e seus níveis relativos em diferentes tecidos podem influenciar na resposta celular mediada por estrógeno. Nos adenocarcinomas mamários, o ER α se destaca como referencia de prognóstico (MARUYAMA et al., 2001; SHAW et al., 2002).

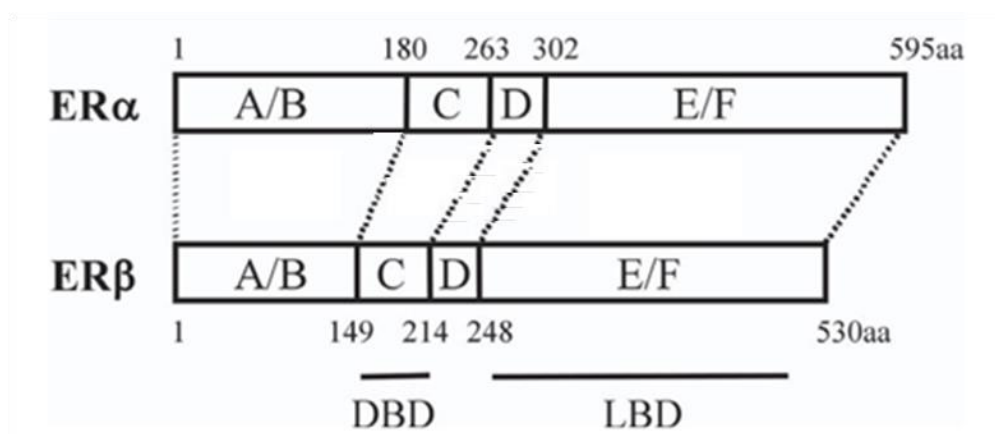


Figura 3 - Diagrama representativo dos receptores α e β . A porção C representa o domínio ligante a DNA e a porção E/F representa o domínio de interação com o ligante. (IKEDA; INOUE, 2004)

Complexos AP-1 são fatores onipresentes de transcrição heterodimérica das subfamílias Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, e Fra-2). Através de ligação a 12-O-tetradecanoil-forbol-3-acetato (TPA) ou um elemento de resposta AMP cíclico, AP-1 regula uma grande variedade de processos celulares, tais como o crescimento celular, diferenciação, morte e sobrevivência. Geralmente, complexos AP-1 funcionam como reguladores positivos da proliferação celular através da regulação da expressão de proteínas essenciais do ciclo celular, como a ciclina D1, p53, p21, p19 e p16, mas os efeitos diferenciais também estão presentes entre os membros individuais (GUTZMAN et al., 2004; XIE et al., 2005).

A inibição da expressão gênica de Jun e Fos por RNAs anti-senso reduzem a taxa de proliferação dos fibroblastos de camundongo, enquanto a introdução de

anticorpos específicos contra as proteínas Fos e Jun em fibroblastos resultou em efeitos similares. Alguns membros do complexo AP-1, como as proteínas Jun, podem ajudar Ras ativado na transformação celular. A superexpressão de c-fos causou osteossarcomas e condrossarcomas em camundongos transgênicos (RÜTHER et al, 1987 *apud* (GUTZMAN et al., 2004; XIE et al., 2005). Em contraste, a expressão de um transgene dominante negativo para c-jun (DN) em camundongos inibiu a promoção de tumor induzido por TPA (GUTZMAN et al., 2004; XIE et al., 2005).

Além de seu papel no crescimento celular, a transformação celular e indução da formação do tumor, AP-1 também está envolvida em outros aspectos da progressão do tumor, como a invasão e angiogênese, regulando a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) e fatores angiogênicos (GUTZMAN et al., 2004; XIE et al., 2005).

No diagnóstico e tratamento do câncer de mama, a prática de detecção do hER α é geralmente reconhecida como sendo útil uma vez que a presença dele está relacionada a uma resposta favorável à terapia endócrina. (GOULDING et al., 1995; PERTSCHUK et al., 1996; BARNES et al., 1996; SHAW et al., 2002)

Apesar de uma grande homologia na região ligante ao DNA (97%), em outras regiões a homologia entre o hER α e o hER β é menor sendo 53% no domínio ligante a estrógeno e menos de 30% no restante da molécula. (IKEDA; INOUE, 2004; SHAO; BROWN, 2004; DAHLMAN-WRIGHT et al., 2006)

Atualmente, o teste “padrão ouro” para verificar a positividade para hER α é realizado por imunohistoquímica (IH). A técnica de IH usa anticorpos monoclonais anti-hER α como marcadores para presença da proteína e anticorpos secundários anti Ig complexados com HRP como repórter (Figura 4).

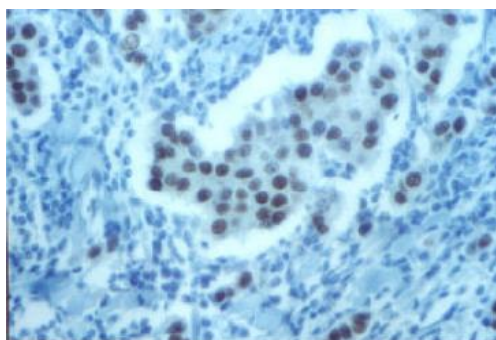


Figura 4– Aspecto imunohistoquímico de tecido tumoral de mama com positividade para receptor de estrógeno. Núcleos corados em preto indicando positividade para o receptor. (BOLASÉLL et al., 2000)

A grande maioria dos laboratórios de patologia que realizam esse teste utiliza o anticorpo provindo do clone 1D5 da Dako Biotechnology. O alto valor praticado pela empresa motivou algumas outras empresas a produzirem esses anticorpos, no entanto, a dificuldade em se obter um produto de qualidade semelhante tem se mostrado bastante significativa.

A publicação de Saati e colaboradores, 1993 na qual esse hibridoma foi produzido não apresenta maiores dados sobre as técnicas e abordagens utilizadas, o que reforça a importância de um trabalho com essas moléculas.

1.1.3 Dako biotechnology

A Dako Biotechnology foi fundada em 1966 na Dinamarca, se destacou por introduzir os primeiros anticorpos conjugados para imunohistoquímica e padronização entre lotes de anticorpos, o que possibilitou a formação de protocolos mais precisos em hospitais e serviços de saúde.

Hoje é uma empresa que se destaca na produção de insumos e soluções para diagnóstico de câncer baseados em tecidos que aperfeiçoem o fluxograma operacional de laboratórios de patologia.

Atualmente a empresa tem duas estruturas de manufatura, uma na Dinamarca e outra nos EUA. No mercado de insumos para análise histopatológica em câncer, a Dako é a empresa líder de mercado nos mais de 70 países em que opera e tem um faturamento anual de mais de U\$280 milhões (DDK 1,6 bilhões).

1.1.4 Mercado brasileiro

Fazendo um levantamento do número previsto de casos para o Brasil nos relatórios do INCA de 2008 e 2010, ocorrem no país aproximadamente 49.000 novos casos de câncer de mama anualmente. No entanto, a venda de insumos para análise supera esse número em ao menos 20%, uma vez que os testes não são feitos todos sequencialmente no mesmo laboratório e existe uma repetição em 5 a 10% dos testes para confirmação e teste em outras partes do tecido. O uso desse insumo em pesquisa foi desconsiderado, pois a maioria dos laboratórios que tem acesso aos tumores já os obtêm analisados quanto à presença do receptor.

Considerando um total de 58.800 testes ano, o mercado atual baseado no preço praticado pela Dako Biotechnology (R\$3.391,96 para 1mL de sobrenadante de cultura) é de aproximadamente R\$1 milhão.

1.2 HIBRIDOMAS E ANTICORPOS MONOCLONAIS

Há pouco mais de um século, Paul Ehrlich (EHRlich, 1900) imaginou a possibilidade da existência de “balas mágicas” (*magic bullets*), moléculas capazes de especificamente reconhecer um determinado antígeno e neutralizá-lo. Em 1975, Köhler e Milstein (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) propuseram um método de produção de anticorpos monoclonais, que teriam esta função. Em seu método, células B produtoras de anticorpos seriam fusionadas com uma linhagem de células imortalizadas (mieloma, por exemplo) e assim, seria possível a obtenção de uma linhagem imortalizada de células produtoras de anticorpos. Atualmente, diversas linhagens de mieloma podem ser utilizadas, no entanto elas devem ser deficientes para a enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT). A fusão é facilitada pela adição de polietilenoglicol (PEG), que promove a aderência celular e a troca de material genético. As células fusionadas, denominadas hibridomas, são então cultivadas em meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT) (LITTLEFIELD, 1964), no qual apenas as células híbridas são capazes de proliferar dado que a aminopterina bloqueia a síntese *de novo* de nucleotídeos. Em seguida, é realizado uma diluição limitante dos clones positivos para obtenção de linhagens provenientes de uma única célula (STGROTH, DE; SCHEIDEGGER, 1980) (Figura 5). Desde 1975, mais de 10.000 clones já foram desenvolvidos (MICHAUD et al., 2003), para diversos antígenos sendo alguns já comercializados e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration, EUA).

O método de produção de hibridomas tem limitações como a existência de linhagens eficientes de mielomas apenas de roedores e lagomorfos, o processo de fusão é randômico, além de ter um alto custo (BERRY, 2005).

Os anticorpos monoclonais são atualmente muito importantes tanto na pesquisa como em diversas formas de diagnóstico e terapias, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, bem como devido à excelente reprodutibilidade que ensaios que o utilizam apresentam (PAYNE et al., 1988). Apesar do alto custo de produção dos anticorpos monoclonais (em relação aos anticorpos policlonais), depois que se tem uma linhagem celular estabelecida, podem ser produzidos com

alta reprodutibilidade e em alta quantidade, diferentemente dos policlonais. Além disso, os anticorpos monoclonais evitam possíveis reações cruzadas inerentes aos anticorpos policlonais (BERRY, 2005). Atualmente, para a produção de anticorpos monoclonais que possam ser utilizados em terapias com humanos, já é possível produzi-los de maneira quimérica (com a porção Fc humana e a porção Fab de outro animal), bem como é possível produzir anticorpos monoclonais pela técnica de *phage display* ou por recombinação gênica (LITTLE et al., 2000).

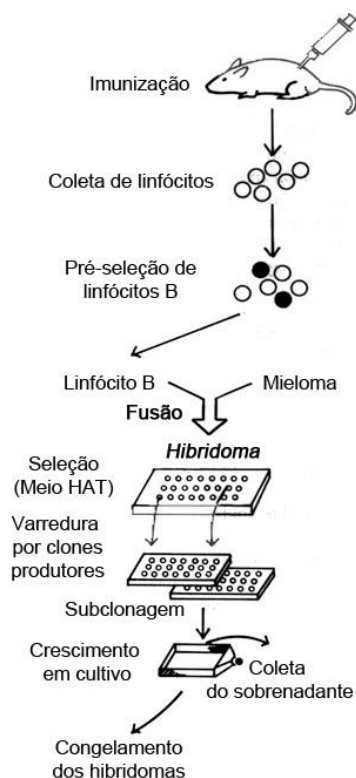


Figura 5 – Representação do processo de produção de hibridomas. (adaptado de http://faculty.matcmadison.edu/mLjensen/BloodBank/lectures/blood_bank_antigens_and_antibodi.htm)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconheçam o receptor α de estrógeno humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Clonar o fragmento codificante para o hER α em vetor de expressão para sistema heterólogo em *E. coli*
- Expressar e purificar a proteína recombinante

- Produzir anticorpos policlonais anti-hER α a partir de imunização de camundongos
- Produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais a partir da fusão de esplenócitos de camundongo com células de mieloma

3 JUSTIFICATIVA

Com base em uma pesquisa em bancos de patentes e de publicações científicas, não foram encontradas no Brasil publicações ou patentes relacionados à produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-hER α . A ausência de publicações brasileiras referentes a esses hibridomas indica que não estão sendo realizados esforços nesse sentido no nosso país. Já a ausência de patentes indica a dependência tecnológica que o Brasil tem em relação a esse produto.

Num contexto em que cada vez fala-se mais sobre a saúde da mulher no Brasil, mais do que um projeto de desenvolvimento científico, a produção de tecnologia que garanta a capacidade independência do país em relação a outras nações no que concerne a tais insumos, torna-se também uma questão de soberania.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM

Considerando-se a homologia das diferentes regiões dos receptores α e β como visto na figura 6 e homologia do receptor humano e murino (ANEXO 1 e 2), foram utilizadas duas estratégias: a clonagem da sequência codificante para a proteína inteira e a sequência codificante para a região A/B do hER α verificando a diferença na imunogenicidade das mesmas. Essas estratégias se justificam pelo artigo de Saati (SAATI et al., 1993) pois eles usaram a proteína inteira mas conseguiram os anticorpos monoclonais anti-hER α com epítipo na região A/B que é exatamente a região com menor homologia entre os receptores α e β . Além disso, a formação de corpos de inclusão pela proteína inteira pode representar um obstáculo para a purificação o que justifica a clonagem do domínio A/B apenas.

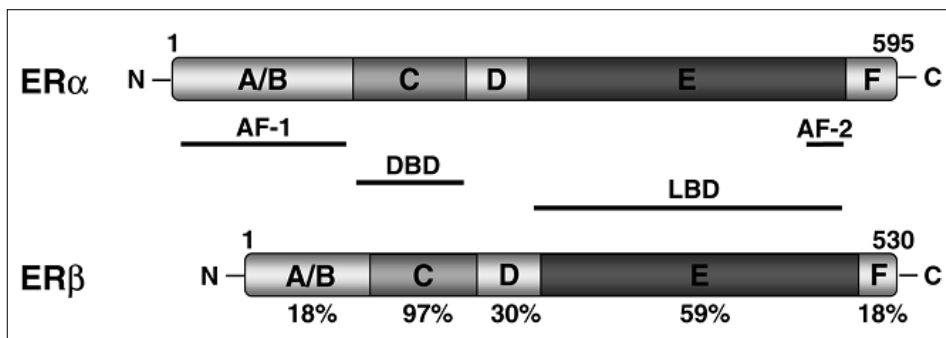


Figura 6 -Diagrama representativo dos receptores α e β diferenciando os domínios funcionais e a taxa de homologia nas diferentes regiões. (SHAO; BROWN, 2004)

Para basear as estratégias, foi utilizada a sequência do gene para *Homo sapiens estrogen receptor 1 (ESR1), transcript variant 1, mRNA (NM_000125.3* no banco de dados da NCBI).

O vetor escolhido para a expressão foi o pET28a (Novagen) baseado na abordagem realizada por Saati (SAATI et al., 1993). O mapa do vetor pode ser visto em anexo (ANEXO 3). Em ambas as abordagens, a cauda de histidina ficou fusionada à extremidade N terminal da proteína.

4.1.1 Desenho dos iniciadores

Para o desenho dos iniciadores foram usadas as seguintes ferramentas de bioinformática:

- *Oligo Analyzer*: Ferramenta para verificar, T_m , *hairpin*, homodímeros e heterodímeros em oligonucleotídeos.
- BLAST: Ferramenta para busca de alinhamento de seqüências de nucleotídeos com o banco de dados da NCBI. Útil para verificar o alinhamento específico dos iniciadores com a seqüência de referência.
- ClustalW2: Ferramenta para alinhamento de seqüências escolhidas.
- NEBcutter V2.0: Ferramenta para prever sítios de restrição em uma seqüência de nucleotídeos. Ferramenta útil para determinar as enzimas de restrição usadas no trabalho.

Usando o NEBcutter V2.0 foram determinadas as enzimas de restrição que poderiam ser usadas por estarem presentes no sítio de policlonagem do vetor pET28a e não digerirem a seqüência alvo.

Em seguida as sequências de mRNA inteiro e codificante foram alinhadas com o auxílio do ClustalW2 para determinar as posições nas quais seriam projetados os iniciadores.

Os iniciadores foram projetados manualmente e testados para os seus T_m (temperatura de *melting* – temperatura na qual metade das bases em determinada sequência encontra-se desnaturada), *hairpin* (estrutura de grampo que uma sequência pode formar por interações entre as bases de sua própria fita), homodímeros (dímeros formados entre duas moléculas do mesmo iniciador) e heterodímeros (dímeros formados entre moléculas de diferentes iniciadores utilizados na mesma reação) utilizando-se o *Oligo Analyzer*.

Após o desenho, foi utilizado o BLAST para confirmar a especificidade do alinhamento dos iniciadores com as sequências e posições desejadas.

Por fim, o ClustalW2 foi utilizado mais uma vez para verificar o correto alinhamento com as posições previstas dos iniciadores com o mRNA e foram geradas as figuras 7, 8, 9 e 10. Este programa também foi utilizado para conferir o sequenciamento dos insertos nos vetores com a sequência de referência no NCBI.

No quadro 1 podemos observar os iniciadores projetados para a realização deste trabalho.

Nome dado ao iniciador	Sequência
R5RERTPCRMX	GTGCCACTAAGAACTGAG
F1REMXEL	GGCCACGGCATATGACCATG
R1REABMXEL	ACAGTCTCGAGTCTACTTGGCAG
R2REINTMXEL	TGCCCTCGAGCTCTCAGAC
F2RESECMX443	GGCATTCTACAGGCCAAATTC
F3RESECMX843	GGTCTGCTGGAGACATGAG
F4RESECMX1215	CCTAACTTGCTCTTGGACAGG

QUADRO 1 – Relação de iniciadores projetados.

4.1.1.1 R5RERTPCRMX

O cDNA de mama normal foi cedido gentilmente pela pesquisadora Felicia Peterson Cavalher do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Dada a extensão do mRNA de interesse, foi sintetizado com uma combinação de iniciadores randômicos e Oligo dT.

Com o fim do material cedido, foi tomada a decisão de produzir o cDNA a partir de mRNA de células da linhagem MCF7 (linhagem ATCC HTB-22™). Essa linhagem é derivada de um adenocarcinoma de glândula mamária. Essa linhagem já foi caracterizada e é descrita como positiva para expressão de receptor de estrógeno.

Uma vez que foi verificado que o uso de iniciadores randômicos e Oligo dT não foi eficiente para amplificar a sequência codificadora para a proteína inteira, foi realizada uma abordagem com primer específico (Figura 7).

```

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      TCTACTTCATCGCATTCTCTGCAAAAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGA 2000

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      GGGTTCCTGCCACGGTCTGAGAGCTCCCTGGCTCCACACGGTTCAGA 2050
R2REINTMXEL                          -----GGTCTGAGAGCTCGAGGGCT----- 20
                                      *****~*****

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      TAATCCCTGCTGCATTTTACCCTCATCATGCACCACTTTAGCCAAATCT 2100

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      GTCTCCTGCATACACTCCGGCATGCATCCAACACCAATGGCTTTCTAGAT 2150

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      GAGTGGCCATTCATTTGCTGCTCAGTTCCTTAGTGGCACATCTTCTGTCT 2200
R5RERTPCRMX                          -----CTCAGTTCCTTAGTGGCAC----- 18
                                      *****

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      TCTGTTGGGAACAGCCAAAGGATTCCAAGGCTAAATCTTGTAAACAGCT 2250

```

Figura 7 - Alinhamento do mRNA codificante para hER α com os iniciadores R2REINTMXEL e R5RERTPCRMX (sequência complementar inversa). As bases que não estão alinhadas são correspondentes a mutações pontuais para criar o sítio de restrição no amplicon.

O iniciador R5RERTPCRMX foi montado a uma distância de mais de 150 bases a 3' do códon finalizador da proteína para que o iniciador R2REINTMXEL não tivesse impedimentos para anelar com eficiência.

4.1.1.2 F1REMXEL

O sítio de restrição escolhido para ser inserido na extremidade 5' da sequência foi o *NdeI*. Para isso foi projetado o iniciador *forward* F1REMXEL – GGCCACGGCATATGACCATG. No iniciador, as letras em vermelho indicam bases que diferem da sequência original e foram adicionadas para criar sítios de restrição desejados, a marcação de fundo em verde identifica o códon de início da proteína e a sequência sublinhada indica o sítio de restrição criado (Figura 8). Esse iniciador foi utilizado nas duas abordagens da clonagem, mudando-se apenas o iniciador *reverse*.

```

gi|1170295798|ref|NM_000125.3|H      TGCTCTTTTCCAGGTGGCCCGCCGGTTTCTGAGCCTTCTGCCCTGCGGG 200

gi|1170295798|ref|NM_000125.3|H      GACACGGTCTGCACCCCTGCCCGCGGCCACGGACCATGACCATGACCCCTCC 250
F1REMXEL                               -----GGCCACGGCATATGACCATG----- 20
                                         ***** ~*****

gi|1170295798|ref|NM_000125.3|H      ACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCAGATCCAAGGGAACGAG 300

```

Figura 8 - Alinhamento do mRNA codificante para hER α com o iniciador F1REMXEL. As bases que não estão alinhadas são correspondentes a mutações pontuais para criar o sítio de restrição no amplicon.

4.1.1.3 R1REABMXEL

O sítio de restrição escolhido para ser inserido na extremidade 5' da sequência foi o *XhoI*. O iniciador *reverse* criado para clonar o domínio A/B foi o R1REABMXEL (Figura 9). A sequência de nucleotídeos referente ao iniciador é dada por: ACAGTCTCGAGTCTACTTGGCAG. No iniciador, as letras em vermelho indicam bases que diferem da sequência original e foram adicionadas para criar códon de parada de transcrição e sítio de restrição desejados, o fundo em cinza indica o códon de parada (Âmbar) e a sequência sublinhada indica o sítio de restrição criado.

```

gi|1170295798|ref|NM_000125.3|H      ATCGACGCCAGGGTGGCAGAGAAAAGATTGGCCAGTACCAATGACAAGGGA 750

gi|1170295798|ref|NM_000125.3|H      AGTATGGCTATGGAATCTGCCAAGGAGACTCGCTACTGTGCAGTGTGCAA 800
R1REABMXEL                               -----CTGCCAAGTAGACTCGAGACTGT----- 23
                                         ***** ~*****

gi|1170295798|ref|NM_000125.3|H      TGACTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTGGTCTGTGAGGGCTGCA 850

```

Figura 9 - Alinhamento do mRNA codificante para hER α com o iniciador R1REABMXEL (seqüência complementar inversa). As bases que não estão alinhadas são correspondentes a mutações pontuais para criar o sitio de restrição no amplicon e o códon de parada.

4.1.1.4 R2REINTMXEL

O iniciador *reverse* para a proteína inteira usou também o sitio de restrição *XhoI*. Este iniciador foi chamado de R2REINTMXEL e a sua seqüência é dada por TGCCCTCGAGCTCTCAGACC. No iniciador, as letras em vermelho indicam bases que diferem da seqüência original para adicionar o sitio de restrição desejado, o fundo em cinza indica o códon de parada (Opala) e a seqüência sublinhada indica o sitio de restrição criado.

```

gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      TCTACTTCATCGCATTCTCTGCAAAAAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGA 2000
gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      GGGTTTCCCTGCCACGGTCTGAGAGCTCCCTGGCTCCCACACGGTTCAGA 2050
R2REINTMXEL                          -----GGTCTGAGAGCTCGAGGGCT----- 20
                                      *****~*****
gi|170295798|ref|NM_000125.3|H      TAATCCCTGCTGCATTTTACCCTCATCATGCACCACTTTAGCCAAATTCT 2100

```

Figura 10 - Alinhamento do mRNA codificante para hER α com o iniciador R2REINTMXEL (seqüência complementar inversa). As bases que não estão alinhadas são correspondentes a mutações pontuais para criar o sitio de restrição no amplicon.

4.1.1.5 Iniciadores para sequenciamento

Para o sequenciamento do inserto codificante para a proteína inteira, foi necessário o desenho de iniciadores internos. Na nomenclatura dada a cada um deles, o final do nome indica a posição em que inicia o anelamento (extremidade 5') com o inserto.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA

Células MCF7 (linhagem ATCC HTB-22™) foram cultivadas em meio de cultivo MEM (Eagle's minimum Essential Medium) com adição de 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 40µg/mL de sulfato de gentamicina e 0,01 mg/mL de insulina bovina. As células expandidas em seis placas com 100mm de diâmetro para a extração do RNA.

Após lavagens da placa com PBS para remover o meio de cultura e soro fetal bovino, o RNA foi extraído usando-se 1mL de TRIzol (Invitrogen) por placa e seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante no manual.

Parte das células foi mantida em cultivo para nova expansão e para a produção de extrato.

4.3 REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

A reação foi realizada em duas etapas.

Na primeira etapa, em um tubo de 200 μ L com paredes finas (pré tratado por 16h em um pote de vidro com 20 μ L de DEPC (Invitrogen) que em seguida foi autoclavado) foi adicionado 20pmol de iniciadores (que variaram entre reações), 500ng de RNA total de MCF7, H₂O (ultrapura tratada com DEPC) qsp. 5 μ L. Alternativamente, em algumas reações, foi adicionado 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Amershan).

Essa mistura foi então aquecida em um termociclador (BioRad MyCycler) a 70°C por 5min e resfriada rapidamente para 4°C numa tentativa de eliminar estruturas secundárias do mRNA.

Na segunda etapa, foi adicionado ao tubo 20 μ L de uma solução contendo: Tampão ótimo para a enzima 1,25x (50mM Tris-HCl (pH 8.3 a 25°C), 75mM KCl e 10mM DTT), MgCl 3,75mM, dNTPs 0,625mM, RNase Out 1,25U/20 μ L, transcriptase reversa *Improm II Reverse transcriptase* 1 μ L, H₂O (ultrapura tratada com DEPC) qsp. 20 μ L. Todos os reagentes dessa reação eram da marca Promega. Alternativamente, em algumas reações, foi adicionado até 5% de DMSO.

Essa mistura foi então aquecida em um termociclador (BioRad MyCycler) a 25°C por 5min para anelamento dos iniciadores, seguidos por 42°C por 60min para extensão e 72°C por 15min para inativação da enzima.

4.4 OBTENÇÃO DOS INSERTOS

Os insertos foram obtidos por reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Inicialmente foram realizadas reações piloto de PCR utilizando *Taq* DNA Polimerase para padronizar as condições de reação e teste dos iniciadores. Após os testes, foram realizadas reações utilizando enzima *Pfu* DNA Polimerase para a amplificação de produtos, visando a clonagem com uma taxa de erros mais baixa.

As reações foram realizadas com: Enzima e tampão da Pfu Polimerase da marca Fermentas (5 U/ μ L), dNTPs 0,5mM Promega, iniciadores encomendados da IDT a partir do desenho desenvolvido, termociclador (BioRad MyCycler), tubos de polipropileno de 200 μ L com paredes finas. Como moldes, foi utilizado o cDNA produzido (item 4.3). Após a reação, foi feita a corrida em gel de agarose 1,5% em TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8) contendo brometo de etídio (5 μ g/mL) juntamente com 0,5 μ g do marcador de pares de base 100bp e/ou Lambda *HindIII* ladder (Fermentas).

4.5 OBTENÇÃO DE VETORES

4.5.1 Digestão dos insertos e vetores

Os produtos de PCR obtidos com os pares de iniciadores F1REMXEL - R1REABMXEL e F1REMXEL - R2REINTMXEL foram purificados por extração de gel (QUIAGEN - QIAquick Gel *Extraction Kit*) e duplamente digeridos pelas enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* assim como os plasmídeos pET28a vazios.

A reação de digestão foi feita em um micro tubo contendo o material a ser digerido, buffer tango 2x concentrado (Fermentas), *NdeI* 10U (Fermentas), *XhoI* 10U (Fermentas), água ultrapura autoclavada qsp. 50 μ L. A digestão foi realizada a 37°C por 16h seguidas por inativação das enzimas a 80°C por 20min.

4.5.2 Ensaio de ligação

Os produtos da digestão foram purificados por extração de gel (kit QUIAGEN) e usados no ensaio de ligação. O ensaio de ligação consiste na junção de plasmídeos (50ng) e insertos (fração molar de 1:5) cortados com o mesmo par de enzimas e a ligação deles usando a enzima T4 DNA ligase.

A reação foi feita em um micro tubo contendo os plasmídeos, insertos, tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) 1x, T4 DNA ligase recombinante (Fermentas) 5U. A reação de ligação foi realizada a 16°C por 16h seguidas por inativação da enzima a 65°C por 15min.

4.5.3 Transformação em *E. coli DH5 α*

Para a transformação das células eletrocompetentes, alíquotas (40 μ L) foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas lentamente em gelo. Após o

descongelamento, foi adicionado 1 μ L (aproximadamente 5ng) do produto de ligação (pET28a-ER ou pET28a-ER-A/B). As células foram então incubadas no gelo durante 1min e submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV, para a introdução do DNA na célula (eletroporador Bio-Rad). Após os pulsos elétricos, foram adicionados às células 1 mL de meio LB (triptona 10g, extrato de levedura 5g, cloreto de sódio 10g e água destilada qsp. 1L) e a cultura foi incubada a 37°C durante uma hora sob agitação de 210RPM em incubadora para recuperação das células. (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Após a recuperação das células a cultura foi plaqueada em meio sólido (LB-Ágar 17g/L LB) contendo sulfato de canamicina na concentração de 30 μ g/mL (o plasmídeo pET28a possui um gene que codifica resistência à canamicina). (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

Algumas colônias selecionadas das bactérias DH5 α , que apresentaram resultado positivo no PCR de colônia, foram usadas para se fazer uma preparação plasmidial em pequena escala (mini-prep) (kit Quiagen). A partir de cada colônia individual, a mini-prep fornece uma suspensão purificada uniforme dos plasmídeos gerados.

Os plasmídeos foram analisados pelo teste de padrão de digestão e sequenciamento. Aqueles que passaram pela seleção por apresentarem o padrão esperado foram usados para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3) STAR (Invitrogen).

4.6 VERIFICAÇÃO DOS VETORES OBTIDOS

4.6.1 PCR de colônia

As colônias selecionadas aleatoriamente foram repicadas para uma placa mestre com o uso de palitos de dente esterilizados. Os palitos foram usados para o repique e em seguida foram passados no fundo de micro tubos de 200 μ L. Dentro de cada tubo foram adicionados 10 μ L da seguinte solução: tampão *Taq* -MgCl 1X, MgCl 2mM, dNTPs 10mM, iniciador *forward* 0,5 μ M, iniciador *reverse* 0,5 μ M, *Taq* DNA polimerase 1U/ μ L, DMSO 5%, água ultrapura autoclavada qsp. 10 μ L. As condições e iniciadores da reação foram as mesmas usadas na produção do inserto exceto o primeiro aquecimento a 95°C que durou 5min com o objetivo de garantir uma lise eficiente das bactérias presentes no tubo.

Algumas das colônias que apresentaram positividade para esse teste foram usadas para fazer uma mini-preparação (item 4.5.3).

4.6.2 Ensaio de digestão

A reação de digestão foi feita a partir do produto obtido das mini-preparações. Para cada uma das amostras foram feitos três tubos. Um micro tubo contendo 150ng do material a ser digerido, buffer tango 2x concentrado (Fermentas), enzimas *NdeI* 2,5U (Fermentas) e *XhoI* 2,5U (Fermentas) e água ultrapura autoclavada qsp. 10 μ L. Os outros dois tubos continham a mesma mistura porém com apenas uma das enzimas de restrição. A digestão foi realizada a 37°C por 16h seguidas por inativação das enzimas a 80°C por 20min.

Após a reação, foi feita a separação eletroforética em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (5 μ g/mL) juntamente com 0,5 μ g do marcador de pares de base 100bp e/ou Lambda *HindIII* ladder (Fermentas).

4.6.3 Sequenciamento

As colônias que apresentaram o padrão esperado no ensaio de digestão foram submetidas à reação de sequenciamento com a finalidade de verificar a conformidade da clonagem do inserto no vetor, assim como a ausência de mutações de qualquer tipo no inserto.

As reações foram feitas em tubos para termociclador com a seguinte solução: 1 μ L BigDye (Applied Biosystems), 3 μ L Buffer 2,5x, 5pmol iniciador, 300ng dsDNA (plasmídeo molde), em um volume final de 10 μ L.

Os iniciadores utilizados em diferentes reações foram: T4 *promoter*, T4 *terminator*, presentes no vetor assim como o F2RESECMX443, F3RESECMX843 e F4RESECMX1215 internos à sequência codificante para a proteína inteira. A reação foi submetida a 96°C por 2min e 35 ciclos de 96°C 15 s, 48°C 15 s, 60°C 4min.

Após a reação, as amostras foram precipitadas, adicionando-se 1 μ L de Acetato de Sódio 1,5M/ EDTA 0,25M e 30 μ L de etanol 100% (Merck), a reação foi então transferida para um tubo de 1,5mL e homogeneizada gentilmente. Os tubos foram mantidos no gelo por 10min e então centrifugados por 20min a 20.000xg, 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 15 μ L de etanol (Merck) 70% gelado para lavagem do sedimento, em seguida, os tubos foram novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o tubo seco em estufa a 37°C por

uma hora. As reações foram mantidas em -20°C até serem aplicadas no sequenciador. Para a aplicação, $10\mu\text{L}$ de formamida (HI-DI) foram adicionados logo antes da corrida. Foram utilizados os sequenciadores Applied Biosystems 3500xL e 3130 (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e Núcleo de Fixação de Nitrogênio respectivamente).

4.7 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

4.7.1 Transformação bacteriana

A transformação para expressão ocorreu da mesma forma do item 4.5.3, no entanto, a cepa bacteriana foi a *E. coli BL21 (DE3) STAR* eletrocompetente.

4.7.2 Produção de antígeno recombinante

Das *E. coli BL21 (DE3) STAR* que cresceram em meio seletivo, algumas colônias foram selecionadas para fazer uma expressão em pequena escala (mini-expressão) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As colônias selecionadas foram transferidas para uma placa mestre inoculadas em 5mL de meio LB com antibiótico e incubadas em agitador por 16h, 36°C , 210rpm. Essas culturas em fase de crescimento estacionário eram usadas como pré-inóculo do processo de mini-expressão. Em novos frascos, contendo 10mL de meio LB seletivo, foi feita a inoculação a uma taxa de 1:50 e incubadas por 3h, 36°C , 210RPM ou até que atingissem uma D.O. entre 0,5 e 0,8 quando medidas em 600nm . Para controle negativo de expressão, 1mL de cada cultura era separado e reservado. Nesse momento, 1mM de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) foi adicionado à cultura induzindo o operon Lac que regula a expressão da proteína recombinante inserida no vetor pET28a. A indução ocorreu por 3h mantendo-se as condições de cultivo e em seguida as bactérias contidas em 1mL de cultura foram coletadas por centrifugação a $4000\times g$ por 10min. O sedimento era então ressuspenso em $30\mu\text{L}$ de tampão de amostra redutor (60mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofenol) (LAEMMLI, 1970) e aquecido a aproximadamente 90°C por 5min. dessa amostra $7,5\mu\text{L}$ foram submetidos a uma separação eletroforética por SDS-PAGE (10 ou 12% dependendo do tamanho do fragmento esperado) e corada com azul de coomassie para verificação do clone com melhor taxa de expressão (SHAPIRO et al., 1967).

Para expressão em larga escala, foi realizado um processo análogo ao de pequena escala, no entanto o pré-inoculo foi feito em 20mL de meio LB com antibiótico e 10mL dessa cultura foram usados como inoculo de uma cultura com volume final de 1L. As condições e tempos de incubação foram os mesmos da mini-expressão.

4.7.3 Purificação do antígeno recombinante

Após diferentes abordagens, o protocolo para purificação da proteína A/B (F1R1) do receptor foi realizado com uma adaptação do método para purificação de corpos de inclusão proposto por Singh e Panda, 2005 e é resumido no fluxograma da figura 11.

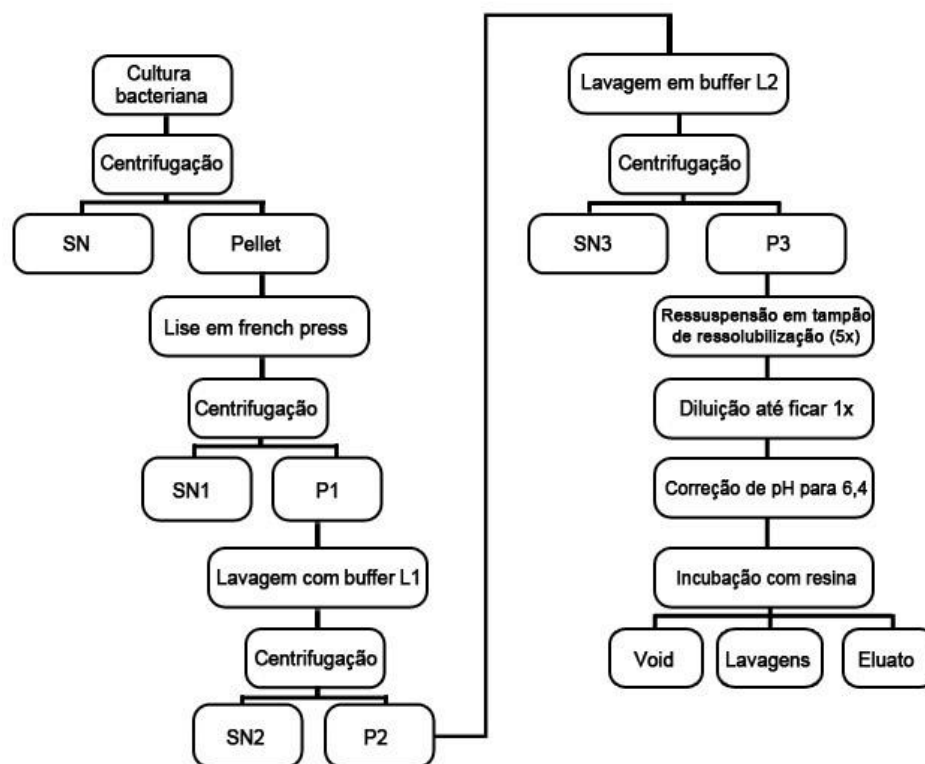


Figura 11 – Fluxograma de purificação da fração A/B recombinante de hER α .

O volume total da cultura foi separado em 4 tubos de 250mL e centrifugado a 5000xg por 15min. O sobrenadante (SN) foi descartado e o sedimento de cada tubo foi ressuspenso em 25mL de tampão de lise nativa gelado (Tampão fosfato pH8, 150mM NaCl , 2mM PMSF) acrescido de 1mg/mL de lisozima e mantido em banho de gelo (3 das alíquotas foram congeladas). As células foram lisadas em seguida

utilizando uma prensa de french para efetuar lise mecânica (1000psi). O lisado foi então centrifugado a 9000xg por 30min a 4°C e o sobrenadante (SN1) descartado. O sedimento (P1) foi ressuspensão em 5 mL de tampão de lavagem 1 (*Buffer L1*) (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, pH8,5) e foi submetido a 8 ciclos de sonicação de 30s com 10s de intervalo em banho de gelo. A suspensão foi então centrifugada a 9000xg por 30min a 4°C e o sobrenadante (SN2) descartado. O sedimento (P2) foi ressuspensão em 5mL de tampão de lavagem 2 (*Buffer L2*) (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, 1% triton x-100, pH8,5) e era submetido a mais uma etapa de sonicação. Após nova centrifugação, o sobrenadante (SN3) foi descartado. O sedimento foi ressuspensão em 5mL de tampão de ressolubilização 5x (100mM tris, 2M uréia, 10% glicerol, 5% sucrose, pH12,5) e submetido a uma nova dissociação por sonicação. Essa suspensão foi levada então para câmara fria e mantida sob agitação. A cada 10min, 5mL de água ultrapura foram adicionados à mistura até que o tampão ficasse 1x concentrado (4 adições de água). O pH foi corrigido para 6,4 e a suspensão foi então centrifugada a 9000xg por 30min a 4°C, o sobrenadante (SN6,4) foi incubado a 4°C, por 1 hora com a resina de Ni-NTA-Agarose sob agitação.

O polimento foi feito por meio de cromatografia de afinidade à metal imobilizado (Novagen Co.) uma vez que o plasmídeo produz o peptídeo desejado conjugado com uma etiqueta de 6 histidinas.

O processo tem por princípio a cromatografia de afinidade baseada em uma competição da cauda de histidina e do imidazol (que é inserido em forma de gradiente na fase móvel) pelo níquel presente na fase estacionária.

O SN6,4 foi incubado com a resina por 1-3h e esta empacotada em uma coluna. A parte do SN6,4 que não fica ligado à resina é chamado de Void. A coluna foi então lavada com 30mL de tampão de solubilização 1x pH6,4 com 20mM de imidazol coletados de 10 em 10mL (Lavagens).

A eluição foi feita com 10mL de tampão de solubilização 1x pH6,4 com 250mM de imidazol coletados em micro tubos em alíquotas de 1mL. De cada alíquota, foram retirados 30µL que após serem misturados com tampão de amostra redutor (LAEMMLI, 1970) e aquecidos a aproximadamente 90°C por 5min, foram submetidos a uma separação eletroforética por SDS-PAGE 12% e o gel corado com

azul de coomassie para verificação dos eluatos que contem a maior quantidade de proteína recombinante (SHAPIRO et al., 1967).

Esses eluatos foram reunidos e submetidos a uma diálise em sistema aberto com troca de tampão por gradiente. O processo foi iniciado com uma diálise contra 500mL de tampão B (25mM fosfato dissódico monoácido, 12mM ácido cítrico, 1% sucrose, 60mM NaCl, 1M uréia, pH5,2) por um sistema de gradiente o tampão foi trocado durante 40h com 3L de tampão A (25mM fosfato dissódico monoácido, 12mM ácido cítrico, 1% sucrose, 60mM NaCl, pH5,2).

A concentração de proteína foi então medida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e as alíquotas acrescidas de 10% de glicerol foram estocadas a -20°C.

A pureza foi testada por SDS-PAGE (SHAPIRO et al., 1967) seguido por coloração com prata (Silver Staining (and De-Staining) of Polyacrylamide Gels Protocols).

4.8 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Os procedimentos que utilizam animais descritos nesse trabalho estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA-SCB-UFPR), certificado nº214.

Após purificação do antígeno recombinante, camundongos (Balb/C, gentilmente cedidos pelo pesquisador Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná) foram imunizados de acordo com o seguinte protocolo: No dia -3 foi coletado o soro pré-imune. No dia 0. os animais foram imunizados e reforços de imunização foram feitos nos dias 13, 27 e no dia 37 foram coletados os soros hiperimunes.

Os cinco animais foram separados em dois grupos que receberam misturas diferentes para imunização:

1. 20µg de antígeno (F1R1) (50µL), 50µL de adjuvante de Freund (completo na primeira dose e incompleto nos reforços). Do qual fizeram parte os animais 1, 3 e 5. O adjuvante de Freund incompleto é composto por óleo mineral e o completo contém uma suspensão de

micobactérias no óleo mineral. A mistura do adjuvante com o antígeno forma uma emulsão.

2. 20µg de antígeno (F1R1), 10µg de Al(OH)₃, PBS qsp. 100µL. Do qual fizeram parte os animais 2 e 4.

Três animais (1, 3 e 4) receberam mais um reforço no dia 83 e tiveram o soro coletado para testes no dia 94.

Posteriormente foram recebidos mais três animais que seguiram o seguinte protocolo de imunização baseado nas melhores respostas dos primeiros animais. No dia -3 foi coletado o soro pré-imune. No dia 0 os animais foram imunizados com reforço nos dias 14, 26, 79, 94 e 112. Todos os animais foram imunizados com 20µg de antígeno (F1R1), 10µg de Al(OH)₃, PBS qsp. 100µL.

4.9 EXTRATO CELULAR (MCF7)

Células MCF7 (linhagem ATCC nº HTB-22™) foram cultivadas em meio de cultivo MEM (Eagle's minimum Essential Medium) com adição de 10% de soro fetal bovino, 40µg/mL de sulfato de gentamicina e 0,01 mg/mL de insulina bovina.

Placas contendo as células foram lavadas três vezes com PBS para a remoção completa do meio de cultivo. Em seguida, as células foram removidas mecanicamente com o auxílio de um policial de borracha. A suspensão foi centrifugada 5min a 500xg e o sobrenadante descartado.

Um volume equivalente a quatro vezes o volume do sedimento de tampão de lise (Tris-HCl 100mM pH7,4, desoxicolato de sódio 1%, Triton X-100 1%, NaCl 150mM, SDS 0,1%) acrescido de coquetel de inibidores de protease (Roche) foi adicionado à amostra.

A suspensão foi mantida em gelo por 40min sendo homogeneizada a cada 10min. O tubo foi então centrifugado (16000xg, 30min, 4°C) e o sobrenadante (extrato) coletado.

A concentração de proteínas do extrato foi medida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

O extrato foi armazenado a -20°C até o uso.

4.10 ENSAIOS DE WESTERN BLOT

Para realização dos ensaios de *Western blot* (TOWBIN et al., 1979), as amostras foram submetidas à SDS-PAGE (10 ou 12%) seguido da transferência para uma membrana de nitrocelulose em sistema *semi-dry* (*Bio-Rad*). A membrana foi bloqueada por 1h a temperatura ambiente com solução de TBST-leite (NaCl 150mM, Tris 50mM, Tween 20 0,05%, leite em pó desnatado 5%, pH 7,4), e em seguida incubada com o anticorpo primário diluído na solução de bloqueio por 16h a 4°C. Por fim, a membrana foi lavada com TBST (NaCl 150mM, Tris 50mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4) e incubada com anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio por 1h em temperatura ambiente. A revelação foi conduzida após nova lavagem com TBST pela adição de luminol e peróxido de hidrogênio (Pierce) e posterior exposição a filme fotográfico (Hiperfilm, GE), o qual foi revelado em seguida.

4.11 OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS

4.11.1 Cultivo de células de mieloma

Para a primeira fusão, foram utilizadas para a fusão células mielóides da linhagem Sp2/0-Ag14 (ATCC nº CRL-1581™). Na segunda, essas células foram substituídas pela linhagem P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL-1580™). As células foram mantidas em meio RPMI (Gibco) suplementado com glutamina 2mM, soro fetal bovino 20%, estreptomicina 10µg/mL, penicilina 10U.I./mL e anfotericina B 2,5µg/mL (meio de manutenção). Um dia antes da fusão, as células foram repicadas de forma que as placas estivessem com uma confluência de 40 a 60% no momento da fusão. As células foram soltas com auxílio de PBS-EDTA e contadas em câmara de Neubauer.

4.11.2 Obtenção de esplenócitos do animal imunizado

Três dias antes do dia programado para a fusão, o animal escolhido foi imunizado via intravenosa com 20µg de proteína recombinante em 50µl de PBS.

No dia programado, o animal hiperimune foi anestesiado e o sangue total coletado por punção cardíaca (eutanásia por exsanguinação e posterior uso do soro como repertório de anticorpos policlonais). Em seguida, o baço foi retirado assepticamente em fluxo laminar, sendo então macerado em meio RPMI (com adição de glutamina 2mM, estreptomicina 10µg/mL, penicilina 10U.I./mL e anfotericina B 2,5µg/mL) para liberação dos esplenócitos. Com o auxílio de uma

micropipeta, as células foram dissociadas, e o material foi então filtrado em seringa contendo um elemento filtrante constituído por uma malha de nylon estéril. Tais células foram centrifugadas por 10min a 500xg e então foi adicionado 5 mL de cloreto de amônio gelado (NH_4Cl 150mM, NaHCO_3 10mM, EDTA 0,1mM). O cloreto de amônio foi incubado por 5min em banho de gelo para que ocorresse a lise seletiva de hemácias. Adicionou-se meio RPMI sem soro (qsp. 25 mL) e a suspensão foi centrifugada novamente por 10min a 500xg. Novamente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 25 mL de meio RPMI sem soro. As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi então descartado. As células foram ressuspensas em mais 20 mL de meio sem soro e sua quantificação feita por contagem em câmara de Neubauer.

4.11.3 Ensaio de fusão

As células de mieloma foram então misturadas aos esplenócitos na proporção de 1:5 e novamente a mistura celular foi centrifugada 10min a 500xg. O sobrenadante foi descartado e, durante 2min, 1 mL de PEG 50% (Roche) aquecido a 37°C foi gotejado à mistura em constante agitação branda. Adicionou-se então 1 mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 1min (com agitação branda). Esse passo foi repetido uma vez. Por fim, adicionou-se 7 mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 2min (com agitação branda). A mistura foi então centrifugada por 5min a 1500 rpm. As células foram então ressuspensas em volume suficiente de meio de manutenção e distribuídas em placas de 96 poços (100 μL por poço, TPP) na razão de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células por poço.

4.11.4 Seleção dos hibridomas

No dia seguinte à fusão 100 μl de meio HAT (meio de manutenção, hipoxantina de sódio 0,1mM, aminopterina 0,4 μM , timidina 0.8mM). Durante a semana seguinte as células tiveram o seu meio parcialmente trocado duas vezes por meio HAT, essas duas trocas devem fazer com que a concentração de meio HAT fique em torno de 87,5%. Essa concentração é suficiente para a ação da aminopterina. No total, foram 3 adições de meio HAT com uma periodicidade de duas vezes por semana.

Como dito anteriormente, a linhagem de mieloma utilizada é deficiente para HPRT. A via de salvamento de produção de nucleotídeos é dependente de HPRT.

Portanto, uma vez que a aminopterina bloqueia a via de novo da síntese de nucleotídeos, as células deficientes em HPRT (mielomas não fusionados) irão morrer. Os esplenócitos que não se fundiram são inviáveis em cultivo e morrem em cerca de uma semana. Os hibridomas formados pela fusão entre a célula de mieloma e os esplenócitos possuem a HPRT e tem a capacidade de sobreviver ao meio HAT. Dessa forma os hibridomas, mesmo com a via de novo bloqueada, são capazes de sintetizar nucleotídeos pela via de salvamento (da qual a hipoxantina e a timidina são intermediários) e são, portanto, as únicas células que sobrevivem ao período de seleção (o esquema geral da seleção é apresentado na figura 12).

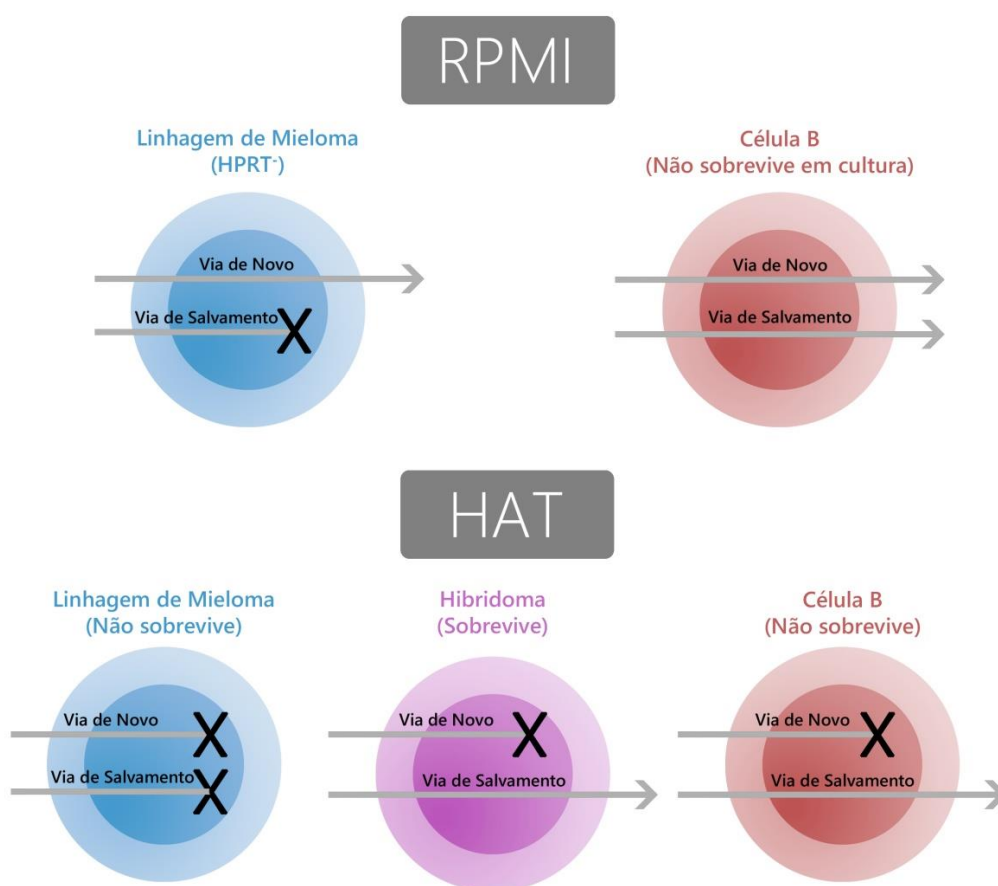


Figura 12 – Diagrama de seleção com meio contendo HAT

Em seguida foram feitas três trocas parciais de meio com meio HT (meio de manutenção acrescido de hipoxantina de sódio 0,1mM, timidina 0.8mM) mantendo-se a periodicidade. Esse procedimento mantém elevados os níveis dos intermediários da via de salvamento e vão diluindo a aminopterina até aproximadamente 11% do meio HAT. Dessa forma, os hibridomas são mantidos

pelos intermediários até que as diluições sucessivas em meio RPMI sejam suficientes para que a concentração da aminopterina não afete mais as células.

4.11.5 Manutenção dos hibridomas

As células foram mantidas em meio de manutenção e manteve-se a periodicidade da troca até o fim do período de varredura dos hibridomas (item 4.11.6).

Os clones que foram considerados negativos no processo de varredura foram eliminados com a adição uma solução de NaOH 1M corada com azul de metileno no lugar do meio em seus poços. Este procedimento reduz a possibilidade de contaminação e identifica facilmente os poços que já foram inutilizados na placa de cultivo.

4.11.6 Varredura dos hibridomas

A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra antígeno recombinante tanto nos soros hiperimunes quanto nos sobrenadantes de cultura foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) (ENGVALL; PERLMANN, 1971).

Para este ensaio, é feita a imobilização de 0,1µg de antígeno recombinante (em todos os ensaios o antígeno utilizado foi a porção A/B do receptor) em 50µl de tampão carbonato (100mM, pH9,6) por 16 horas a 4°C, por poço (placa de 96 poços). Após este período, efetuou-se o bloqueio dos sítios não ocupados pelo antígeno, acrescentando-se 200 µl/poço de PBS contendo 1% de albumina bovina por uma hora a 37°C. Em seguida, a placa foi incubada com 100µl/poço dos soros dos animais imunizados (diluídos 1:1000 em PBS com 0,1% de BSA) ou sobrenadante de cultura de hibridoma por duas horas a 37°C, dissolvidos em PBS contendo 1% de albumina bovina. Decorrido este período, os poços foram submetidos a cinco lavagens com PBS acrescido de 0,05% de tween 20 (PBST 0,05%). Então, a cada poço é adicionado 100µL de anticorpo anti-Ig de camundongo conjugado com peroxidase do rábano (HRP) diluído em solução de PBS com 1% de albumina bovina. Após incubação de uma hora a 37 °C, lavam-se os poços (5 vezes) com PBST 0,05% e a reação é revelada adicionando-se 100 µl/poço de solução de 0,2 mg/mL de OPD diluído em solução tampão de citrato de sódio 100mM acrescido de fosfato de sódio monobásico 100mM e 0,0006% (m/v) de peróxido de hidrogênio, pH5,2. Após incubação em câmara escura, a reação foi

bloqueada através da adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1M. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas com filtro para comprimento de onda a 490nm (BioRad).

Os hibridomas selecionados na varredura foram cultivados e a especificidade testada por *Western blot* (TOWBIN et al., 1979) com amostras de linhagens celulares conhecidamente positivas e negativas para ER α e amostras de proteína recombinante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Uma vez que o processo de produção de anticorpos monoclonais segue uma seqüência em que cada etapa depende dos resultados da etapa anterior, a discussão de cada resultado antes de se apresentar o próximo foi considerada como a mais adequada, pois confere maior clareza ao trabalho.

5.1 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total de células MCF7 foi obtido a partir de placas (100mm de diâmetro) de cultivo contendo as células em aproximadamente 90% de confluência. Alíquotas do material armazenado em freezer -80°C foram analisadas em gel de agarose 1,5% para teste de integridade (figura 13).

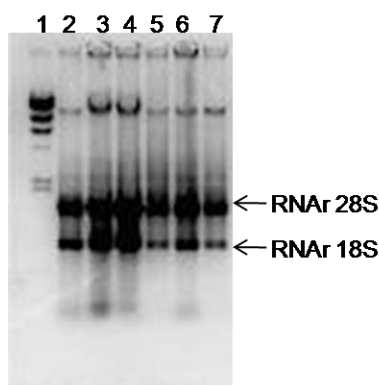


Figura 13 - Teste de integridade de RNA. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% do RNA extraído de MCF7. A linha 1 mostra o padrão de massa do Lambda *Hind*III enquanto as linhas de 2 a 7 mostram o perfil eletroforético do RNA extraído.

O perfil exibe uma grande quantidade de RNA com alta massa molecular (acima da banda de RNAr 28S). Percebe-se também uma pequena quantidade de

material abaixo da banda do RNAr 18S. Esse perfil indica que o RNA total extraído das células MCF7 apresenta um bom grau de integridade. O RNA de alta massa nesse caso é altamente interessante uma vez que o mRNA que codifica para o hER α (NM_000125.3) é indicado no site da NCBI como tendo 6330bp. Uma vez tendo-se verificado a integridade e aparente concentração do RNA extraído todas as alíquotas foram combinadas. Novas alíquotas contendo 500ng de RNA total (medido por espectrofotometria em nanodrop) foram feitas e preservadas em freezer -80°C até o seu uso para síntese de cDNA.

5.2 RT-PCR

Os testes iniciais foram realizados com cDNA de mama normal cedidos pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer que havia sido produzido com iniciadores randômicos em combinação com iniciadores de Oligo dT. Com o material recebido, verificou-se que essa abordagem foi adequada para amplificar a sequência codificante para a porção A/B do receptor, mas não para a do receptor inteiro. Repetindo em nosso laboratório a abordagem com RNA de MCF7, verificou-se o mesmo resultado. Iniciou-se então um trabalho com diferentes abordagens na produção de cDNA com combinações de iniciadores e aditivos de reação. Desses trabalhos obteve-se os seguintes resultados para amplificação dos produtos desejados (QUADRO 2).

Abordagem nº	Iniciador utilizado				DMSO	Produto	
	Oligo dT	Random	R2REINTMXEL	R5RERTPCRMX		hER α int.	A/B
1	-	-	+	-	-	-	+
2	-	-	+	-	5%*	-	+
3**	-	+	+	-	-	-	+
4**	-	+	+	-	5%*	-	+
5**	+	+	-	-	-	-	+
6**	+	+	-	-	5%*	-	+
7	-	-	-	+	-	+	+
8	-	-	-	+	5%*	+	+

* Usou-se 2x a concentração de transcriptase reversa.

** Reações com dois iniciadores receberam a metade da concentração de cada um.

QUADRO 2 – Relação de cDNAs produzidos e eficiência do RT-PCR. A primeira coluna indica o número do teste, as últimas duas colunas fazem

referência à amplificação dos produtos quando usado o cDNA resultante da reação, as colunas restantes indicam os componentes da reação.

As abordagens 1, 2, 3 e 4 resultaram em bandas fracas de amplificação no PCR com os iniciadores para o receptor inteiro, tinham porém, um padrão de produtos espúrios abaixo dessas bandas que não poderiam ser utilizadas para as etapas seguintes do processo (dado não mostrado). Esses resultados, no entanto, indicaram que uma abordagem com outro iniciador localizado a 3' da seqüência desejada poderia ser uma abordagem eficaz, o que se provou verdade após o planejamento e síntese do iniciador R5RERTPCRMX e sua utilização para a produção do cDNA.

Por uma questão de dinâmica de trabalho, simultaneamente aos testes para produzir o inserto de hER α inteiro, a abordagem com o domínio A/B para o qual as condições de produção do cDNA já eram adequadas foi trabalhada em paralelo para melhor aproveitamento do tempo (Figura 14).

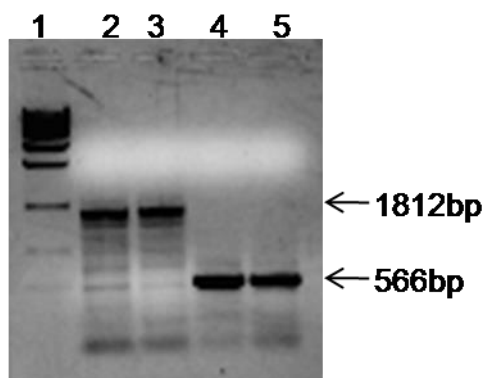


Figura 14 - Teste cDNAs 7 e 8 (QUADRO 1). Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% para os produtos de PCR quando usados os cDNAs 7 e 8 como molde. A linha 1 mostra o padrão de massa do Lambda *Hind*III enquanto as linhas de 2 e 4 mostram o produto da reação do cDNA 7 com os iniciadores para hER α int. (1812bp) e A/B (566bp), respectivamente. As linhas 3 e 5 mostram o produto da reação do cDNA 8 com os iniciadores para hER α int. e A/B, respectivamente.

5.3 OBTENÇÃO DOS INSERTOS

5.3.1 Insertos do domínio A/B

Para obter os insertos de A/B foram usados os iniciadores F1REMXEL e R1REABMXEL de forma que o inserto foi denominado F1R1. Inicialmente testou-se uma reação de PCR contendo: Tampão *Taq* – MgCl 1x, MgCl 2mM, dNTP 0,2mM,

iniciadores 0,5 μ M (cada), *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) 0,05U/ μ L, cDNA 1 μ L (aproximadamente 20ng), água ultrapura autoclavada qsp. 15 μ L.

Dados os T_m 's dos iniciadores (F1REMXEL 58,9°C e R1REABMXEL 58,1°C) testou-se as seguintes condições de reação: 95°C – 2min, repetição de 35x ciclos de (95°C – 1min, anelamento a 52°C, 54,1°C ou 55,5°C – 1min e 72°C – 1min), 72°C – 10min, 4°C – até a retirada do material.

Uma vez que não foi possível amplificar insertos em nenhuma das condições, a primeira hipótese a se trabalhar foi a formação de estrutura secundária que estaria impedindo o anelamento dos iniciadores ou extensão dos insertos.

Em uma tentativa de diminuir as interações G \equiv C e assim evitar a formação das estruturas secundárias, adicionou-se à reação 5% de DMSO (MASOUD et al., 1992)(SAIKI et al., 1988); (WINSHIP, 1989). Como o uso de 10% de DMSO diminui a atividade da *Taq* DNA Polimerase em 50%, usou-se 0,1U/ μ L (o dobro) da enzima para compensar essa perda de atividade (GRUNENWALD, 2003).

Ao repetir o teste, verificou-se que houve amplificação do inserto, portanto a hipótese estava correta. Com mais alguns testes chegou-se à temperatura de anelamento adequada de 53°C.

As condições se mostraram igualmente adequadas quando a *Taq* foi substituída por Pfu DNA Polimerase (Fermentas) 0,06U/ μ L, o Tampão *Taq* pelo tampão para Pfu e o MgCl 2mM por MgSO₄ 2mM por recomendação do fabricante. As reações foram feitas então em 25 μ L de volume final.

Ao se confirmar as condições com Pfu, a banda foi cortada do gel de agarose e reservada a -20°C. Foram feitas então quatro reações iguais para se obter material suficiente para as etapas subsequentes. O material foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Figura 15).

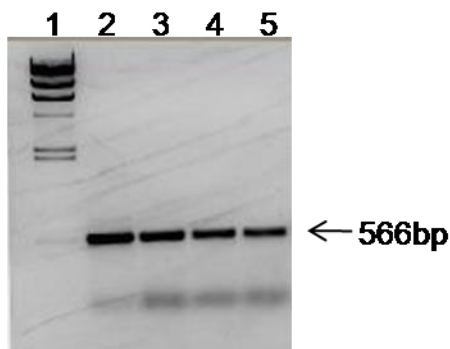


Figura 15 - Produção de inserto F1R1. Gel de agarose 1% em TAE. Na primeira linha foi aplicado o marcador de massa Lambda *Hind*III, nas outras quatro linhas foram aplicadas as reações de PCR com Pfu. Em todas as amostras obteve-se o produto esperado com 566bp.

5.3.2 Insertos do receptor inteiro

Para obter os insertos do receptor inteiro foram usados os iniciadores F1REMXEL e R2REINTMXEL de forma que o inserto foi denominado F1R2. Com a experiência obtida com o inserto F1R1, testou-se a seguinte condição de PCR: Buffer *Taq* – MgCl 1x, MgCl 2mM, dNTP 0,2mM, iniciadores 0,5 μ M (cada), *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) 0,05U/ μ L, cDNA 1 μ L (aproximadamente 20ng), DMSO 5% e água ultrapura autoclavada qsp. 25 μ L.

Dados os T_m 's dos iniciadores (F1REMXEL 58,9 $^{\circ}$ C e R2REINTMXEL 61,2 $^{\circ}$ C) testou-se as seguintes condições de reação: 95 $^{\circ}$ C – 5min, repetição de 40 ciclos de (95 $^{\circ}$ C – 1min, anelamento a 53 $^{\circ}$ C, 54,9 $^{\circ}$ C, 56,7 $^{\circ}$ C, 59,1 $^{\circ}$ C, 61,0 $^{\circ}$ C e 63,0 $^{\circ}$ C – 1min e 72 $^{\circ}$ C – 4min), 72 $^{\circ}$ C – 10min, 4 $^{\circ}$ C – até a retirada dos tubos (Figura 16).

Com esse teste chegou-se à conclusão de que a temperatura ideal para anelamento estava entre 54,9 e 56,7 $^{\circ}$ C. Foi feito então um teste para ajuste fino variando a temperatura de anelamento nesta faixa e utilizando 1 ou 2 μ L de cDNA para cada condição. As reações tiveram a sua separação eletroforética feita em um gel de agarose 1% em TAE.

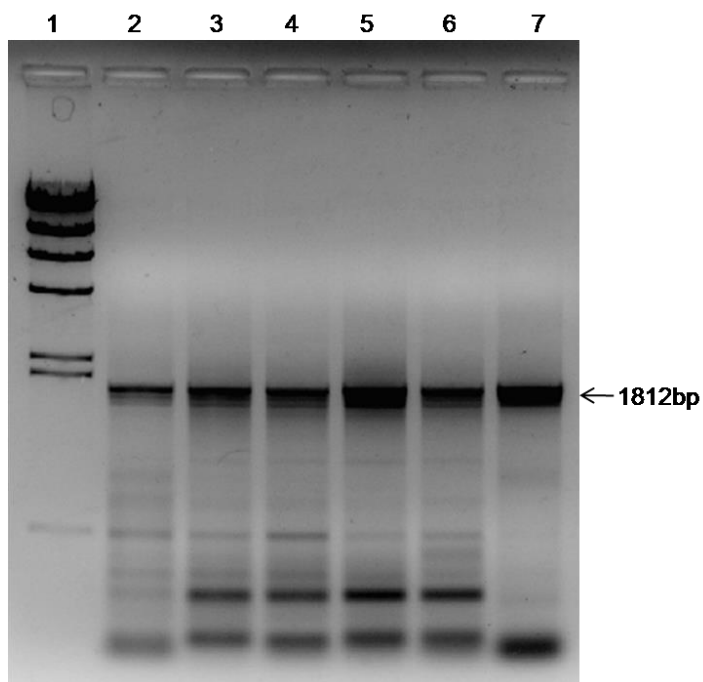


Figura 16 - Ajuste fino da reação de PCR para F1R2. Na primeira linha foi aplicado o marcador de massa Lambda *Hind*III nas linhas 2 e 3 foram aplicadas as reações com anelamento realizado a 55°C, nas linhas 4 e 5 foram aplicadas as reações com anelamento realizado a 56°C, nas linhas 6 e 7 foram aplicadas as reações com anelamento realizado a 56,7°C. As linhas 2, 4 e 6 receberam as reações com 1µL de cDNA e as linhas 3, 5 e 7 receberam as reações com 2µL de cDNA. A banda esperada para F1R2 estava presente em todas as reações com o tamanho de 1812bp.

Após a análise dos resultados de otimização, foi escolhida a condição de 2µL de cDNA com anelamento a 56,7°C, pois foi a condição na qual se obteve um bom rendimento de produto específico e o mínimo de produtos espúrios.

As condições se mostraram igualmente adequadas quando a *Taq* foi substituída por Pfu DNA Polimerase (Fermentas) 0,06U/µL e MgCl₂ 2mM por MgSO₄ 2mM por recomendação do fabricante.

Ao se confirmar as condições com Pfu, a banda foi cortada do gel de agarose e reservada a -20°C. Foram feitas então quatro reações iguais para a obtenção de material suficiente para as etapas subsequentes. O material foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE e purificado por extração de gel (Figura17).

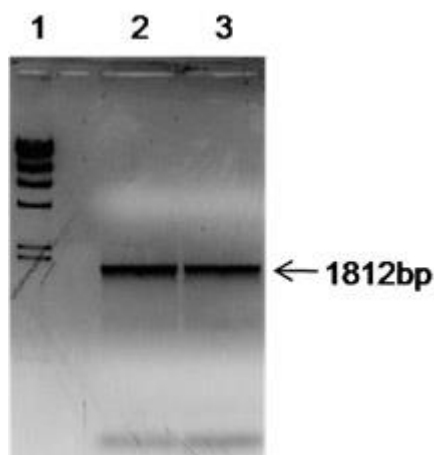


Figura 17 - Produção de inserto F1R2, gel preparativo. Na primeira linha foi aplicado o marcador de massa Lambda *HindIII*, nas outras linhas foram aplicadas os produtos da PCR com Pfu.

5.4 OBTENÇÃO DOS VETORES

5.4.1 Digestão do plasmídeo

A dupla digestão do plasmídeo foi feita a partir de uma solução estoque de pET28a. Partiu-se de 3µg de plasmídeo, que depois de recuperado foi o suficiente para a realização de todas as reações de ligação do projeto. O padrão da digestão do plasmídeo pET28a é apresentado na figura 18.

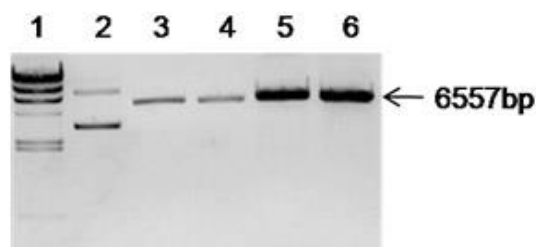


Figura 18 - Digestão do plasmídeo pET28a. As amostras foram analisadas em um gel de agarose 1% em TAE. Na primeira linha foi aplicado o marcador de massa Lambda *HindIII*. A linha 2 mostra o perfil eletroforético do plasmídeo pET28a integro, sendo a banda superior formada pelo plasmídeo em forma relaxada e a inferior por plasmídeo em formato *coil* ou *super coil*. As linhas 3 e 4 mostram o resultado da digestão simples do pET28a pela enzima *NdeI* e *XhoI*, respectivamente. As linhas 5 e 6 contem o plasmídeo duplamente digerido (6557bp) com *NdeI* e *XhoI*.

As bandas que estavam na altura correta das linhas 5 e 6 do gel foram cortadas e o DNA foi purificado por extração do gel.

No ensaio de digestão pode-se conferir a atividade das duas enzimas nas condições escolhidas. Uma vez que ambas linearizaram o plasmídeo, o resultado do teste foi satisfatório.

5.4.2 Digestão F1R1

O material produzido por PCR e purificado a partir do gel de agarose passou por dupla digestão. O material resultante da digestão foi purificado por separação eletroforética em gel de agarose 1% (Figura 19).

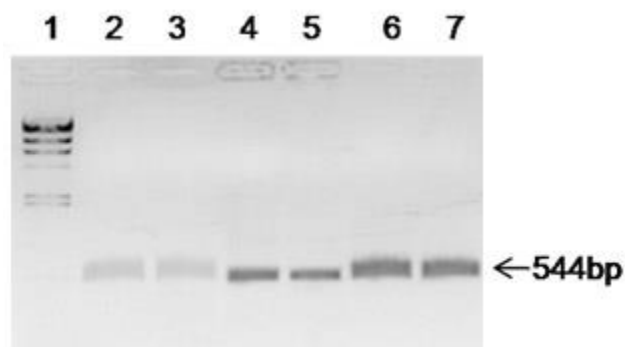


Figura 19 - Digestão do inserto F1R1. Na primeira linha foi aplicado o marcador de massa Lambda *Hind*III. As outras linhas contêm o inserto duplamente digerido com *Nde*I e *Xho*I.

Uma vez que as linhas 2 e 3 do gel apresentavam uma quantidade pequena de material, apenas as linhas de 4 a 7 foram utilizadas para a extração de gel.

5.4.3 Digestão F1R2

O inserto resultante do PCR purificado foi duplamente digerido com *Nde*I e *Xho*I. O produto da digestão foi separado eletroforicamente em gel de agarose 1% (figura 20). As linhas de 3 e 4 foram utilizadas para a extração de gel.

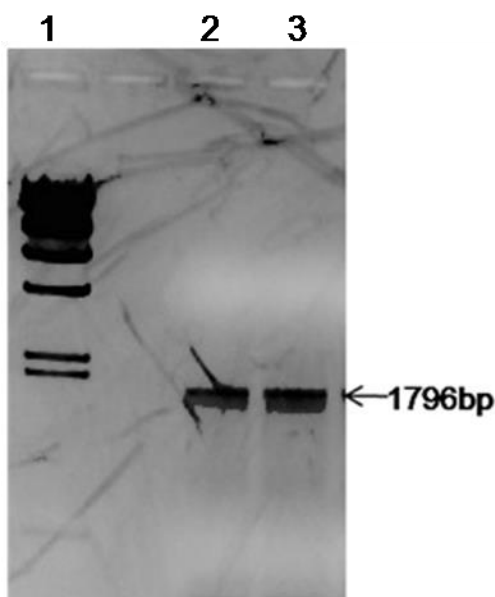


Figura 20 - Digestão do inserto F1R2. Na primeira linha foi aplicado o marcador de massa Lambda *Hind*III, As linhas restantes contêm o inserto digerido com *Nde*I e *Xho*I.

5.4.4 Transformação em *E. coli* DH5 α com pET28a-domínio A/B (F1R1)

Como controles para as reações de digestão e ligação e seleção pelo sulfato de canamicina, o plasmídeo digerido purificado foi colocado sozinho em uma reação de ligação.

Diferentes alíquotas de bactérias foram eletroporadas com o produto da ligação de plasmídeo digerido puro (pET28a DG²) e do plasmídeo ligado ao inserto (pET28a-REF1R1).

Nas placas onde foram colocadas as bactérias eletroporadas com pET28a DG² não foi observado o crescimento de nenhuma colônia. Já nas placas nas quais foram colocadas as bactérias eletroporadas com pET28a-REF1R1 foi observado o crescimento de centenas de colônias das quais vinte foram escolhidas aleatoriamente para o PCR de colônia e foram separadas na placa mestre.

5.4.5 Transformação em *E. coli* DH5 α com pET28a-receptor inteiro (F1R2)

Usando-se os mesmos controles do item 5.4.4, alíquotas de bactérias foram eletroporadas com plasmídeo ligado contendo o receptor inteiro (pET28a-REF1R2).

Em um primeiro ensaio, em nenhuma das placas houve crescimento bacteriano. Os cálculos foram revisados e a reação de ligação repetida.

A eletroporação foi repetida e observou-se o mesmo comportamento para as bactérias eletroporadas com pET28a DG². Nas placas que continham as células eletroporadas com pET28a-REF1R2 foi observado o crescimento de duas colônias, estas foram usadas para o PCR de colônia.

Uma vez que o baixo número de colônias foi reproduzido, foram formuladas diferentes hipóteses: má eficiência na reação de ligação, baixa eficiência das enzimas de restrição, perda de competência das bactérias eletrocompetentes.

A atividade das enzimas foi confirmada com a digestão dos vetores produzidos, eliminando essa opção.

Para a reação de ligação, foi utilizado um novo tampão que certamente teria a concentração adequada de ATP e uma nova alíquota a enzima.

Para verificar a competência das bactérias, foi feita uma eletroporação com um vetor padronizado e verificou-se que de fato a competência das bactérias estava comprometida. No entanto não foram necessárias mais transformações de *E. coli DH5 α* pois as colônias obtidas foram suficientes para prosseguir com a produção do receptor.

5.5 VERIFICAÇÃO DOS VETORES OBTIDOS

5.5.1 PCR de colônia

No PCR de colônia, é possível saber quais colônias escolhidas contem um plasmídeo com o inserto esperado. As colônias que tiverem o inserto, ainda que não ligado da forma correta, irão apresentar bandas na altura esperada. A avaliação foi feita pelo perfil eletroforético dos produtos em um gel de agarose 1% em TAE.

5.5.1.1 Domínio A/B

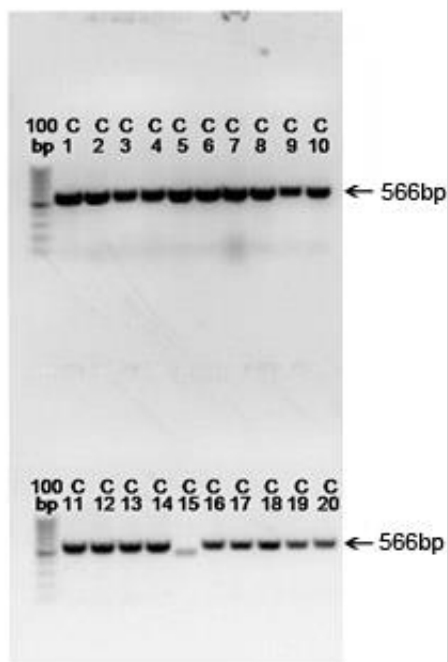


Figura 21 - PCR de colônia F1R1. Na primeira linha das duas alturas do gel esta o marcador de massa 100bp *ladder*, a banda mais destacada é referente a 500bp. As outras linhas tem a indicação de qual colônia foi aplicada.

Na figura 21 é apresentado o perfil eletroforético do produto de PCR das colônias que apresentaram uma banda de 566bp (todas, exceto a C15). Para os testes de digestão e seqüenciamento, quatro dessas colônias tiveram os seus plasmídeos purificados (Quiagen - QIAprep Spin Miniprep Kit). As escolhidas para mini-preparação foram as colônias C1, C2, C3 e C4.

5.5.1.2 Receptor inteiro

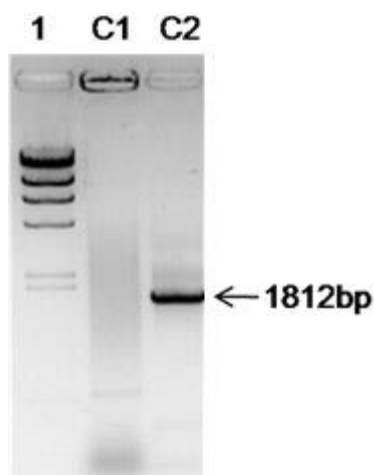


Figura 22 - PCR de colônia F1R2. Na primeira linha esta o marcador de massa Lambda *Hind*III. As duas linhas seguintes são os produtos das reações usando as colônias C1 e C2 como molde.

Apenas uma das colônias apresentou resultado positivo na PCR de colônia (Figura 22), a C2 com o produto de 1812bp, compatível com o inserto de interesse. Conseqüentemente, a partir de C2 foi feita uma mini-preparação para os ensaios seguintes.

5.5.2 Ensaio de digestão

Com o ensaio de digestão pode-se conferir se os sítios de restrição estão conservados (uma vez que uma ligação gerada de um anelamento não perfeito das pontas coesivas acabaria com o sítio de restrição), isso é um indicativo da ligação correta do inserto no plasmídeo. Nesse ensaio pode-se ainda verificar se o tamanho do inserto que é liberado é compatível com o esperado para dado vetor. A análise foi feita em gel de agarose 1% em TAE.

5.5.2.1 Domínio A/B

As mini-preparações das colônias C3 e C4 de F1R1 apresentaram rendimento muito baixo, possivelmente em conseqüência de uma taxa mais baixa na replicação destes plasmídeos pela *E. coli DH5 α* , portanto, apenas C1 e C2 de F1R1 foram usadas para o ensaio de digestão (Figura 23).

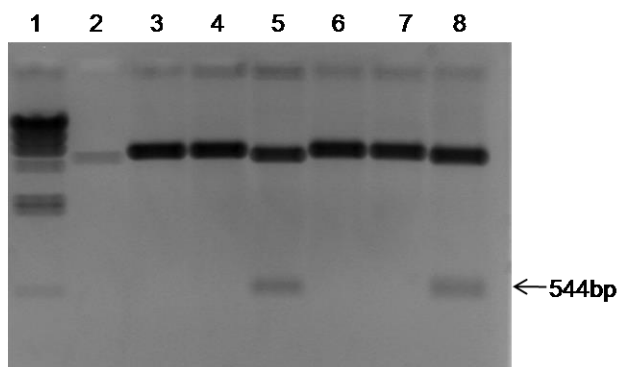


Figura 23 - Ensaio de digestão para vetor contendo inserto codificante para o domínio A/B. A primeira linha esta o marcador de massa Lambda *HindIII*. A segunda contem pET28a duplamente digerido com *NdeI* e *XhoI* como padrão de referência para o vetor vazio linearizado. As linhas 3, 4 e 5 contêm o plasmídeo purificado de C1 digerido respectivamente com *NdeI*, *XhoI* e duplamente digerido. As linhas 6, 7 e 8 seguem a mesma sequência porém com os plasmídeos purificados de C2.

Os dois vetores testados apresentaram o seguinte resultado (Figura 23), nas digestões simples (linhas 3, 4, 6 e 7) o vetor linearizado possui o tamanho um pouco maior que o do controle de vetor vazio (linha 2) pois possui o inserto. A digestão dupla (linhas 5 e 8) resultou no vetor vazio, o que pode ser visto por estar um pouco mais baixo que o vetor contendo inserto da digestão simples, pode-se observar ainda o inserto que foi liberado do vetor. Como o inserto liberado tinha tamanho apropriado (544bp), os dois plasmídeos foram submetidos ao sequenciamento (item 5.5.3).

5.5.2.2 Receptor inteiro

Uma vez que apenas a colônia C2 apresentou resultado positivo, os plasmídeos purificados a partir de C2 foram usados para o ensaio de digestão.

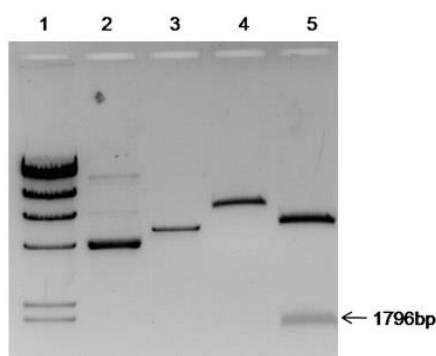


Figura 24 - Ensaio de digestão para vetor contendo inserto codificante para o receptor inteiro. Na linha 1, observa-se o marcador de massa Lambda *HindIII*. Na linha 2, o plasmídeo vazio íntegro, a linha 3 contem pET28a duplamente digerido com *NdeI* e *XhoI* como padrão de tamanho para o vetor vazio linearizado. As linhas 4 e 5 contêm o plasmídeo purificado de C2 digerido respectivamente com *NdeI* e duplamente digerido. Na linha 5 pode-se ver o inserto liberado com 1796bp.

Uma vez que apenas uma das digestões simples foi realizada (Figura 24) foi utilizado o plasmídeo inteiro vazio para referencia de altura caso o vetor não fosse linearizado (linha 2). No entanto, a enzima foi capaz de linearizar o inserto que ficou mais alto que o vetor vazio linearizado (linha 3). Quando duplamente digerido (linha 5), o inserto do tamanho esperado (1796bp) foi liberado. Nesse teste pode-se observar o efeito da salinidade das amostras digeridas que migraram um pouco mais lentamente que as amostras purificadas com baixa quantidade de sais.

5.5.3 Sequenciamento

Os três vetores obtidos foram sequenciados, para o sequenciamento da porção A/B, foram utilizados os iniciadores “T7 promoter primer #69348-3” e “T7 terminator primer #69337-3” (ANEXO 3) recomendados pela Novagen para sequenciar insertos no plasmídeo pET28a. Para o seqüenciamento do receptor inteiro, foram utilizados (além dos dois citados) os iniciadores F2RESECMX443, F3RESECMX843 e F4RESECMX1215.

O vetor pET28a-F1R1-C1 forneceu uma seqüência que coincidiu exatamente a esperada.

O vetor pET28a-F1R2-C2 forneceu uma seqüência que coincidiu exatamente com a do banco de dados da NCBI.

Esses dois vetores foram escolhidos para a continuação do trabalho.

O alinhamento do sequenciamento de cada um deles com a seqüência de referência esta disponível nos anexos desse trabalho (ANEXO 4 e 5).

5.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

5.6.1 Transformação usando *E. coli* BL21 (DE3) STAR

5.6.1.1 Transformação com pET28a-F1R1-C1

Uma alíquota de bactéria *E. coli* BL21 (DE3) STAR foi eletroporada com o vetor pET28a-REF1R1-C1. Nas placas onde foram colocadas as bactérias eletroporadas foi observado o crescimento de centenas de colônias das quais quatro foram escolhidas aleatoriamente para o ensaio de mini-expressão.

5.6.1.2 Transformação com pET28a-F1R2-C2

O procedimento foi o mesmo do item 5.6.1.1, no entanto foi utilizado o vetor pET28a-REF1R2-C2 e foram escolhidas quatro colônias entre as sete observadas após 24 horas.

5.6.2 Produção do antígeno recombinante

5.6.2.1 Expressão do domínio A/B

Para a produção do antígeno recombinante inicialmente foi feito um teste de mini-expressão com as quatro colônias escolhidas aleatoriamente (Figura 25).

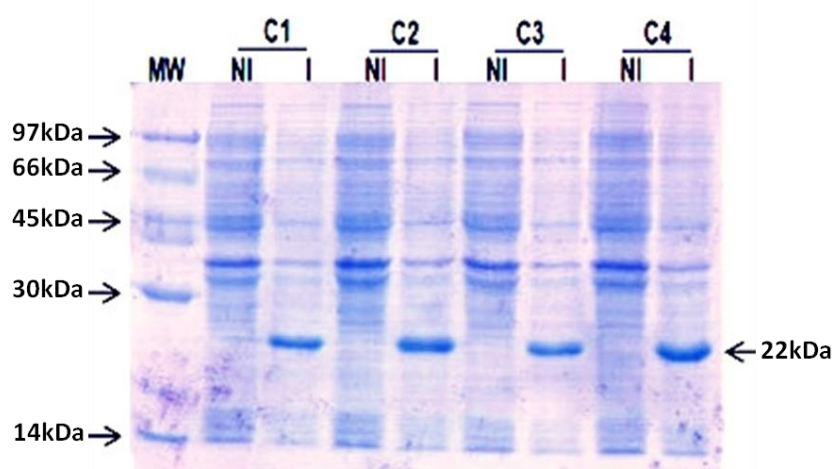


Figura 25 - Gel da mini-expressão da porção A/B. SDS-PAGE 12% das amostras provenientes das culturas induzidas com IPTG 1mM por 3h (I) e não induzidas (NI). As colônias positivas para a produção da proteína possuem uma banda super expressa de aproximadamente 22kDa.

As quatro colônias escolhidas apresentaram produção da proteína recombinante (Figura 25). A massa esperada para a banda formada por peptídeos da porção A/B conjugada à cauda de histidina era de aproximadamente 22kDa.

A colônia escolhida para as etapas seguintes foi a C4, pois visualmente parece produzir uma quantidade de proteína recombinante um pouco maior do que as outras colônias testadas. Uma vez que houve sucesso na expressão da proteína nessas condições, elas foram mantidas para a expressão em larga escala (1L de meio de cultivo).

5.6.2.2 Expressão do receptor inteiro

Seguindo o mesmo procedimento do item 5.6.2.1, o resultado da mini-expressão pode ser observado na figura 26.

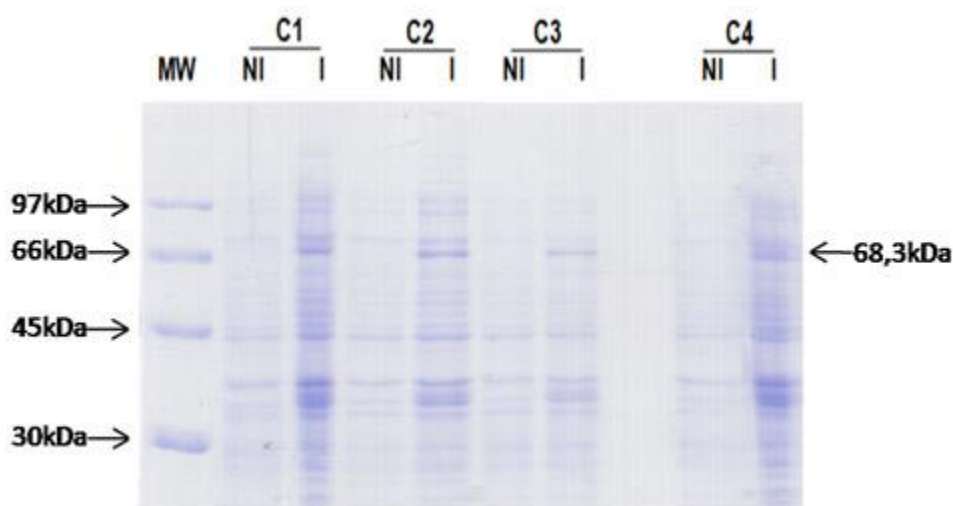


Figura 26 - Gel da mini-expressão do receptor inteiro. SDS-PAGE 10% das amostras provenientes das culturas induzidas por 3 horas com IPTG 1mM (I) e não induzidas (NI). As colônias positivas possuem uma banda de proteína super expressa com aproximadamente 68kDa.

A altura esperada para a banda do receptor conjugada à cauda de histidina era de 68,3kDa, todas as colônias escolhidas apresentaram produção da proteína recombinante apesar de a C4 ter mostrado um resultado fraco para a expressão quando comparada às demais.

A colônia escolhida para as etapas seguintes foi a C2 que foi usada para a expressão em larga escala

5.6.3 Purificação do antígeno recombinante

5.6.3.1 Purificação da porção A/B

Uma vez que o trabalho se trata da produção de anticorpos, uma etapa extremamente estratégica é a purificação do antígeno. Como apresentado anteriormente, o antígeno foi produzido em sistema heterólogo em *E. coli*, isso significa que caso a proteína não esteja bem pura os contaminantes serão de origem bacteriana. Na tentativa de conseguir uma resposta imune humoral contra o receptor de estrógeno humano, as proteínas bacterianas provavelmente teriam potencial antigênico maior, direcionando a resposta imune a essas proteínas e não ao antígeno de interesse.

Numa tentativa inicial (figura 27 (A)), foi feita uma lise em condições nativas (tampão nativo – NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 1mM, pH8) (manual do usuário de Ni-NTA *Purification system* – Invitrogen) e purificação por cromatografia

de afinidade a metal imobilizado (IMAC) com resina de Ni-NTA-Agarose. Verificou-se que nessas condições, apesar de a cauda de histidina estar na porção N terminal, o que poderia melhorar a sua solubilidade (WOESTENENK et al., 2004), a proteína de interesse encontrava-se insolúvel.

Uma vez considerada a hipótese de formação de corpos de inclusão para a proteína super expressa, o que é descrito como uma situação recorrente na produção de proteína recombinante em *E. coli* (VENTURA; VILLAVARDE, 2006), em uma segunda tentativa (figura 27 (B)) analisou-se o protocolo de Singh e Panda para a purificação de corpos de inclusão (SINGH; PANDA, 2005). Embora a proteína tenha de fato atingido uma boa pureza, continuou insolúvel (linha P, Figura 27 (B)). No entanto, o grau de pureza da proteína foi compatível com a hipótese.

Na terceira tentativa (figura 27 (C)), com o objetivo de entender o motivo de a proteína permanecer insolúvel, foi traçado perfil teórico de hidrofobicidade e o de carga relativa ao pH do peptídeo (com o algoritmo "*Peptide property calculator*" da Innovagen), assim pretendia-se avaliar duas variáveis importantes para a solubilidade de proteínas recombinantes (IDICULA-THOMAS; BALAJI, 2005). A partir do perfil teórico de carga por pH, tentou-se solubilizar a proteína mudando o pH da lise para 6,4 e afastando assim o peptídeo de seu ponto isoelétrico (PI). A proteína manteve-se insolúvel. Esse pH foi escolhido por ser suficiente para que o peptídeo se afastasse consideravelmente do seu ponto isoelétrico e ainda assim os resíduos de histidina da *his-tag* mantivessem a sua carga negativa ($pK_a=6,04$) para interagir com a coluna de níquel.

Como uma quarta abordagem (figura 27 (D)), uma vez que o protocolo de Singh e Panda (2005) gerou uma boa pureza da proteína, após etapa de ressolubilização do protocolo original, tentou-se usar tampão desnaturante (uréia 8M, NaH_2PO_4 20mM, NaCl 50mM, pH 7.8) (manual do usuário de Ni-NTA *Purification system* – Invitrogen) para solubilizar a proteína já purificada. Mais uma vez a proteína manteve-se insolúvel com essa abordagem apesar da alta concentração de agente caotrópico.

Partindo da suposição que de alguma forma os componentes do protocolo de Singh e Panda (2005) poderiam ter afetado negativamente a solubilidade dos corpos de inclusão, a quinta tentativa (figura 27 (E)) consistiu em usar o tampão

desnaturante para a solubilização direta da proteína após a lise. Novamente a proteína recombinante permaneceu insolúvel.

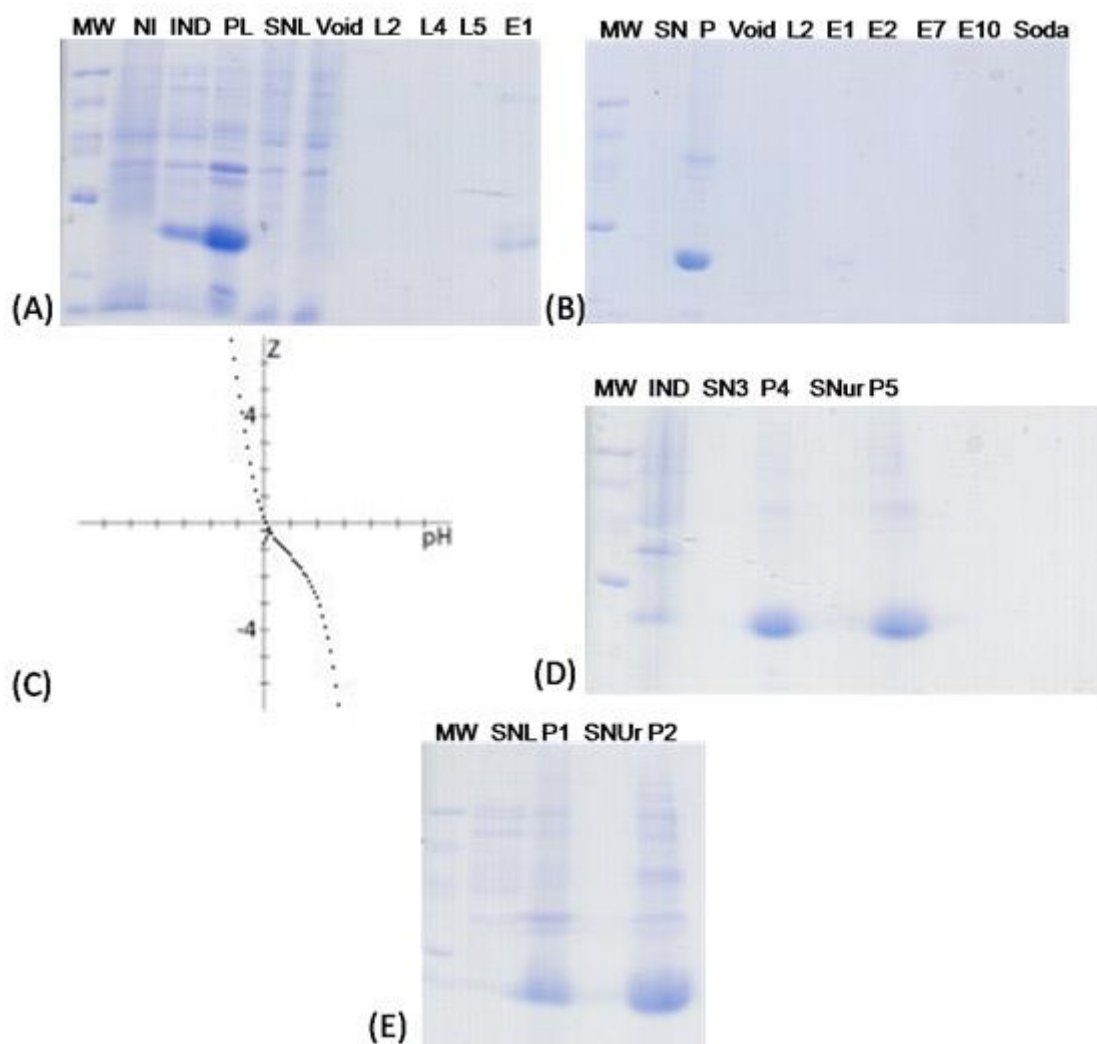


Figura 27 - Abordagens iniciais para a purificação de F1R1 conjugada a cauda de histidina. (A) Gel de poliácridamida 12% da abordagem 1, pode-se observar na seqüência MW (padrão de massa), NI (bactéria não induzida), IND (bactéria induzida), PL (sedimento lise), SNL (sobrenadante lise), L(lavagens da coluna), E1 (eluato 1 da coluna). Nessa abordagem vê-se claramente a proteína no sedimento já da primeira etapa de separação. (B) Gel de poliácridamida 12% da abordagem 2, SN (sobrenadante da etapa de dissolução), P (sedimento da etapa de dissolução). Percebe-se a proteína ainda na fração insolúvel. (C) diagrama de carga por pH que levou ao raciocínio da abordagem 3. (D) Gel de poliácridamida 12% da abordagem 4, o P5 (sedimento após a adição de tampão desnaturante) contem a fração a proteína recombinante que se manteve insolúvel. (E) Gel de poliácridamida 12% da abordagem 5, o P2 (sedimento após a adição de tampão desnaturante) contem a fração a proteína recombinante que se manteve insolúvel.

Finalmente, a partir da observação da mudança no aspecto do precipitado da etapa de ressolubilização proposta por Singh e Panda, usou-se o conceito da abordagem 3 combinada com a abordagem 2, chegando-se ao protocolo de purificação descrito em materiais e métodos como um protocolo adaptado do Singh

e Panda (SINGH; PANDA, 2005) com a alteração do pH para 6,4 no tampão de solubilização antes da incubação com a resina (Figura 28 (B)). Na figura 28 (C), pode-se observar as eluições da resina com 250mM de imidazol.

O rendimento do processo foi de aproximadamente 13mg de proteína recombinante por litro de cultura. O antígeno, no fim dessa abordagem estava solúvel e o seu grau de pureza do antígeno após a diálise foi verificado por meio de um gel de poliácridamida corado com prata (Silver Staining (and De-Staining) of Polyacrilamide Gels Protocols) (Figura 28 (C)).

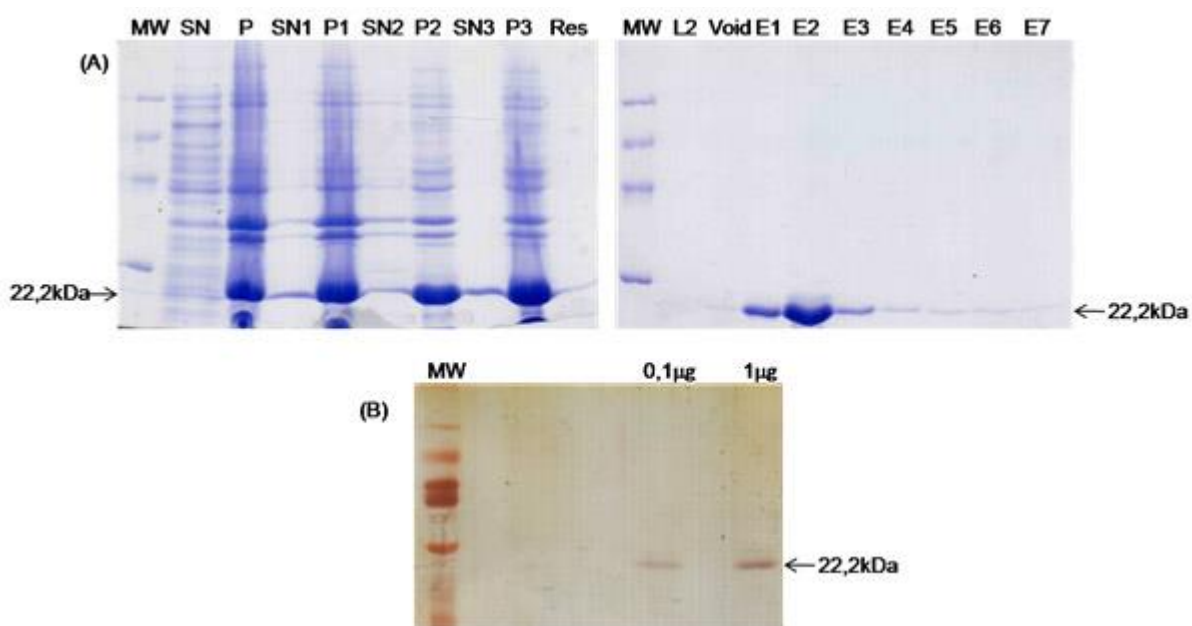


Figura 28 - Purificação da porção A/B conjugada a cauda de histidina. (A) Géis de poliácridamida 12%, as linhas se referem a: MW (padrão de massa), Res (resina após eluição), as demais amostras receberam as mesmas denominações do fluxograma da purificação (figura 11). Os eluatos E1, E2 e E3 foram usados para a diálise. (B) Gel de poliácridamida 12% corado com prata, as linhas indicam a quantidade de proteína recombinante aplicada.

5.6.3.2 Purificação do receptor inteiro

Pelo tempo que se levou até que o receptor inteiro fosse clonado, a proposta de usá-lo como antígeno tornou-se inviável nesse projeto de mestrado. No entanto, ele ainda representa uma ferramenta interessante na varredura e seleção dos hibridomas e na avaliação dos anticorpos policlonais nos animais imunizados, assim trabalhou-se na sua purificação.

Em um primeiro ensaio, foi realizada a lise nativa (manual do usuário de Ni-NTA Purification system – Invitrogen) apenas para a verificação da solubilidade da proteína nessas condições. Ela mostrou-se insolúvel (linha P, Figura 29 (A)).

Em seguida o sedimento da lise nativa foi ressuspenso em tampão desnaturante (manual do usuário de Ni-NTA Purification system – Invitrogen), o que serviu para solubilizar a proteína recombinante. Ao sobrenadante foi adicionado 10mM de imidazol (para aumentar a seletividade da interação) e ele foi incubado por 3h a 4°C com a resina Ni-NTA-agarose. As lavagens foram feitas com o mesmo tampão acrescido de 20mM de imidazol e a eluição com 250mM de imidazol.

Pouca proteína foi recuperada e apareceu uma outra banda forte com massa mais baixa, em torno de 20kDa, que posteriormente foi identificada (por *Western blot* utilizando anticorpo primário anti penta-his (Invitrogen), dado não mostrado) como parte da proteína degradada (linha E1, Figura 29 (B)).

Em uma abordagem pouco usual, percebeu-se que grande parte da proteína permaneceu no *void*, este então teve o seu pH ajustado para 8,8 e foi incubado novamente com a resina seguindo-se o mesmo processo de lavagens e eluição. Essa abordagem levou em consideração a carga líquida da proteína de acordo com o diagrama (figura 29 (C)), uma vez que cargas negativas são importantes para a interação com o Ni e uma diferença de um ponto no pH conferiu uma mudança na carga líquida da proteína de positiva para negativa. Isso pode ajudar na interação da proteína com o metal imobilizado e melhorar o rendimento da purificação.

Conseguiu-se purificar a forma inteira da proteína, no entanto, a concentração foi baixa (linha E1, figura 29 (D)) e durante o processo de concentração foi perdida provavelmente por ficar adsorvida no material utilizado.

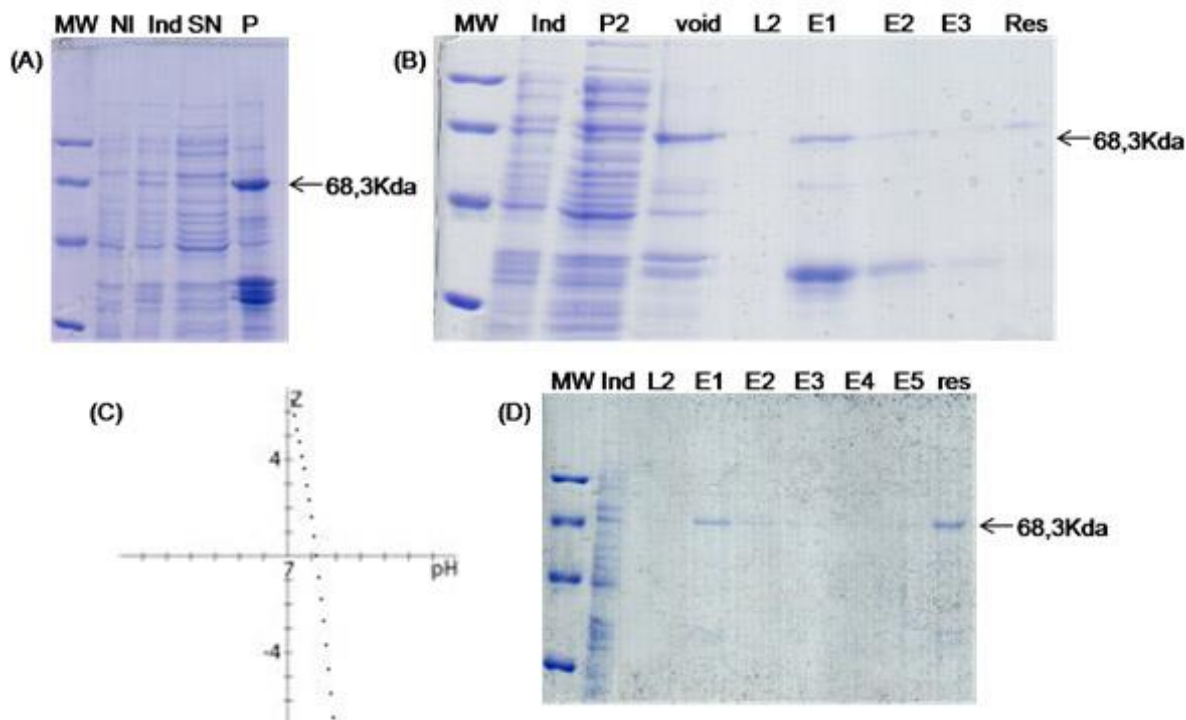


Figura 29 - Purificação do receptor inteiro conjugado com cauda de histidina. (A) Gel de poliacrilamida 12% do teste de solubilidade em tampão nativo, pode-se observar a banda mais forte de proteína recombinante (68,3kDa) na linha P que se refere ao sedimento, portanto a proteína é insolúvel nessas condições. (B) Mostra a purificação do receptor a partir de P, nos eluatos (E) pode-se ver o receptor e uma banda mais forte abaixo. (C) Diagrama de carga por pH obtido pelo algoritmo "Peptide property calculator" da Innovagen). (D) Eluição da abordagem de purificação a partir do void.

Após a perda da proteína no processo de concentração se manter mesmo em diferentes métodos e a verificação da degradação acelerada da proteína ainda que purificada, decidiu-se não purificá-la e usar o sedimento da lise nativa ressuspenso em PBS como amostra nos *Western blots* realizados.

5.7 SELEÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA FUSÃO

Para a verificação da presença de anticorpos específicos nos animais imunizados, os soros pré imunes e hiperimunes dos camundongos foram testados como anticorpos primários em ensaios de *Western blot*.

As diluições dos soros variaram entre 1:500 e 1:2000. Em todos os ensaios que utilizaram extrato de MCF7, foi empregada uma massa de aproximadamente 50µg de extrato protéico.

Após o segundo reforço da imunização, os soros foram testados (figura 30). Os dois soros que resultaram em sinais demasiadamente fortes para serem analisados foram testados novamente sob uma diluição mais alta. Dado o

cronograma do projeto, mesmo não havendo nenhum animal apresentando o perfil ideal, escolheu-se o animal 5 para se realizar a fusão. Enquanto os animais 1, 3 e 4 receberiam uma nova dose de reforço.

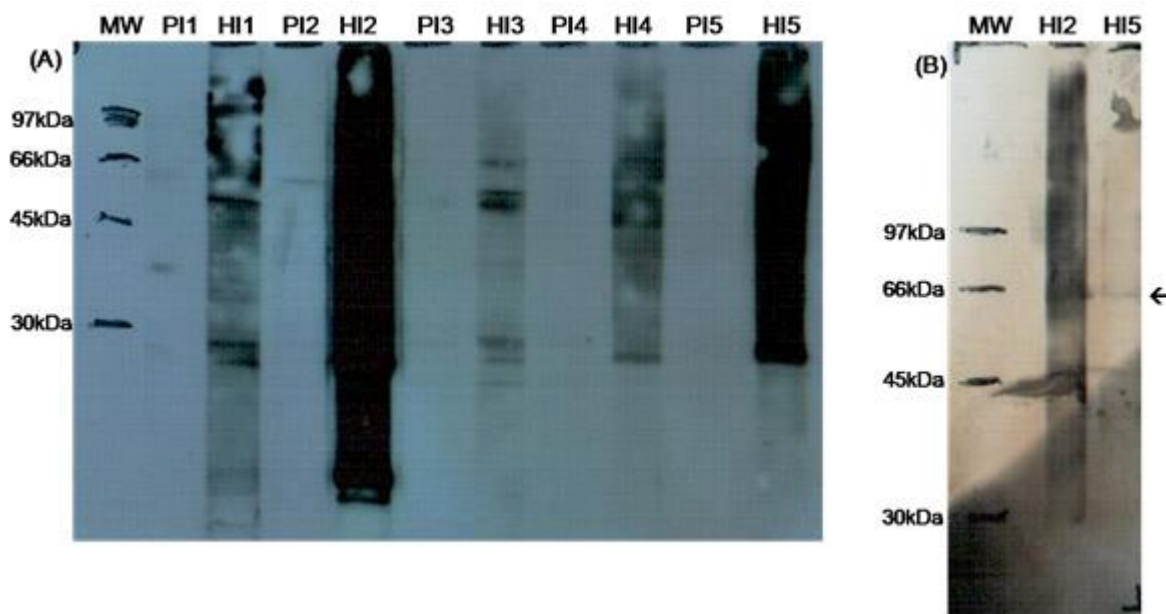


Figura 30 – Primeiro *Western blot* para escolha de animais para fusão. As colunas marcadas com MW se referem ao padrão de massa, as marcadas com PI correspondem a soro preimune e as marcadas com HI a soro hiperimune, os números são correspondetes aos animais. (A) *Western blot* usando extrato de MCF7 e soros na diluição 1:500. (B) Repetição do *Western blot* usando extrato de MCF7 e os soros que estavam na diluição 1:1500. Na altura de 66kDa, pode-se notar uma sutil banda específica na linha HI5 da figura (B). A partir dessa banda, tomou-se a decisão de utilizar esse animal para fusão.

Com os soros da segunda coleta foi feito um novo *Western blot* (Figura 31) no qual como referência para a massa foi usado o receptor inteiro recombinante com o anticorpo primário comercial anti penta-his que reconhece a cauda de histidina conjugada ao receptor clonado. A partir desse teste, foi escolhido o animal 4 para fusão.

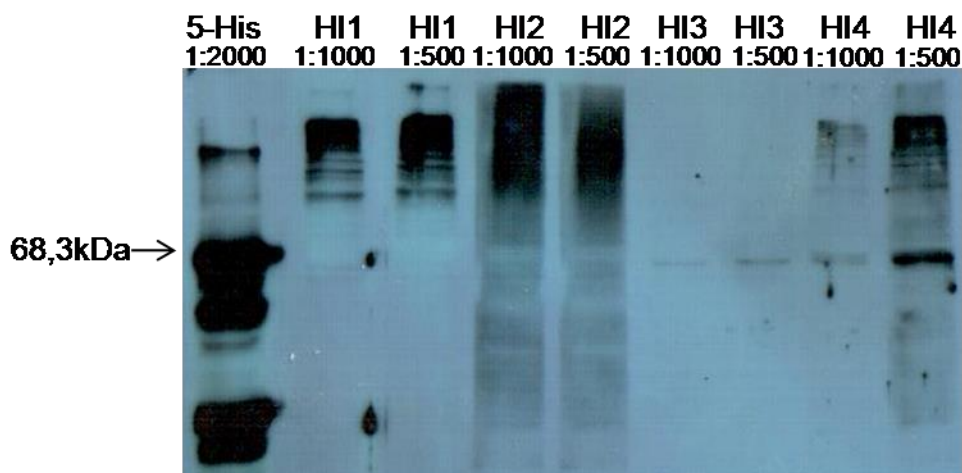


Figura 31 - Segundo *Western blot* para escolha de animais para fusão. Na primeira linha foi aplicado o receptor inteiro recombinante, as outras receberam extrato de MCF7. Cada linha tem indicado o anticorpo primário usado e a sua concentração. Com base nesse experimento, o animal 4 foi escolhido para a segunda fusão.

5.8 OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS

Foram realizadas duas fusões com os animais indicados. Essas fusões geraram uma quantidade células suficientes para encher sete placas de 96 poços (três para a primeira fusão e quatro para a segunda).

Durante o processo de varredura, oito clones geraram um sobrenadante o qual apresentou um sinal positivo para o teste de ELISA. Eles foram denominados como P1E2, P6F11, P7G2, P6C3, P6F8, P6H2, P5D6 e P6F3.

A explicação mais plausível para o baixo número de clones positivos é a de que os animais usados tinham um título relativamente baixo de anticorpos. Isso indica um número relativamente baixo de linfócitos B secretoras de anticorpos. Dado o caráter aleatório da fusão descrito por Köhler (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), um baixo número de células B secretoras de anticorpos de interesse resulta em baixa probabilidade de se obter hibridomas secretoras.

Mesmo os clones que inicialmente tinham um caráter positivo apresentaram uma perda dessa positividade, ou seja, não eram estáveis quanto à produção de anticorpos. Essa instabilidade foi estudada pelo mesmo autor e já havia sido descrita como uma liberação de cromossomos excedentes do heterocáριο, que pode levar à eliminação dos genes produtores das cadeias de imunoglobulinas (KÖHLER, 1980). Em alguns casos ela é considerada como um evento não aleatório, no entanto, como a correlação encontrada não é algo controlável no processo de

produção dos hibridomas, para todos os efeitos é entendido como um fenômeno randômico (esquemático na figura 32).

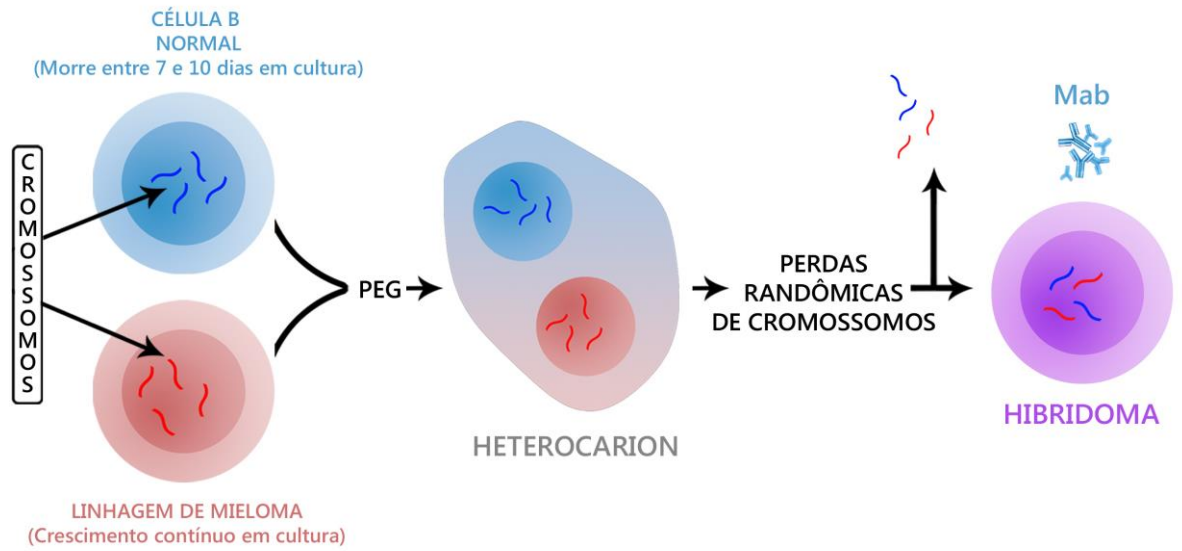


Figura 32 - Representação esquemática da perda randômica de cromossomos.

6 CONCLUSÃO

Diferente da maior parte dos projetos desenvolvidos no programa de pós-graduação em microbiologia, parasitologia e microbiologia, esse foi dedicado à ciência aplicada. Como o caráter é de desenvolvimento tecnológico, apesar das duas fusões realizadas, o objetivo do projeto não foi alcançado.

No entanto, durante os 18 meses em que esse projeto foi desenvolvido, fomos capazes de executar grande parte do que foi proposto.

Dos objetivos específicos, fomos capazes de clonar o fragmento do hER α em vetor de expressão procarioto. Ambas as abordagens foram feitas com sucesso e os vetores montados estão disponíveis para futuros trabalhos do nosso grupo e de outros laboratórios.

Em relação à expressão e purificação, ambos fragmentos foram expressados e tiveram um rendimento razoável na sua expressão. No entanto, apenas a abordagem do fragmento A/B foi bem sucedida quanto à purificação em quantidades suficientes para o uso como antígeno. O sucesso na purificação do receptor inteiro não gerou uma quantidade de proteína recombinante suficiente para a utilização na etapa subsequente do processo.

A produção de anticorpos policlonais anti-hER α a partir de imunização de camundongos foi bem sucedida, apesar de apenas dois animais responderem de forma satisfatória, conseguiu-se desenvolver um protocolo adequado de imunização de camundongos com a proteína recombinante e adjuvantes.

Perspectivas

Uma vez que o segundo grupo de animais ainda está passando pelo processo de imunização, novas fusões poderão ser feitas em um futuro próximo.

Uma vez caracterizados e purificados, os anticorpos monoclonais poderão ser disponibilizados para validação laboratorial. O anticorpo deverá reconhecer células positivas para a presença do receptor de estrógeno α em imunohistoquímica e ser útil na avaliação do status de expressão deste antígeno em carcinomas de mama humano.

REFERÊNCIAS

- Align Sequences using ClustalW2. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Acesso em 13/02/11
- BARNES, D. M.; HARRIS, W. H.; SMITH, P.; MILLIS, R. R.; RUBENS, R. D. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. **British journal of cancer**, v. 74, n. 9, p. 1445–51, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2074773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15/1/2011.
- BERRY, J. D. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 170, n. 2, p. 193–211, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16129340>>. Acesso em: 9/2/2011.
- BOLASÉLL, A. H. T.; ZETTLER, C. G.; VINHOLES, J.; MACHADO, S. M.; KLIEMANN, C. Indicadores de Prognóstico em Câncer de Mama com Axila Negativa: Receptor de Estrógeno e Expressão de P53 e de c-erbB-2. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n. 7, p. 449–454, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032000000700008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 15/2/2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>. .
- DAHLMAN-WRIGHT, K.; CAVAILLES, V.; FUQUA, S. A.; et al. International Union of Pharmacology . LXIV . Estrogen Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 773–781, 2006.
- EHRlich, P. On Immunity with Special Reference to Cell Life. **Proceedings Of the Royal Society of London**, v. 66, p. 424–448, 1900.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–4, 1971. Am Assoc Immnol. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5135623>>. Acesso em: 13/7/2010.
- GIARDIELLO, F. M.; BRENSINGER, J. D.; TERSMETTE, A. C.; et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1447–53, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113065>>. Acesso em: 28/1/2011.
- GOULDING, H.; PINDER, S.; CANNON, P.; et al. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. **Human pathology**, v. 26, n. 3, p. 291–4, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890280>>. Acesso em: 28/1/2011.
- GRUNENWALD, H. Optimization of polymerase chain reactions. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 226, p. 89–100, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958489>>. Acesso em: 24/2/2011.
- GUTZMAN, J. H.; RUGOWSKI, D. E.; SCHROEDER, M. D.; WATTERS, J. J.; SCHULER, L. A. Multiple kinase cascades mediate prolactin signals to activating protein-1 in breast cancer cells. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 18, n. 12, p. 3064–75, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1634796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15/2/2011.

IDICULA-THOMAS, S.; BALAJI, P. V. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. , n. 5, p. 582–592, 2005.

IKEDA, K.; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Breast**, v. 67, n. 5, p. 435–442, 2004.

INCA. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2009.

KÖHLER, G. Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 4, p. 2197–9, 1980. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=348679&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/2/2011.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–7, 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1172191>>. Acesso em: 20/7/2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>>. .

LITTLE, M.; KIPRIYANOV, S. M.; GALL, F. LE; MOLDENHAUER, G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunology today**, v. 21, n. 8, p. 364–70, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10916138>>. Acesso em: 9/2/2011.

LITTLEFIELD, J. W. SELECTION OF HYBRIDS FROM MATINGS OF FIBROBLASTS IN VITRO AND THEIR PRESUMED RECOMBINANTS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 145, n. 6, p. 709–10, 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14168277>>. Acesso em: 16/2/2011.

LOVE, R. R. Oophorectomy for Breast Cancer: History Revisited. **CancerSpectrum Knowledge Environment**, v. 94, n. 19, p. 1433–1434, 2002. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/94.19.1433>>. Acesso em: 15/2/2011.

MARUYAMA, S.; FUJIMOTO, N.; ASANO, K.; ITO, A. Suppression by estrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 78, n. 2, p. 177–84, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566442>>. Acesso em: 28/1/2011.

MASOUD, S. A.; JOHNSON, L. B.; WHITE, F. F. The sequence within two primers influences the optimum concentration of dimethyl sulfoxide in the PCR. **PCR methods and applications**, v. 2, n. 1, p. 89–90, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1490180>>. Acesso em: 24/2/2011.

MICHAUD, G. A.; SALCIUS, M.; ZHOU, F.; et al. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1509–12, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608365>>. Acesso em: 9/2/2011.

PAYNE, W. J.; MARSHALL, D. L.; SHOCKLEY, R. K.; MARTIN, W. J. Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. **Clinical microbiology reviews**, v. 1, n. 3, p. 313–29, 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9/2/2011.

PERTSCHUK, L. P.; FELDMAN, J. G.; KIM, Y. D.; et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Sp gamma in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays. **Cancer**, v. 77, n. 12,

p. 2514–9, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640700>>. Acesso em: 28/1/2011.

SAATI, T. AL; COHEN-KNAFO, E.; CAVERIVIÈRE, P.; et al. Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER). **International Journal of Cancer**, v. 55, n. 4, p. 651–654, 1993. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910550423>>. Acesso em: 28/1/2011.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 487–91, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2448875>>. .

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHIFF, R.; MASSARWEH, S. A.; BHARWANI, J. S. L.; et al. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance : implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. **Cancer**, v. 56, p. 10–20, 2005.

SHAO, W.; BROWN, M. Advances in estrogen receptor biology : prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. **Breast Cancer Research**, p. 39–52, 2004.

SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; MAIZEL, J. V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 28, n. 5, p. 815–20, 1967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4861258>>. Acesso em: 14/2/2011.

SHAW, J. A.; UDOKANG, K.; MOSQUERA, J.-M.; et al. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. **The Journal of pathology**, v. 198, n. 4, p. 450–7, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434414>>. Acesso em: 15/1/2011.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–10, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233795>>. Acesso em: 19/7/2010.

SOMMER, S.; FUQUA, S. A. W. Estrogen receptor and breast cancer. **Online**, v. 11, p. 339–352, 2001.

STGROTH, S. F. DE; SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. **Journal of immunological methods**, v. 35, n. 1-2, p. 1–21, 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7009747>>. Acesso em: 9/2/2011.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439>>. .

VENTURA, S.; VILLAVARDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 179–85, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503059>>. .

WINSHIP, P. R. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 3, p. 1266, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=331767&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/2/2011.

WOESTENENK, E. A.; HAMMARSTRÖM, M.; BERG, S. VAN DEN; HÄRD, T.; BERGLUND, H. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. **Journal of structural and functional genomics**, v. 5, n. 3, p. 217–29, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15503425>>. Acesso em: 13/3/2011.

XIE, J.; PAN, H.; YOO, S.; GAO, S.-J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of virology**, v. 79, n. 24, p. 15027–37, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1316010&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15/2/2011.

ANEXO 3: MAPA DO VETOR PET28A (NOVAGEN)



pET-28a-c(+) Vectors

TB074 12/98

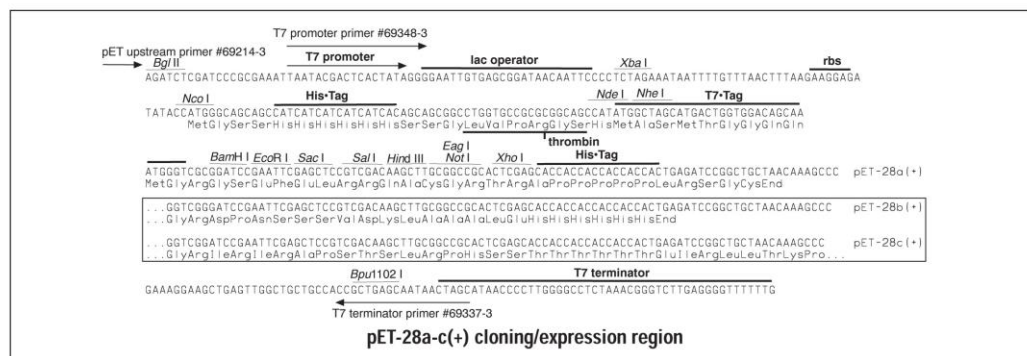
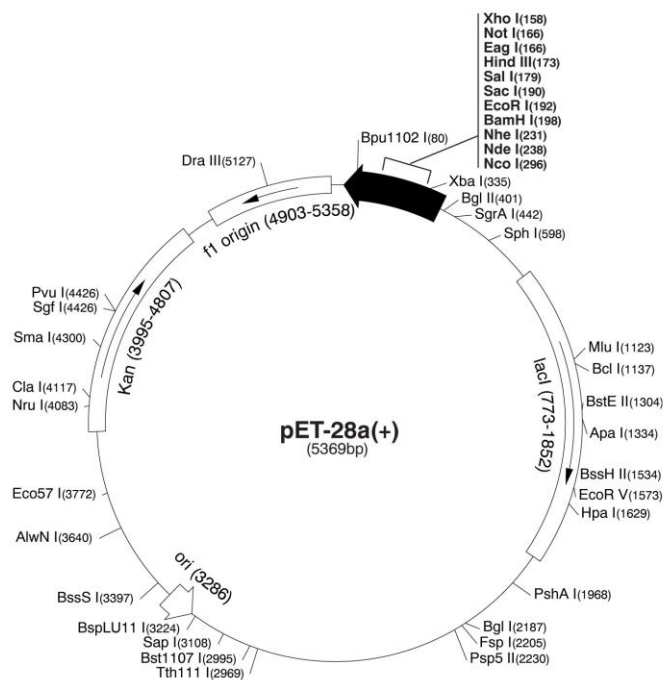
	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag[®]/thrombin/T7•Tag[®] configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



ANEXO 4: SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO CONTENDO O RECEPTOR INTEIRO ALINHADO COM A SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA

ESR1_CDS_ Sequenciamento	ATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCAGATCCAAGGG 60 ATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCAGATCCAAGGG 60 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	AACGAGCTGGAGCCCCTGAACCGTCCGCGAGCTCAAGATCCCCCTGGAGCGGCCCTGGGC 120 AACGAGCTGGAGCCCCTGAACCGTCCGCGAGCTCAAGATCCCCCTGGAGCGGCCCTGGGC 120 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GAGGTGTACTGGACAGCAGCAAGCCCGCGTGTACAACCTACCCCGAGGGCGCCGCTAC 180 GAGGTGTACTGGACAGCAGCAAGCCCGCGTGTACAACCTACCCCGAGGGCGCCGCTAC 180 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GAGTTCAACGCCGCGGCCGCGCCAACGCGCAGGTCTACGGTACAGCCGGCTCCCTAC 240 GAGTTCAACGCCGCGGCCGCGCCAACGCGCAGGTCTACGGTACAGCCGGCTCCCTAC 240 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GGCCCCGGGTCTGAGGCTGCGGCGTTCGGCTCCAACGGCCTGGGGGGTTTCCCCCACTC 300 GGCCCCGGGTCTGAGGCTGCGGCGTTCGGCTCCAACGGCCTGGGGGGTTTCCCCCACTC 300 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	AACAGCGTGTCTCCGAGCCCGTGTACTGCAACCCGCGCCGCGAGCTGTGCGCTTTC 360 AACAGCGTGTCTCCGAGCCCGTGTACTGCAACCCGCGCCGCGAGCTGTGCGCTTTC 360 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	CTGCAGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCTACTACCTGGAGAACGAGCCAGCGGCTACAG 420 CTGCAGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCTACTACCTGGAGAACGAGCCAGCGGCTACAG 420 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GTGCGCGAGGCCGCGCCCGCGCATCTACAGGCCAAATTCAGATAATCGACGCCAGGGT 480 GTGCGCGAGGCCGCGCCCGCGCATCTACAGGCCAAATTCAGATAATCGACGCCAGGGT 480 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GGCAGAGAAAGATTGGCCAGTACCAATGACAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCTGCCAAG 540 GGCAGAGAAAGATTGGCCAGTACCAATGACAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCTGCCAAG 540 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GAGACTCGTACTGTGCAGTGTGCAATGACTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTGG 600 GAGACTCGTACTGTGCAGTGTGCAATGACTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTGG 600 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	TCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGGACATAACGACTATATG 660 TCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGGACATAACGACTATATG 660 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	TGTCCAGCCACCAACCAGTGCACCATTTGATAAAAAACAGGAGGAAGAGCTGCCAGGCCTGC 720 TGTCCAGCCACCAACCAGTGCACCATTTGATAAAAAACAGGAGGAAGAGCTGCCAGGCCTGC 720 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	CGGCTCCGCAAAATGCTACGAAGTGGGAATGATGAAAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGA 780 CGGCTCCGCAAAATGCTACGAAGTGGGAATGATGAAAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGA 780 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GGAGGGAGAATGTTGAAACACAAGCGCCAGAGAGATGATGGGGAGGGCAGGGGTGAAGTG 840 GGAGGGAGAATGTTGAAACACAAGCGCCAGAGAGATGATGGGGAGGGCAGGGGTGAAGTG 840 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGC 900 GGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGC 900 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	TCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTTG 960 TCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTTG 960 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCT 1020 GATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGAAGCT 1020 *****

ESR1_CDS_ Sequenciamento	TCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTACATGATCAACTGG 1080 TCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTACATGATCAACTGG 1080 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAA 1140 GCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAA 1140 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	TGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGACCCAGGG 1200 TGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGACCCAGGG 1200 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	AAGCTACTGTTTGTCTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGC 1260 AAGCTACTGTTTGTCTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGC 1260 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	ATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTG 1320 ATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTG 1320 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	CAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCTATTATTTTGTCTAATCTGGAGTGTACACA 1380 CAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCTATTATTTTGTCTAATCTGGAGTGTACACA 1380 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	TTTCTGTCCAGCACCCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCCCTGGAC 1440 TTTCTGTCCAGCACCCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCCCTGGAC 1440 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	AAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCCTGCAGCAGCAG 1500 AAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCCTGCAGCAGCAG 1500 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACATCAGGCACATGAGTAACAAA 1560 CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACATCAGGCACATGAGTAACAAA 1560 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GGCATGGAGCATCTGTACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGGTGCCCTCTATGACCTGCTG 1620 GGCATGGAGCATCTGTACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGGTGCCCTCTATGACCTGCTG 1620 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	CTGGAGATGCTGGACGCCACCCCTACATGCGCCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTG 1680 CTGGAGATGCTGGACGCCACCCCTACATGCGCCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTG 1680 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	GAGGAGACGGACCAAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCCTTGCAA 1740 GAGGAGACGGACCAAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCCTTGCAA 1740 *****
ESR1_CDS_ Sequenciamento	AAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACGGTCTGA 1788 AAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACGGTCTGA 1788 *****

ANEXO 5: SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO CONTENDO A FRAÇÃO A/B DO RECEPTOR ALINHADO COM A SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA

A mutação pontual inserida na posição 541 para produção de um códon de fim está destacada em vermelho.

```

ESR1_CDS_      ATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCAGATCCAAGGG 60
Sequenciamento ATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCAGATCCAAGGG 60
*****

ESR1_CDS_      AACGAGCTGGAGCCCCTGAACCGTCCGCGAGCTCAAGATCCCCCTGGAGCGGCCCTGGGC 120
Sequenciamento AACGAGCTGGAGCCCCTGAACCGTCCGCGAGCTCAAGATCCCCCTGGAGCGGCCCTGGGC 120
*****

ESR1_CDS_      GAGGTGTACTTGGACAGCAGCAAGCCCGCGTGTACAACCTACCCCGAGGGCGCCGCTAC 180
Sequenciamento GAGGTGTACTTGGACAGCAGCAAGCCCGCGTGTACAACCTACCCCGAGGGCGCCGCTAC 180
*****

ESR1_CDS_      GAGTTCAACGCCGCGGCCGCGCCAACGCGCAGGTCTACGGTCAGACCGGCTCCCTAC 240
Sequenciamento GAGTTCAACGCCGCGGCCGCGCCAACGCGCAGGTCTACGGTCAGACCGGCTCCCTAC 240
*****

ESR1_CDS_      GGCCCCGGGTCTGAGGCTGCGGCGTTCGGCTCCAACGGCCTGGGGGGTTTCCCCCACTC 300
Sequenciamento GGCCCCGGGTCTGAGGCTGCGGCGTTCGGCTCCAACGGCCTGGGGGGTTTCCCCCACTC 300
*****

ESR1_CDS_      AACAGCGTGTCTCCGAGCCCGCTGATGCTACTGCACCCGCGCCGCGAGCTGTGCGCTTTC 360
Sequenciamento AACAGCGTGTCTCCGAGCCCGCTGATGCTACTGCACCCGCGCCGCGAGCTGTGCGCTTTC 360
*****

ESR1_CDS_      CTGCAGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCCTACTACCTGGAGAACGAGCCAGCGGCTACACG 420
Sequenciamento CTGCAGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCCTACTACCTGGAGAACGAGCCAGCGGCTACACG 420
*****

ESR1_CDS_      GTGCGCGAGGCCGCGCCCGCGCATTTCTACAGGCCAAATTCAGATAATCGACGCCAGGGT 480
Sequenciamento GTGCGCGAGGCCGCGCCCGCGCATTTCTACAGGCCAAATTCAGATAATCGACGCCAGGGT 480
*****

ESR1_CDS_      GGCAGAGAAAGATTGGCCAGTACCAATGACAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCTGCCAAG 540
Sequenciamento GGCAGAGAAAGATTGGCCAGTACCAATGACAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCTGCCAAG 540
*****

ESR1_CDS_      GAGACTCG 548
Sequenciamento TAGACTCG 548
*****

```