

BEATRIZ ESSENFELDER BORGES

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS
RECOMBINANTES QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE E PRION CELULAR**

Monografia apresentada à disciplina
de Estágio II em Patologia Básica
como requisito parcial à conclusão
do curso de Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Doutora Ida
Cristina Gubert.

Co-orientador: Professor Doutor
Sílvio Marques Zanata.

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, José Borges Neto e Cléa Mara Essenfelder Borges, que fizeram o possível e o impossível para que um dia eu me tornasse uma profissional e, finalmente, pudesse dar os meus primeiros passos, depois de tantos tombos. Amo vocês!

Agradeço também meus orientadores Ida Cristina Gubert e Silvio Marques Zanata pela oportunidade e por terem me apresentado ao mundo científico. Sem a ajuda deles não teria trabalhado com pesquisa em laboratórios. Através dessas duas pessoas acabei me apaixonando pela pesquisa e por isso só tenho que agradecer.

Outra pessoa que tenho que agradecer é a Professora Lia Nakao, com quem trabalhei intensamente esses oito meses, com ela pude tirar todas as minhas dúvidas e questionar tudo que me parecia diferente e desconhecido, além de aprender muito sobre pesquisa.

Além dessas pessoas não poderia deixar de agradecer a todo o pessoal do laboratório de neurobiologia pela paciência e ajuda nas horas difíceis. À Professora Adriana Mercadante, por perder uns minutos de seu tempo para me explicar diluição. Ao Luiz por deixar seus experimentos um pouco de lado para me salvar de algumas enrascadas. À Michele, Katya e Beth, pela paciência e disposição de responder a todas as dúvidas e perguntas que algumas vezes pareciam idiotas. À Monica e Heloisa pelo companheirismo e cumplicidade em todos os dias de trabalho. À Aline, Jaque, Ciro, Vivi, e todos os outros que de alguma forma me auxiliaram nesse trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus amigos da faculdade, ao Regi pela paciência de mineiro, ao Dan pelas gargalhadas em todos os momentos, à Lua pela amizade e companheirismo em todos os trabalhos, à Tânia pelo carinho e amizade, à Letícia, Tuca e Ane pela amizade sem preconceito da turma do elevador, por aumentar o quinteto e tornar esse grupo maior e bem mais divertido. Tenho certeza que essa amizade vai durar para sempre.

Em especial agradeço meu amor, Carlos, pela imensa paciência quando dava chiliques porque o computador não funcionava, quando ligava desesperada dizendo que não conseguia usar um programa, quando perdia a paciência por qualquer coisa, ou seja, agradeço ter sobrevivido à minha tensão pré-monografia. Amo você muito!

Enfim agradeço a todos que de alguma maneira me apoiaram para terminar esse trabalho.

“O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar todo seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como poucos)”.

Newton Freire Maia

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DE PONTES DISSULFETO: Sulfidril Oxidases	2
2.2 PROTEÍNA PRION CELULAR	6
3. JUSTIFICATIVA	10
3.1 Proteína QSOX	10
3.2 Proteína Prion Celular	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Proteína QSOX	11
4.2 Proteína Prion Celular	11
5. MATERIAL E MÉTODOS	12
5.1 Experimentos com QSOX	12
5.1.1 Imunizações de camundongos com QSOXrec	12
5.1.2 Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com QSOXrec	12
5.1.3 Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com extrato de <i>E.coli</i>	13
5.1.4 Expressão da QSOX humana	13
5.1.5 Obtenção de extratos bacterianos	13
5.1.6 Purificação da proteína QSOX rec	14
5.1.7 Diálise	14
5.2 Coleta de Líquido Seminal de rato e Sêmen Humano	14
5.3 Experimentos com Prion Celular	15
5.3.1 Imunizações de camundongos com a proteína prion celular	15
6. RESULTADOS	16
6.1 Ensaio de ELISA para testar os anticorpos contra proteína recombinante QSOX	16
6.2 Expressão e Purificação da proteína QSOX humana	20
6.3 Ensaio de ELISA para testar os anticorpos contra proteína prion celular	21
7. DISCUSSÕES E CONCLUSÃO	24
7.1 Proteína QSOX	24
7.2 Proteína Prion Celular	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ARL	<i>Augmenter Liver Regeneration</i>
bp	Pares de base
BSA	Albumina bovina
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERV	<i>Essencial for Respiration and Viability</i>
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
GPF	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GSS	Síndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Ln	Laminina
M61	Camundongo com a marcação 61
M62	Camundongo com a marcação 62
M63	Camundongo com a marcação 63
M64	Camundongo com a marcação 64
M65	Camundongo com a marcação 65
M69	Camundongo com a marcação 69
M71	Camundongo com a marcação 71
OPD	<i>o-Phenylenediamine</i>
ORF	Fase de leitura aberta
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBST	Salina tamponada com fosfato com tween-20
PMSF	<i>Phenylmethane sulphonyl fluoride</i>
PrPc	Proteína prion celular
PrPsc	Prion <i>scrapie</i>
QSOX	Quiescina Sulfidril Oxidase
QSOXrec	Quiescina Sulfidril Oxidase recombinante
SFB	Soro fetal bovino
ST11	<i>Stress-inductible protein 1</i>
TRX	Tioredoxina

RESUMO

Neste trabalho estudamos dois tipos diferentes de proteínas. Uma delas é da família das quiescinas sulfidril oxidases (QSOx). Estas proteínas estão envolvidas na formação de pontes dissulfeto e dobramento oxidativo de uma grande variedade de proteínas. A proteína QSOx é bastante ubíqua e pode ser encontrada em vários tecidos e secreções como na clara do ovo, no trato reprodutivo masculino, no fluido de vesículas seminais e em soro fetal bovino. Especula-se que QSOX possa participar na regulação do ciclo celular, manutenção estrutural das proteínas de matriz extracelular, até provável envolvimento no desenvolvimento embrionário. A outra é a proteína prion celular (PrPc) que, possivelmente, está relacionada com doenças neurodegenerativas, plasticidade neuronal, cognição e memória. Na tentativa de elucidar algumas das funções desempenhadas por estas proteínas, produziram-se ferramentas que podem auxiliar no estudo de QSOx e PrPc. Tais ferramentas incluem a produção de anticorpos policlonais que foram testados por ensaio de ELISA. O método de ELISA utilizado foi o de captura de anticorpo que tem como objetivo detectar e quantificar anticorpos na amostra de soro do animal. Esse método consiste em sensibilizar a placa com antígeno, colocar o soro do animal imunizado junto com um marcador anti-IgG e observar a presença dos anticorpos. No caso de QSOX, além da produção de anticorpos, foi feita expressão heteróloga para produção de proteínas recombinantes para utilização em ensaios bioquímicos.

1. INTRODUÇÃO

Nosso sistema imune é capaz de fabricar anticorpos com diferentes especificidades. Mesmo ao entrarmos em contato com antígenos simples, fabricamos uma mistura de anticorpos, com maior ou menor especificidade em relação à molécula estimuladora. Cada um desses diferentes anticorpos é produzido por um único clone de linfócitos B, após sua transformação em plasmócito. Os linfócitos B pertencentes a um mesmo clone fabricam um único tipo de anticorpo. Muitos dos anticorpos formados na resposta imune contra um determinado antígeno são de baixa especificidade e por isso têm uma reatividade biológica muito pequena.

A imunização com um determinado antígeno gera um soro policlonal com uma ampla variedade de anticorpos de diferentes especificidades e afinidades.

Nesse trabalho os anticorpos foram produzidos contra as proteínas quiescina sulfidril oxidase (QSOX) e prion celular (PrPc).

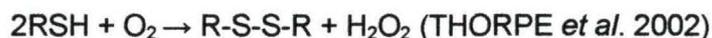
A proteína QSOX tem sido descrita como uma proteína envolvida em proliferação celular. Essa proteína é responsável por manter a estrutura de moléculas devido à sua capacidade de catalisar a formação de pontes dissulfeto presentes em diversas proteínas. Por apresentar essas características, o interesse pela QSOX tem aumentado, embora não haja a disponibilidade comercial para seu estudo.

No caso da proteína prion celular, a produção de anticorpos pode auxiliar na elucidação da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, pela possibilidade de demonstrar o papel desta proteína na neuritogênese, plasticidade neuronal, cognição e memória.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteínas envolvidas na formação de pontes dissulfeto: Sulfidril Oxidases

As proteínas sulfidril oxidases catalisam a oxidação de grupos sulfidril a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio:



Até agora foram descritas duas classes principais de sulfidril oxidases - as enzimas sulfidril oxidases metaldependentes (contém cobre ou ferro); e as sulfidril oxidases dependentes de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) – essa classificação baseia-se no cofator utilizado por essas enzimas (THORPE *et al.* 2002).

Recentemente foi descoberto que algumas sulfidril oxidases como as encontradas na clara do ovo de galinha (HOOBER *et al.*, 1996), em fibroblastos de pulmão humano (COPPOCK *et al.*, 1993), no trato reprodutivo masculino e no fluido de vesículas seminais (OSTROWSKY & KESTLER, 1980; BENAYOUN *et al.*, 2001), e na epiderme de camundongo (MATSUBA *et al.*, 2002) são todas membros de uma família de enzimas sulfidril oxidases dependentes de FAD: quiescina sulfidril oxidases – QSOX. Estas proteínas contêm dois domínios (figura1): um domínio N-terminal tioredoxina (TRX) e um domínio próximo à região carboxi terminal homóloga a ERV1p.

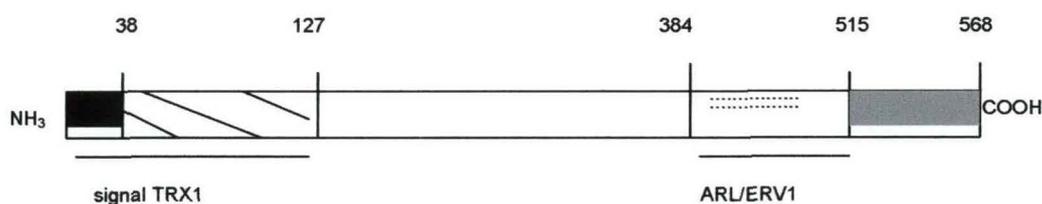


Figura 1: Representação esquemática de QSOX de camundongo, baseada em BENAYOUN *et al.*, 2001 e MATSUBA *et al.*, 2002. A figura representa o arranjo típico de domínios encontrados nas sulfidril oxidases ligadas à flavina. Na porção N-terminal, a proteína inicia com uma seqüência sinal (1-38 aa), seguido por um motivo tioredoxina (38-127 aa); uma região espaçadora com pouca homologia entre as diferentes sulfidril oxidases e um motivo ERV1/ALR (384-515 aa). A QSOX nativa de camundongo tem uma ORF de 1704 pb, traduzida em uma proteína de 568 aa.

No entanto o arranjo das proteínas QSOX, formado pela fusão dos domínios TRX e ERV1/ALR, foi inicialmente reconhecido em quiescência Q6.

A família de proteínas QSOX tem sido descrita como proteínas que participam na elaboração da matriz extracelular, maturação de poxvirus, fatores de crescimento envolvidos na regeneração de tecidos, sensibilização de células de neuroblastoma a estímulos apoptóticos e fatores de regulação de crescimento e adesão celular (COPPOCK *et al.*, 1998; THORPE *et al.*, 2002; WITTKE *et al.*, 2003).

O gene QSOX é encontrado em vários organismos, abrangendo filões eucariotes e genes relacionados em protistas, mas esses genes não foram encontrados em leveduras (THORPE *et al.*, 2002). Para humanos foram descritos dois genes para estas enzimas. Estes genes são encontrados em cromossomos distintos e são denominados QSOx1 (Q6) e QSOx2 (QSOXN) localizados nos cromossomos 1q24 e 9q34. 3, respectivamente (COPPOCK *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002).

De acordo com COPPOCK & THORPE, 2006, os metazoários duplicaram o gene QSOX, portanto todo o clado dos vertebrados possui as duas formas do gene descritas acima.

A expressão do gene QSOx1 (Q6) de humanos é baixa em fibroblastos em proliferação. Porém sua expressão é induzida quando fibroblastos entram em quiescência. A maior expressão gênica sugere que esta proteína esteja envolvida no processo normal de quiescência celular reversível e, portanto, a inibição desta poderia levar a processos patológicos como câncer (COPPOCK *et al.*, 1998).

Ainda não são conhecidas as funções de Q6 e seus homólogos. Porém, vários genes são expressos durante a quiescência celular reversível, incluindo colágenos e decorina, que são componentes da matriz extracelular. Estas proteínas secretadas possuem muitas pontes dissulfeto essenciais para a integridade estrutural da matriz; por exemplo, a formação de pontes dissulfeto em muitos colágenos é necessária para o arranjo trimérico destas proteínas (COPPOCK *et al.*, 1998).

Através da identificação de uma sulfidril oxidase derivada de neuroblastoma humano descobriu-se a existência da segunda forma do gene QSOX (QSOX2) (WITTKE *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a inativação de QSOx2, utilizando a expressão de QSOx2 antisense em células de neuroblastoma, confere resistência à apoptose induzida por IFN- γ (WITTKE *et al.*, 2003).

Somando-se a existência de dois genes codificantes para sulfidril oxidases dependentes de FAD, podem ocorrer formas diferentes de RNAm e proteínas truncadas devido à ocorrência de processamento alternativo do RNAm (COPPOCK & THORPE, 2006). Para ratos e camundongos dois transcritos foram relatados. Observou-se a tradução dos transcritos, mas apenas um dos transcritos, que codifica

uma proteína com massa molecular próxima a 70kDa, corresponde à mesma proteína encontrada na vesícula seminal desses animais (MAIRET-COELLO *et al.*, 2005). A extensão dos mRNAs traduzidos é similar ao de humanos, com 2433 bp para camundongos e 2472 bp para ratos (BENAYOUN *et al.*, 2001; THORPE *et al.*, 2002). O genoma de camundongo contém seqüências homólogas ao longo do transcrito humano de QSOx1. Contudo a expressão desta seqüência não foi observada (THORPE *et al.*, 2002).

QSOx1 é particularmente abundante no tecido secretório do oviduto de galinhas e apresenta uma ampla distribuição nos tecidos de aves (THORPE *et al.*, 2002). A sulfidril oxidase de ave é constituída de um dímero de duas subunidades glicosiladas idênticas, cada qual com 80 kDa devido à alta glicosilação (o esqueleto protéico possui cerca de 67 kDa e a seqüência é muito similar à de Quiescina Q6 humana) (HOOBER *et al.*, 1996; HOOBER *et al.*, 1999). Cada subunidade contém uma molécula de FAD ligada por interações não covalentes e uma ponte dissulfeto redox-ativa. Os substratos conhecidos de QSOX de ave são peptídeos e substratos protéicos reduzidos e parece haver pouca dependência em relação à massa molecular ou pl destes substratos protéicos (HOOBER *et al.*, 1999; THORPE *et al.*, 2002).

Sulfidril oxidase de murinos e bovinos são monoméricas, apresentando massa molecular de 65 kDa (HOOBER *et al.*, 1996; MATSUBA *et al.*, 2002; HOOBER *et al.*, 1999), diferente da proteína de ave, dimérica (HOOBER *et al.*, 1999; THORPE *et al.*, 2002).

MATSUBA *et al.*, 2002 purificaram e caracterizaram QSOX a partir de amostras de epiderme de camundongos como uma tiol protease de 65 kDa e também descreveram o cDNA de camundongo apresentando uma ORF de 1704 pb codificando uma proteína de 568 aa.

Coppock & Thorpe 2006, observaram que na maior parte dos tecidos de mamíferos QSOx1 é, consideravelmente, mais abundante que QSOx2. Sabe-se que um mesmo tipo celular expressa transcritos de um mesmo gene, e que estes transcritos são produzidos a partir de processamento alternativo. Três transcritos com tamanhos diferentes e provenientes do gene QSOx2 foram demonstrados em neuroblastoma (WITTKE *et al.*, 2003). Estudos de imunohistoquímica mostram uma ampla expressão de sulfidril oxidases em uma variedade de tecidos e a localização dessa expressão é bastante específica. Essas são expressas em tipos celulares associados com vias secretoras, como a superfície secretória luminal de células epiteliais, sítios envolvidos na secreção apócrina, células do ducto epitelial de parótida, ilhotas de Langerhans, trato reprodutivo, entre outros (THORPE *et al.*, 2002).

Muitos trabalhos demonstram a presença de QSOX no ambiente extracelular, como fluidos seminais (BENAYOUN *et al.*, 2001), clara do ovo (HOOBER *et al.*, 1996; HOOBER *et al.*, 1999) e sobrenadante de cultivo de fibroblasto quiescentes (HOOBER *et al.*, 1999). O destino extracelular de QSOX sugere que esta possa estar envolvida na remodelação dos componentes da matriz extracelular ou na sinalização celular principalmente pelo favorecimento da formação de pontes dissulfeto dentro de uma mesma proteína ou entre proteínas distintas (THORPE *et al.*, 2002).

QSOX1 no sistema nervoso pode modular interações célula-célula, levando em consideração que essa pode ser liberada nos sítios sinápticos e, hipoteticamente, implicar no fortalecimento sináptico quando liberada juntamente com neurotransmissores (AMIOT *et al.*, 2003; MAIRET-COELLO *et al.*, 2005). Também poderia exercer influencia nos processos de migração e estabelecimento celulares, crescimento da arborização dendrítica pela introdução e/ou manutenção das pontes dissulfeto em proteínas secretadas, componentes de matriz extracelular ou proteínas de membranas (MAIRET-COELLO *et al.*, 2005).

As supostas funções para QSOX induzem ao conceito de que estas proteínas exercem papel importante na geração de dissulfetos *in vivo*. Entretanto deve-se levar em conta que o único estudo detalhado da especificidade enzimática foi feito apenas com QSOX de ave; não existem ainda estudos com animais nocautes ou mutantes para QSOX de vertebrados; e as vias para a interconversão de tióis e dissulfetos possuem múltiplos catalisadores e abrangem processos com especificidades sobrepostas. Dessa forma é possível que QSOX possa introduzir dissulfetos em uma pequena parcela de peptídeos e proteínas que dependam do substrato protéico e tipo celular em questão (COPPOCK & THORPE, 2006).

QSOX também é encontrada intracelularmente. Esta proteína pode ser localizada no retículo endoplasmático, no aparato de Golgi, grânulos secretórios, e também se relatou a enzima associada à mitocôndria ou na matriz mitocondrial durante o desenvolvimento de células testiculares de mamíferos (COPPOCK & THORPE, 2006).

A presença de QSOX ativa em soro fetal bovino (SFB) e o seu decréscimo após o nascimento até o completo desaparecimento próximo a P60 (60 dias após o nascimento) foram demonstrados por ZANATA *et al.*, 2005. A presença de QSOX no modelo SFB, provavelmente, pode estar relacionada à elaboração de componentes da matriz extracelular e ser crucial nos processos de proliferação, migração e diferenciação celulares. Também se deve considerar que o balanço tiol/dissulfeto altera o ambiente redox podendo afetar a funcionalidade de vários receptores de superfície celular e moléculas extracelulares. Portanto QSOX poderia ser um dos

fatores que contribui para a regulação de processos celulares pela modulação do ambiente redox (ZANATA *et al.*, 2005).

Levando-se em consideração que os papéis específicos desempenhados por QSOX na fisiologia celular ainda não foram identificados, a localização e a expressão desta família de proteínas fornecem pistas que podem auxiliar na elucidação da funcionalidade e substratos específicos das diferentes sulfidril oxidases dependentes de FAD.

2.2 Proteína Prion Celular

O estudo de doenças neurodegenerativas tem caracterizado e divulgado alguns patógenos por elas responsáveis, cuja estrutura se mostra diferente da estrutura dos vírus conhecidos. A infecção por estas partículas, uma vez denominada “scrapie”, mostrou-se dependente de um componente protéico denominado *prion* (Prusiner, 1997).

Entre as doenças que envolvem prions estão as encefalopatias espongiformes transmissíveis de bovinos, carneiros, felinos, ungulados e de alguns animais selvagens (revisado por Prusiner *et al.*, 1998; Prusiner, 1997). Estas doenças são definidas por algumas características macroscópicas em comum, entre as quais está a degeneração espongiforme de neurônios com o aparecimento de um grande número de vacúolos e a gliose acentuada dos astrócitos. A forma Kuru de doença priônica foi descrita em humanos, em populações nativas da Papua-Nova Guiné, cuja tradição de ingerir vísceras de seus antepassados mortos era mantida entre uma das tribos (Gajdusek, 1977). Além desta, a síndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker (GSS), a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) e a Insônia Familiar Fatal também atingem a espécie humana (Prusiner, 1997).

Uma preocupação tem sido direcionada à disseminação da encefalopatia espongiforme bovina no gado europeu. A sua provável transmissão para seres humanos por ingestão de carne e derivados contaminados (Aguzzi, 1996; Butler, 1996) transformou as doenças priônicas em um grande problema econômico e de saúde pública.

A transmissão de “scrapie” de ovelhas para animais de laboratório permitiu o conhecimento do agente infeccioso e dos mecanismos patológicos envolvidos nas encefalopatias espongiformes, uma vez que permitiu uma redução drástica no tempo de incubação da doença, de anos para meses (Prusiner *et al.*, 1998).

O isolamento da partícula infecciosa (prion) aconteceu no início de 1980, quando o grupo de Stanley Prusiner descreveu experimentos de purificação de

partículas infecciosas através da extração de amostras de cérebros de camundongos infectados experimentalmente com "scrapie". O material obtido mostrou-se extremamente insolúvel. Em microscopia eletrônica de transmissão, a amostra de agente infeccioso purificado apresentou-se em pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e formato irregulares. Um material semelhante, sob aspecto bioquímico e microscópico, foi extraído do cérebro de pacientes cujo diagnóstico foi o de portadores de CJD (Prusiner *et al.*, 1982).

Estas partículas infecciosas foram usadas para a produção de anticorpos monoclonais, que reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, encontrada em cérebros de animais doentes, bem como em cérebros de animais não infectados. Com a ajuda destes anticorpos foi isolada uma proteína constituinte do agente infeccioso. Analisando-se sua porção amino-terminal, sintetizaram-se peptídeos que foram usados como antígeno na produção de anticorpos policlonais em coelhos. Estes anticorpos reagiram com a mesma proteína de 33-35 kDa, sugerindo assim que a proteína presente nas partículas infecciosas do scrapie era um componente do cérebro de animais normais (Barry *et al.* 1986).

A definição de prion é: uma 'partícula proteinácea infectante desprovida de ácido nucléico (Prusiner *et al.* 1998), o que enfatiza sua natureza unicamente protéica. Já a proteína que é constituinte do sistema nervoso central foi chamada de prion celular (PrPc), enquanto a proteína depositada no cérebro de animais infectados foi denominada prion *scrapie* (PrPsc). Ao digerir-se proteoliticamente o PrPsc obtém-se uma forma truncada, chamada de PrP 27-30 (Oesch *et al.*, 1985). A proteólise aplicada ao PrPc leva à sua completa digestão.

As propriedades físico-químicas do PrPsc foram estudadas partindo-se da solubilização dos agregados de PrPc 27-30, extraídos de cérebros de animais de laboratório portadores de "scrapie", sem que o poder de infectividade das partículas fosse reduzido. Métodos físico-químicos que normalmente alteravam ácidos nucléicos, como radiação ultravioleta, ação de nucleases e dietil pirocarbonato não desempenharam qualquer efeito sobre a capacidade infecciosa dos prions (Prusiner, 1982).

Determinou-se então que PrPsc é uma isoforma anormal, modificada pós transdução do PrPc, sendo que ambas são ligadas à membrana celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Oesch *et al.* 1985). A seqüência primária de ambas as proteínas é a mesma, enquanto a sua estrutura secundária difere acentuadamente. O PrPc é constituído de α -hélices (42%) enquanto o PrPsc tem muitas regiões contendo folhas β -pregueadas (Pan *et al.*, 1992). Estudos mostraram ainda que as α -hélices podem ser convertidas em estruturas β -pregueadas (Gasset *et*

al., 1992), e que estas podem induzir mudanças conformacionais em peptídeos com estrutura helicoidal (Nguyen *et al.*, 1995). Ainda foi mostrada a conversão do PrPc em PrPsc *in vitro* (Kocisko *et al.*, 1994), e a proteína resultante desta conversão mostrou-se rica em estruturas β -pregueadas, explicando então a deposição tóxica de agregados insolúveis nos tecidos cerebrais. Este acúmulo de proteínas insolúveis nas células é responsável pelas alterações celulares observadas e acabam em morte celular (Büeler *et al.*, 1993).

O PrPc é codificado em uma seqüência aberta de leitura, localizada em um único exon tanto em camundongos e ratos como em humanos (revisado por Prusiner, 1997). É possível detectar-se mRNA do PrPc no tubo neural de camundongos a partir do décimo terceiro dia de vida intra-uterina, e a quantidade deste aumenta após o nascimento (Manson *et al.*, 1992). A função da proteína PrPc ainda não é totalmente conhecida.

Uma vez conhecido o gene codificador da proteína PrPc, foram obtidos animais nocautes (PrPc *-/-*) para este gene. Animais nocautes são utilizados para estudar a função de uma proteína. Procede-se a deleção do gene codificador da proteína em estudo em células-ovo. A partir daí, avalia-se o que acontece com o fenótipo do animal resultante desta manipulação. Os estudos com os animais nocautes para o gene codificador do prion são controversos. O grupo de Charles Weissmann (Büeler *et al.*, 1992) não encontrou alteração significativa nos animais nocautes. Recentemente foi descrito que esses animais são mais sensíveis a drogas indutoras de distúrbios epilépticos (Walz *et al.*, 1999). Entretanto todos os grupos afirmam que os animais são viáveis e sobrevivem mais de 500 dias (tempo médio de vida apresentado por camundongos).

O PrPc atua como receptor de laminina (Ln), que vem a ser uma proteína predominantemente encontrada na membrana basal das células e que assume papel na proliferação, diferenciação, migração e morte celular. Parte da neuritogênese induzida pela Ln é mediada pela interação PrPc-Ln. Animais que tiveram o gene do PrPc removido possuem atividade neuritogênica diminuída frente à Ln, quando comparados a animais selvagens (Graner *et al.*, 2000a, b). Para a investigação do movimento intracelular de PrPc em células vivas de mamíferos foi gerada uma proteína verde fluorescente (GPF) e sugeriu-se que esta pode ser usada para seguir o movimento induzido e constitutivo do PrPc (Lee *et al.*, 2001). Foi também descrita uma proteína ligante de 66 kDa identificada como STI1 (*stress-inductible protein 1*). A interação do PrPc com esta proteína está associada com sinais neuroprotetores que resgatam as células da retina da apoptose. A descrição desta proteína empregou a teoria da hidropaticidade complementar (Brentani, 1990), a partir da qual se deduziu

um peptídeo que foi usado para obtenção de anticorpos (Martins *et al.*, 1997) que levaram à obtenção da identidade protéica do ligante de 66kDa (Zanata *et al.*, 2002a).

Na busca das possíveis funções biológicas apresentadas pelo PrPc, o uso de anticorpos policlonais e monoclonais como ferramentas pode ser de grande importância.

3. JUSTIFICATIVAS

3.1 Proteína QSOX

Trabalhos recentes têm demonstrado evidências do envolvimento de processos redox durante o desenvolvimento, ontogenia celular, assim como a participação na modulação da sinalização celular e dobramento correto de proteínas. Portanto torna-se interessante avaliar a expressão e regulação de QSOX, na tentativa de melhor compreender o papel de tióis críticos na fisiologia celular.

A elucidação de muitas vias sinalizadoras passa por etapas que dependem do estabelecimento de metodologias adequadas, bem como da produção de reagentes que reconheçam especificamente as moléculas estudadas.

Produção de ferramentas para posteriores estudos também justificam o desenvolvimento desse trabalho como um todo.

3.2 Proteína Prion Celular

A produção de anticorpos auxiliou a descrição de uma proteína ligante que tem interação como PrPc. De maneira semelhante, o estudo das funções fisiológicas do PrPc pode auxiliar na elucidação de doenças neurodegenerativas, além de demonstrar o papel desta proteína na neuritogênese, plasticidade neuronal, cognição e memória, como demonstram investigações recentes abordando estas hipóteses. A produção de anticorpos policlonais e monoclonais pode auxiliar as investigações, por se tratar de um anticorpo que reage com o PrPc com grande especificidade.

4. OBJETIVOS

4.1 Proteína QSOX

- Produção de anticorpos policlonais anti-proteína QSOXrec de humano produzidos em camundongos BALB/c;
- Avaliação da especificidade e reatividade dos anticorpos produzidos através de diferentes técnicas imunobiológicas.

4.2 Proteína Príon Celular

- Produção de anticorpos policlonais anti-proteína PrPc produzidos em camundongos nocautes;
- Avaliação da especificidade e reatividade dos anticorpos produzidos através de diferentes técnicas imunobiológicas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimentos com QSOX

5.1.1 Imunizações de camundongos com QSOXrec

Foi utilizada a proteína QSOX humana recombinante gentilmente cedida por Criminácio, C., dados não publicados, para imunizar quatro camundongos de linhagem BALB/c. Esses animais foram imunizados quatro vezes com intervalo de quinze dias entre as imunizações. As imunizações foram feitas por via intraperitoneal sendo que na primeira imunização foi utilizado adjuvante completo de Freund e nas demais, óleo mineral.

Para cada animal foram usados em cada imunização, 25µg (1µg/ul) de proteína QSOXrec, 25 µl de adjuvante, 83 µl de PBS e 17 µl de hidróxido de alumínio, totalizando 150 µl finais.

Após dez dias da última imunização, apenas dois camundongos foram sangrados via plexo orbital porque um morreu durante o processo de imunização e o outro estava muito debilitado para ser submetido à sangria.

5.1.2 Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com QSOXrec

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de captura de anticorpo foi empregado para testar esses soros. Esse método consiste em sensibilizar a placa com antígeno, 0,1 µl de proteína por poço em 50 µl de tampão carbonato pH 9,7, deixando *overnight* a 4°C para que a proteína seja adsorvida na placa. No dia seguinte a reação foi bloqueada por uma hora a 37 °C com 100 µl de PBS-BSA 1%. Após essa etapa, o soro dos camundongos imunizados foi incubado na placa na diluição desejada de 1 a 3 horas a 37 °C. Em seguida a placa foi lavada com PBST 0,05% e incubada com 100 µl de anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000 por 45 minutos a 37 °C. Novamente a placa foi lavada e adicionada 100 µl da solução de revelação que consiste de Tampão Citrato (50mM Fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5 a 5,2), OPD (0,2mg/ml de Tampão) e Peróxido de hidrogênio 30% (2 µl/ml de Tampão). Após 10 minutos de incubação no escuro a reação foi interrompida com 100 µl de Ácido Sulfúrico 2M. Para finalizar o ensaio fez-se a leitura em comprimento de onda 490nm.

5.1.3 Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com extrato de *E. coli*

Esse ensaio consiste em sensibilizar a placa com 5 µl de extrato de bactéria em 1000 µl de tampão carbonato pH 9,7, em volume de 50 µl por poço e deixando *overnight* a 4°C para que o extrato seja adsorvido na placa. No dia seguinte a reação foi bloqueada por uma hora a 37 °C com 100 µl de PBS-BSA 1%. Após essa etapa o soro dos camundongos imunizados foi incubado na placa na diluição desejada de 1 a 3 horas a 37 °C. Em seguida a placa foi lavada com PBST 0,05% e incubada com 100 µl de anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase na diluição de 1:5000 por 45 minutos a 37 °C. Novamente a placa foi lavada e, em seguida, é adicionado 100 µl da solução de revelação que consiste de Tampão Citrato (50mM Fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5 a 5,2), OPD (0,2mg/ml de Tampão Citrato) e Peróxido de hidrogênio 30% (2 µl/ml de Tampão Citrato). Após 10 minutos de incubação no escuro a reação foi interrompida com 100 µl de Ácido Sulfúrico 2M. Para finalizar o ensaio fez-se a leitura em comprimento de onda 490nm.

5.1.4 Expressão da QSOX humana

Nova expressão e purificação da proteína QSOX humana foi realizada com a finalidade de obter anticorpos de melhor qualidade. A bactéria utilizada para fazer a expressão foi roseta blue com pET 28. Essa bactéria foi inoculada em meio LB com kanamicina e cloranfenicol. Depois de crescer em agitação por 16 horas, este inóculo foi induzido com IPTG (0,4mM) por 3 horas em agitação de 200rpm à 37°C. O produto da indução foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Amostras da cultura antes e após a indução foram sedimentadas e ressuspensas em tampão de amostra redutor 1x e submetidas a uma separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10%.

5.1.5 Obtenção de extratos bacterianos

Confirmada a expressão de QSOXrec, foi realizada a lise bacteriana. As bactérias procedentes de cerca de 950 ml de cultivo em meio LB estavam congeladas a -70°C. Estas foram descongeladas, ressuspensas e homogeneizadas em 30ml de tampão de lise (50mM Cloreto de Sódio, 20mM Tris-HCl, 10% glicerol, pH 8) com 10mM Imidazol e inibidor de protease 1mM PMSF.

A suspensão celular em tampão de lise foi submetida à alta diferença de pressão fornecida pela prensa de French (French Press) a fim de se obter a lise das bactérias e, portanto, o extrato bacteriano.

Os extratos bacterianos foram mantidos no gelo durante todo o processo de lise e o inibidor de protease foi adicionado aos extratos durante o processo de lise e purificação.

5.1.6 Purificação da proteína QSOX rec

Por meio da presença de uma etiqueta de poli-histidina nas proteínas recombinantes, realizou-se a separação de QSOXrec do extrato bacteriano pela purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a metal imobilizado.

O extrato foi clarificado por centrifugação a 10.000 rpm, a 4^oC, por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado (30ml) e incubado com 800 µl (*pack*) da resina Ni-NTA agarose (segundo manual da QIAGEN) pré-equilibrada com tampão de lise acrescido de 10mM de Imidazol. Após a incubação *overnight* (16h) da resina com o extrato bacteriano em tampão de lise, a 4^oC, procedeu-se a montagem da coluna, com o empacotamento da resina. Foi realizada a lavagem da coluna com tampão de lavagem (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, glicerol 10%, PMSF 2mM, Imidazol 10mM).

A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de lise acrescido com 300mM de imidazol. Foram coletadas 13 amostras de 1ml. A presença de proteínas recombinantes em cada uma das amostras foi monitorada através do ensaio de Bradford qualitativo em escala semi-micro, empregando placas de 96 poços, conforme instrução do fornecedor (Bio-Rad). Uma vez que apenas três dessas amostras continham proteína, as demais foram descartadas.

5.1.7 Diálise

Cada amostra foi diluída em 2ml de PBS e transferida para membranas de diálise, que foram colocadas em um béquer de 2 litros com PBS e mantidas sob agitação constante a 4^oC por 16 horas. Depois disso, o PBS do béquer foi trocado e deixado mais uma hora. As amostras da diálise foram aliquotadas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford e separação eletroforética em gel de poliacrilamida.

5.2 Coleta de Líquido Seminal de rato e Sêmen Humano

O líquido seminal de rato foi coletado através de intervenção cirúrgica. O animal teve o abdômen cortado com um bisturi e o líquido seminal foi retirado com seringa de 1ml da vesícula seminal do animal. A substância foi congelada e utilizada pura para os experimentos.

O Sêmen Humano foi gentilmente cedido por um colega do laboratório que após a coleta colocou 50 µl de PBS para poder congelar e o sêmen não precipitar. Na hora de aplicar a substancia foi centrifugada por 2 minutos a baixa rotação (1500 rpm) e aplicada nos experimentos.

Nos dois casos as substâncias foram analisadas através do método de Bradford para quantificar proteína e dessa maneira utilizar apenas 0,1 µl de proteína em 50 µl de tampão carbonato em cada poço da placa de ELISA.

5.3 Experimentos com Prion Celular

5.3.1 Imunizações de camundongos com a proteína prion celular

A proteína prion celular, cedida pelo Instituto Ludwig, foi utilizada para imunizar cinco camundongos nocautes. Esses animais foram imunizados quatro vezes com intervalo de quinze dias entre as imunizações. As imunizações foram feitas por via intraperitoneal sendo que na primeira imunização foi utilizado adjuvante completo de Freund e nas demais, óleo mineral.

Para cada animal foram usados em cada imunização, 25 µl de proteína PrP^{rec}, 25 µl de adjuvante, 83 µl de PBS e 17 µl de hidróxido de alumínio.

Após dez dias da última imunização os camundongos foram sangrados pelo plexo orbital. O teste de ELISA de captura de anticorpo foi utilizado para testar esses soros e foi realizado exatamente como descrito para a proteína QSOX.

Para testar esses anticorpos também foi utilizado o aparato multi-screen da Bio-Rad. Esse método consiste em correr um gel de poliacrilamida preparativo com aplicação de extrato de cérebro fração 30%, transferir o gel para uma membrana de nitrocelulose e bloquear com leite desnatado 10% e colocar essa membrana no aparato. Diluições seriadas dos anticorpos primários foram feitas e estes anticorpos foram mantidos por 16 horas a 4°C. Após este período o anticorpo primário foi retirado com bomba a vácuo, as amostras foram lavadas e o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi adicionado na diluição de 1:2000 e deixado por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com substrato adequado para reação quimioluminescente (Amersham - Pharmacia). Um filme (Kodak) foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequado.

6. RESULTADOS

6.1 Ensaio de ELISA para testar os anticorpos contra proteína recombinante QSOX

Para se verificar a capacidade dos anticorpos policlonais em reconhecer QSOX em um ambiente mais próximo da realidade fisiológica (*e.g.* força iônica e pH), e determinar a titulação dos soros obtidos, foram realizados ensaios de ELISA (figura 2).

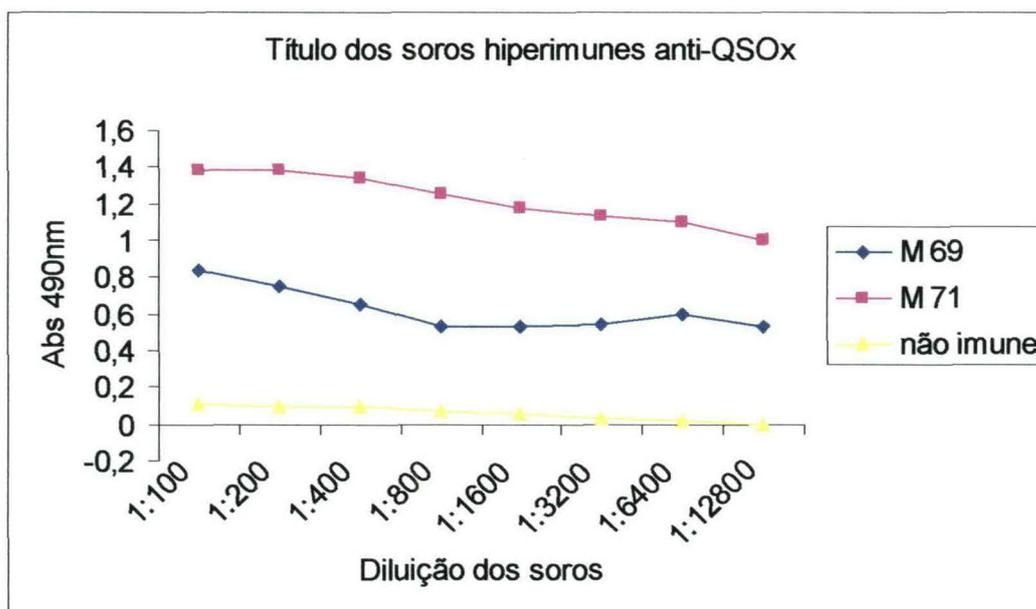


Figura 2: ELISA para determinação dos títulos dos soros anti-QSOX. As reações foram feitas com QSOX humana recombinante purificada e incubada com o soro de 3 camundongos, M69, M71 e não imune. Esse ensaio foi realizado conforme descrito em **Materiais e Métodos**.

Foi possível observar que a faixa de diluição escolhida para o ensaio de titulação (1:100 – 1:12800) foi inadequada uma vez que a variação na absorbância ficou entre 1,4 e 1,2, indicando uma saturação de anticorpos nestas condições experimentais.

Para testar a especificidade dos soros dos camundongos foram feitos mais três ensaios de ELISA de captura de anticorpo utilizando faixa de titulação superior aquela da figura 2 (título inicial 1:1600). No primeiro deles, a placa de ELISA foi sensibilizada com a proteína QSOX humana recombinante purificada e depois incubada com os soros dos animais imunizados (figura 3). Paralelamente foi feito ELISA empregando apenas proteínas totais de *E. coli* não transformadas e não induzidas com IPTG (figura

4). Pode ser observado que o animal M71 produziu grande quantidade de anticorpos anti-proteínas de *E.coli*, uma vez que a saturação da curva compreende toda a faixa de diluição empregada (1:1600 – 1:204800) (figura 4 – linha vermelha). Já o animal M69 produziu menos imunoglobulinas reativas para antígeno bacteriano quando comparado com o animal M71 (figura 4 – linha azul).

Baseado nos resultados das figuras 3 e 4, decidiu-se analisar a proporção de anticorpos anti-*E.coli* e anti-QSOX na coleção de anticorpos produzidos pelos animais. Assim procedeu-se um ELISA de competição entre antígeno bacteriano em solução e QSOX recombinante imobilizada no poço de poliestireno pelos anticorpos primários. Este ensaio foi feito, pois se suspeitava que a QSOX recombinante estivesse contaminada com antígenos bacterianos.

Como pode ser observado na figura 5, o antígeno bacteriano em solução inibe consistentemente a interação do soro M71 com a QSOX imobilizada no poço sugerindo uma contaminação da QSOX por antígeno bacteriano ou reação cruzada dos anticorpos produzidos pelos dois antígenos.

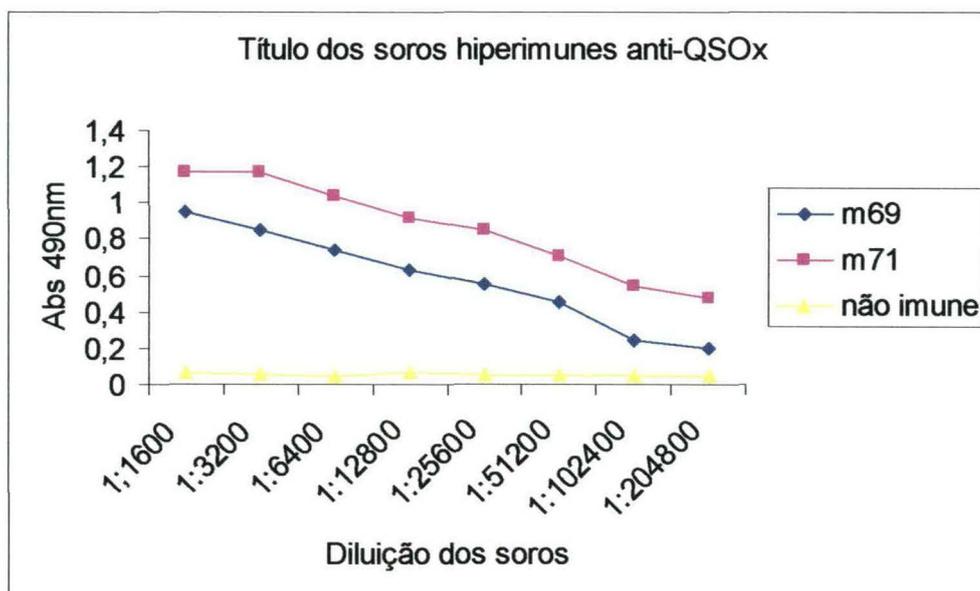


Figura 3: ELISA de captura de anticorpo empregando proteína QSOX humana recombinante. Esse ensaio foi realizado da maneira como descrito em Materiais e Métodos.

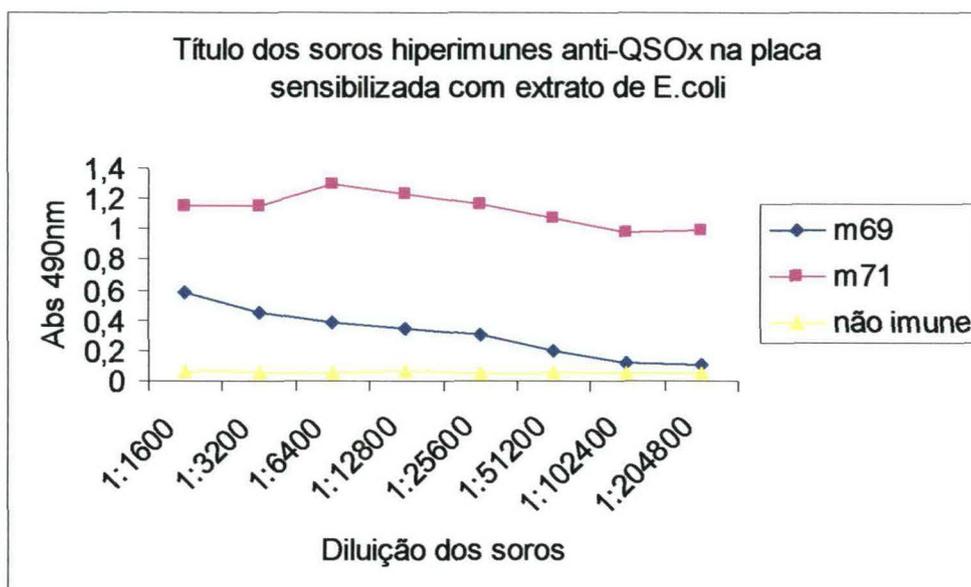


Figura 4: ELISA de captura de anticorpo empregando proteínas totais de *E.coli* como antígeno imobilizado. Esse ensaio foi realizado da maneira como descrito em Materiais e Métodos.

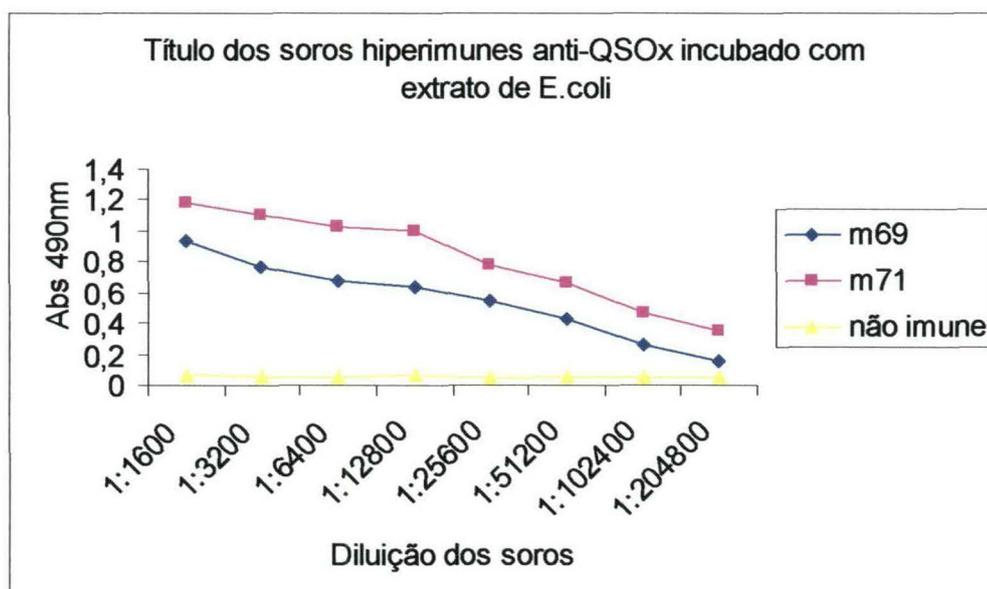


Figura 5: ELISA de competição entre anticorpos primários anti-QSOX humana com proteínas totais de *E.coli* frente à QSOX humana recombinante imobilizada. O anticorpo primário desse experimento foi incubado com extrato de *E.coli* por 30 minutos. A incubação foi feita com 5 μ l de extrato para 1ml de solução. O restante desse ensaio foi realizado como descrito em Materiais e Métodos.

Para saber se esses soros reconheciam a proteína QSOX endógena produzida por células eucarióticas, foi realizado ensaio de ELISA de captura de anticorpo com placas sensibilizadas com sêmen humano (figura 6) e com líquido seminal de rato, (figura 7).

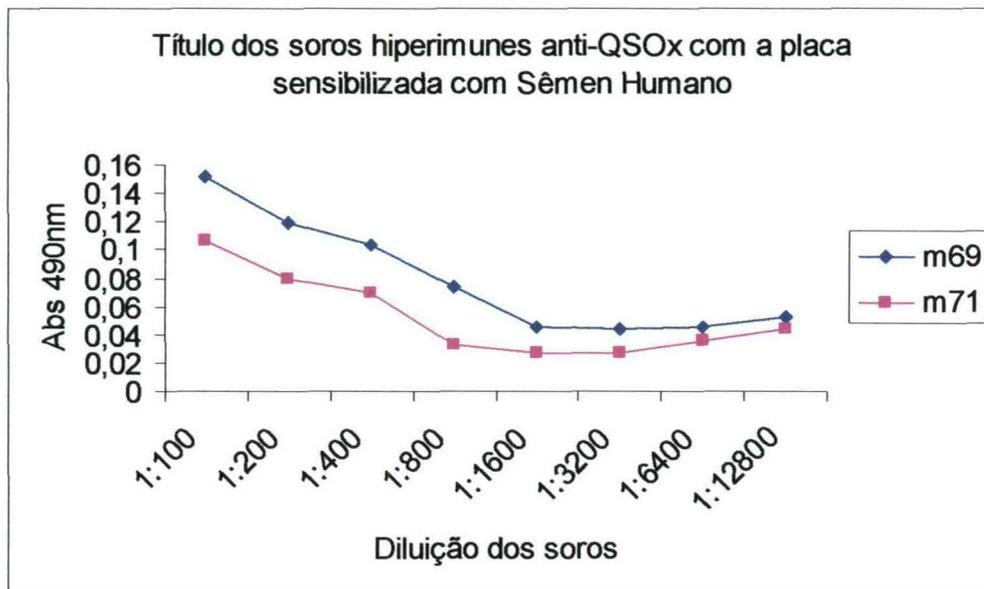


Figura 6: ELISA com a placa sensibilizada com sêmen humano. Esse ensaio foi realizado como descrito em Materiais e Métodos.

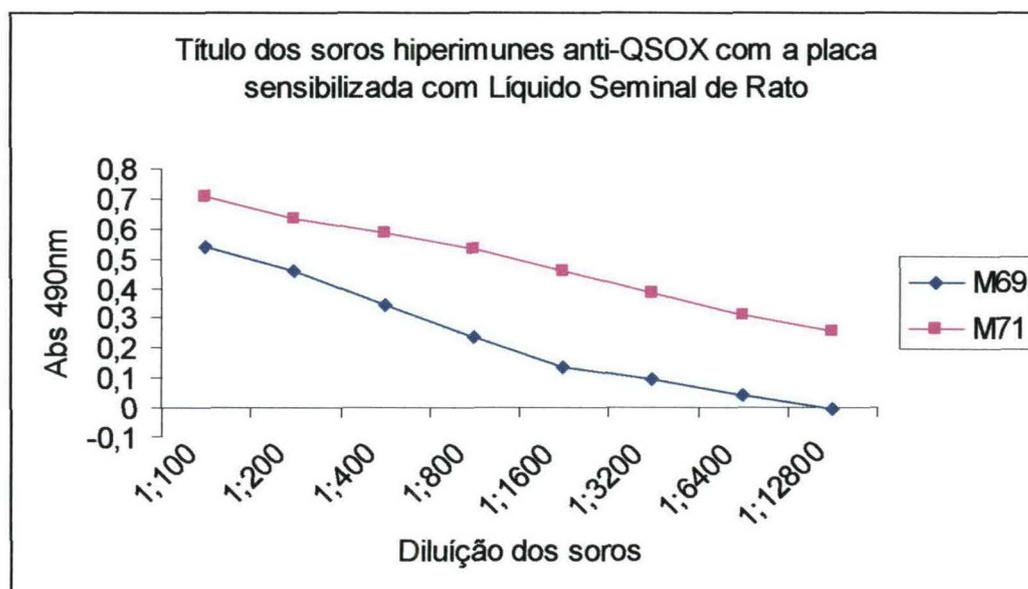


Figura 7: ELISA com a placa sensibilizada com líquido seminal de rato. Esse ensaio foi realizado como descrito em Materiais e Métodos.

Com base nos resultados apresentados nas figura 6 e 7 pode-se observar que os soros anti-QSOX reconhecem a proteína presente nas secreções seminais, mas esse reconhecimento é muito pequeno em relação àquele que ocorreu quando a placa foi sensibilizada com extrato bacteriano (figura 4). Observa-se que a absorvância é muito baixa, quando comparada àquela obtida para antígenos bacterianos. A faixa da titulação empregada nestes experimentos (1:100 – 1:12800) foi bem menor do que a utilizada com o antígeno recombinante (figura 4; 1:1600 – 1:204800). Este resultado sugere duas possíveis explicações, ou os anticorpos anti-QSOX recombinantes são muito mais eficientes no reconhecimento do antígeno recombinante do que aqueles expressos por células eucarióticas, ou grande parte dos anticorpos apresentados pelos animais reconhecem apenas antígenos bacterianos (anti-*E.coli*). Interessantemente os anticorpos se ligaram mais eficientemente ao antígeno de rato do que humano (comparar as figuras 6 e 7).

De acordo com OSTROWSKY & KESTLER, 1980; BENAYOUN *et al.*, 2001, os fluidos de vesículas seminais são ricos em proteína QSOX, e por esse motivo foi utilizado liquido seminal humano e liquido seminal de rato para testar a especificidade dos soros dos camundongos imunizados com proteína QSOX humana recombinante.

6.2 Expressão e Purificação da proteína QSOX humana

Tendo em vista a baixa especificidade dos anticorpos frente à proteína alvo, procedeu-se uma nova purificação da proteína com a finalidade de eliminar eventuais contaminantes ainda presentes. O protocolo utilizado foi aquele descrito em materiais e métodos.

Amostras obtidas antes e depois da indução com IPTG foram coletadas e separadas em um gel contendo 10% de poliacrilamida a finalidade de verificar se havia indução da expressão da proteína recombinante. Como mostra a figura 8, a indução ocorreu da maneira esperada.

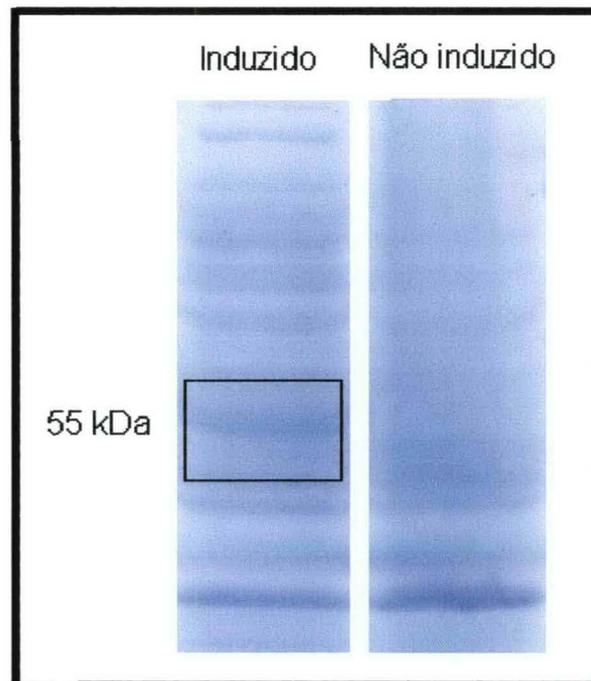


Figura 8: Gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie sugerindo indução adequada por IPTG.

Depois da indução, foi feita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Apesar de haver expressão da proteína recombinante (figura 8) não foi possível obter o antígeno recombinante purificado após etapa cromatográfica (resultado não mostrado)

6.3 Ensaio de ELISA para testar os anticorpos contra proteína prion celular

Para se verificar a capacidade dos anticorpos policlonais em reconhecer PrPc recombinante, foram realizados ensaios de ELISA de captura de anticorpo (figura 9).

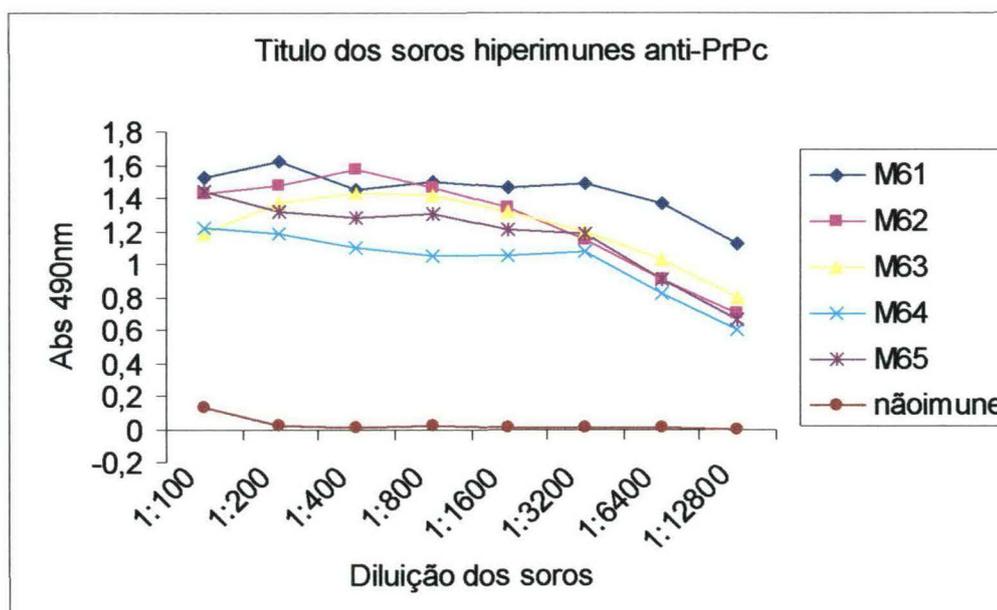


Figura 9: ELISA de captura de anticorpo anti-PrPc. Esse ensaio foi realizado como descrito em Materiais e Métodos.

Esse experimento foi realizado para observar o título dos anticorpos produzidos em camundongo nocaute para o gene *prpn*. O que se pode observar é que na diluição de 1:3200 os anticorpos são considerados bons para serem utilizados como ferramentas de estudo de proteínas, mas mesmo na diluição de 1:6400 foi evidenciado reação positiva, indicando boa reatividade dos anticorpos (comparando as figuras 9 e 10).

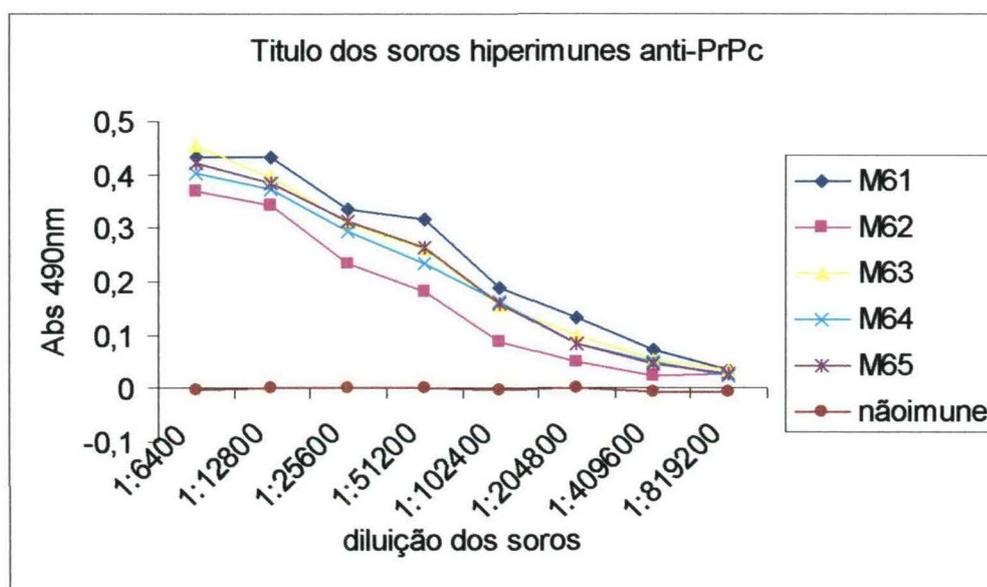


Figura 10: ELISA para PrPc iniciando a diluição em 1:6400. Esse ensaio foi realizado como descrito em Materiais e Métodos.

Após a análise do ensaio de ELISA pode-se perceber que os soros dos camundongos M061, M063 e M064 foram os que tiveram a melhor resposta. E por esse motivo esses soros foram submetidos a ensaio de *western blotting* empregando o aparato multi-screen, o qual permite a análise simultânea de diversas concentrações de anticorpos bem como soros de diferentes animais (figura 11).

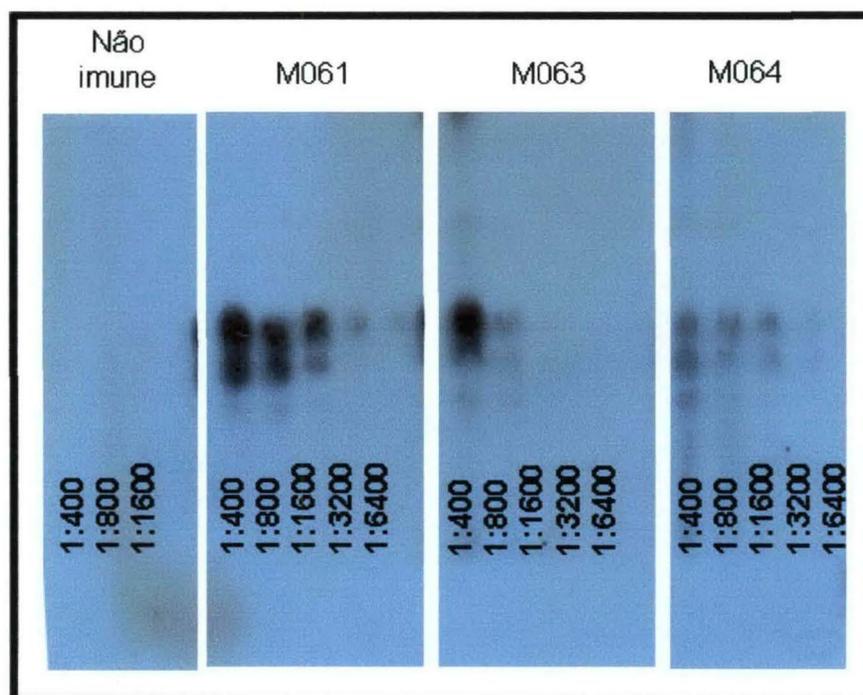


Figura 11: Revelação da membrana de nitrocelulose com os soros dos camundongos M61, M63 e M64.

De acordo com a figura 11 o camundongo M061 foi o que apresentou melhor resposta, sendo sua melhor titulação 1:1600, diferentemente do que foi observado no ensaio de ELISA.

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

7.1 Proteína QSOX

Analisando todos os ensaios de ELISA realizados para os soros dos camundongos imunizados com a proteína QSOX, percebeu-se que um dos problemas pode estar na etapa de purificação das proteínas recombinantes, que pode ter sido inadequado, não eliminando a contaminação com as proteínas de bactéria. Com isso, os protocolos de purificação de QSOX devem ser analisados e modificados para que a obtenção da proteína seja de qualidade.

Com uma proteína bem purificada os animais podem ser imunizados obtendo-se anticorpos específicos para a proteína alvo.

Outro problema que pode estar ocorrendo é a reação cruzada dos anticorpos produzidos pelos dois antígenos, sugerindo que *E.coli* e QSOX possuem epítopos de ligação de anticorpos semelhantes. Com os resultados obtidos não há como saber o que está realmente acontecendo, mas tudo indica que o problema possivelmente está relacionado com a purificação da proteína.

A proteína QSOX é muito ubíqua, ou seja, está conservada nos mamíferos (THORPE *et al.*, 2002), o que talvez gere um problema na produção dos anticorpos anti-QSOX em camundongos. De acordo com HARLOW & LANE, 1988 existe um mecanismo de auto-tolerância dos camundongos, essa tolerância protege o animal de danos autoimunes e pode desempenhar um papel determinante na imunogenicidade apresentada a um respectivo antígeno. Portanto as imunizações deveriam ser realizadas em animais com parentesco evolutivamente distante da fonte do antígeno. Outra alternativa é a utilização de animais nocauteados para o gene de interesse (ver item 7.2). Infelizmente ainda não está disponível um animal com esta modificação genética para QSOX.

Neste trabalho, utilizou-se QSOX codificada a partir de gene humano nas imunizações de camundongos. Logo, pelo fato dessa proteína ser ubíqua, os camundongos BALB/c podem ter apresentado tolerância ao antígeno – QSOXrec humana.

Outro fator que pode ter contribuído para uma diminuição da produção de anticorpos anti-QSOX humana é a de que camundongos BALB/c são isogênicos. Esta característica leva a uma diminuição da diversidade de proteínas de Classe II ou outras proteínas envolvidas na resposta imune (HARLOW, E. & LANE, D. 1988).

Levando em consideração tal característica, pode-se esperar o desenvolvimento de uma resposta imune tênue em BALB/c, com baixa produção de anticorpos a determinados antígenos, como verificada para QSOX humana.

De acordo com a literatura, os camundongos da linhagem BALB/c são os mais indicados para esse tipo de imunização (HARLOW, E. & LANE, D. 1988), mas, no caso dessa proteína, talvez essa linhagem não seja a mais indicada. Assim, deve-se pensar em utilizar outra linhagem de camundongos para imunização com QSOX humana recombinante, ou até mesmo outra espécie de animal.

O fato dos anticorpos se ligarem mais eficientemente ao antígeno de rato do que de humano pode possivelmente ser explicado pela diferença de coleta de um e outro. O sêmen humano foi processado antes de ser aplicado na placa de ELISA (centrifugação). Esse processamento da amostra pode ter alterado a quantidade de QSOX que foi imobilizada na placa. Portanto, se tinha pouca QSOX imobilizada, conseqüentemente o reconhecimento foi menor.

Um dos objetivos do trabalho era produzir anticorpos monoclonais contra QSOX; porém os camundongos se mostraram pouco responsivos à proteína, e o soro hiperimune destes reconhecia fortemente as proteínas bacterianas (figura 5), por isto não foi dado início à produção de monoclonais.

Também se deve levar em conta que uma das etapas mais críticas para a produção de monoclonais é a realização da triagem dos clones positivos, ou seja, selecionar os hibridomas que secretam os anticorpos contra o antígeno de interesse, neste caso QSOX. Como contaminantes bacterianos aparentemente são co-purificados com QSOX humana, ficaria difícil distinguir entre hibridomas secretores de anticorpos específicos para QSOX ou para o contaminante bacteriano. Além disso, espera-se que o antígeno bacteriano seja muito mais potente em estimular a imunidade humoral dos animais do que QSOX, a qual é expressa pelo camundongo. Neste contexto, o número de clones de linfócitos B específicos para antígenos bacterianos provavelmente seria muito maior que aqueles para QSOX, o que resultaria em uma baixa eficiência na produção de hibridomas secretores de anticorpos específicos para QSOX.

7.2 Proteína Prion Celular

Analisando os resultados dos ensaios realizados para prion celular pode-se observar que a utilização de camundongos nocautes é uma excelente ferramenta para obtenção de anticorpos contra moléculas conservadas em diferentes espécies. No caso desse trabalho, as imunizações com PrP^{Sc} se mostraram eficazes resultando em

altos títulos de anticorpos em todas as amostras de soro estudadas, como mostram as figuras 9 e 10. A resposta dos soros dos camundongos imunizados ficou dentro do esperado. Além disso, a utilização de antígenos purificados, sem contaminantes bacterianos também é fator adicional para induzir resposta imune humoral específica contra antígenos de interesse.

Analisando as figuras 9 e 10 e comparando com a figura 11, pode-se observar que houve diferenças nos resultados e isso se deve ao fato dos dois experimentos em questão serem bem diferentes um do outro. O ELISA é um ensaio menos sensível que o *Western Blotting*, e a placa foi sensibilizada com uma proteína recombinante que é muito simplificada comparada com a proteína do cérebro utilizada para o ensaio de *Western Blotting*.

Observa-se que na figura 11 aparecem três bandas em cada diluição dos soros, apresentando as três formas de glicosilação da proteína PrPc, a forma diglicosilada, que está representada pela banda mais alta, a forma monoglicosilada, que é a banda intermediária e a forma não-glicosilada que é a banda mais baixa. Dessa forma a complexidade da molécula cerebral de PrPc faz com que o reconhecimento seja menor e por esse motivo que no ensaio de *Western Blotting* os soros tiveram uma titulação mais baixa comparado com a titulação desses soros no ELISA.

Com base nos resultados pode-se concluir que a utilização combinada de animais nocauteados (BÜCLER *et al.*, 1992) para determinado gene, neste caso *prpn*, e antígenos com alto grau de pureza (ZANATA *et al.*, 2002, GRANER *et al.*, 2000) permite, a obtenção de soros policlonais com alta especificidade e título.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUZZI, A. Between cows and monkeys. *Nature*, v.381, p.734-735, 1996.
- AMIOT, C.; MUSARD, J.F.; HADJIYIASSEEMIS, M.; JOUVENOT, M.; FELLMANN, D.; RISOLD, P.Y.; ADAMI, P. Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. *Mol Brain Med*, v.125, 13-21, 2003.
- BARRY, R.A.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, v. 46, p. 417-428, 1986.
- BENAYOUN, B.; ESNARD-FÉVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F.J. Rat Seminal Vesicle FAD-dependent Sulfhydryl Oxidase. *Biol. Chem*, v. 276, p.13830-37, 2001.
- BRENTANI, R.R. Biological implications of complementary hydrophobicity of aminoacids. *J. Theor. Biol.*, v. 135, p. 495-499, 1990.
- BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoided of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, v. 73, p. 1339-47, 1993.
- BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, v. 356, p. 577-582, 1992.
- BUTLER, D. BSE Maternal transmission results may be released soon. *Nature*, v. 38, p. 724, 1996.
- COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics*, v. 54, p. 460-468, 1998.
- COPPOCK, D.L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERMAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ*, v. 4, p. 483-493, 1993.
- COPPOCK, D.L.; THORPE, C. Multi-domain Flavin-dependent Sulfhydryl Oxidases. *Antioxid Redox Signal*, v. 8, p. 300-11, 2006
- GAJDUSEK, D.C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, v.197, p. 943-960, 1997.
- GASSET, M.; BALDWIN, M.A.; LLOYD, D.H.; GABRIEL, J.M.; HOLTZMAN, F.C.; COHEN, F.; FLETTERICK, R.; PRUSINER, S.B. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 89, p. 10940-10944, 1992.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R.; JAY, D.G.; BRENTANI, R.R. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett*, v. 482, p. 257-60, 2000b.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; ORESTES, V.F.; CABRAL, A.L.B.; VEIGA, S.S.; JULIANO, M.A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINERRI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain. Res. Mol. Brain Res.**, v. 76, p. 85-92, 2000a.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory annual.** CSH Press, 1988.

HOOBER, K.L.; GLYNN, N.M.; BURNSIDE, J.; COPPOCK, D.L.; THORPE, C.J. Homology between Egg White Sulfhydryl Oxidase and Quescin Q6 Defines a New Class of Flavin-linked Sulfhydryl Oxidases. **Biol.Chem**, v. 274, p. 31759-62, 1999.

HOOBER, K.L.; JONEJA, B.; WHITE, H.B.; THORPE, C.J. A Sulfhydryl Oxidase from Chicken Egg White. **Biol. Chem.**, v. 271, p. 30510-16, 1996.

KOCISKO, D.A.; COME, J.H.; PRIOLA, S.A.; CHESEBRO, B.; RAYMOND, G.J.; LANSBURY, P.T.; CAUGHEY, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. **Nature**, v. 370, p. 471-474, 1994.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **J Neurochem**, v. 79, p. 79-87, 2001.

MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; ESNARD-FÉVE, A.; FELLMANN, D.; RISOLD, P.Y.; GRIFFOND, B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 484(4), p. 403-17, 2005.

MANSON, J.; WEST, J.D.; THOMSON, V.; MCBRIDE, P.; KAUFMAN, M.H.; HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development**, v. 115, p. 117-122, 1992.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. Complementary hydrophobicity identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Med**, v. 3, p. 1376-1382, 1997.

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulfhydryl oxidase (Sox) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **J. Dermatol. Sci**, v. 30, p. 50-62, 2002.

NGUYEN, J.; BALDWIN, M.A.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B. Prion protein peptides induced alpha-helix to beta-sheet conformation transitions. **Biochemistry**, v. 34, p. 4186-92, 1995.

OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, v. 40, p. 735-746, 1985.

OSTROWSKI, W.S.; KISTLER, W.S. Properties of a Flavoprotein Sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry**, v. 19, p. 2639-45, 1980.

PAN, K.M.; STAHL, N.; PRUSINER, S.B. Purification and properties of cellular prion protein from Syrian hamster brain. **Protein Sci.**, v. 1, p. 1343-52, 1992.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 13363-13383, 1997.

PRUSINER, S.B.; BOLTON, D.C.; GROTH, D.F.; BOWMAN, K.A.; COCHRAN, S.P.; MCKINLEY, M.P. Further purification and characterization of scrapie prions. **Biochemistry**, v. 21, p. 6942-6950, 1982.

PRUSINER, S.B.; SCOTT, M.R.; DEARMOND, S.J.; COHEN, F.E. Prion protein biology. **Cell**, v. 93, p. 337-348, 1998.

THORPE, C.; HOOBER, K.L.; RAJES, S.; GLYNN, N.M.; BURNSIDE, J.; TURI, G.K.; COPPOCK, D.L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 405, p. 1-12, 2002.

WALS, R.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, L.C.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; CAVALHEIRO, E.A.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia**, v. 40, p. 1679-82, 1999.

WITTKER, I.; WIEDEMEYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. **Cancer Res.**, v.15, p. 7742-7752, 2003.

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.; FREITAS, A.R.O.; CHIARINI, L.B.; CABRAL, A.L.B.; NOMIZO, R.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **EMBO journal**, v. 21, p. 3307-3316, 2002a.

ZANATA, S.M.; LUVIZON, A.C.; BATISTA, D.F.; IKEGAMI, C.M.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; CHAVES, D.F.S.; CARON, L.F.; PELIZZARI, J.V.; LAURINDO, F.R.M.; NAKAO, L.S. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox Report**, v. 10, p. 319-323, 2005.