

Audrey Dalianna Rebicki Arriola Scarante

Produção de Anticorpos Policlonais contra a Proteína Prion Celular (PrPc)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2005

“Pedras no caminho? Guardo todas. Um dia construirei um castelo.”

Fernando Pessoa

PARA

MEUS PAIS DELAIR (in memorian) E JESSE

Meus sinceros agradecimentos

À Universidade Federal do Paraná

À coordenação da pós graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná

Ao Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, em especial à Prof. Dra. Vanete T. Soccol, por toda a sua dedicação a este curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Silvio M. Zanata pela oportunidade concedida, pelo exemplo, pela amizade e pelo seu tempo dedicado ao nosso aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia : Michele, Lianara, Aline, Daniel, Tatiana, Cecília, Beth e Plínio.

Aos colegas do laboratório de Matriz Extracelular e aos colegas Marcelo, Ângela, Lucélia e Valéria dos demais laboratórios.

À Dra. Irene Fernandes e ao Instituto Butantan pelos materiais cedidos e pela disposição em nos ajudar neste projeto.

Aos amigos de sempre Eliane, Andreza, Adriane, Fernanda, Heloisa, Shizuê, Ana Paula Paloma, Ana Paula Passos, Gisele, Andressa, Gislaine, Adriane, Paula e Vanessa pela contribuição que tiveram em toda a minha vida.

Aos amigos Franco, por ter me apresentado ao cultivo de células, Marion, Eliane e Ivete pela dedicação e exemplo em seus trabalhos e pela confiança em mim depositada.

Aos colegas Gesse, Elizeu, Klaus e Ruy pela oportunidade de trabalhar e aprender em seus empreendimentos.

Aos Professores que fizeram mais do que apenas ensinar conceitos, contribuindo para que eu desenvolvesse o gosto pela pesquisa, entre eles Profa. Kazuko, Prof. Luis Fernando e Prof. Mira.

Aos meus avós Anna e Lauro (in memoriam), e Dalila e Hipólito, por serem exemplo de força na minha vida.

Aos meus pais pelo grande amor por mim demonstrado das mais diversas maneiras.

Ao meu esposo Victor pelo respeito, amor e paciência de sempre.

Ao meu irmão Jesse Jr pelo amor e amizade.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a atingir este objetivo.

RESUMO

Neste trabalho produzimos soro e líquido ascítico policlonais reagentes contra a proteína prion celular. Utilizamos uma estratégia experimental na qual camundongos nocaute para o gene que codifica a proteína prion celular foram imunizados com proteína prion celular recombinante. Experimentos de Elisa mostraram o título dos reagentes produzidos. Experimentos de imunofluorescência utilizando os reagentes produzidos mostram a presença e distribuição da proteína prion celular pela membrana celular em células isoladas em cultura celular. Para produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (mAb), descrevemos as diferentes técnicas experimentadas e possíveis razões pelas quais não foi obtido sucesso nas mesmas.

SUMMARY

In this study we produced polyclonal serum and ascitic fluid containing antibodies that recognize the cellular prion protein. 'Knockout' mouse lacking the gene that expresses the cellular prion protein were immunized with recombinant cellular prion protein. ELISA essays determined the concentration of the reagents produced. Immunofluorescent essays executed with the produced reagents show the presence and distribution of the cellular prion protein through the cell membrane in isolated cells in cell culture. Expecting to produce hibridomas secreting monoclonal antibodies against the cellular prion protein we describe the different techniques carried out followed by some possible reasons why the essays were unsuccessful.

Abreviaturas

EDTA	etilenodiamino tetraacetato
SFB	soro fetal bovino
PEG	Polietilenoglicol
RPMI10	Meio de cultivo de células contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)
PrPc	proteína prion celular
PrPsc	proteína prion infeccioso
rPrPc	Proteína prion celular recombinante
ATCC	American Type Culture Collection
CJD	Doença de Crutzfeldt- Jacob
OPI	Oxaloacetato, piruvato de sódio e insulina
DMSO	Dimetil sulfóxido
FLM	Feeder layer de macrófagos
ELISA	Enzime-linked immunosorbent essay

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Prions e Doenças Neurodegenerativas	1
1.2 Anticorpos Monoclonais.....	7
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Células de mieloma.....	14
3.3 Meios de cultura.....	14
3.4 Cultivo das linhagens de mieloma.....	15
3.5 Estocagem das Células.....	15
3.6 Ensaio de detecção de micoplasma	16
3.7 Proteína recombinante.....	16
3.8 Imunizações.....	16
3.8.1 Imunização dos camundongos nocaute via intraperitoneal.....	16
3.8.2 Imunização dos camundongos nocaute via coxim plantar.....	17

3.8.3	Imunização dos camundongos nocaute via intravenosa.....	17
3.9	Avaliação da resposta humoral.....	17
3.10	Ensaio da seleção de lote de soro fetal bovino.....	18
3.11	Obtenção dos hibridomas.....	19
3.11.1	“Feeder Layers” de macrófagos (FLM)	19
3.11.2	Primeiro experimento de fusão.....	19
3.11.3	Segundo experimento de fusão.....	21
3.11.4	Terceiro experimento de fusão.....	23
3.12	Produção de líquido ascítico.....	24
3.13	Avaliação da resposta à produção de líquido ascítico em camundongos nocaute..	25
3.14	SDS-PAGE.....	25
3.15	Ensaio de Western Blotting.....	26
4.	RESULTADOS.....	28
5.	DISCUSSÃO.....	37
6.	CONCLUSÃO.....	52
7.	REFERÊNCIAS.....	53