

JUAN CARLOS MONTEROS

**CONSERVAÇÃO EVOLUTIVA DA PROTEÍNA ST11
NAS ESPÉCIES *Mus musculus* E *Danio rerio***

CURITIBA

2009

JUAN CARLOS MONTEROS

**CONSERVAÇÃO EVOLUTIVA DA PROTEÍNA ST11
NAS ESPÉCIES *Mus musculus* E *Danio rerio***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orietador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2009

Dedico este trabalho ao Professor Ricardo Fernández Perez, do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

AGRADECIMENTOS

À massa e/ou energia que regula a lógica universal, por não ter evitado que meu tempo e minhas circunstâncias coincidissem com os tempos e as circunstâncias das pessoas que cito a seguir, às quais, também agradeço.

A minha família, especialmente, a minha tia Ines Salomé Szeliga quem, além de me ajudar em momentos difíceis de minha vida, nunca deixou de acreditar nos meus projetos.

A meu amigo César Daniel Ieugeniuk quem me ajudou em diferentes momentos de minha vida.

À Senhora Maria Elena Proto da Embaixada Brasileira na Argentina, por que sempre me orientou de forma certa no que diz respeito às questões administrativas do PEC-PG.

À Professora Cloris Ditzel Faraco quem, através de seus enormes conhecimentos, iluminou uma parte importante de meu caminho.

Ao Professor Silvio Marques Zanata, meu orientador, por ter permitido que eu desenvolvesse meu mestrado no seu laboratório.

A meu amigo Rubén Flores, quem me ajudou em momentos difíceis, principalmente, no meu primeiro ano em Curitiba.

A Marlene, nossa Secretária de pós-graduação, por que sempre me deu alternativas para solucionar problemas administrativos, do mestrado.

À Professora Nora Calcaterra da Universidad Nacional de Rosario, Argentina, por ter fornecido as larvas de peixe zebra que utilizamos nos nossos ensaios imunohistoquímicos e o correspondente protocolo original de trabalho.

À minhas colegas Fabiola e Fernanda por que me ensinaram as primeiras letras do laboratório.

À Professora Flavia Sant'Anna Rios por que colaborou na obtenção das amostras de peixe zebra que utilizamos nos nossos ensaios bioquímicos e por que corrigiu este trabalho.

À Professora Lucélia Donatti por que forneceu os espécimes de peixe zebra que utilizamos nos nossos ensaios bioquímicos.

À minha colega Viviane por ter realizado os ensaios bioquímicos deste trabalho.

Ao Professor Leonardo Cruz, porque baseado nos seus alinhamentos de seqüências, comecei escrever este trabalho segundo a estrutura que apresenta hoje.

À Professora Sonia Regina Grotzner quem fotografou as larvas dos nossos ensaios imunohistoquímicos.

Ao Professor Erasto Villa Branco Júnior quem corrigiu várias matérias deste trabalho referentes à evolução.

A meu colega Rafael Vargas por que aclarou muitas de minhas dúvidas e por que me ajudou confeccionar várias figuras deste trabalho.

Ao meu colega Pablo Carvalho Santos, quem fez os alinhamentos dos domínios TPR.

A Luiza Fonseca Taques, quem passou para o Português meus originais escritos em "portunhol".

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>MUS MUSCULUS</i>	1
1.2 <i>DANIO RERIO</i>	2
1.3 PROTEÍNA STI1	5
1.3.1 Conceito	5
1.3.2 Breve história	5
1.3.3 Gene STI1	6
1.3.4 Características estruturais e físico-químicas	6
1.3.5 Distribuição	9
1.3.6 Funções	9
1.3.7 Deterioração das funções da proteína STI1	16
1.4 ASPECTOS EVOLUTIVOS GERAIS DAS ESPÉCIES <i>MUS MUSCULUS</i> E <i>DANIO RERIO</i>	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.2.1 Objetivo 1	21
2.2.2 Objetivo 2	21
2.2.3 Objetivo 3	21
3 MATERIAIS E METODOLOGIA	22
3.1 ANÁLISES DE SEQÜÊNCIAS	22
3.1.1 Materiais	22
3.1.2 Metodologia	22
3.2 ENSAIOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	24
3.2.1 Materiais	24
3.2.2 Metodologia	26
3.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	28
3.3.1 Materiais	28
3.3.2 Metodologia	30

4	RESULTADOS	34
4.1	ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS	34
4.1.1	Resultados referentes à conservação global de aminoácidos da proteína STI1, nas espécies <i>Mus musculus</i> , <i>Danio rerio</i> e <i>Homo sapiens</i>	34
4.1.2	Resultados referentes à conservação de aminoácidos nos domínios TPR da proteína STI1, nas espécies <i>Mus musculus</i> , <i>Danio rerio</i> e <i>Homo sapiens</i>	38
4.2	ENSAIOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	41
4.3	ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	44
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8	ANEXOS	75
8.1	STI1 / <i>MUS MUSCULUS</i>	76
8.2	STI1 / <i>DANIO RERIO</i>	77
8.3	STI1 / <i>HOMO SAPIENS</i>	78
8.4	SOLUÇÕES	79
8.4.1	Solução PBS 1x, ph 7,4; 500 ml volume final.	79
8.4.2	Solução de bloqueio 1; 5 ml volume final.....	79
8.4.3	Solução PBST 0,05%; 100 ml volume final.....	79
8.4.4	Solução TBS 1x, ph 7,4; 500 ml volume final.....	79
8.4.5	Solução DAB; 15 ml volume final.....	79
8.4.6	Solução H2O2 0,008%; 6 ml volume final.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar adulto de <i>Mus musculus</i>	1
Figura 2 – Exemplos adultos de <i>Danio rerio</i>	3
Figura 3 – Representação gráfica da proteína mSTI1.....	6
Figura 4 – Representação gráfica da cristalografia dos complexos TPR.....	8
Figura 5 - Representação gráfica dos domínios TPR1 e TPR2A.....	14
Figura 6 – Árvore Filogenética.....	20
Figura 7 – Alinhamento das proteínas STI1 das espécies <i>Mus musculus</i> , <i>Danio rerio</i> e <i>Homo sapiens</i>	35
Figura 8 – Matriz de identidade correspondente ao alinhamento das proteínas STI1.....	36
Figura 9 – Árvore Filogenética confeccionada a partir das seqüências de aminoácidos das proteínas STI1 de diferentes espécies.....	37
Figura 10 – Matriz de Identidade dos domínios TPR1.....	39
Figura 11 – Matriz de Identidade dos domínios TPR2.....	39
Figura 12 – Matriz de Identidade dos domínios TPR1.....	40
Figura 13 – Matriz de Identidade dos domínios TPR2A.....	40
Figura 14 – Matriz de Identidade dos domínios TPR2B.....	40
Figura 15 (A) – Controle negativo absoluto, (B) – Controle negativo relativo, (C) – Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra.....	44
Figura 16 (A) – Filme 1 : Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra, (B) – Filme 2 : Controle negativo.....	46

1 INTRODUÇÃO

Mus musculus e *Danio rerio* são dois dos mais difundidos organismos experimentais e, no nosso caso particular, têm um interesse a mais; neles resolvemos estudar a conservação evolutiva de suas proteínas STI1, hoje, 400 milhões de anos após da divergência que originou peixes e mamíferos na escala evolutiva (veja figura 6).

A seguir, nos pontos 1.1 e 1.2 faremos referência a esses organismos como modelos experimentais e logo, no ponto 1.4, faremos algumas considerações referidas aos aspectos evolutivos dessas espécies.

1.1 *MUS MUSCULUS*

Também denominado camundongo, *Mus musculus* é o modelo experimental mais difundido devido ao fato que, do ponto de vista genômico, é o organismo mais semelhante ao homem e portanto o modelo mais útil para o estudo de doenças humanas (veja figura 1).

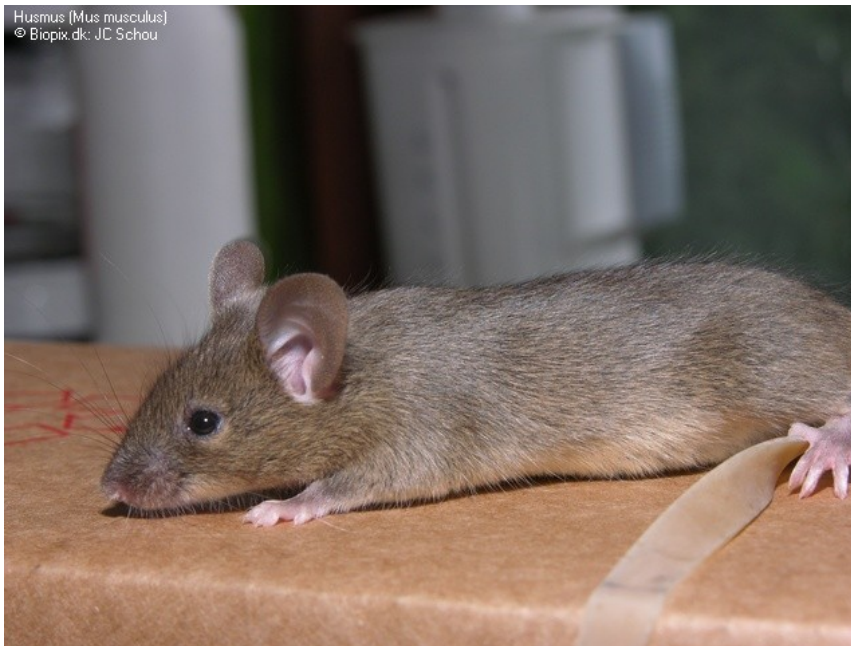


Figura 1 – Exemplar adulto de *Mus musculus*.

As abordagens mais utilizadas para realizar tais estudos constituem o que se conhece como genética reversa ou knock-out gênico. Tais abordagens consistem na inibição da expressão de um gene determinado através de diferentes técnicas. Assim, por exemplo, genes murinos portadores de mutações similares às mutações que afetam genes humanos, são introduzidos nas linhagens germinativas de camundongos progenitores gerando indivíduos heterozigotos para a mutação estudada (ADAMS, A.E.M. et al, 1989; GRIFFITHS, A.G.E. et al, 2000; TONG, A.H. et al, 2001). Logo, esses progenitores heterozigotos, machos e fêmeas, são cruzados dando uma descendência homocigota afetada (CAPECHI, M.R., 1989; FIRE, A. et al., 1998; ZIMMER, A., 1992). Nessa descendência é caracterizado o fenótipo patológico derivado da mutação em estudo, nos níveis molecular, celular, tecidual, orgânico, comportamental, social, reprodutivo, etc.

Essa técnica de Knock-out gênico é bem mais ampla e complexa inclusive, como já foi dito, existem outras técnicas, mas esse tema pretende ser apenas ilustrativo já que excede os limites do presente trabalho.

A desvantagem do modelo *Mus musculus* quando comparado com modelos que possuem desenvolvimento embrionário externo, por exemplo peixes e anfíbios, é que seu desenvolvimento é interno e portanto não pode ser estudado por observação direta como nesses modelos e, além disso, o tempo de desenvolvimento, por volta de 60 dias, é bem maior quando comparado, por exemplo, com *Danio rerio*, o qual às 72 horas pós-fecundação já acabou sua organogênese. Portanto, no que diz respeito à biologia do desenvolvimento, *Mus musculus*, na maioria das abordagens experimentais, foi superado por esses modelos.

Não entanto, quando comparado com outros mamíferos, *Mus musculus* possui um tempo de desenvolvimento relativamente curto e portanto, além da vantagem de ter um genoma muito similar, continua sendo o modelo de eleição para o estudo da embriologia humana.

1.2 *DANIO RERIO*

Também denominado peixe zebra ou paulistinha, *Danio rerio* é um peixe tropical ovíparo, originário da Ásia, que vive em água doce a temperaturas que

variam entre 18°C e 28°C e que atinge um comprimento máximo de seis centímetros (veja figura 2).



Figura 2 – Exemplos adultos de *Danio rerio*

Nos últimos anos *Danio rerio* surgiu como um novo organismo modelo para o estudo do desenvolvimento embrionário de vertebrados em geral e de doenças genéticas humanas em particular (METSCHER, B.D.; AHLBERG, P.E., 1999; ANDERSON, K.V.; INGHAM, P.W., 2003; FISHMAN, M.C., 2001; DODD, A. et al, 2000; GRUNWALD, D.J.; EISEN, J.S., 2002), uma vez que possui características que o tornam muito útil para esses fins, tais como:

- As fêmeas desovam o ano todo. Cada fêmea pode produzir entre 150 e 300 ovócitos por semana (WESTERFIELD, M. 3 ed).
- A espécie tem fecundação e desenvolvimento embrionário externo. Isto, somado ao fato que tanto os ovos quanto os embriões são grandes e transparentes, permite estudar por observação direta em lupa os diferentes estádios do desenvolvimento embrionário, inclusive, o deslocamento dos distintos grupos celulares durante esses estádios e, mais tarde, a organogênese de todos os órgãos e sistemas. (KIMMEL, C.B. et al, 1995)

- O desenvolvimento embrionário é muito rápido. Às 24 horas pós-fecundação (hpf) o coração termina sua organogênese e bate fazendo circular células sanguíneas precursoras, às 72 hpf finaliza a organogênese de todos os órgãos e sistemas, o embrião eclode e começa se deslocar pelos seus próprios meios. (KIMMEL, C.B. et al, 1995).
- *Danio rerio* é uma espécie que tem grande tolerância social e portanto pode conviver em populações de alta densidade. Esse fato permite mantê-lo em aquários pequenos e a custos baixos.
- *Danio rerio* possui um genoma pequeno; $1,7 \times 10^9$ pb, que foi completamente seqüenciado (BARBAZUK, W.B. et al, 2000).
- Devido ao fato que *Danio rerio* é um vertebrado que tem uma alta taxa de fecundidade, produzindo grande quantidade de embriões, possui um desenvolvimento embrionário muito rápido e observável em forma direta, e tem um ciclo de vida curto, atualmente, está substituindo *Drosophila melanogaster* como modelo para a realização de técnicas de genética direta. Uma dessas técnicas consiste na microinjeção de transposons em ovos não fecundados ou em embriões nos primeiros estádios do desenvolvimento, com o objeto de induzir mutações randômicas e gerar diferentes fenótipos mutantes, que, poderão ser reconhecidos através da identificação das proteínas alteradas, das malformações de tecidos e órgãos ou das malformações do embrião inteiro. Logo os indivíduos mutantes são isolados com a finalidade de estudar o ou os genes mutados, primeiramente clonando esses genes e, logo, injetando-os em ovos normais recém fecundados e analisando, posteriormente, os fenótipos resultantes (GRIFFITHS, A.G.E. et al, 2000; TONG, A.H. et al, 2001).

Além disto, o gene mutado pode ser comparado com a mesma mutação mas de um outro modelo, por exemplo, humano. (ACKERMANN, G.E.; PAW, B.H., 2003; BARBAZUK, W.B. et al, 2000; POSTLETHWAIT, J.H. et al, 1998)

Utilizando técnicas de genética direta e outras poderosas ferramentas, *Danio rerio* foi utilizado para estudar distintos aspectos do desenvolvimento humano e de sua patologia. Assim, foram estudados aspectos hematopoiéticos (AMATRUDA, J.F.; ZON, L.I., 1999; SHAFIZADEH, E.; PAW, B.H., 2004), imunológicos (TRAVER, D. et al, 2003), cardíacos (STAINIER, D.Y., 2001; GLICKMAN, N.S.; YELON, D., 2002), vasculares (LAWSON, N.D.; WEINSTEIN, B.M., 2002), renais (REIMSCHUSSEL, R.,

2001), neurológicos (HJORTH, J.; KEY, B., 2002; KEY, B.; DEVINE, C.A., 2003), neurosensoriais; oftalmológicos (BILOTTA, J.; SASZIK, S., 2001; NEUHAUSS, S.C., 2003), olfatórios (WHITLOCK, K.E., 2004) e auditivos (WHITFIELD, T.T., 2002).

Além disto foram estudados transtornos do comportamento, como a doença de Alzheimer (TOMASIEWICZ, H.G. et al, 2002) e autismo (TROPEPE, V.; SIVE, H.L., 2003).

Por outra parte se realizaram estudos sobre ciclos circadianos (CAHILL, G.M., 2002), envelhecimento de organismos (GERHARD, G.S., 2003), apoptose celular (YAMASHITA, M., 2003), estudos farmacológicos e toxicológicos (RUBINSTEIN, A.L., 2003; TERAOKA, H. et al, 2003), estudos referidos a patogênese bacteriana (van der SAR, A.M. et al, 2004) etc.

A única desvantagem do modelo *Danio rerio* é que até agora não foram desenvolvidas com sucesso técnicas de knock-out que permitam fazer estudos de genética reversa.

1.3 PROTEÍNA STI1

1.3.1 Conceito

É uma proteína cuja expressão aumenta em estados de estresse celular e cujas funções mais conhecidas são sua participação nos processos de neuroproteção e neuritogenes; associada à membrana plasmática, e de dobramento de proteínas; associada ao citoplasma.

1.3.2 Breve história

Foram Nicolet e Craig (NICOLET; CRAIG, 1989) quem em 1989 propuseram pela primeira vez, a existência de uma proteína que seria necessária para estabilizar as chaperonas Hsp 70/90 durante o dobramento de proteínas. Mais tarde, em 1994, Nicolet, trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, descreveu aquela hipotética proteína e lhe deu o nome de proteína indutível por stress 1 ou STI1, devido ao fato que quando submetia essa levedura a estresse por calor, a expressão da proteína aumentava.

Hoje existem inúmeras publicações, não apenas a respeito de STI1, senão também referidas a suas homólogas hSTI1 ou Hop em humano, mSTI1 em camundongo etc.

1.3.3 Gene STI1

O gene que codifica a **proteína STI1** foi altamente conservado ao longo da evolução de animais e plantas (veja ponto 4.1.1.3). Tal conservação era esperável uma vez que se trata de um gene “housekeeping”, cujo produto, a proteína STI1, realiza funções de manutenção e outras funções, como já foi citado e como será ampliado no ponto 1.3.6.

1.3.4 Características estruturais e físico-químicas

STI1 é uma proteína que, em todas as espécies, é constituída por três domínios TPR dispostos linearmente (veja figura 3 e ponto 1.3.6.2: co-chaperonas).

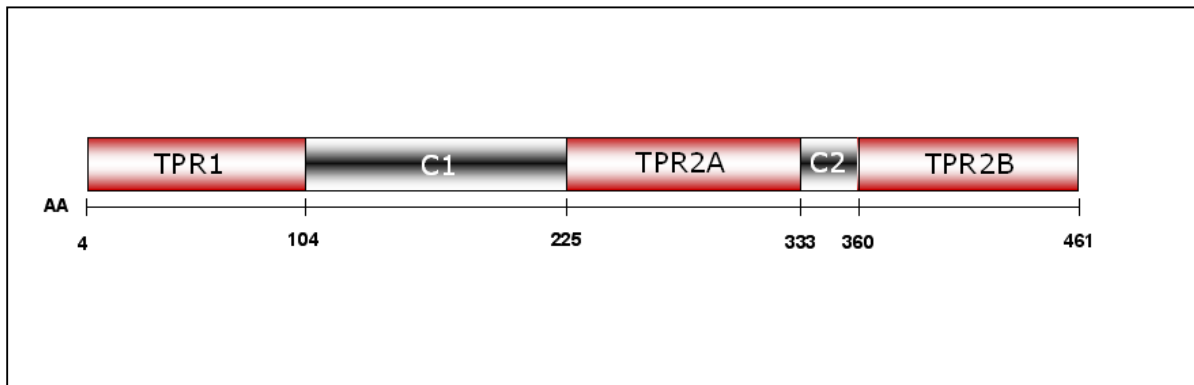


Figura 3 – Representação gráfica da proteína mSTI1 que confeccionamos a partir da seqüência publicada por Odunuga et al, 2003. C1: conector de 121 aminoácidos que une os domínios TPR1 e TPR2A. C2: conector de 27 aminoácidos que une os domínios TPR2A e TPR2B.

Tais domínios, por sua vez, estão constituídos por motivos TPR, dos quais, existem 9 tipos diferentes. Esses motivos TPR, constituintes dos domínios de união, se ligam através de seus extremos N-terminal nos motivos EEVD dos extremos C-terminal das chaperonas Hsp70/90. (BLATCH et al., 1999; ODUNUGA, O.O. et al.,

2004; SAUTA, et al., 2004). Os motivos EEVD são regiões das chaperonas, ricas na seqüência de aminoácidos Ácido glutâmico (E), Valina (V) e Ácido aspártico (D).

Uma das uniões então, acontece entre os aminoácidos do extremo N-terminal de um motivo TPR constituinte de um domínio **TPR1** e um motivo EEVD do extremo C-terminal de uma **Hsp70**. A outra união, ocorre entre os aminoácidos do extremo N-terminal de um motivo TPR constituinte de um domínio **TPR2A** e um motivo EEVD do extremo C-terminal de uma **Hsp90**. Em ambos casos, trata-se de uniões eletrostáticas. (LASSLE, M. et al, 1997; SCHEUFLER, et al, 2000; ODUNUGA, et al, 2003).

A seguir, na figura 4, são mostradas representações gráficas da cristalografia dos complexos **TPR/chaperonas**, correspondentes à espécie *Homo sapiens*, tiradas de Odunuga et al, 2003.

Como o leitor já terá percebido aparentemente, pelo fato de não ter sido suficientemente estudado, o domínio TPR2B não aparece representado nas publicações referentes à proteína STI1, matéria que o leitor irá compreendendo ao longo deste trabalho.

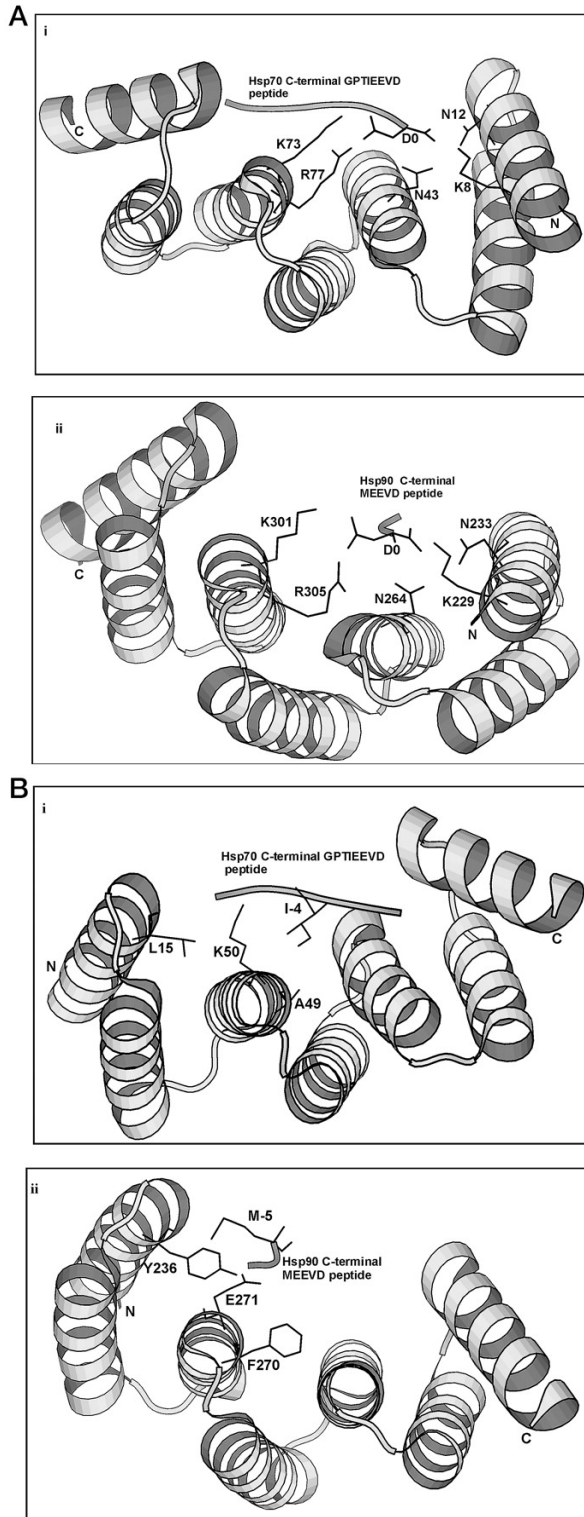


Figura 4 (A:i e ii) – Representação gráfica da cristalografia dos complexos TPR1 / chaperona Hsp70 (i) e TPR2A / chaperona Hsp90 (ii), (B: i e ii) – outro exemplo desses complexos (Figuras tiradas de Odunuga, O.O. et al, 2003)

A proteína STI1 possui um ponto isoelétrico teórico de 6,40 e massa molecular de 62,58 KDa.

Informação complementar desses temas se encontra nos anexos deste trabalho; pontos 8.1, 8.2 e 8.3.

1.3.5 Distribuição

STI1 é uma proteína que tem distribuição ubíqua (veja ponto 4.2; **poços 3: Marcação específica linear**). Quanto a sua distribuição celular, a proteína STI1 se encontra na membrana plasmática, no citoplasma e no núcleo, cumprindo diferentes funções (veja ponto seguinte).

1.3.6 Funções

As funções da proteína STI1 podem ser divididas em funções associadas à membrana plasmática, ao citoplasma e ao núcleo.

1.3.6.1 Funções associadas à membrana plasmática

A proteína STI1 é um ligante da proteína de membrana príon celular ou PrPc e forma com ela o complexo STI1-PrPc de membrana, o qual, acredita-se participar dos processos de neuroproteção e neuritogênese.

1.3.6.1.1 Neuroproteção

Os efeitos neuroprotetores promovidos pelo complexo STI1-PrPc poderiam ser mediados pela via de sinalização acoplada à enzima fosfoquinase A (PKA), pela via de sinalização acoplada à enzima superóxido dismutase (SOD), ou por ambas vias.

Neuroproteção mediada pela via da enzima PKA: O complexo STI1-PrPc ativado, promoveria a ativação da enzima PKA e esta iniciaria uma cascata de fosforilações que terminaria ativando uma via anti-apoptótica que evitaria a morte celular programada prolongando assim a sobrevivência dessa célula.

A existência desta via anti-apoptótica foi postulada devido ao fato que, quando a via da enzima PKA é ativada experimentalmente em neurônios da retina de camundongos neonatos, se produz um efeito anti-apoptótico que evita de forma

eficiente a morte celular e prolonga a sobrevivência destes neurônios. (ZANATA, S.M. et al, 2002; CHIARINI, L.B. et al, 2002).

Neuroproteção mediada pela via da enzima SOD: A superóxido dismutase é uma enzima cuja função é degradar o ânion superóxido endógeno resultante do metabolismo normal de qualquer célula, e gera água como sub-produto, desde que as catalases, enzimas que atuam depois dela, funcionem normalmente.

Quando algum agente etiológico oxidante e inestável, seja exógeno ou endógeno, produz altas concentrações de ânions super óxido nos tecidos, os níveis celulares de SOD baixam e a enzima não consegue degradar o excesso de ânions, que se acumulam nas células.

O ânion superóxido é um composto muito citotóxico por ser um agente altamente oxidante. Este oxida moléculas que em condições normais não deveriam estar oxidadas. Esse fato afeta muito as funções de tais moléculas, provocando grandes transtornos no metabolismo geral da célula e isto, por sua vez, conduz a estresse celular e, finalmente, à morte da célula.

Em estados de estresse celular provocado por algum desses agentes oxidantes e pelo mecanismo descrito, a expressão de STI1 aumenta, como aumenta por calor ou por qualquer outra causa geradora de estresse celular.

A proteína STI1 expressada em tais condições se une à proteína PrPc de membrana formando o complexo STI-PrPc, que aumentaria a atividade da SOD através de um dos mecanismos descritos a seguir, ou através de ambos os mecanismos simultaneamente.

1º) O complexo STI1-PrPc ativado aumentaria a síntese de SOD através da ativação de uma via alternativa de emergência, não utilizada habitualmente pela célula para sintetizar SOD, que potencializar por sinergismo a atividade normal da SOD. (SAKUDO, A. et al., 2005)

2º) O complexo STI1-PrPc ativado forneceria íons de zinco e cobre para a SOD, contidos na molécula da PrPc. É preciso lembrar que a SOD utiliza habitualmente esses íons como co-fatores. (SAKUDO, A. et al., 2005)

Neuroproteção mediada por ambas vias: Devido ao fato de a ativação da via da PKA e da SOD serem eventos independentes e não excluentes, o efeito

neuroprotetor promovido pelo complexo STI1-PrPc poderia ser mediado pela ativação de ambas vias.

1.3.6.1.2 Neuritogênese

Acredita-se que o complexo STI1-PrPc poderia promover a formação de neuritos através da ativação da já conhecida via de sinalização acoplada à enzima ERK1. A ativação da enzima ERK1 e, conseqüentemente da via de sinalização correspondente, promove processos de neuritogênese em neurônios cultivados. Assim, no ano 2005, foi demonstrado que neurônios do hipocampo cultivados emitem prolongamentos em regiões de suas membranas plasmáticas nas quais se expressa a proteína PrPc, quando tais regiões são postas em contato com a proteína STI1. Essa descoberta permitiu postular que a formação do complexo STI1-PrPc ativado, poderia ativar aquela via de sinalização mediada pela enzima ERK1, o que promoveria os processos de neuritogênese observados. (LOPES, M.H. et al, 2005).

1.3.6.2 Funções associadas ao citoplasma

A atividade mais estudada da proteína STI1 no citoplasma é sua função de **co-chaperona** estabilizadora do complexo Hsp 70/90 durante o processo de dobramento de proteínas; fazendo parte do complexo chaperona-chaperonina/co-chaperona.

A seqüência de aminoácidos que resulta do processo de tradução constitui a estrutura primária de uma proteína. A partir dessa seqüência e, através de diferentes dobramentos, a proteína vai ganhando, progressivamente, suas estruturas secundária, terciária e quaternária.

Desde o ponto de vista da estabilidade de uma molécula em seu meio ambiente, cada proteína adota uma conformação que se denomina estado nativo, o qual, constitui a conformação mais estável dessa proteína nesse meio ambiente (BRANDEN C.; TOOZE J., 1999). Por sua vez, uma proteína que se encontra em seu estado nativo, pode ser funcional ou não funcional.

As proteínas recém sintetizadas alcançam seu estado nativo através de dobramentos consecutivos feitos por proteínas especializadas chamadas de chaperonas, chaperoninas e co-chaperonas.

- Chaperonas

As chaperonas são proteínas que estabilizam proteínas recém sintetizadas através de uniões específicas, evitando assim que as diferentes regiões delas se aproximem umas para outras em forma desorganizada e aconteçam uniões incorretas.

Em sua forma inativa as chaperonas estão ligadas a ATP e sua estrutura é parecida com um bolsão. Essa estrutura é hidrofóbica o que facilita o acesso de proteínas de conformação simples ou pouco dobradas como as proteínas recém sintetizadas, as quais também são hidrofóbicas. A entrada de uma dessas proteínas no bolsão hidrofóbico gera hidrólise de ATP em ADP e, a energia liberada, é utilizada para fechar esse bolsão. Uma vez dentro das chaperonas, a proteínas recém sintetizada é dobrada pelas chaperoninas (ALBERTS, B. 4 ed., 2004).

- Chaperoninas

Estas moléculas são proteínas que agem dentro do bolsão hidrofóbico fechado, formado pelas chaperonas.

As chaperoninas reconhecem seqüências específicas das proteínas recém sintetizadas e se ligam nelas. Logo, dobram essas proteínas em pontos que também são específicos (FRYDMAN, J., 2001). Esse dobramento posiciona em forma adequada uma região da proteína em relação às demais regiões dela. Logo e, graças a esse posicionamento prévio, as chaperoninas ligam em forma certa distintos grupos químicos localizados em distintas regiões da proteína, terminando o processo de dobramento e gerando uma proteína em estado nativo. Nesse estado, a molécula recém dobrada possui condição hidrofílica o que favorece sua expulsão do bolsão hidrofóbico formado pela chaperona (LESK et al., 2001).

Além de realizar o dobramento de proteínas, o complexo chaperona/chaperonina tem várias outras funções, por exemplo, sua participação na degradação de proteínas, já seja por via dos lisossomos ou por via do processo de ubiquitinação. (PARSSEL et al, 1994; KORNITZER, D.; CIECHANOVER, A., 2000)

As vezes as chaperoninas cometem erros de dobramento e/ou de união de grupos químicos específicos mas, devido ao fato que realizam proof-reading, podem identificar o erro e refazer sua tarefa corretamente. Se depois de refazer seu trabalho, o dobramento e/ou as uniões continuam sendo anormais, as chaperoninas

marcam a proteína recém sintetizada com ubiquitina para sua destruição nos proteossomos. Existem uns poucos casos nos quais as chaperoninas não conseguem desempenhar essas funções todas, devido a defeitos congênitos. (KORNITZER, D.; CIECHANOVER, A., 2000)

- Co-chaperonas

As co-chaperonas constituem um grupo de mais de 100 proteínas que possuem diferentes funções e, algumas delas, atuam se ligando e portanto estabilizando às chaperonas durante esse processo de dobramento e evitando dessa forma que atuem de maneira descoordenada durante o mesmo. (NICOLET, C.M.; CRAIG, E.A., 1989; NICOLET et al., 1994; ZHANG, Y. et al., 1997; SMITH, et al., 1999; MORISHIMA, Y. et al., 2000; CHANG, H.C. et al., 1997; CHANG, C.C. et al., 2002)

Uma das características que definem as co-chaperonas de todas as espécies é que estão constituídas por **motivos tetratricopeptídeos ou TPR** repetidos várias vezes e formando **domínios TPR**, através dos quais, as co-chaperonas se unem a suas proteínas alvo, por exemplo, às Hsp 70 e 90. (BLATCH, G.L. et al., 1997)

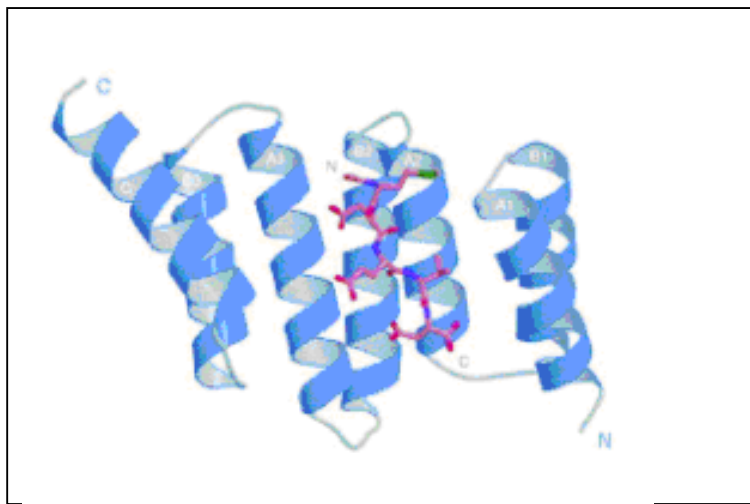
Seguindo uma hierarquia crescente; três oligopeptídeos constituem um **tricopeptídeo**, quatro tricopeptídeos constituem um motivo tetratricopeptídeo ou **motivo TPR** e vários motivos tetratricopeptídeos constituem um **domínio TPR**.

Como exemplo, na figura 5, são mostrados dois dos três domínios TPR da proteína STI1; o domínio TPR1 de união a Hsp 70 e o domínio TPR2A de união a Hsp 90 (Figura tirada de SCHEUFLEER et al, 2000). Para mais detalhes veja ponto 1.3.4 e figura 3.

Novamente, o domínio TPR2B não aparece representado nessa publicação.



A



B

Figura 5 (A) - Representação gráfica de um domínio TPR1, (B) - Representação gráfica de um domínio TPR2A (Figuras tiradas de SCHEUFLER, C. et al, 2000).

Além do dobramento de proteínas, o complexo chaperona-chaperonina/co-chaperona faz o redobramento das proteínas que perderam sua conformação por diferentes causas. Nesses casos, as co-chaperonas do complexo identificam a proteína desnaturada e, logo, as chaperonas as imobilizam. A seguir as chaperoninas redobram a molécula e re-ligam as uniões afetadas. (BOBULA, J. et al., 2006)

As proteínas que conseguem ser re-dobradas com sucesso são proteínas de estrutura primária normal, que perderam sua conformação por estresse celular secundário a causas exógenas. (CAPLAN, A.J., 2003; SANGSTER, T.A. et al., 2004)

Existem outras proteínas cuja estrutura primária é anormal devido a causas endógenas como mutações pontuais, alterações durante o processo de transcrição, de tradução etc. Na maioria das vezes o dobramento dessas proteínas não é possível, não obstante, em alguns casos, o complexo chaperona-chaperonina/co-chaperona consegue dar-lhes conformação e função aceitáveis. (SHACTER, E., 2000; STADTMAN, E.R. et al., 2003; ESTRUCH, F., 2000; GASCH, A.P. et al, 2000) Alguns complexos chaperona-chaperonina e algumas co-chaperonas, fazem parte de um grupo de proteínas denominado Hsps (Heat Shock Proteins), cuja expressão aumenta em estados de estresse celular induzido por calor. Por exemplo, as chaperonas-chaperoninas Hsp70 e Hsp90, a co-chaperona STI1 entre outras. A expressão dessas proteínas aumenta não apenas em casos de estresse celular induzido por calor, mas também em casos de estresse celular secundário a muitas outras causas, como por exemplo, agentes químicos e/ou tóxicos, infecciosos, por hipoxia tecidual etc.

Além da etiologia causadora do estresse, nestes estados existe um aumento da síntese geral de proteínas na célula, inclusive, é claro, das Hsps. Esse último fato resulta benéfico para a célula, já que nesses estados é preciso dobrar essas proteínas gerais cuja síntese aumentou, re-dobrar as proteínas mal dobradas, degradar as proteínas que já cumpriram suas funções e as proteínas anormais etc, e as Hsps participam de todas essas funções. Quando, por diferentes causas, as Hsps não conseguiram dobrar as moléculas recém sintetizadas, essas moléculas são não-funcionais e, se o defeito consistir em que elas não consigam degradar proteínas, essas proteínas se acumulam na célula.

Em ambos casos se produz uma alteração do metabolismo geral da célula comprometimento todas suas funções o que, finalmente, conduz à morte celular.

Existem muitas doenças que se desenvolvem segundo essa patogenia metabólica, por exemplo a doença de Creutzfeld-Jacob, de Gerstman-Strausser-Sheinker, de Alzheimer, doença priônica etc. (HENDERSON, B. et al., 1996.; PRUSINER, S.B., 1998; MANSON, J.C. et al, 2006; FASANO, C. et al., 2006).

1.3.6.3 Funções associadas ao núcleo

Os estudos realizados por Longshaw et. al. (LONGSHAW, V.M. et al., 2004), indicam que STI1 se desloca do citoplasma para o núcleo o que estaria indicando que STI1 teria alguma função nuclear.

Devido ao fato de a bibliografia existente não explicar como acontece a síntese das proteínas altamente consumidas e/ou danificadas durante o processo de dobramento de proteínas nos estados de estresse celular, outra das possíveis funções da proteína STI1, nesses estados, seria reconhecer tais proteínas. Uma provável seqüência de fatos que vincularia essas duas funções candidatas seria que STI1, durante o processo de dobramento de proteínas em estado de estresse celular, do qual ela faz parte importante, **reconheceria** quais são as proteínas que estão em déficit devido ao alto consumo e quais as proteínas danificadas durante o estado de estresse celular.

Com essa informação, STI1 se dirigiria ao núcleo (LONGSHAW, et al, 2004) e ativaria a transcrição dos genes que codificam essas proteínas. Esta eventual ativação da transcrição poderia acontecer de forma direta, atuando STI1 como um fator de transcrição ativador, diretamente nos complexos de transcrição dos genes respectivos, ou de forma indireta ativando vias de sinalização específicas, as quais, chegariam até esses complexos de transcrição e ativariam a transcrição desses genes. Essas funções nucleares candidatas serão discutidas no capítulo 5.

1.3.7 Deterioração das funções da proteína STI1

Como qualquer outra proteína, STI1 pode sofrer deterioração de suas funções, em alguns casos, por causas patológicas e com o passar do tempo, em todos os casos, por causas fisiológicas, o que faz parte da deterioração global das funções celulares acontecida durante o processo de envelhecimento celular.

Em qualquer das duas situações a deterioração poderá comprometer uma, várias ou todas as funções de STI1, ou seja, as funções associadas ao citoplasma, à membrana plasmática ou ao núcleo (veja ponto 1.3.6).

Devido ao fato de o processo de envelhecimento celular comprometer progressivamente todas essas funções, tal processo constitui um ótimo modelo para estudar, em forma completa, o tema das disfunções da proteína STI1.

À esse respeito, pode-se dizer que durante o envelhecimento celular se produz uma desregulação dos processos de transcrição e tradução de todos os genes o que conduz a uma queda na quantidade e na qualidade de todas as proteínas. Quando as proteínas afetadas pelo processo de envelhecimento celular são componentes dos sistemas de sinalização intracelular, elas não conseguem reconhecer ou reconhecem com baixa eficiência suas moléculas ligantes e/ou suas moléculas alvo. Esta situação produz todo tipo de alterações na transmissão e na interpretação de sinais extra e/ou intracelulares e isto, por sua vez, conduz a transtornos de todas as funções celulares, comprometendo o metabolismo geral da célula e sua homeostase.

Em tais condições a célula entra em estado de estresse celular e, por não funcionarem adequadamente as correspondentes vias anti-apoptóticas, a célula morre (SOTI E CSERMEKY, 2006).

No ano 2000, Jiang et al., estudando o processo de envelhecimento cerebral relacionado ao estresse celular, descobriram que camundongos senis, quando comparados com camundongos jovens, apresentavam uma diminuição na expressão de ST11, principalmente em córtex e hipotálamo.

Fazendo parte daqueles estudos, os autores mediram os níveis de RNA mensageiro de ST11 e comprovaram que os indivíduos senis apresentavam uma diminuição desse mensageiro quando comparados com os indivíduos jovens.

Baseados nesses resultados, os investigadores concluíram que durante o processo de envelhecimento cerebral associado a estresse celular, se produz uma diminuição da taxa de transcrição do gene ST11 o que conduz, é lógico, a uma diminuição dos níveis celulares da proteína ST11, observada por eles mesmos. (JIANG, et al, 2000)

Estes estudos indicam que o processo do envelhecimento celular estaria afetando **a eficiência das vias de sinalização intracelular que conduzem a formação e ativação do complexo de transcrição**, nesse caso, associado ao gene ST11, em concordância com as afirmações de SOTI e CSERMEKY, 2006, o que conduziria a uma **diminuição de sua taxa de transcrição e de seu produto, a proteína ST11**, em concordância com as afirmações de JIANG, et al, 2000.

Por último, a queda dos níveis celulares da proteína ST11 conduz, obviamente, para uma deterioração de todas suas funções, segundo será exposto a seguir (comparar com funções normais da proteína ST11; ponto 1.3.6):

1º) Fica ineficiente o dobramento e redobramento de proteínas, o que é um fator agravante em estados de estresse celular, já que neles existe um aumento na demanda dessas funções.

2º) Fica ineficiente a via de sinalização mediada pela enzima PKA, portanto fica ineficiente a ativação de sinais anti-apoptóticos, o que, é um fator agravante em estados de estresse celular já que favorece os processos de morte celular.

3º) Fica diminuída a atividade da enzima SOD e portanto os ânions superóxido se acumulam na célula, piorando o estado de estresse celular e favorecendo os processos de morte celular.

4º) Fica ineficiente a via de sinalização mediada pela enzima ERK1 e portanto fica ineficiente o processo de neuritogênese.

5º) Fica diminuída a **síntese de novo** de proteínas altamente consumidas ou danificadas durante os estados de estresse celular, o que agrava esses estados, já que neles são necessárias proteínas em quantidades suficientes e ótimo funcionamento. (Esse aspecto também será discutido no capítulo 5)

1.4 ASPECTOS EVOLUTIVOS GERAIS DAS ESPÉCIES *Mus musculus* E *Danio rerio*

Um dos aspectos mais interessantes da evolução é que espécies muito afastadas do ponto de vista evolutivo, com morfologias completamente diferentes, possuem, em seus respectivos patrimônios genéticos, genes altamente conservados cujos produtos cumprem, em cada espécie, funções similares. Por exemplo, genes que participam da projeção do plano corporal, como os genes Hox; do desenvolvimento de tecidos e órgãos, como o gene Cnbp; do empacotamento do DNA, como os genes que codificam as histonas; do dobramento de proteínas, como o gene STI1 etc. (GIBSON, G.; HONEYCUTT, E., 2002; PIRES-DASILVA, A.; SOMMER, R.J., 2003; PURUGGANAN, M.D., 1998; SALAZAR-CIUDAD, I.; JERNVALL, J.; NEWMAN, S.A., 2003).

Na maioria dos casos, genes que participam do desenvolvimento e da manutenção de dois organismos tão diferentes quanto um camundongo e um peixe, ou de uma mosca e uma planta, codificam produtos diferentes, só que, em alguns dos casos, em ambos os organismos diferentes, os produtos codificados são iguais ou muito similares estrutural e funcionalmente. Em tais circunstâncias se fala que estes genes foram conservados ao longo da evolução destes dois organismos. Isso significa que houve um “controle” que evitou a alteração destas informações genéticas. Os processos de Seleção Natural, impondo diferentes padrões de **pressão seletiva**, resultantes da interação de múltiplos e complexos mecanismos gênicos e ambientais, resultaram, nestes casos, na preservação de estruturas e funções ao longo de grandes intervalos de tempo. (RIDLEY, 2006; HARTL, 2007; FUTUYMA, 1993).

A ação de fatores estocásticos, como a Mutação e a Deriva Genética, e de um fator determinístico, a Seleção Natural, produziram os padrões de alteração e conservação que se observam na história de todas as espécies.

Em muitos casos temos motivos para esperar que um determinado produto gênico seja muito ou pouco conservado, por associarmos suas funções atuais com as necessidades dos organismos das espécies em estudo. O gene STI1, por ser um gene “de manutenção” ou “housekeeping”, faz supor que seja muito conservado, e para verificar tal suposição, resolvemos estudar sua conservação em *Mus musculus* e *Danio rerio*, tendo sido escolhidas estas duas espécies por já terem acumulada grande quantidade de outros estudos genéticos e por apresentarem uma divergência evolutiva de muitos milhões de anos, o que deixaria mais evidente a relevância de uma eventual descoberta de conservação. (Veja figura 6)

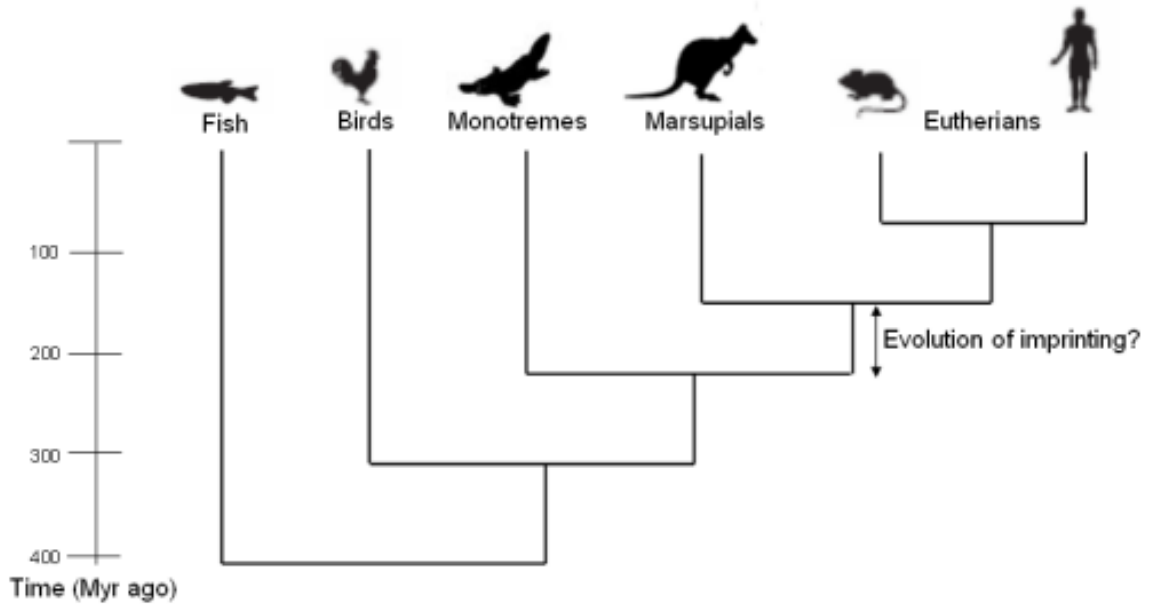


Figura 6 – Árvore Filogenética

Também pelo fato de ser STI1 uma proteína “de manutenção”, fizemos a suposição que deveria ter uma **distribuição ubicua** nos organismos que apresentam o gene, o que nos fez, também, estudar sua expressão, tendo, para isto, utilizado as larvas de *Danio rerio*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Provar a eventual conservação do gene STI1, caracterizando a expressão de seu produto, a proteína STI1, em indivíduos adultos de duas espécies muito afastadas evolutivamente, *Mus musculus* e *Dario rerio*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Objetivo 1

Identificar os eventuais aminoácidos **conservados** e os não conservados na proteína STI1 durante a evolução destas duas espécies, verificar qual o grau de **identidade** existente entre as proteínas STI1 das espécies mencionadas, tanto no que diz respeito a suas seqüências globais quanto às seqüências de seus respectivos domínios TPR, e qual o **posicionamento** destas espécies numa **árvore filogenética**, tendo como referência, em cada caso, a seqüência de aminoácidos da proteína STI1 humana.

2.2.2 Objetivo 2

Analisar, por meio de ensaios imunohistoquímicos, uma eventual expressão de **distribuição ubicua** da proteína STI1 em larvas **inteiras** de peixe zebra, utilizando um anticorpo primário anti-STI1 **de camundongo** e um anticorpo secundário anti-IgG de coelho.

2.2.3 Objetivo 3

Confirmar os eventuais resultados positivos decorrentes da experimentação que é necessário realizar para atingir os objetivos contidos nos pontos 2.2.1 e 2.2.2, realizando ensaios bioquímicos a partir de amostras obtidas **apenas de um único órgão**; cérebro de camundongo e peixe zebra, e utilizando **os mesmos anticorpos** mencionados no ponto 2.2.2.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 ANÁLISES DE SEQÜÊNCIAS

3.1.1 Materiais

- a) Programa CLUSTAL W., disponível no site www.ebi.ac.uk/clustalw
- b) Programa BIOEDIT, disponível no site www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html.
- c) Programa MEGA 4, disponível no site www.megasoftware.net/mega.html.
- d) Programa PROSITE; disponível no site www.expasy.org.

3.1.2 Metodologia

Utilizando o programa CLUSTAL W foi realizado um **alinhamento de seqüências de aminoácidos** das proteínas STI1 das espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens* e, a partir dele, utilizando o programa BioEdit, foi calculada a **porcentagem de identidade** existente entre as seqüências globais de aminoácidos dessas proteínas STI1 nas espécies *Mus musculus* e *Danio rerio*, tendo como referência a proteína STI1 humana.

Além disso, o mencionado alinhamento, incluindo as seqüências de aminoácidos das proteínas STI1 de muitas outras espécies, foi analisado pelo programa MEGA4 o qual, a partir desses dados, confeccionou uma **árvore filogenética** posicionando nela às espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*, além dessas outras espécies.

A árvore foi construída através do método Neighbour-Joining, usando distâncias calculadas pelo método de Jukes & Cantor. Na análise foram confeccionadas 1000 amostras bootstrap; indicadas como porcentagem em cada nó da árvore, a qual, foi gerada sem raiz.

Os domínios TPR constituem os centros funcionais das co-chaperonas, e claro, da proteína STI1 (veja pontos 1.3.4 e 1.3.6: co-chaperonas).

Devido ao fato de a proteína STI1 desempenhar tais funções através de seus domínios TPR, a conservação deles deveria ser **igual ou maior** que a conservação global da proteína. Por tal motivo, resolvemos estudar o grau de conservação

desses domínios nas mesmas três espécies nas quais já tínhamos estudada a conservação global da proteína STI1.

A importância de conhecer o grau de conservação desses domínios, além de provar a hipótese de conservação igual ou maior formulada mais acima, é que eventuais pequenas diferenças entre eles poderiam auxiliar no desenho de ferramentas experimentais específicas (HONG, J.T. et al., 2003). Tais ferramentas, por sua vez, poderiam ser utilizadas para explicar aspectos comportamentais e/ou funcionais da proteína STI1, não muito claros até agora, como por exemplo suas **eventuais funções nucleares**. No capítulo 5 serão discutidas essas funções e essas ferramentas.

Então, com a finalidade de estudar a conservação de aminoácidos no nível dos domínios TPR das proteínas STI1 das referidas espécies, procedemos da mesma forma que para estudar a conservação global dos aminoácidos dessas proteínas; ou seja, carregamos no programa BioEdit o alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas STI1 de *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens* fornecido pelo programa CLUSTAL W, e confeccionamos uma matriz de identidade a partir apenas dos aminoácidos correspondentes aos motivos TPR dessas proteínas.

Com o objeto de **identificar** quais as seqüências de aminoácidos correspondentes a esses domínios TPR, neste caso de *Mus musculus*, utilizadas como referência para alinhar as outras duas espécies, usamos o programa PROSITE.

Assim, segundo esse programa, o domínio TPR1 se estende desde o aminoácido 4 da seqüência global de aminoácidos, até o aminoácido 105 e o domínio TPR2, **não subdividido em segmentos A e B**, se estende desde o aminoácido 225 até o aminoácido 461 desta seqüência (veja ponto 8.1: proteína mSTI1).

Posteriormente, resolvemos aprofundar ainda mais no que diz respeito à conservação de aminoácidos no nível dos domínios TPR e desta vez, com o objetivo de localizar as seqüências de aminoácidos correspondentes a esses domínios TPR, em vez de utilizar o programa PROSITE como na análise anterior, usamos uma seqüência publicada por Odunuga, O.O. et al, no ano 2003 (ODUNUGA, O.O. et al, 2003).

Trata-se de uma seqüência de aminoácidos correspondente à proteína STI1 de *Mus musculus*, que foi publicada sem os conectores aminoacídicos C1 e C2 que unem os domínios TPR1 com TPR2A e esse último com TPR2B respectivamente. É preciso lembrar que, além dessa prestação, nós utilizamos essa seqüência para confeccionar a figura 3 deste trabalho.

Logo repetimos a mesma metodologia utilizada na análise anterior, isto é: alinhamento dessa seqüência com as seqüências dos respectivos domínios TPR de *Danio rerio* e *Homo sapiens* através do programa CLUSTAL W e, posteriormente, confecção das correspondentes matrizes de identidade através do programa BioEdit,

O alinhamento das seqüências de aminoácidos e todas suas aplicações foram realizadas pelo Professor Leonardo Cruz do Departamento de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, exceto, o cálculo das porcentagens de identidade correspondentes aos domínios TPR das proteínas STI1 das espécies estudadas, o que foi realizado por Pablo Sandro Carvalho Santos, da Universidade de Charité, Berlim, Alemanha.

3.2 ENSAIOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

3.2.1 Materiais

3.2.1.1 Animais experimentais

Nestes ensaios foram utilizadas larvas de *Danio rerio* (KIMMEL, 1995). Devido ao fato que nosso objetivo é estudar a expressão da proteína STI1 em indivíduos adultos de camundongo e peixe zebra (vide ponto 2.1), e que do ponto de vista metodológico resulta impossível realizar técnicas de imunohistoquímica nesses organismos inteiros por causa de seus tamanhos, no que diz respeito ao peixe zebra, resolvemos utilizar estas técnicas em espécimes em estágio de larva por que neles a organogênese acabou e, portanto, do ponto de vista da Biologia do desenvolvimento, trata-se de indivíduos adultos mesmo que nas suas morfologias ainda conservem algumas características embrionárias e que sejam chamados de “embriões” em estágio de larva e por que, nesse estágio esses organismos ainda possuem um tamanho adequado para serem estudados inteiros. (veja ponto 2.2.2)

Os progenitores destas larvas foram peixes zebra adultos criados para ser reprodutores, com alimentação específica e ciclos de luz-obscuridade adequados (WESTERFIELD, 1995).

Após sua coleta as larvas foram fixadas por meio de uma solução de fixação constituída por paraformaldeído ao 4% em PBS 1x, durante 16 horas a 4°C e, logo, incluídos em metanol 100% para sua melhor conservação. Nessas condições os espécimens foram cedidos para nosso grupo pela Professora Nora Calcaterra da Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

3.2.1.2 Soro pré-imune

Soro pré-imune de coelho coletado do coelho R019 da raça Neozelandesa, do laboratório de Neurobiologia do Departamento de Biologia celular.

3.2.1.3 Anticorpo primário

Anticorpo primário policlonal de coelho, anti-proteína ST11 recombinante de camundongo, feito no mesmo coelho R019 do qual foi coletado o soro pré-imune, após a imunização dele com a proteína recombinante murina 6His-ST11, expressa e purificada como descrito por Zanata e Colaboradores (ZANATA, S.M. et al, 2002).

A produção desse anticorpo policlonal foi realizada segundo procedimento de imunizações por via intramuscular e subcutânea, como descrito por Harlow e Lane (HARLOW, E.; LANE, D., 1988).

Para a primeira imunização foram utilizadas 500 µg da mencionada proteína recombinante, devidamente purificada e emulsificada com adjuvante completo de Freund e 1 mg de hidróxido de alumínio. As imunizações seguintes foram conduzidas a cada 15 dias com 250 µg dessa proteína, emulsificada com o adjuvante incompleto de Freund e 1 mg de hidróxido de alumínio e, a primeira coleta de sangue, realizou-se após a terceira imunização.

As demais imunizações foram realizadas a cada 30 dias, com coletas mensais de sangue durante um período de sete meses. Após cada coleta do sangue, o mesmo foi mantido em estufa a 37°C por 1 hora para retração do coágulo. Em cada caso o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 4K rpm, em centrífuga eppendorf 5810R, rotor A-4-62, durante 10 minutos a 4°C, sendo em seguida coletado, identificado e estocado a -20°C.

3.2.1.4 Anticorpo secundário

Anticorpo secundário de cabra, anti-IgG de coelho (α rabbit HRP-Sigma), conjugado com peroxidase.

3.2.1.5 Soluções

- Solução PBS 1x, ph 7,4; 500 ml volume final (vide ponto 8.4.1).
- Solução de bloqueio 1; 5 ml volume final (vide ponto 8.4.2).
- Solução PBST 0,05%; 100 ml volume final (vide ponto 8.4.3).
- Solução TBS 1x, ph 7,4; 500 ml volume final (vide ponto 8.4.4).
- Solução DAB; 15 ml volume final (vide ponto 8.4.5).
- Solução H₂O₂ 0,008%; 6 ml volume final (vide ponto 8.4.6)

3.2.1.6 Acetona (Quimex)

3.2.1.7 Glicerol, P.A., redestilado (Reagen).

3.2.2 Metodologia

A metodologia experimental foi padronizada após vários experimentos, originando um protocolo de imunohistoquímica whole mount modificado com relação ao protocolo inicial cedido gentilmente pela Professora Nora Calcaterra da Universidad Nacional de Rosario, Argentina. A seguir é apresentado o protocolo modificado que utilizamos em todos nossos experimentos após essa padronização.

* Imunomarcção de larvas inteiras de *Danio rerio*:

Do estoque de embriões de *Danio rerio* fixados segundo relatado no ponto 3.2.1.1, foram tirados 6 espécimes que foram distribuídos em partes iguais nos poços 1, 2 e 3 de uma placa de 4 poços, ficando vazio o poço 4.

Posteriormente foram realizados dois lavados de 5 minutos cada, em PBS 1x (veja ponto 8.4.1), e uma lavagem de 5 minutos em água destilada. Logo as larvas foram permeabilizadas por meio de incubação em acetona a -20°C durante 7 minutos e depois foram realizados dois lavados de 5 minutos cada, à temperatura ambiente, um em água destilada e outro em PBS 1x.

Posteriormente a placa foi organizada da forma a seguir:

- Poço 1: **Controle negativo absoluto:** Solução de bloqueio 1 (veja ponto 8.4.2).
- Poço 2: **Controle negativo relativo:** Soro pré-imune de coelho (veja ponto 3.2.1.2), em diluição adequada em solução de bloqueio 1.
- Poço 3: **Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra:** Anticorpo primário de coelho, anti-proteína STI1 de camundongo (veja ponto 3.2.1.3), em diluição adequada em solução de bloqueio 1.

Os espécimes, dois em cada um desses poços, foram incubados nestes, seus respectivos meios, durante 16 horas, a 4°C, e logo lavados 4 vezes com PBST 0,05% (veja ponto 8.4.3), durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, as larvas dos três poços foram incubadas durante 4 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário de cabra, anti-IgG de coelho (veja ponto 3.2.1.4), em diluição adequada em solução de bloqueio 1. Em seguida, foram realizados 4 lavagens com PBST 0,05%, durante 20 minutos à temperatura ambiente, e as larvas foram incubadas durante 10 minutos em solução DAB (veja ponto 8.4.5).

Finalmente foi adicionado H₂O₂ numa concentração de 0,008% (veja ponto 8.4.6). A reação do H₂O₂ foi interrompida por meio de lavagens com PBS1x e água destilada e os espécimes foram colocados em glicerol e fotografados utilizando uma câmara digital Sony acoplada a um microscópio estereoscópico Leica.

Como exemplo das diferentes diluições que utilizamos ao longo de nossos experimentos de imunomarcagem da proteína STI1 em *Danio rerio*, como também dos tempos de exposição para o DAB e para o H₂O₂, a seguir mostramos uma tabela que resume alguns desses experimentos.

Experimento	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poços 1, 2 e 3		
	Solução de bloq. 1	Soro pré-imune	Ac. 1º	Ac. 2º	DAB	H ₂ O ₂
1	Solução de bloq. 1	1/100	1/100	1/300	10'	3'
14	Solução de bloq. 1	1/700	1/200	1/1500	10'	60'
15	Solução de bloq. 1	1/700	1/700	1/1500	10'	60'
16	Solução de bloq. 1	1/700	1/700	1/1500	10'	9'

3.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.3.1 Materiais

a) Animais experimentais:

Foram utilizados camundongos e peixes zebra.

* **Camundongos:** Foram utilizados camundongos Swiss adultos. Esses animais foram cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

* **Peixes zebra:** Foram utilizados peixes zebra adultos, cedidos pela Professora Lucélia Donatti do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Todos os procedimentos envolvendo animais de experimentação foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal – Setor de Ciências – UFPR, a qual forneceu certificado de aprovação nº 104.

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical após profundamente anestesiados com éter etílico e os peixes zebra foram sacrificados por seção medular.

b) Tampão A (50 mM de Tris-HCl 10%, pH 7,4, 320 mM de sacarose, 5 mM de EDTA e inibidores de protease, 10 mM de iodoacetamida, 1 mM de PMSF (Phenylmethane Sulphonyl fluoride), 10 mM de 2-fenantrolina).

c) Homogeneizador de tecidos com pistilo de teflon (B. Braun, Alemanha).

d) Centrífuga Beckman J-21 B.

e) Tampão de lise (Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4, deoxicolato 0,2%, NP-40 1% e inibidores de protease; Complete Mini-protease inibidor Cocktail tablets; Roche).

f) Pistilo de plástico eppendorf para homogeneização manual em eppendorf.

g) Centrífuga eppendorf 5810R

h) Proteine-Assay (Bio Rad)

i) Tampão Tris-HCl para géis de separação¹ (Tris-HCl 1,5 M, ph 8,8, contendo 0,4% de SDS e agentes catalizadores da polimerização da acrilamida).

j) Tampão Tris-HCl para stacking géis² (Tris-HCl 0,5 M, ph 6,8, contendo 0,4% de SDS e agentes catalizadores da polimerização da acrilamida).

k) Tampão de amostra redutor (Tris-HCl 62 mM, ph 6,8, SDS 0,2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,005%, B. Mercaptoetanol 50 mM; como agente redutor).

l) Tampão de corrida 10x (144 g de glicina, 30,3 g de Tris, 10 g de SDS).

m) Membranas de nitrocelulose (Hibond™ – C. Extra/Amershan Bio-Sciences).

n) Tampão de transferência (192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol).

o) Tampão de bloqueio TBST/leite desnatado (120 mM de NaCl, 20 mM de Tris e 0,05% de Tween 20 / 5% de leite desnatado liofilizado; Molico, Nestlé).

o) Kit West Pico (Pierce . Co).

q) Anticorpo primário de coelho, anti-proteína ST11 de camundongo (veja ponto 3.2.1.3).

r) Soro pré-imune de coelho (veja ponto 3.2.1.2).

s) Anticorpo secundário de cabra, anti-IgG de coelho (veja ponto 3.2.1.4).

^{1,2} Em suas respectivas composições, esses dois tampões possuem Persulfato de Amônio (BioRad) e N,N,N,N-Tetrametil etilenodiamina ou TMED (Pharmacia Biotech).

3.3.2 Metodologia

Foi realizado Western Blotting através dos seguintes passos.

3.3.2.1 Homogeneização do sistema nervoso central

* **Camundongos:** Após remoção da calota craniana, o conteúdo craniano foi extirpado por seção do tronco cerebral no nível do foramen magnum. Logo, esse conteúdo foi lavado com PBS 1x e colocado em tampão A (veja ponto 3.3.1 - b).

Foram realizados dois homogeneizados desse material em homogeneizador de tecidos (veja ponto 3.3.1 - c). O primeiro deles foi realizado a 600 rpm durante 7 minutos a 4°C e, o homogenato resultante, foi centrifugado a 2000 g (veja ponto 3.3.1 - d). Desta maneira foram obtidos o primeiro sobrenadante ou super I que foi colocado num eppendorf, e o primeiro precipitado.

O segundo homogeneizado foi realizado no mesmo homogeneizador a partir do primeiro precipitado resuspendido numa nova fração de tampão A, a 900 rpm durante 7 minutos a 4°C, obtendo-se o segundo sobrenadante ou Super II e o segundo precipitado. O super II foi adicionado ao super I e o segundo precipitado foi descartado.

O sobrenadante super I / super II ou extrato final, foi submetido, na mesma centrifuga utilizada anteriormente, a uma centrifugação de 41241 g durante 30 minutos obtendo um super III e um terceiro precipitado pequeno. Uma pequena amostra do super III foi destinada à dosagem de proteínas pelo método de Bradford (veja ponto 3.3.2.2) e o restante, incluindo o terceiro precipitado, foi armazenado a -20°C para que posteriormente o sobrenadante fosse analisado por meio de SDS-PAGE e Western Blotting. Foi utilizado 1 exemplar adulto de *Mus musculus*.

* **Peixes zebra:** Após a remoção da calota craniana, o conteúdo craniano foi dissecado até atingir a região posterior do mesmo, onde se encontrava o corte correspondente à seção medular realizada para sacrificar o animal. Esses procedimentos foram realizados pela Professora Flavia Sant'Anna Rios do Departamento de Biologia celular do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Na seqüência, o conteúdo craniano foi colocado num eppendorf contendo tampão de lise (veja ponto 3.3.1 - e).

Foram realizados dois homogeneizados manuais macerando esse material dentro do mesmo eppendorf por meio de um pistilo para homogeneização manual

(veja ponto 3.3.1 - f). Após a primeira homogeneização o material foi centrifugado em centrífuga a 6000g (veja ponto 3.3.1 - g), durante 4 minutos a 4°C, produzindo o primeiro sobrenadante ou super I que foi colocado num outro eppendorf, e produzindo o primeiro precipitado.

Esse primeiro precipitado, que ficou no primeiro eppendorf, foi ressuspendido em tampão de lise e a partir dele foi realizada a segunda homogeneização manual por maceração. Logo o eppendorf foi submetido à mesma centrifugação que a primeira vez gerando o segundo sobrenadante ou super II e o segundo precipitado. O super II foi adicionado ao eppendorf contendo o super I e o segundo precipitado foi descartado.

Uma pequena amostra do sobrenadante super I / super II ou extrato final, foi destinada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (veja ponto 3.3.2.2), e o restante foi armazenado a -20°C para ser analisado por SDS-PAGE e Western Blotting. Foram utilizados 16 exemplares adultos de *Danio rerio*.

3.3.2.2 Determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos finais

Utilizando o reagente correspondente (veja ponto 3.3.1 - h), foi realizada a dosagem de proteínas totais presentes tanto no extrato final de cérebros de camundongo quanto de peixe zebra, através do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.3.2.3 Corrida eletroforética por meio de SDS-PAGE

Os ensaios eletroforéticos em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio ou SDS, foram realizados em cubas de acrílico e placas de vidro 20 x 20 cm (BioRad).

A concentração de acrilamida para os géis de separação (BioRad), foi de 10%, dissolvida em tampão Tris-HCl para géis de separação (veja ponto 3.3.1 - i). A concentração de acrilamida para os stacking géis (BioRad), foi de 6%, dissolvida em tampão Tris-HCl para stacking géis (veja ponto 3.3.1 - j).

Foram preparados dois géis de corrida eletroforética; os géis 1 e 2, cada um deles constituído por seu respectivo gel de separação e stacking gel.

O gel 1 foi destinado ao estudo de nossa proteína incógnita, a proteína STI1 de peixe zebra, e o gel 2 foi utilizado para a realização de um controle negativo.

Foram confeccionadas duas amostras de proteínas que foram tiradas, uma do extrato final de cérebros de camundongo e a outra de cérebros de peixe zebra respectivamente, e diluídas em tampão de amostra redutor (veja ponto 3.3.1 - k). Logo, e com o objetivo de separar em condições redutoras as proteínas presentes em nossas amostras, as mesmas foram fervidas durante 5 minutos.

Foi aplicado nas canaletas 1 dos géis 1 e 2, um marcador de massas moleculares (BioRad), constituído por 4 proteínas com massas moleculares de 31, 83, 125 e 197 KDa, respectivamente.

Nas canaletas 3 e 5 de ambos os géis foram aplicados 100 µg da amostra de camundongo e nas canaletas 7 e 9, também de ambos géis, se aplicaram 100 µg da amostra de peixe zebra. Foi adicionado tampão de corrida (veja ponto 3.3.1 - l) e a separação eletroforética foi realizada com corrente de 30 mA até as proteínas entrarem no gel de separação. Em seguida a amperagem foi levada para 40mA e mantida constante até as proteínas chegarem ao ânodo.

3.3.2.4 Transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose por meio de Western Blotting

As proteínas foram transferidas dos géis de poliacrílamida para membranas de nitrocelulose (veja ponto 3.3.1 - m), durante 16 horas a 4°C e sob voltagem constante de 25v, em tampão de transferência (vide ponto 3.3.1 - n).

Para determinar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com vermelho Ponceau (Sigma). Após a lavagem correspondente, e durante 2 horas, as membranas foram bloqueadas por meio de tampão de bloqueio TBST/leite desnatado (veja ponto 3.3.1 - o), à temperatura ambiente.

3.3.2.5 Imunodeteccção, imunomarcação e revelado

A membrana 1 foi submetida à imunodeteccção por meio de um anticorpo primário de coelho, anti-proteína STI1 de camundongo (veja ponto 3.3.1 - q), numa diluição de **1/3000** em tampão de bloqueio TBST/leite desnatado, e a membrana 2 também foi submetida a imunodeteccção, só que por meio de um soro pré-imune obtido do mesmo coelho (veja ponto 3.3.1- r), numa diluição de **1/3000** em tampão

de bloqueio TBST/leite desnatado. Ambas as membranas foram incubadas nestes anticorpos durante 16 horas a 4°C. Após essa incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST, durante 5 minutos cada lavagem, e submetidas a imunomarcação por meio de um anticorpo secundário de cabra, anti-IgG de coelho (veja ponto 3.3.1 - s), numa diluição de **1/3000** em solução de bloqueio TBST/leite desnatado. As duas membranas foram incubadas com esse anticorpo durante 2 horas a temperatura ambiente.

Após as lavagens correspondentes, as duas membranas foram reveladas com substrato adequado para reação quimioluminescente (veja ponto 3.3.1 - p) e reunidas a um filme radiográfico (kodak) até marcação do mesmo com sinal adequado.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS

Após realizar as análises bioinformáticas correspondentes, obtivemos resultados relevantes, os quais, podem ser divididos em dois grupos: resultados referentes à conservação global de aminoácidos da proteína STI1 e resultados referentes à conservação de aminoácidos no nível dos domínios TPR desta proteína.

4.1.1 Resultados referentes à conservação global de aminoácidos da proteína STI1, nas espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*
Estes resultados foram decorrentes de três diferentes análises de seqüências.

4.1.1.1 Alinhamento das proteínas STI1

Através do programa CLUSTAL W foram alinhadas, de forma completa, as proteínas STI1 das espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*.

Essa análise permitiu identificar, aminoácido por aminoácido, quais deles foram conservados ao longo da evolução de *Mus musculus* e *Danio rerio* e quais não foram conservados, tendo como referência a seqüência de aminoácidos de *Homo sapiens*. (veja figura 7).

No que diz respeito à conservação de aminoácidos **entre estas duas espécies**, tal condição está representada por meio de um ponto nas suas seqüências, tendo como referência a seqüência de *Homo sapiens*.

As demais situações correspondem a aminoácidos não conservados entre *Mus musculus* e *Danio rerio*, tendo como referência a seqüência de *Homo sapiens*.

A partir do referido alinhamento, além de obter esses resultados, foi confeccionada uma matriz de identidade e uma árvore filogenética, que produziram seus respectivos resultados, como será visto nos pontos 4.1.1.2 e 4.1.1.3.



Figura 7 – Alinhamento das proteínas ST1 das espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*.

4.1.1.2 Confeção da respectiva matriz de identidade

Devido ao fato do alinhamento de seqüências constituir um ótimo método para visualizar aminoácidos conservados ou não conservados entre duas ou mais seqüências, mas não quantificar esses resultados, nós carregamos essas seqüências alinhadas pelo programa CLUSTAL W no programa BioEdit e ele calculou a **porcentagem de identidade**³ existente entre os aminoácidos das proteínas STI1 de *Mus musculus* e de *Danio rerio*, tendo como referência a seqüência de aminoácidos da proteína STI1 humana e confeccionou, a partir dessas porcentagens, uma matriz de identidade (veja figura 8).

A mencionada matriz indica que entre as proteínas STI1 das espécies *Mus musculus* e *Danio rerio* existem **79,9%** de aminoácidos idênticos e que entre as espécies *Danio rerio* e *Homo sapiens*; relação utilizada como referência, essa porcentagem é de 80,1%.

Outro resultado informado por essa matriz é que entre as proteínas STI1 de *Mus musculus* e *Homo sapiens* a porcentagem de identidade é de 97,4%, o que também constitui um dado referencial dentro do contexto geral dos nossos resultados, embora seja um dado muito mais conhecido do que os resultados informados por nós mais acima.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>Mus musculus</i>	97,4%	
<i>Danio rerio</i>	80,1%	79,9%

Figura 8 – Matriz de identidade correspondente ao alinhamento das proteínas STI1.

4.1.1.3 Confeção de uma árvore filogenética

As seqüências de aminoácidos das proteínas STI1 de *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Homo sapiens* e outros animais, fungos, plantas, etc, foram carregadas no programa MEGA 4. O critério utilizado para escolher esses diferentes grupos foi a grande distância evolutiva existente entre eles, o qual permite que possam

³ Quantidade de aminoácidos idênticos entre duas seqüências, medida em porcentagem.

permanecer juntas apenas aquelas espécies cujas seqüências estejam **muito** conservadas.

O mencionado programa processou as correspondente seqüências e confeccionou, a partir delas, 1000 árvores filogenéticas ou escadas evolutivas possíveis, das quais, a árvore observada na figura 9, é o resultado final e mostra juntas as espécies constituintes do grupo de vertebrados, entre os quais se encontram *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*. (veja figura 9)

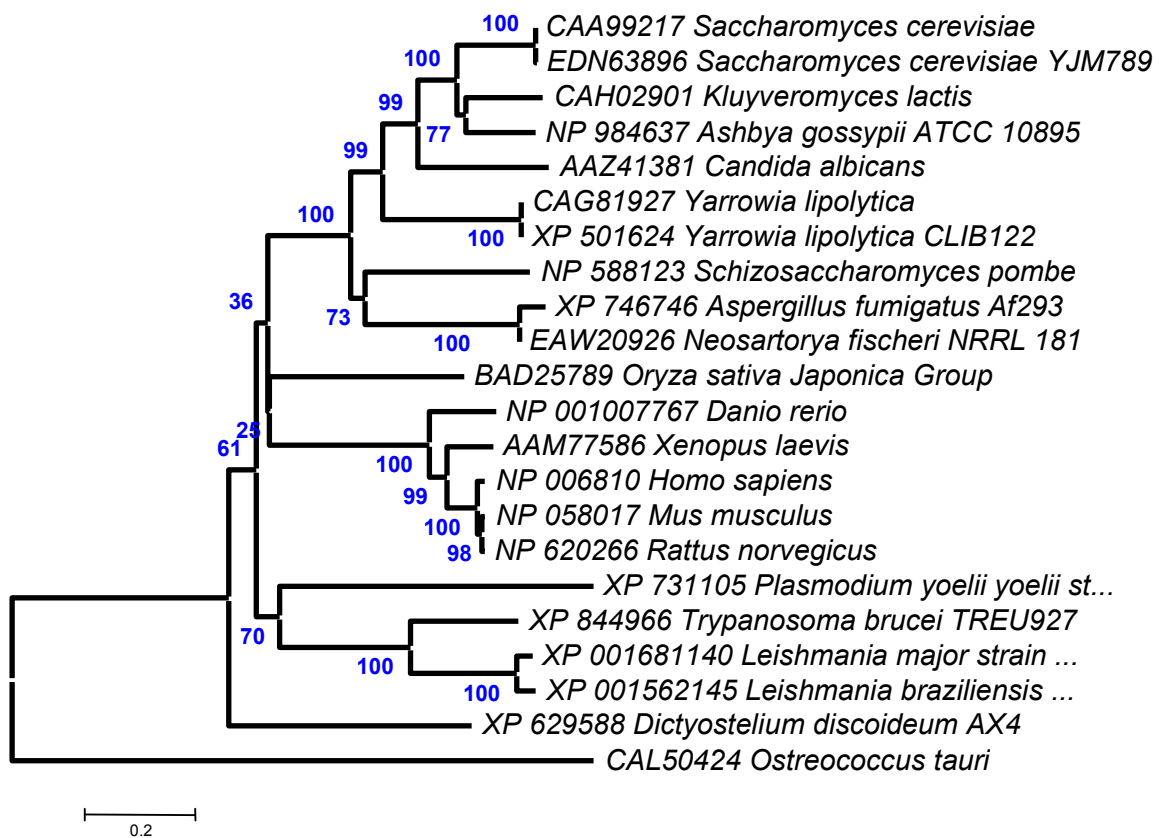


Figura 9 – Árvore Filogenética confeccionada a partir das seqüências de aminoácidos das proteínas STI1 das espécies que figuram nela.

A análise da árvore deve ser realizada lendo os valores porcentuais que estão localizados em seus nós. Estas porcentagens representam o número de vezes que as diferentes espécies integrantes da árvore definitiva ficaram juntas durante a confecção das referidas 1000 árvores.

Assim, analisando apenas o grupo de vertebrados, foram gerados 4 subgrupos distribuídos da forma a seguir:

- *Danio rerio*, *Xenopus leavis*, *Homo sapiens* e *Mus musculus* permaneceram juntos em 100% das 1000 árvores confeccionadas.
- *Xenopus leavis*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*, em 99% das árvores confeccionadas.
- *Homo sapiens* e *Mus musculus*, em 100% das árvores confeccionadas.
- *Mus musculus* e *Ratus norvegicus*, em 98% das árvores confeccionadas.

Levando em conta os objetivos deste trabalho, o resultado mais importante surgido da confecção dessa árvore filogenética foi que *Mus musculus* e *Danio rerio*, a partir das seqüências de aminoácidos de suas respectivas proteínas STI1, ficaram posicionados juntos em 100% das 1000 árvores confeccionadas por MEGA 4, em companhia de *Xenopus leavis* e *Homo sapiens*. Esse resultado, além de demonstrar mais uma vez a enorme conservação da proteína STI1 entre as duas primeiras espécies mencionadas, confirma os resultados que tínhamos obtido através das duas primeiras análises (veja ponto 4.1.1.1 e 4.1.1.2).

4.1.2 Resultados referentes à conservação de aminoácidos nos domínios TPR da proteína STI1, nas espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*

Da mesma forma que nas análises anteriores, BioEdit calculou a porcentagem de identidade existente, neste caso, apenas entre os domínios TPR destas três espécies, **e incluindo os conectores 1 e 2** (veja ponto 3.1.2, no que diz respeito do primeiro alinhamento dos domínios TPR). Os resultados mais relevantes levando em conta os objetivos deste trabalho, foram os que são mostrados na seqüência (veja figura 10; matriz de identidade dos domínios TPR1 e figura 11; matriz de identidade dos domínios TPR2).

```

Sequence Identity Matrix
Input Alignment File: C:\Dokumente und Einstellungen\Budapest\Desktop\TPR1.fas

Seq->  HUM      MUS      DAN
HUM    ID       0,980   0,676
MUS    0,980   ID       0,686
DAN    0,676   0,686   ID

```

Domínios TPR1:

- *Mus musculus* / *Danio rerio*: **68,6%**
- *Danio rerio* / *Homo sapiens* (referência): 67,6%
- *Homo sapiens* / *Mus musculus* (referência): 98%

Figura 10 – Matriz de Identidade dos domínios TPR1

```

Sequence Identity Matrix
Input Alignment File: c:\Dokumente und Einstellungen\Budapest\Desktop\TPR2.fas

Seq->  HUM      MUS      DAN
HUM    ID       0,983   0,848
MUS    0,983   ID       0,839
DAN    0,848   0,839   ID

```

Domínios TPR2:

- *Mus musculus* / *Danio rerio*: **83,9%**
- *Danio rerio* / *Homo sapiens* (referência): 84,8%
- *Homo sapiens* / *Mus musculus* (referência): 98,3%

Figura 11 – Matriz de Identidade dos domínios TPR2

Já, quando os domínios TPR foram alinhados **sem os conectores 1 e 2** (veja ponto 3.1.2 no que diz respeito do segundo alinhamento dos domínios TPR), os resultados que obtivemos foram os que mostramos a seguir. (veja figura 12; matriz de identidade dos domínios TPR1, figura 13; matriz de identidade dos domínios TPR2A e figura 14; matriz de identidade dos domínios TPR2B).

Sequence Identity Matrix

Input Alignment File: C:\Dokumente und Einstellungen\Budapest\Desktop\TPR1.fas

Seq->	MUS	HUM	DAN
MUS	ID	0,980	0,683
HUM	0,980	ID	0,673
DAN	0,683	0,673	ID

Domínios TPR1:

- *Mus musculus* / *Danio rerio*: **68,3%**
- *Danio rerio* / *Homo sapiens* (referência): 67,3%
- *Homo sapiens* / *Mus musculus* (referência): 98%

Figura 12 – Matriz de Identidade dos domínios TPR1

Sequence Identity Matrix

Input Alignment File: C:\Dokumente und Einstellungen\Budapest\Desktop\TPR2A.fas

Seq->	MUS	HUM	DAN
MUS	ID	0,972	0,816
HUM	0,972	ID	0,834
DAN	0,816	0,834	ID

Domínios TPR2A:

- *Mus musculus* / *Danio rerio*: **81,6%**
- *Danio rerio* / *Homo sapiens* (referência): 83,4%
- *Homo sapiens* / *Mus musculus* (referência): 97,2%

Figura 13 – Matriz de Identidade dos domínios TPR2A

Sequence Identity Matrix

Input Alignment File: C:\Dokumente und Einstellungen\Budapest\Desktop\TPR2B.fas

Seq->	MUS	HUM	DAN
MUS	ID	0,990	0,852
HUM	0,990	ID	0,852
DAN	0,852	0,852	ID

Domínios TPR2B:

- *Mus musculus* / *Danio rerio*: **85,2%**
- *Danio rerio* / *Homo sapiens* (referência): 85,2%
- *Homo sapiens* / *Mus musculus* (referência): 99%

Figura 14 – Matriz de Identidade dos domínios TPR2B

4.2 ENSAIOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

Como já foi falado no ponto 3.2.2, nossos ensaios imunohistoquímicos consistiram em imunomarcção de larvas inteiras de *Danio rerio*.

Os resultados obtidos através desses ensaios, os quais serão descritos na seqüência (veja figura 15), eram os resultados esperáveis quando lembrados os resultados que já tínhamos obtido através de nossas análises de seqüências (veja pontos 4.1.1 e 4.1.2) e constituem um resumo dos resultados que obtivemos nos poços 1,2 e 3, ao longo de vários experimentos.

- **Poços 1: Controle negativo absoluto** (veja ponto 3.2.2). Em todos os ensaios as larvas dos poços 1 apresentaram ausência de marcação. (veja figura 15A)

- **Poços 2: Controle negativo relativo** (veja ponto 3.2.2). Nos diferentes ensaios as larvas dos poços 2 apresentaram diferentes marcações inespecíficas; de fundo, tendo tais marcações uma **distribuição** generalizada, não difusa, e uma **intensidade** variável; na faixa de **leve** até ausência de marcação na região crânio-facial e de **muito leve** até ausência de marcação nas regiões toraco-abdominal e caudal. (veja figura 15B)

- **Poços 3: Estudo da proteína incógnita; proteína STI 1 de peixe zebra** (veja ponto 3.2.2). Em todos os ensaios as larvas dos poços 3 apresentaram duas marcações superpostas (veja figura 15C):

a) Marcação inespecífica, de fundo: Marcação de fundo, de **distribuição** generalizada, não difusa, e de intensidade variável; na faixa de **leve** até **moderada** na região crânio-facial e de **leve** até **muito leve** nas regiões toraco-abdominal e caudal.

b) Marcação específica, linear: Marcação linear, de **distribuição** generalizada, não difusa; com grande predomínio da região crânio-facial em relação às regiões toraco-abdominal e caudal, e de **intensidade** variável, na faixa de **moderada** até **intensa**

na região crânio-facial e de **leve** até **muito leve** nas regiões toraco-abdominal e caudal.

Essa marcação específica superposta à marcação inespecífica de fundo, marca nitidamente os contornos de diferentes estruturas anatômicas nas larvas, o que é especialmente evidente na região crânio-facial. Nessa região ficam bem marcadas as linhas precursoras do maxilar superior, as quais se encontram por frente e ligeiramente abaixo dos olhos, as linhas precursoras da mandíbula e da boca, as bordas das órbitas oculares e as bordas da região auditiva e das brânquias. Além disso, fica bem marcado o esqueleto precursor do crânio, localizado por diante, por cima e por detrás dos olhos do embrião observado de perfil.

Tal marcação específica também marca diferentes estruturas das regiões toraco-abdominal e caudal, sendo evidentes as linhas intersegmentárias que separam os diferentes segmentos musculares derivados dos respectivos somitos. Também se observam linhas de marcação específica nas membranas precursoras das aletas e nas aletas já desenvolvidas.

A presença desta marcação específica, linear, nas larvas dos poços 3 de nossos experimentos, confirma os resultados que informamos nos pontos 4.1.1 e 4.1.2, ou seja, a existência de um elevado número de epitopos conservados entre a proteína ST11 de camundongo, **origem do anticorpo primário policlonal que utilizamos**, e a proteína ST11 de peixe zebra, detectada especificamente por esse anticorpo nas larvas destes poços 3.



A



B



C

Figura 15 (A) – Controle negativo absoluto, (B) – Controle negativo relativo, (C) – Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra.

4.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Levando em conta os resultados que já tínhamos obtido através de nossas análises de seqüências (veja ponto 4.1.1 e 4.1.2) e de nossos ensaios imunohistoquímicos (veja ponto 4.2; **poços 3; Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra coloração específica linear**), os resultados de nossos ensaios bioquímicos eram esperáveis e são mostrados na figura 16, filmes 1 e 2.

Filme 1: Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra.

Se observam 4 bandas na altura dos 66 KDa; nas canaletas 3,5,7 e 9, o que indica que o anticorpo primário policlonal de coelho anti-proteína STI1 recombinante **de camundongo**, além de detectar seu antígeno específico, ou seja, a proteína STI1 de camundongo presente nas canaletas 3 e 5, **detecta** a proteína STI1 **de peixe zebra** presente nas canaletas 7 e 9.

A diferença de tamanho que existe entre as bandas das canaletas 3 e 5 em relação às bandas das canaletas 7 e 9 e a presença de bandas ectópicas no nível dos 66 KDa só que nas canaletas 4 e 6, constituem artificios de técnica produzidos por esvazamento de material e serão analisados no capítulo 5 deste trabalho.

Filme 2: Controle negativo

Não se observa nenhuma banda fora as bandas de massa molecular, o que indica que não houve imunodeteções inespecíficas por parte dos anticorpos do soro pré-imune nem imunomarcações inespecíficas por parte do anticorpo secundário, já seja, atuando sobre as proteínas cerebrais de camundongo presentes nas canaletas 3 e 5 ou sobre as proteínas cerebrais de peixe zebra presentes nas canaletas 7 e 9 ou, se houve, foram ligações muito fracas e portanto eliminadas durante as lavagens.

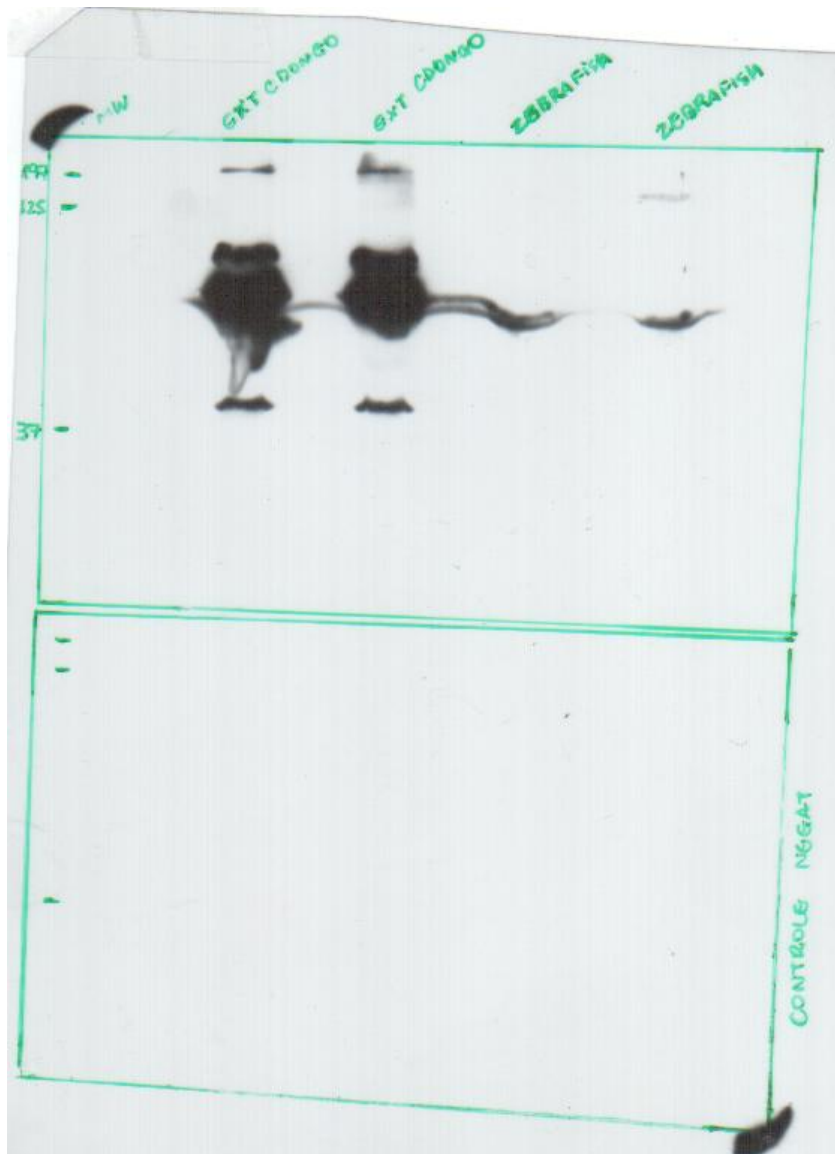


Figura 16 (A) – **Filme 1**: Estudo da proteína incógnita; proteína ST11 de peixe zebra, (B) – **Filme 2**: Controle negativo.

5 DISCUSSÃO

As diferentes análises de seqüências que realizamos indicam que entre as proteínas STI1 das espécies *Mus musculus* e *Danio rerio* existe uma elevada conservação evolutiva, sendo utilizada como referência, em cada uma destas análises, a proteína STI1 humana, em relação à qual, as proteínas STI1 das duas primeiras espécies também apresentam uma elevada conservação.

Segundo essas análises, a conservação global de aminoácidos entre as proteínas STI1 de *Mus musculus* e *Danio rerio* é de **79,9%** e no que diz respeito aos aminoácidos dos domínios TPR, essa conservação é de **68,6%** para os domínios TPR1 e de **83,9%** para os domínios TPR2, incluindo os conectores C1 e C2 (veja figura 3), segundo seqüência de mSTI1 fornecida pelo programa PROSITE (veja ponto 8.1).

Antes de continuar nossa discussão, é preciso salientar que o grau de conservação que encontramos no nível dos domínios TPR2 apóia nossa hipótese de **conservação igual ou maior** formulada no começo do ponto 3.1.2 deste trabalho. Sobre esse tema voltaremos a discutir mais adiante, nessa oportunidade analisando por separado a conservação dos domínios TPR1, TPR2A e principalmente TPR2B.

Para interpretar os resultados referidos mais acima, é preciso lembrar que o tamanho do domínio TPR2, por sua vez constituído pelos subdomínios A e B e o conector C2, é bem maior do que o tamanho do domínio TPR1 e que, portanto, as probabilidades de seus aminoácidos terem sofrido substituições durante a evolução também são bem maiores devido, simplesmente, ao fato que seus respectivos nucleotídeos codificantes são bem mais numerosos. **Paradoxalmente**, as análises de seqüências demonstram que o domínio TPR2 foi bem mais conservado durante a evolução do que o domínio TPR1.

Uma hipótese simples para explicar esse fenômeno seria que o domínio TPR2 estaria envolvido em funções mais críticas para as espécies estudadas do que o domínio TPR1 e, portanto, o processo de pressão seletiva teria evitado, mais no domínio TPR2 do que no domínio TPR1, a ocorrência de mutações ao longo da evolução. (RIDLEY, 2006; HARTL, 2007; FUTUYMA, 1993).

Infelizmente não existe na literatura a vinculação de cada domínio TPR com a totalidade das funções que desempenha. Uma informação desse tipo, além de quantificar, de forma organizada, todas as funções conhecidas da proteína ST11, permitiria, principalmente, avaliar a **importância** das funções que cumpre **cada domínio**, o que, confirmaria ou descartaria a hipótese formulada mais acima.

Nesse sentido, seria interessante poder determinar qual a importância que tem cada um desses domínios para a célula, por exemplo, produzindo espécimes knock-out para cada um deles.

Levando em conta que por enquanto não foi possível produzir com sucesso peixes zebra knock-out, que já conhecemos quais os aminoácidos conservados entre as proteínas ST11 de *Mus musculus* e *Danio rerio* e, principalmente, devido ao fato que **a manutenção** desse alto grau de conservação ao longo de 400 milhões de anos de evolução só pôde ter acontecido por se tratar de seqüências de alta relevância **funcional** para a célula, poderiam ser nocauteados, em camundongo, apenas os aminoácidos que foram conservados nos domínios TPR de peixe zebra, ou seja, propomos avaliar em camundongo os efeitos causados pelo knock-out de seus aminoácidos conservados em relação aos aminoácidos dos domínios TPR de peixe zebra já que, com certeza, eles correspondem às seqüências **estritamente funcionais** entre essas duas espécies. Assim, em primeiro lugar e com a finalidade de identificar as seqüências de aminoácidos correspondentes a cada domínio TPR, poderiam ser utilizadas, por exemplo, as seqüências publicadas por Odunuga, no ano 2003, representadas na figura 3(AA), às quais já fizemos referência no final do ponto 3.1.2 e, para individualizar os aminoácidos conservados entre essas duas espécies, poderia ser utilizado nosso alinhamento de seqüências (veja figura 7).

A partir dessas seqüências de aminoácidos e, através dos programas bioinformáticos disponíveis, poderiam ser deduzidas as seqüências de nucleotídeos codificantes dos respectivos mRNA e, a partir delas, obter as correspondentes seqüências de DNA genômico, obviamente, sem seus introns, ou cDNA. Logo deveriam ser fabricadas seqüências lineares desse DNA genômico e introduzidas nas linhas germinais de camundongos progenitores a fim de obter, nas suas descendências, camundongos knock-out para os domínios TPR1 ou para o domínio TPR2 (ALBERTS, B., 2004).

Dessa forma, a partir da não expressão de um ou outro domínio, poderá ser avaliada a **importância funcional** do respectivo domínio para ambas as espécies mas, principalmente, para *Danio rerio*, já que seriam seus domínios TPR os que estariam sendo nocauteados em camundongo. Se após a correspondente avaliação nós comprovássemos que o grau de compromisso das funções celulares, teciduais e orgânicas dos camundongos knock-out para o domínio TPR2 são maiores do que o grau de compromisso observado nos camundongos knock-out para o domínio TPR1, nós teríamos demonstrada a hipótese que formularmos mais acima, o que constituiria uma primeira aplicação prática dos resultados deste trabalho.

No que diz respeito às possíveis conseqüências das disfunções da proteína STI1 considerada globalmente, mas não por ausência de função de um de seus domínios como proposto acima, as mesmas já foram consideradas no ponto 1.3.7.

Por outra parte é preciso lembrar que a análise da conservação dos aminoácidos no nível dos domínios TPR foi realizada a partir de uma seqüência de aminoácidos da proteína mSTI1 fornecida pelo programa PROSITE e, segundo esse programa, o domínio TPR1 se estende desde o aminoácido 4 até o 105 e, o domínio TPR2, desde o aminoácido 225 até o 461 sem subdivisão em subdomínios A e B, ou seja, incluindo o conector de 27 aminoácidos que existe entre eles. (veja figura 3 e ponto 8.1).

Como acontece com a maioria dos conectores, é altamente provável o conector C2 não fazer parte das seqüências funcionais dos domínios TPR2 sendo, assim, pouco factível ele se encontrar sob pressão seletiva, e muito provável, portanto, que tal conector esteja pouco conservado entre as espécies estudadas.

Na publicação de Odunuga et. al, referida mais acima, os autores descreveram a organização dos domínios TPR na proteína STI1 de *Mus musculus*. Segundo eles, o domínio TPR1 se estende desde o aminoácido 4 até o 104, o domínio TPR2A, desde o aminoácido 225 até o 333 e o domínio TPR2B, desde o aminoácido 360 até o 461.

De um ponto de vista experimental, no que diz respeito aos alinhamentos de seqüências desses domínios TPR, seria aconselhável, no futuro, utilizar essa organização já que ela elimina os conectores existentes entre o domínio TPR1 e TPR2A e entre esse último e o domínio TPR2B. Nós já realizamos experimentos utilizando essa estratégia e o resultado mais relevante que obtivemos foi descobrir

que a porcentagem de identidade existente entre os domínios TPR2B da proteína STI1 das espécies *Mus musculus* e *Danio rerio* é de **85,2%**, sendo essa a maior porcentagem que encontramos durante todas as análises correspondentes a essas duas espécies. Já, quando tais análises envolvem os domínios TPR2B, só que relacionando as espécies *Danio rerio* / *Homo sapiens* e *Homo sapiens* / *Mus musculus*, essa porcentagem é igual ou maior, em nenhum caso é menor (veja ponto 4.1.2; figura 14).

Antes de dispor desses resultados, nós imaginamos uma possível função citoplasmático-nuclear da proteína STI1. Naquela oportunidade, baseados numa publicação de LONGSHAW et al, do ano 2004, nos formulamos a hipótese que a proteína STI1, durante o processo de **dobramento de proteínas** no citoplasma, em estados de estresse celular, teria a capacidade de reconhecer quais as proteínas deficitárias devido a alta utilização e quais as danificadas. Segundo aquela hipótese, a mesma proteína STI1, havendo realizado esse reconhecimento, se dirigiria ao núcleo e ativaria direta ou indiretamente a transcrição dos genes que codificam tais proteínas, restabelecendo assim seus níveis citoplasmáticos. (veja ponto 1.3.6.3).

Hoje, à luz dos nossos últimos resultados, referidos acima, temos condições de aperfeiçoar aquela hipótese. Assim, devido ao fato que as proteínas que possuem alto grau de conservação exercerem funções altamente **restritas e específicas**, seria pouco provável a proteína STI1 participar desses dois processos; reconhecimento de proteínas durante o dobramento protéico primeiro e ativação da transcrição dos correspondentes genes codificantes depois. O mais provável é que ela participe num desses processos. Além disso, achamos que tal participação aconteceria através de seu domínio TPR2B.

Tal afirmação tem dois fundamentos:

1º) Funções dos domínios TPR durante o processo de dobramento de proteínas: O domínio TPR1 se liga na chaperona Hsp70 e o domínio TPR2A na chaperona Hsp90 (veja pontos 1.3.4 e 1.3.6.2: co-chaperonas). O único domínio que permanece livre, portanto o único que poderia desempenhar essa hipotética função de reconhecimento durante o processo de dobramento de proteínas, é o domínio TPR2B. Segundo esse fundamento, é muito mais provável do ponto de vista da **ergonomia celular**; primeiro, e, conseqüentemente, da **ergonomia evolutiva**, geração após geração; depois, que seja um domínio de uma das proteínas que faz

parte do processo de dobramento protéico que desempenhe tal função de reconhecimento, e não um componente estranho ao complexo.

Também é bem mais provável, do mesmo ponto de vista da **ergonomia celular e evolutiva**, que seja um componente do próprio complexo quem se dirija até o núcleo. Devido a seus grandes tamanhos e sua função específica de dobramento, é pouco provável que as Hsps 70/90 façam esse trabalho. De novo, o único componente livre durante o processo de dobramento é o domínio TPR2B da proteína STI1. Nesse sentido, pensamos que, após um evento de dobramento, a proteína STI1 se desligaria das chaperonas e se dirigiria ao núcleo. Novamente, do mesmo ponto de vista **ergonômico**, é pouco provável que a proteína STI1 se desloque inteira para dentro do núcleo. Achamos que ela ficaria do lado citoplasmático de um poro nuclear e seu domínio TPR2B entraria no núcleo na procura de seus genes alvo e/ou de suas vias de ativação intra-nuclear alvo.

Talvez, nesse processo, ele continue ancorado no resto da proteína através do conector C2 que o une ao domínio TPR2A ou, talvez, ele se desligue e se dirija sozinho à procura de seus alvos.

2º) Grau de conservação do domínio TPR2B: Como já foi dito, existem **85,2%** de identidade entre os domínios TPR2B das proteínas STI1 de *Mus musculus* e *Danio rerio*, a maior identidade já achada por nós entre essas duas espécies.

Então, um outro fundamento que sustenta a hipótese que seria o domínio TPR2B que desempenharia uma daquelas funções candidatas (reconhecimento de proteínas no citoplasma ou fator de transcrição no núcleo) é este elevadíssimo grau de conservação deste domínio entre essas duas espécies; um mamífero e um peixe, que divergem evolutivamente há milhões de anos.

O leitor, talvez, não esteja achando relação entre o grau de conservação de um domínio protéico e o cumprimento de uma determinada função. Neste ponto, no que diz respeito de uma dessas funções candidatas (a transcrição de genes) é preciso lembrar que os **fatores de transcrição** são as proteínas mais conservadas entre os seres vivos. Todas as proteínas, inclusive as histonas e a actina, que são duas das proteínas mais conservadas, precisam de um fator de transcrição que esteja **igual ou mais conservado** do que elas para poder ativar a transcrição dos genes que as codificam.

Pensamos nessas duas funções candidatas porque no que diz respeito à execução delas nos estados de estresse celular, a literatura não atribui para nenhuma proteína o cumprimento das mesmas que, como é fácil de imaginar, são imprescindíveis para a célula nesses estados, isto é, reconhecimento de proteínas danificadas e síntese de novo de tais proteínas através da correspondente ativação da transcrição gênica. Apenas dispomos de uma publicação de Longshaw, et al, 2004, na qual, os autores comunicaram que a proteína STI1 se desloca para o núcleo, sem informar se é toda a proteína ou apenas um de seus domínios que se desloca. Fora essa comunicação, na literatura existe um vazio no que diz respeito destas duas funções em estados de estresse celular e também no que diz respeito à eventual participação do domínio TPR2B nestas ou em outras funções.

Além do domínio TPR2B cumprir uma ou outra função, o que é indiscutível é a importância que qualquer delas possui para a célula e, portanto, do ponto de vista evolutivo, é perfeitamente compreensível aquela relação **diretamente proporcional** que existe entre o grau de conservação de uma proteína e a **importância** que suas funções têm para a célula. Nesse sentido achamos que o elevado grau de conservação do domínio TPR2B entre essas duas espécies se deveria ao cumprimento de uma de tais funções, ou de alguma outra função tanto ou mais importante ainda.

Achamos pouco provável que um domínio que foi conservado pelo processo de pressão seletiva durante 400 milhões de anos de evolução, apresentando hoje **85,2%** de identidade entre essas duas espécies, que é o domínio **mais conservado** da proteína STI1 quando alinhadas as três espécies estudadas e que, além disso, está presente **sem função conhecida** nesses dois eventos essenciais para a célula, não participe de nenhum deles ou não participe em **nenhuma outra função** relevante para a célula.

Levando em conta os resultados de LONGSHAW et al, 2004 e, **principalmente**, considerando que segundo nossos resultados o domínio TPR2B é **o mais conservado** das proteínas STI1 das três espécies que estudamos, pensamos que o **mais intenso** processo de pressão seletiva age sobre o domínio TPR2B e que a conservação dos outros dois domínios, que também é elevada só que um pouco menor, deve ser, ao longo da evolução, a pressões menos intensas. (RIDLEY, 2006; HARTL, 2007; FUTUYMA, 1993).

Se o leitor lembrar, a porcentagem de identidade que obtivemos analisando os domínios TPR2 das espécies *Mus musculus* e *Danio rerio*, incluindo o conector C2 que une os domínios TPR2A e TPR2B, foi de 83,9% e, fazendo o mesmo experimento só que sem esse conector, essa identidade, para os domínios TPR2B, aumentou para 85,2% (veja ponto 4.1.2, figuras 11 e 14 respectivamente).

Este resultado era previsível pois quanto maior a utilidade de uma estrutura protéica maior a pressão seletiva exercida com o objeto de **manter** a informação genética que a codifica, o que equivale a dizer que quanto menor a utilidade, por exemplo, por se tratar de uma seqüência conectora, mais sujeita está esta informação a acumular modificações produzidas por diferentes mutações ao longo da história evolutiva do ser vivo que a possui.

A importância dessa porcentagem de identidade ser elevada, tem a ver com que quanto maior for a semelhança das proteínas, por exemplo de STI1, entre duas ou mais espécies alinhadas, maiores serão as probabilidades de desenhar ferramentas experimentais de alta especificidade como anticorpos monoclonais eficientes, de uso comum em pesquisas que envolverem, por exemplo, as três espécies que estudamos neste trabalho, matéria que antecipamos no ponto 3.1.2; e que discutimos a seguir.

Assim, outra das aplicações práticas dos resultados deste trabalho seria a produção de anticorpos monoclonais dirigidos apenas contra as seqüências de aminoácidos conservados nas proteínas STI1 das três espécies estudadas.

Uma metodologia simples que poderia ser utilizada seria a fabricação de uma seqüência única de aminoácidos sintéticos confeccionada apenas com os aminoácidos que se repitam nas seqüências correspondentes às espécies *Mus musculus* e *Danio rerio*. (veja ponto 4.1.1.1).

A seqüência única de aminoácidos sintéticos resultante, após sua fabricação, representará o conjunto dos aminoácidos comuns, ou seja, **conservados**, entre as espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*.

Injetada, por exemplo em coelho, para a obtenção de um anticorpo primário, essa seqüência única gerará um anticorpo primário de coelho, **monoclonal**, já que estará dirigido contra uma parte e não contra toda uma proteína STI1.

Em futuros experimentos envolvendo uma, duas ou as três espécies estudadas neste trabalho, poderá ser utilizado esse anticorpo, o qual terá a

capacidade de reconhecer o conjunto dos aminoácidos conservados nas proteínas ST11 dessas três espécies.

Uma das vantagens disso será o melhoramento na qualidade dos experimentos realizados com essas espécies. Por exemplo, nos ensaios bioquímicos descritos nos pontos 3.3.2.3, 3.3.2.4, 3.3.2.5 e 4.3; filme 1 deste trabalho, nós utilizaremos um anticorpo primário de coelho, **policlinal**, anti-proteína ST11 de camundongo, ou seja, um anticorpo dirigido contra a totalidade dos aminoácidos da proteína ST11 de camundongo que possui, quando comparada com a proteína ST11 de peixe zebra, por volta de 20% de aminoácidos não conservados.

Neste experimento, corremos duas amostras de extrato de cérebro de *Mus musculus* e duas amostras de extrato de cérebro de *Danio rerio*. Devido ao fato que, como já foi dito, o anticorpo primário utilizado foi um anticorpo de coelho anti-proteína ST11 de *Mus musculus*, ele reconheceu o total dos aminoácidos das proteínas ST11 presentes nas amostras de extrato de cérebro de *Mus musculus*; canaletas 3 e 5, e 79,9% dos aminoácidos das proteínas ST11 presentes nas amostras de extrato de cérebro de *Danio rerio*; canaletas 7 e 9. O resultado foi uma marcação positiva nas quatro canaletas na altura dos 66 KDa, correspondente à proteína ST11, só que com uma grande diferença de tamanho a favor das canaletas 3 e 5. Se naquele experimento tivéssemos utilizado um anticorpo monoclonal do tipo referido acima, ele teria reconhecido, o mesmo número de aminoácidos nas proteínas ST11 de *Mus musculus* e de *Danio rerio*, ou seja, apenas os aminoácidos conservados entre as proteínas ST11 de **ambas as espécies**, o que corresponde a 79,9% dos aminoácidos totais, considerando os conservados e os não conservados nessas proteínas ST11 **dessas duas espécies** e, em tais condições, o tamanho das bandas, desde que não houvessem artifícios de técnica, teria sido o mesmo nas quatro canaletas. Esse e outros aspectos referidos a nossos ensaios bioquímicos serão discutidos mais adiante.

Devido ao fato de já conhecermos as seqüências conservadas que existem entre as proteínas ST11 das espécies *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens* no nível de seus domínios TPR, sem inclusão dos conectores que os ligam, outra aplicação prática deste trabalho seria a fabricação de anticorpos monoclonais dirigidos exclusivamente contra essas seqüências sem os conectores, por exemplo, da proteína ST11 de *Danio rerio*. Assim, disporíamos de anticorpos monoclonais

anti-domínio TPR1, anti-domínio TPR2A e anti-domínio TPR2B da proteína STI1 dessa espécie, pouco estudada até agora.

Posteriormente poderiam serem escolhidos diferentes tipos de amostras de *Danio rerio*; embriões, larvas, peixes adultos, inteiros ou em diferentes classes de cortes etc. Usando amostras de um desses diferentes tipos, poderiam ser feitos usos de anticorpo anti-TPR1 em uma delas, de anticorpo anti-TPR2A em outra, e de anticorpo anti-TPR2B em outra.

A seguir poderia ser investigada, por exemplo, a localização intra-nuclear desses anticorpos o que poderia demonstrar, por exemplo, se durante o processo de dobramento de proteínas, toda proteína STI1 deslocar-se-ia para o núcleo ou se apenas um ou dois desses domínios se deslocariam.

Os peixes e os anfíbios, durante os primeiros estádios de seus respectivos desenvolvimentos embrionários, utilizam para se desenvolver, as proteínas, os mRNA e a maquinaria de tradução de proteínas que herdaram do ovo materno. Isso acontece até um momento do desenvolvimento denominado transição de blástula meia ou TBM, momento a partir do qual o DNA genômico das células embrionárias começa a ser transcrito e traduzido e, portanto, o embrião começa sintetizar suas próprias proteínas.

Os resultados deste trabalho também poderiam ser utilizados, por exemplo, para estudar a participação da proteína STI1 nas primeiras etapas do desenvolvimento do peixe zebra, antes da TBM que, nessa espécie, acontece na blástula meia, em estágio de escudo, quando o embrião possui 520 células. Também seriam úteis para estudar a participação dessa proteína em etapas posteriores; entre a TBM e a etapa de larva, ou em etapas ainda posteriores.

Então, para futuros estudos pré ou pós-TBM e, a partir das seqüências de aminoácidos conservados na proteína STI1 de peixe zebra, disponíveis no ponto 4.1.1.1 deste trabalho, deveriam serem deduzidas as respectivas seqüências codificantes do correspondente mRNA utilizando os programas bioinformáticos que estão disponíveis para tais fins. Logo, utilizando essas seqüências codificantes como molde, deveriam serem sintetizadas seqüências complementares delas para serem utilizadas como RNA de interferência anti-mRNA de STI1. Devido ao fato que o segundo códon, do mRNA da proteína STI1 de peixe zebra, que codifica para o aminoácido ácido glutâmico, também estar conservado, a seqüência metionina,

ácido glutâmico, na região 5' da seqüência codificante, região crítica para o início da tradução, garante a ligação do RNA de interferência nessa região do mRNA, além da garantia dada pelo resto da seqüência codificante que, como já foi dito, tem 79,9% de conservação global incluindo, é claro, esses dois primeiros códons.

Os referidos RNA de interferência, injetados em ovos recém fecundados, vão se ligar nesse mRNA, presente no citoplasma do ovo, impedindo a síntese de proteína STI1 materna durante todo o período pré-TBM. É preciso lembrar que, nesse período, todas as moléculas inclusive, é claro, a proteína STI1, estão dissolvidas no citoplasma do ovo e são incorporadas nas células embrionárias durante a divisão delas. Portanto, durante esse período, as células embrionárias vão incorporar umas poucas moléculas de proteína STI1 materna; apenas as não ligadas ao RNA de interferência e, assim, tais moléculas serão rapidamente consumidas durante as primeiras divisões celulares do embrião e o mesmo ficará sem essa proteína a maior parte do período pré-TBM. A partir da TBM, as células embrionárias começarão sintetizar sua própria proteína STI1 e os níveis da mesma no embrião serão normalizados rapidamente, só que não podemos prever quais as conseqüências pós-TBM, até a idade adulta, se o embrião chegar lá, do déficit pré-TBM de proteína STI1.

Após a TBM, então, poderão ser estudadas, em diferentes idades pós-fecundação (hpf; horas pós-fecundação), as eventuais alterações do desenvolvimento embrionário do peixe zebra causadas por esta deficiência. Tais alterações avaliadas, é claro, desde o ponto de vista do fenótipo molecular, celular, tecidual, orgânico, social, reprodutivo etc, poderão esclarecer qual a participação da proteína STI1 no desenvolvimento inicial do peixe zebra, participação que, talvez, essa proteína tenha durante o desenvolvimento de outros vertebrados, por exemplo, no humano.

É preciso salientar que na literatura não existem publicações referidas à estudo da proteína STI1 e/ou de seu mRNA em ovos de *Danio rerio*, sejam eles fecundados ou não fecundados e, portanto, o leitor poderia estar se perguntando como é que nós imaginamos experimentos como os referidos mais acima sem ter a total certeza de que a proteína STI1 efetivamente se expressa nesses ovos. A resposta é simples; por que todo produto de um gene housekeeping se encontra no ovo materno até que seja demonstrado o contrário.

Então, um primeiro passo antes de desenvolver esses experimentos, seria confirmar ou descartar a presença da proteína STI1 em ovos não fecundados de *Danio rerio*, através da injeção de um anticorpo anti-proteína STI1. Obviamente que seria bem melhor utilizar um anticorpo monoclonal anti-proteína STI1 de peixe zebra confeccionado, como sugerido, a partir de nossos alinhamentos de seqüências (veja ponto 4.1.1.1) e segundo a metodologia também já sugerida. Se por enquanto, por falta desses anticorpos não fossem possíveis tais procedimentos, uma alternativa provisória, cujo fim seja confirmar ou descartar a presença de proteína STI1, seria injetar, nesses ovos, o anti-corpo policlonal anti-proteína STI1 **de camundongo** que nós já utilizamos nos experimentos que relatamos neste trabalho e, através do qual, **detectamos** proteína STI1 **de peixe zebra**. (Veja pontos 4.2: **Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra: marcação específica, linear** e 4.3: **Filme 1: Estudo da proteína incógnita; proteína STI1 de peixe zebra**, e veja também, em breve, a discussão desses resultados).

Assim, uma vez demonstrada a expressão da proteína STI1 em ovos não fecundados de *Danio rerio*, o desenvolvimento daqueles experimentos é apenas uma questão de recursos e de tempo até dispor desses anticorpos.

No que diz respeito às análises de seqüências, em futuros trabalhos, as mesmas poderão ser estendidas para a análise das seqüências do DNA genômico e do mRNA de STI1 de peixe zebra permitindo estudar, dessa forma, entre outros temas, da existência de diferentes isoformas da proteína STI1 nesse sistema, decorrentes de splicing alternativos etc.

Em relação aos nossos ensaios imunohistoquímicos, a ausência de marcação nas larvas dos **poços 1** era um resultado esperável devido ao fato de nesses poços ter sido colocada apenas uma solução de bloqueio, ou seja, não foram colocados nem soro pré-imune nem anticorpo primário e, portanto, o anticorpo secundário colocado nesses poços no final de cada experimento, não teve antígeno ao qual se ligar e foi eliminado durante os correspondentes lavagens, sem gerar qualquer tipo de marcação.

Além disso, o resultado indica que o anticorpo secundário também não se ligou de forma direta e inespecífica, nem em STI1, nem em qualquer outra proteína de *Danio rerio* (veja ponto 4.2; **poços 1**).

Também eram esperáveis ao longo desses ensaios, ou ausência de marcação ou presença de marcações inespecíficas, de fundo, nas larvas dos **poços 2**, devido ao fato que neles foi colocado o correspondente soro pré-imune como controle negativo relativo e, tais soros, possuem muitos anticorpos que podem estabelecer ligações cruzadas com distintas proteínas do sistema em estudo, neste caso, com as proteínas de peixe zebra, podendo originar assim marcações inespecíficas (veja ponto 4.2; **poços 2**).

Nos nossos experimentos evidentemente, essas ligações cruzadas foram de baixa afinidade e portanto a maioria desses anticorpos séricos, assim ligados, foram eliminados durante os lavados correspondentes. Mesmo assim alguns deles continuaram ligados sendo alvo do anticorpo secundário o qual, além de ligar-se neles em forma específica, muito provavelmente tenha se ligado em forma direta em proteínas do sistema em estudo, neste caso, em proteínas variadas das larvas de peixe zebra presentes nos mencionados poços 2.

Ao longo dos experimentos, os espécimes dos poços 2 nos quais conseguimos eliminar a maioria ou todas as ligações cruzadas durante as correspondentes lavagens, apresentaram ausência de marcação. Já, nos casos nos quais as ligações cruzadas permaneceram, houve marcação inespecífica de fundo, de **distribuição** generalizada, não difusa e de **intensidade** variável segundo já foi descrito no ponto 4.2; **poços 2**, e segundo será discutido a seguir.

A mencionada marcação inespecífica tem **distribuição** generalizada porque os anticorpos do soro pré-imune e o anticorpo secundário se ligaram em forma cruzada em diferentes proteínas distribuídas ao longo de todo o embrião, ou seja que tais ligações estão presentes tanto na região crânio-facial quanto nas regiões toraco-abdominal e caudal dessas larvas.

Além disso, essa distribuição é não difusa porque permite visualizar claramente os limites de duas estruturas vecinas, o qual tem relação com as diluições pouco concentradas que utilizamos nos nossos experimentos. Quando as diluições utilizadas são baixas, ou seja, muito concentradas e/ou, o tempo de exposição para a solução de revelado é muito prolongado, a marcação é difusa, ou seja, tão intensa assim, que não permite distinguir uma estrutura anatômica de outra estrutura vecina.

A **intensidade** variável que observamos, ou seja, **leve** até ausência de marcação na região crânio-facial, e **muito leve** até ausência de marcação nas regiões toraco-abdominal e caudal, deve ser analisada em dois contextos diferentes: 1º) Intensidade variável na marcação inespecífica das larvas dos poços 2 de experimentos diferentes: Neste contexto as variações na intensidade da marcação inespecífica depende exclusivamente das diluições utilizadas em um e outro experimento e/ou do tempo de exposição para a solução de revelado em cada experimento.

2º) Intensidade variável na marcação inespecífica das diferentes regiões de um mesmo embrião, localizado no poço 2 de um mesmo experimento: A região crânio-facial possui uma relação célula/matriz extracelular bem maior do que as regiões toraco-abdominal e caudal, fato especialmente evidente no nível das linhas precursoras da cartilagem crânio-facial onde a quantidade de pequenas células é proporcionalmente bem maior à quantidade de matriz extra-celular, quando comparadas essas linhas com outras regiões embrionárias.

Essa maior celularidade aumenta muito as probabilidades de interações cruzadas entre a grande quantidade de proteínas expressas nesse grande número de células e os anticorpos do soro pré-imune e/ou o anticorpo secundário e, conseqüentemente, aumentam muito as marcações inespecíficas nessa região quando comparada com as outras duas regiões, onde a relação célula/matriz extracelular é menor.

Por outra parte, essa maior relação célula/matriz extracelular aumenta, na mesma proporção, as probabilidades de interações específicas com um anticorpo primário específico, como será tratado ao discutir os resultados observados nos poços 3 de nossos experimentos, mas adiante. É preciso o leitor lembrar que ST11 é uma proteína de expressão predominantemente celular; membrana plasmática, citoplasma e núcleo (veja pontos 1.3.5 e 1.3.6). Portanto, uma região que apresente uma alta celularidade em relação à quantidade de matriz extracelular, apresenta também maiores probabilidades de marcações específicas de ST11 e inespecíficas porque, obviamente, não é apenas a proteína ST11 que se expressa numa célula.

Fora esses dois contextos analisados, a intensidade da marcação inespecífica pode aumentar em forma **localizada** em zonas onde houve perdas de pele. Efetivamente, observamos que nas larvas nas quais aconteceram perdas de pele

durante os respectivos ensaios, especialmente após a permeabilização com acetona, houve marcação inespecífica, localizada, de intensidade variável, devido que um número maior de proteínas da larva ficaram expostas para os anticorpos do soro pré-imune e para o anticorpo secundário. Nesses lugares os lavados não conseguiram tirar completamente as ligações cruzadas e portanto as marcações inespecíficas e localizadas persistiram.

Esse fato explica por que num mesmo poço 2 de um mesmo experimento, uma das larvas apresenta ausência de marcação; larva sem roturas da pele e, a outra larva, apresenta regiões de marcação inespecífica; larva com roturas da pele nas regiões correspondentes.

A presença de duas marcações superpostas; uma inespecífica e outra específica nos embriões dos **poços 3** dos nossos experimentos, foi descrita no ponto 4.2; **poços 3**, deste trabalho, e constitui um resultado esperável segundo será discutido na seqüência.

1º) Marcação inespecífica de fundo: Como já foi tratado no ponto 3.2.1.3, o anticorpo anti-proteína STI1 que utilizamos para identificar a proteína STI1 nas larvas de **peixe zebra**, presentes nos poços 3 de nossos experimentos, foi um anticorpo **policlonal** obtido em coelho a partir da injeção de proteína STI1 recombinante de **camundongo**. Esse tipo de anticorpos são produzidos contra proteínas completas e reconhecem o 100% de seus epitopos, no nosso caso, o 100% dos epitopos da proteína STI1 de camundongo.

O grande número de aminoácidos que constituem uma proteína completa, faz com que também sejam altas as probabilidades que várias seqüências parciais dessa seqüência completa de aminoácidos estejam presentes em outras proteínas da mesma célula e que, portanto, o anticorpo primário policlonal, além de reconhecer o 100% dos aminoácidos de sua proteína antígeno específico, reconheça também, em forma específica, seqüências de aminoácidos de tamanhos variáveis em outras proteínas da célula, se ligando nelas e originando interações cruzadas com essas proteínas.

Acontecido esse tipo de interação, o anticorpo secundário vai se ligar especificamente no anticorpo primário policlonal já ligado, além de se ligar de forma direta e fraca em diferentes proteínas do sistema em estudo e, se ele não é

eliminado completamente durante as lavagens correspondentes, originará uma coloração inespecífica de fundo.

Nos nossos experimentos, o anticorpo primário policlonal anti-proteína STI1 de camundongo, além de reconhecer em forma específica o 79,9% da proteína STI1 de peixe zebra, tema que será discutido a seguir, no ponto 2, reconheceu, também em forma específica, pequenas seqüências de outras proteínas do peixe zebra, originando as referidas ligações cruzadas. Posteriormente o anticorpo secundário gerou a marcação inespecífica de fundo, de **distribuição** generalizada, não difusa e de **intensidade** variável, descrita no ponto 4.2; **poços 3**, e discutida a seguir.

A **distribuição** generalizada dessa marcação inespecífica se deve ao fato que as pequenas seqüências mencionadas mais acima, reconhecidas pelo nosso anticorpo primário, correspondem a muitas proteínas diferentes, distribuídas por toda a larva. Após a união desse anticorpo com essas seqüências, o anticorpo secundário fez sua parte originando a correspondente marcação, que é **inespecífica**, por que não corresponde à marcação da proteína STI1 de peixe zebra senão a essas outras proteínas.

A marcação específica, produzida por detecção da proteína STI1 de peixe zebra, também é generalizada quanto à marcação inespecífica só que por outro motivo; a proteína STI1 tem distribuição ubíqua nos embriões de peixe zebra, ou seja, é ela sozinha e não pequenas seqüências de muitas proteínas a que está distribuída por toda a larva, o que gera uma marcação que também é generalizada, só que com um padrão próprio, específico, diferente da marcação inespecífica de fundo que está sendo discutida agora, marcação específica que será discutida no seguinte ponto 2.

Além de generalizada, a distribuição da marcação inespecífica que observamos é não difusa devido ao fato que, como já foi tratado ao discutir a marcação inespecífica observada nos poços 2, as diluições que utilizarmos nos poços 3 também foram baixas e os tempos de exposição para a solução de revelado foram os estabelecidos em todos os protocolos.

Como também foi falado naquele ponto, a **intensidade** variável que observamos, neste caso, da marcação inespecífica das larvas dos poços 3, que variou na faixa de **leve** até **moderada** na região crânio-facial e de **leve** até **muito leve** nas regiões toraco-abdominal e caudal ao longo dos nossos experimentos,

também deve ser analisada naqueles dois contextos (vide discussão referida à marcação inespecífica das larvas dos poços 2).

Outro fator que também foi discutido naquele ponto foram as roturas na pele das larvas, o qual produz marcações localizadas e inespecíficas, fato que também aconteceu nas larvas dos poços 3, colaborando para essa marcação inespecífica de fundo que observamos.

2) Marcação específica, linear: Devido ao fato que nossas análises de seqüências demonstram que entre as proteínas STI1 de *Mus musculus* e *Danio rerio* existe 79,9% de identidade global e, além disso, a identidade no nível dos domínios TPR chega a ser ainda maior (veja pontos 4.1.1 e 4.1.2), o resultado obtido nos poços 3 de nossos experimentos, ou seja, marcação **específica** da proteína STI1 em larvas de **peixe zebra** utilizando um anticorpo anti-proteína STI1 de **camundongo** (veja ponto 4.2; **poços 3**), era um resultado esperável, o qual, além disso, demonstra que é possível marcar seqüências de aminoácidos conservados entre essas duas espécies, no nosso caso, usando um anticorpo primário que, teoricamente, apenas poderia reconhecer os epitopos da proteína STI1 de uma delas; de *Mus musculus*.

Por outra parte demonstra que para detectar a proteína STI1 em larvas de peixe zebra, seria suficiente o uso de um anticorpo monoclonal que esteja dirigido contra esse 79,9% dos aminoácidos que foram conservados na proteína total ou contra os aminoácidos que foram conservados nos domínios TPR1 e TPR2, tema que será ampliado em breve.

Como foi descrito naquele ponto 4.2; **poços 3**, a referida marcação específica tem uma **distribuição** generalizada, ou seja, marca **especificamente** estruturas anatômicas tanto da região crânio-facial quanto das regiões toraco-abdominal e caudal, o qual também era um fato esperável por ser a proteína STI1 o produto de um gene “de manutenção” e portanto ter, teoricamente, uma distribuição ubíqua no nosso sistema de estudo, coisa que nos propusemos ao delinear os objetivos deste trabalho (veja ponto 2.2.2) e demonstramos naquele ponto 4.2; **poços 3**.

Além de generalizada, essa marcação é não difusa já que permite visualizar claramente os limites de estruturas anatômicas que são vizinhas o qual, o mesmo que as marcações inespecíficas, tem relação com as baixas diluições utilizadas.

A **intensidade** da marcação específica que observamos nas larvas dos poços 3 de nossos experimentos, varia entre **moderada** até **marcada** na região crânio-facial e entre **leve** até **muito leve** nas regiões toraco-abdominal e caudal.

Essa variabilidade na intensidade da marcação, neste caso específica, deve ser analisada nos mesmos dois contextos nos quais analisamos a variabilidade na intensidade da marcação inespecífica de fundo que observamos nos poços 2 e 3 e que já discutimos.

O uso de anticorpos monoclonais produzidos como sugerido no começo desta discussão e dirigidos apenas contra as seqüências conservadas das proteínas STI1 de *Mus musculus* e *Danio rerio* como mencionado mais acima, poderia melhorar muito a qualidade dos futuros ensaios imunohistoquímicos envolvendo essas espécies. Um exemplo prático disso poderia ser formulado a partir dos resultados que obtivemos nos poços 3 de nossos ensaios imunohistoquímicos, os quais foram discutidos mais acima: se tivéssemos usado um anticorpo monoclonal como proposto, nas larvas dos poços 3 de nossos experimentos não existiria a marcação inespecífica de fundo analisada mais acima no ponto 1 e, nesta discussão, estaríamos falando apenas da marcação específica linear que discutimos no respectivo ponto 2 e, diríamos, que essa marcação específica se encontra sobre um fundo límpido e transparente.

Em futuros experimentos, os estudos histológicos em microscópio de luz e/ou eletrônico, poderiam constituir um ótimo complemento desses ensaios imunohistoquímicos.

Levando em conta os resultados obtidos através de nossas análises de seqüências primeiro (veja pontos 4.1.1 e 4.1.2) e de nossos ensaios imunohistoquímicos depois (veja ponto 4.2; **poços 3**), os resultados obtidos por meio de nossos ensaios bioquímicos eram completamente esperáveis (veja ponto 4.3; **filme 1**).

Nesse último ponto, foi abordado co-lateralmente o tema da presença de duas bandas ectópicas nas canaletas 4 e 6 do filme 1. Outro tema que foi tratado de forma tangencial naquele ponto e logo, no começo desta discussão, foi a diferença de tamanho existente entre as bandas 3 e 5 e as bandas 7 e 9.

Antes de discutir esses dois temas, que aparentemente são duas partes de um mesmo fenômeno, é preciso lembrar que no experimento, cujos resultados foram

relatados naquele ponto 4.3; **filme 1**, foram aplicados 100 µg de extrato de cérebro de camundongo nas canaletas 3 e 5 e 100 µg de extrato de cérebro de peixe zebra nas canaletas 7 e 9 (veja ponto 3.3.2.3), ou seja, a mesma quantidade de amostra nas quatro canaletas.

Lembrando esses fatos e, observando esse filme 1, a hipótese que melhor explica o maior tamanho das bandas 3 e 5 quando comparadas com as bandas 7 e 9, é que houve um esvazamento de material durante a aplicação das amostras nas canaletas 3 e/ou 5, e durante a corrida eletroforética se formaram, dentro dessas canaletas 3 e 5, as respectivas bandas de 66 KDa correspondentes à proteína STI1 de camundongo e, por fora delas, duas bolhas constituídas pelo material esvaziado, as quais, se encontram rodeando essas bandas das canaletas 3 e 5 respectivamente. Além disso, parte do material das bolhas passou para as canaletas vizinhas, criando essas duas bandas ectópicas mencionadas mais acima, uma na canaleta 4 e a outra na canaleta 6 respectivamente.

Por outra parte, o material esvaziado corresponde às amostras de camundongo cuja proteína STI1 é o antígeno específico do anticorpo primário que utilizamos. Com certeza esse fator tem contribuído para o maior tamanho das bandas das canaletas 3 e 5 pelo fato que o mencionado anticorpo reconhece o 100% dos epítopos da proteína STI1 de **camundongo** presente nessas bandas e o 79,9% dos epítopos da proteína STI1 de peixe zebra presente nas bandas das canaletas 7 e 9. Ou seja que um outro motivo pelo qual as bandas 3 e 5 tem maior tamanho do que as bandas 7 e 9, é o fato que o mencionado anticorpo reconhece por volta de 20% a mais de epítopos nas proteínas STI1 de camundongo; canaletas 3 e 5, do que nas proteínas STI1 de peixe zebra; canaletas 7 e 9.

Outro aspecto importante surgido da análise do filme 1, é que a banda da canaleta 9 ficou fora do alcance do esvazamento e portanto, nela, o anticorpo primário anti-STI1 de camundongo que utilizamos, só podia ter detectada a presença de proteína STI1 **de peixe zebra**, fato absolutamente esperável se lembramos os resultados de nossas análises de seqüências e de nossos ensaios imunohistoquímicos.

Existem pelo menos duas alternativas para solucionar o problema da assimetria no tamanho das bandas. A primeira é a mais radical mas é a melhor, e consistiria na produção de anticorpos monoclonais dirigidos exclusivamente contra os epítopos conservados entre as proteínas STI1 de camundongo e peixe zebra,

segundo já foi falado no começo deste capítulo, quando tratamos algumas aplicações práticas dos resultados deste trabalho.

Uma outra alternativa consistiria em repetir o mesmo experimento, usando os mesmos anticorpos, protocolo, etc, só que modificando as quantidades de amostras aplicadas. Por exemplo, em vez de correr 100 µg de extrato de cérebro de camundongo, poderiam ser corridos 50 µg e, em vez de correr 100 µg de extrato de cérebro de peixe zebra, poderiam ser corridos entre 120 e 150 µg.

Essa última alternativa seria apenas cosmética já que a verdadeira assimetria, a assimetria no número de epitopos reconhecidos pelo anticorpo primário policlonal; 100% nas amostras de camundongo e 79,9% nas amostras de peixe zebra, continuaria existindo, mesmo que na repetição do experimento não aconteçam esvazamentos nem outros problemas técnicos.

Fora tais considerações, o esperável seria que o tamanho das bandas fosse similar pelo fato que o anticorpo primário policlonal agindo nas canaletas 3 e 5 vai detectar um número total de epitopos menor; o volume total da amostra passaria de 100 µg para 50 µg e, agindo nas canaletas 7 e 9, vai detectar um número total de epitopos maior; o volume total da amostra passaria de 100 µg para 120-150 µg.

É preciso salientar que nos repetemos o experimento segundo essa segunda alternativa mas os resultados foram confusos e, por falta de tempo segundo data prevista para defesa desta dissertação, não fizemos um terceiro experimento.

A realização de nossos ensaios bioquímicos teve um duplo objetivo; por um lado confirmar os resultados que já tínhamos obtido através dos dois ensaios anteriores e, por outro lado, extremar o rigor experimental deste trabalho exigindo, no máximo possível, as prestações do anticorpo primário que utilizarmos nesses experimentos. A respeito disso, quando usamos esse anticorpo para detectar proteína ST11 em larvas de peixe zebra nos nossos ensaios imunohistoquímicos, este trabalho já foi submetido, uma primeira vez, para um alto grau de rigor experimental. Neste ponto é preciso lembrar que o referido anticorpo é anti-proteína ST11 de camundongo e, portanto, é heterólogo quando usado num outro sistema que não seja *Mus musculus*, o qual sempre será uma desvantagem do ponto de vista experimental já que a identidade entre sistemas nunca é de 100%. Portanto, usado em *Danio rerio* como feito nos nossos ensaios imunohistoquímicos, ele perde por volta de 20% de sua capacidade de

reconhecer epitopos desse sistema; reconhece o 79,9% deles, os conservados, e não o 100% como o faz em *Mus musculus*.

Achamos que depois daqueles ensaios imunohistoquímicos, o rigor experimental deste trabalho foi extremado quando realizamos nossos ensaios bioquímicos já que eles, além de serem feitos baixo o mesmo grau de rigor do que os ensaios imunohistoquímicos devido ao fato que os fizemos usando o mesmo anticorpo primário que tínhamos usado naqueles ensaios, acrescentaram mais um grau de rigor já que foram feitos a partir de amostras de um único órgão; cérebro de *Mus musculus* e de *Danio rerio*, diferentemente do feito naqueles ensaios imunohistoquímicos, os quais, foram realizados em organismos inteiros, envolvendo todos seus tecidos e órgãos.

Num organismo inteiro, as probabilidades de detectar uma proteína utilizando um anticorpo heterólogo são bem **maiores** do que num órgão único por que num organismo inteiro existem células provenientes das diferentes camadas germinativas; ectodérmicas, mesodérmicas e endodérmicas, inclusive, por que a partir de cada uma dessas camadas são originados diferentes tipos celulares e teciduais que constituirão diferentes órgãos e sistemas, cada um deles com uma grande variabilidade em sua expressão gênica. Essa variabilidade na expressão faz com que aumentem muito as probabilidades de encontrar epitopos conservados de uma proteína qualquer num sistema de estudo qualquer, no nosso caso, da proteína STI1 em larvas inteiras de peixe zebra e, através de um anticorpo primário heterólogo, no nosso caso, um anticorpo anti-proteína STI1 de camundongo, quando comparadas com as probabilidades de achar esses mesmos epitopos conservados só que por meio de ensaios bioquímicos realizados a partir de amostras provenientes de um único órgão, no nosso caso, cérebro de peixe zebra, devido ao fato que, nessas condições, a variabilidade da expressão gênica é bem **menor** do que num organismo inteiro.

Mesmo assim e, extremando o rigor experimental segundo exposto até aqui, nos conseguimos detectar proteína STI1 em amostras de cérebro de peixe zebra, por meio de Western Blotting e usando um anticorpo heterólogo segundo já foi relatado no ponto 4.3; filme 1 e discutido mais acima.

Em futuros ensaios bioquímicos, além de usar anticorpos monoclonais como já sugerido, o qual permitiria obter bandas do mesmo tamanho e evitaria a presença

de bandas inespecíficas nos ensaios de Western Blotting, seria interessante realizá-los a partir de estratos de órgãos que sejam derivados de camadas germinativas diferentes, o qual levaria em conta os conceitos de variabilidade na expressão gênica discutidos mais acima.

Um dos objetivos de experimentos desse tipo, seria a determinação do nível de expressão da proteína STI1 num órgão específico, derivado de uma camada germinativa específica, por exemplo endoderma, e obtido de um animal específico, por exemplo; fígado de camundongo ou fígado de peixe zebra, e, a partir dos resultados, poderia ser avaliada uma eventual expressão diferencial da proteína STI1 nos sistemas estudados, no nosso exemplo; nível de expressão da proteína STI1 em fígado de camundongo versus nível de expressão da proteína STI1 em fígado de peixe zebra. Posteriormente poderiam ser feitos os mesmos experimentos a partir de órgãos derivados da ectoderma e da mesoderma.

6 CONCLUSÕES

- Devido ao fato que os domínios TPR2B das proteínas ST11 das espécies *Mus musculus* e *Danio rerio* foram altamente conservados pelo processo de pressão seletiva **durante 400 milhões de anos de evolução**, apresentando, hoje, **85,2%** de identidade entre seus aminoácidos e, levando em conta as diferentes considerações realizadas na discussão correspondente, pensamos que esse domínio participaria no reconhecimento de proteínas altamente consumidas e/ou danificadas durante o processo de dobramento de proteínas em estados de estresse celular ou, possivelmente, na ativação dos genes que codificam essas proteínas durante esse processo nesses estados ou, talvez, em **alguma outra função** que, evidentemente, é muito relevante para a célula, só compatível com **esse grau de conservação** ao longo **desse tempo de evolução**.
- O anticorpo primário policlonal de coelho, anti-proteína ST11 recombinante **de camundongo** reconhece especificamente os **epitopos conservados** da proteína ST11 de **peixe zebra**, fato que em primeiro lugar foi demonstrado através de ensaios imunohistoquímicos realizados em larvas inteiras de *Danio rerio* e, em segundo lugar, através do ensaio bioquímico Western Blotting, realizado a partir de amostras de cérebros obtidas de indivíduos destas mesmas espécies.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, G.E.; PAW, B.H.. **Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders.** Front Biosci. 2003.

ADAMS, A.E.M.; BOTSTEIN, D.; DRUBIN, D.B. **A yeast actin-binding protein is encoded by sac 6, a gene found by suppression of an actin mutation.** Science 243:231, 1989.

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula.** 4. ed. Artmed, 2004.

AMATRUDA, J.F.; ZON, L.I.. **Dissecting and disease using the zebrafish.** Dev. Biol. 1999.

ANDERSON, K.V.; INGHAM, P.W.. **The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics.** Nat. Genet., 2003.

BARBAZUK, W.B. et al. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes.** Genome Res. 2000.

BILOTTA, J.; SASZIK, S.. **The zebrafish as a model visual system.** Int J. Dev. Neurosci, 2001.

BLATCH, G.L. et al. **Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif.** Gene, 1997

BOBULA, J. et al. **Why molecular chaperones buffer mutational damage: a case study with a yeast Hsp40/70 system.** Genetics, 2006.

BRANDEN C.; TOOZE J.. **Introduction to protein structure.** Garland, 1999.

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, 1976.

CAHILL, G.M.. **Clock mechanisms in zebrafish.** Cell Tissue Res. 2002.

CAPECCHI, M.R. **Altering the genome by homologous recombination.** Science 244: 1288-1292, 1989.

CHANG, C.C. et al. **Protein folding by a quasi-static-like process: a first-order state transition.** Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2002.

CHANG, H.C. et al. **In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60).** Mol Cell Biol, 1997

CHIARINI, L.B. et al. **Cellular prion protein transduces neuroprotective signals.** EMBO J., 2002.

CAPLAN, A.J. **What is a co-chaperone?** Cell Estresse Chaperones, 2003.

CLARK, G. **Staining procedures.** 4 ed. Baltimore. The Willians & Wilkins Company.
DODD, A. et al. **Zebrafish: bridging the gap between development and disease.** Hum. Mol. Genet, 2000.

DE CASTRO, E. et al. **Scan ProSita: detection of PROSITE signatura matches and ProRule associated functional and structural residues in proteins.** Nucleic Acids Research.

ESTRUCH, F. **Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast.** FEMS Microbiol Rev, 2000.

FASANO, C. et al. **Prions: protein only or something more? Overview of potencial prion cofactors.** J. Mol. Neurosci, 2006

FIRE, A. et al. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans.** Nature 391:806-811, 1998.

FISHMAN, M.C.. **Genomics. Zebrafish-the canonical vertebrate.** Science, 2001.

FRYDMAN, J. **Folding of translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones.** Annu Rev Biochem. 2001.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva.** 2. ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1993.

GASH, A.P. et al. **Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.** Mol Biol Cell, 2000.

GERHARD, G.S.. **Comparative aspects of zebrafish (Danio Rerio) as a model for aging research.** Exp. Gerontol. 2003.

GIBSON, G; HONEYCUTT, E.. **The evolution of developmental regulatory pathways.** Curr. Opin. Genet. Dev., 2002.

GLICKMAN, N.S.; YELON, D.. **Cardiac development in zebrafish:** coordination of form and function. Semin. Cell Dev. Biol. 2002.

GRUNWALD, D.J.; EISEN, J.S.. **Headwaters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate.** Nat. Rev. Genet. 2002.

GRIFFITHS, A.G.E. et al. **An introduction genetic analysis.** 7th ed. W.H. Freeman and co, 2000.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual.** 1 ed. CSH Press, USA, 1988.

HARTL, D.L. **Principles of population genetics.** 4. ed. Sunderland, 2007.

HENDERSON, B. et al. **Molecular chaperones and disease.** Inflamm Res, 1996.

HONG, J.T. et al. **Computing motif correlations in proteins.** J. Comput. Chem, 2003.

HJORTH, J.; KEY, B.. **Development of axon pathways in the zebrafish central nervous system.** Int J. Dev. Biol. 2002.

HULO, N. et al. **Recent improvements to the Prosite database.** Nucleic Acids Rescarch. 2004.

KEY, B.; DEVINE, C.A.. **Zebrafish as an experimental model:** strategies for developmental and molecular neurobiology studies. Methods Cell Sci. 2003.

KIMMEL, C.B. et al. **Stages of embryonic development of the zebrafish.** Dev. Dyn. 1995

KORNITZER, D.; CIECHANOVER, A.. **Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation.** J. Cell Physiol, 2000.

LASSLE, M. et al. **Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases.** J Biol Chem, 1997

LAWSON, N.D.; WEINSTEIN, B.M.. **Arteries and veins: making a difference with zebrafish.** Nat Rev. Genet. 2002.

LONGSHAW, V.M. et al. **Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases.** J. Cell Sci, 2004.

LOPES, M.H. et al. **Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways.** J. Neurosci, 2005.

MANSON, J.C. et al. **The transmissible spongiform encephalopathies: emerging and declining epidemics.** Biochem Soc Trans, 2006.

METSCHER, B.D.; AHLBERG, P.E.. **Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies.** Dev. Biol., 1999.

MORISHIMA, Y. et al. **The Hsp organizer protein hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system.** J. Biol Chem, 2000

NEUHAUSS, S.C.. **Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish.** J. Neurobiol, 2003.

NICOLET, C.M.; CRAIG, E.A.. **Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from Saccharomyces cerevisiae.** Mol Cell Biol. 1989

ODUNUGA, O.O. et al. **Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein.** Bioessays, 2004.

_____. **Tetratricopeptide Repeat Molif – mediated Hsc70-MSTI1 Interaction.** The journal of Biological Chemistry. 2003.

PIRES-DASILVA, A.; SOMMER, R.J.. **The evolution of signalling pathways in animal development.** Nat. Rev. Genet. 2003.

POSTLETHWAIT, J.H. et al. **Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map.** Nat Genet. 1998

PRUSINER, S.B. **Prions.** Proc Natl Acad Sci USA, 1998.

PURUGGANAN, M.D.. **The molecular evolution of development.** Bioessays, 1998.

REIMSCHUSSEL, R.. **A fish model of renal regeneration and development.** ILAR.J. 2001.

RIDLEY, M. **Evolução.** 3. ed. Artmed, 2006.

RUBINSTEIN, A.L.. **Zebrafish: from disease modeling to drug discovery.** Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2003.

SAKUDO, A. et al. **PrP cooperates with ST11 to regulate SOD activity in PRP-deficient neuronal cell line.** Biochem Biophys Res Commun, 2005.

SALAZAR-CIUDAD, I.; JERNVALL, J.; NEWMAN, S.A.. **Mechanisms of pattern formation in development and evolution.** Development, 2003.

SANGSTER, T.A. et al. **Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance.** Bioessays, 2004.

SCHEUFLER, C. et al. **Structure of TPR Domain – Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine.** Cell. 2000.

SHACTER, E. **Quantification and significance of protein oxidation in biological samples.** Drug Metab Rev, 2000.

SHAFIZADEH, E.; PAW, B.H.. **Zebrafish as a model of human hematologic disorders.** Curr. Opin. Hematol, 2004.

SIGRIST, C.J. et al. **Prosite: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors.** Oxford journals; Briefings in Bioinformatics. 2002.

STADMAN, E.R. et al. **Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences.** Antioxid Redox Signal, 2003.

STAINIER, D.Y.. **Zebrafish genetics and vertebrate heart formation.** Nat Rev. Genet. 2001.

TERAOKA, H. et al. **Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology.** Congenit. Anom. (Kyoto). 2003.

TOMASIEWICZ, H.G. et al. **Transgenic zebrafish model of neurodegeneration.** J. Neurosci. Res. 2002.

TONG, A.H. et al. **Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants.** Science 294:2364-2368, 2001.

TRAVER, D. et al. **The zebrafish as a model organism to study development of the immune system.** Adv. Immunol. 2003.

TROPEPE, V.; SIVE, H.L.. **Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism?** Genes Brain Behav. 2003.

VAN DER SAR, A.M. et al. **A star with stripes: zebrafish as an infection model.** Trends Microbiol. 2004.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. Guide for the laboratory use of Zebrafish (Danio rerio).** 3 ed. University of Oregon Press. Eugene, Oregon, USA.

WHITLOCK, K.E.. **A new model for olfactory placode development.** Brain Behav. Evol. 2004.

WHITFIELD, T.T.. **Zebrafish as a model for hearing and deafness.** J. Neurobiol. 2002.

YAMASHITA, M.. **Apoptosis in zebrafish development.** Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol Bio. 2003.

ZANATA, S.M. et al. **Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection.** EMBO J., 2002.

ZHANG, Y. et al. **Ehrlichia sennetsu groE operon and antigenic properties of the GroEL homolog.** FEMS Immunol Med Microbiol, 1997.

ZIMMER, A. **Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells.** Ann. Rev. Neurosci. 15:115, 1992.

8 ANEXOS

8.1 STI1 / *Mus musculus*



PS50005 TPR TPR repeat profile :

4 - 37: score = 10.532

VNELKEKGNKALSAGNIDDALQCYSEAIKLDPQN

38 - 71: score = 8.054

HVLYSNRSAAAYAKKGDYQKAYEDGCKTVDLKPDW

72 - 105: score = 6.136 [level tag: R]

GKGYSRKAALFLNRFEEAKRTYEEGLKHEANN

225 - 258: score = 10.561

ALKEKELGNDAYKKKDFDKALKHYDRAKELDPTN

259 - 292: score = 6.254 [level tag: R]

MTYITNQAAVHFEKGDYNKCRELCEKAIEVGREN

300 - 333: score = 9.912

AKAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFYNKSLAEHRTP

360 - 393: score = 9.352

ALEEKNGNECFQKGDYPQAMKHYTEAIKRNP

394 - 427: score = 8.349

AKLYSNRAACYTKLLEFQLALKDCEECIQLEPTF

428 - 461: score = 8.968

IKGYTRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSC

PS50293 TPR_REGION TPR repeat region circular profile :

4 - 105: score = 21.219

VNELKEKGNKALSAGNIDDALQCYSEAIKLDPQNHVLYSNRSAAAYAKKGDYQKAYEDGCK
TVDLKPDWGKGYSRKAALFLNRFEEAKRTYEEGLKHEANN

225 - 461: score = 31.661

ALKEKELGNDAYKKKDFDKALKHYDRAKELDPTNMTYITNQAAVHFEKGDYNKCRELCEK
AIEVGRENredyrqiAKAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFYNKSLAEHRTPdvlkccqqaek
ilkeqerlayinpdLALEEKNGNECFQKGDYPQAMKHYTEAIKRNPDAKLYSNRAACY
TKLLEFQLALKDCEECIQLEPTFIKGYTRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSC

8.2 ST11 / *Danio Rerio*



PS50005 TPR TPR repeat profile :

4 - 37: score = 10.561
VSQDKDQGNKALSAGNLEEAIRCYTEALTLDPSN

38 - 71: score = 7.788 [level tag: R]
HVLFSNRSAAAYAKKGDYDNALKDACQTIKIKPDW

72 - 105: score = 6.962 [level tag: R]
GKGYSRKAALFLGRLEDAKATYQEGLRQEPSN

224 - 257: score = 10.060
ALKEKELGNAAYKKKDFATALKHYYEAAIKHDPTN

258 - 291: score = 6.903 [level tag: R]
MTYLSNQAAVYFEKGFDFKCRELCEKAIDVGREN

299 - 332: score = 10.886
AKAYARIGNSYFKQEKYKEAVQFFNKSLTEHRTF

359 - 392: score = 8.585
ALEEKNKGNDAFQKGDYPLAMKHYSEAIKRNPYD

393 - 426: score = 6.372 [level tag: R]
AKLFSNRAACYTKLLEFQLALKDCEECINLDSTF

427 - 460: score = 10.886
IKGYTRKGAALAMKDFSKAMDVYQKALELDSNS

PS50293 TPR_REGION TPR repeat region circular profile :

4 - 105: score = 22.432
VSQDKDQGNKALSAGNLEEAIRCYTEALTLDPSNHVLFSNRSAAAYAKKGDYDNALKDACQ
TIKIKPDWGKGYSRKAALFLGRLEDAKATYQEGLRQEPSN

224 - 460: score = 31.560
ALKEKELGNAAYKKKDFATALKHYYEAAIKHDPTNMTYLSNQAAVYFEKGFDFKCRELCEK
AIDVGRENredyrqiAKAYARIGNSYFKQEKYKEAVQFFNKSLTEHRTFpdlkckcqeak
ilkeqekvayinpd1ALEEKNKGNDAFQKGDYPLAMKHYSEAIKRNPYDAKLFSNRAACY
TKLLEFQLALKDCEECINLDSTFIKGYTRKGAALAMKDFSKAMDVYQKALELDSNS

8.3 ST11 / *Homo sapiens*



PS50005 TPR TPR repeat profile :

4 - 37: score = 10.532
VNELKEKGNKALSVGNIDDALQCYSEAIKLDPHN

38 - 71: score = 8.054
HVLYSNRSAAAYAKKGDYQKAYEDGCKTVDLKPDW

72 - 105: score = 6.136 [level tag: R]
GKGYSRKAALFLNRFEEAKRTYEEGLKHEANN

225 - 258: score = 10.060
ALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPTN

259 - 292: score = 7.021 [level tag: R]
MTYITNQAAVYFEKGDYNKCRELCEKAIEVGREN

300 - 333: score = 9.912
AKAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFNKSLAEHRTP

360 - 393: score = 9.411
ALEEKNKGNECFQKGDYPQAMKHYTEAIKRNPKD

394 - 427: score = 8.349
AKLYSNRAACYTKLLEFQLALKDCEECIQLEPTF

428 - 461: score = 8.968
IKGYTRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSC

PS50293 TPR_REGION TPR repeat region circular profile :

4 - 105: score = 21.084
VNELKEKGNKALSVGNIDDALQCYSEAIKLDPHNHVLYSNRSAAAYAKKGDYQKAYEDGCK
TVDLKPDWKGKYSRKAALFLNRFEEAKRTYEEGLKHEANN

225 - 461: score = 31.965
ALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPTNMTYITNQAAVYFEKGDYNKCRELCEK
AIEVGRENredyrqiAKAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFNKSLAEHRTPdvlkkcqaek
ilkeqerlayinpdLALEEKNKGNECFQKGDYPQAMKHYTEAIKRNPDKAKLYSNRAACY
TKLLEFQLALKDCEECIQLEPTFIKGYTRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSC

8.4 SOLUÇÕES

8.4.1 Solução PBS 1x, ph 7,4; 500 ml volume final.

NaCl	4g
KCl	0,1g
Na ₂ HPO ₄	0,72g
H ₂ O destilada	500 ml

8.4.2 Solução de bloqueio 1; 5 ml volume final

Soro de Cabra	1 ml
DMSO	50 µl
Tween 20	5 µl
Solução PBS 1x, ph 7,4	5 ml

8.4.3 Solução PBST 0,05%; 100 ml volume final

Tween 20	50 µl
Solução PBS 1x, ph 7,4	100 ml

8.4.4 Solução TBS 1x, ph 7,4; 500 ml volume final

NaCl	4g
KCl	0,1g
Tris-base	1,5 g
H ₂ O destilada	500 ml

8.4.5 Solução DAB; 15 ml volume final

DAB	10 mg
Solução TBS 1x, ph 7,4	15 ml

8.4.6 Solução H₂O₂ 0,008%; 6 ml volume final

H ₂ O ₂ 30%	1,6 µl
H ₂ O destilada	6 ml