

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CECÍLIA MAYUMI SHIMOIDA DE CARVALHO

**QUANTIFICAÇÃO DE STI1 EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
ATRAVÉS DO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)**

CURITIBA

2010

CECÍLIA MAYUMI SHIMOIDA DE CARVALHO

QUANTIFICAÇÃO DE STI1 EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS ATRAVÉS DO MÉTODO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do Bacharelado em Ciências Biológicas. Realizado no Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Silvio Marques Zanata .

CURITIBA

2010

RESUMO

A STI1, *stress-inducible protein*, é uma proteína conservada entre diferentes espécies e possui expressão elevada em condições de estresse. Ela associa-se a outras proteínas como Hsps 70 e 90 e PrP^C promovendo diferentes funções. Esta proteína tem sido encontrada com expressão aumentada em vários tipos de câncer tais como pancreático, hepatocelular, ovariano e glioma. Assim, a quantificação de STI1 pelo método ELISA, uma técnica de sensibilidade, especificidade, precisão, de simples execução, baixo custo e rapidez, torna-se uma importante ferramenta para o estudo da STI1 em tumores. Neste trabalho foram testados dois tipos de ELISA: o indireto e o de competição de antígeno. No ELISA indireto a padronização das diluições do anticorpo primário (anti-STI1) e secundário (anti-IgG coelho) foi de 1:2000. O extrato total de encéfalo de camundongo após a sua preparação foi testado como possível fonte de antígeno STI1 na sua forma nativa. Esta amostra foi preparada através de uma centrifugação, então congelou-se o sobrenadante e depois do seu descongelamento foi utilizado nos experimentos. A faixa linear de detecção foi em µg/ml, de: 3,9; 2; 1 e 0,5. Problemas com a precipitação do antígeno STI1 recombinante foram parcialmente resolvidos a partir do armazenamento da solução antígeno em glicerol 20%. A amostra de MEM com e sem soro fetal bovino acrescida de STI1 recombinante (rec.) também foi testada, porém a absorvância de 1200 ng/ml de STI1 rec. nos dois tipos de MEM comparada a curva padrão foi menor. Dessa maneira optou-se em realizar o ELISA de competição de antígeno. Para o mesmo, na placa Nunc MaxiSorp, a determinação da quantidade de IgG de coelho anti-STI1 foi de 2,5 µg/ml, a diluição da extravidina-HRP foi de 1:2000 e a concentração de OPD foi de 0,8 mg/ml. A curva padrão de STI1 recombinante e STI1 recombinante biotinizada, com limite de saturação estabelecido em 150 ng/ml, foi parcialmente semelhante a curva descrita para a detecção de cGMP por ensaio imunoenzimático (manual), sendo necessário maior número de ensaios para obter uma curva melhor e verificar a reprodutibilidade. Mesmo assim a amostra de sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo, a mesma do ELISA indireto, foi testada, e não resultou em uma curva igual a curva padrão, logarítmica, mas conforme a quantidade de amostra e consequentemente de STI1 aumentava a absorvância diminuía, o que era esperado para o ELISA de competição de antígeno. Assim também é necessário realizar mais ensaios para obter uma curva dessa amostra semelhante a curva padrão. A amostra MEM sem soro fetal bovino também foi testada no ELISA de competição de antígeno. A detecção de STI1 nessa amostra foi mais baixa quando comparada com a curva padrão. Porém quando foi adicionada 1200 ng/ml de STI1 biotinizada a 50% MEM sem soro fetal bovino e 50% PBS-BSA 0,1%, e 25% MEM sem soro fetal bovino e 75% PBS-BSA 0,1%, e estas condições comparadas a PBS-BSA 0,1% com 1200 ng/ml de STI1 biotinizada, as absorvâncias foram semelhantes. Dessa maneira a amostra MEM sem soro fetal bovino pode ser diluída para detectar STI1, contudo mais ensaios deverão ser realizados para comprovar a evidência.

Palavras-Chave: STI1, ELISA indireto e ELISA de competição de antígeno, sobrenadante de extrato total de cérebro de camundongo, MEM.

ABSTRACT

The STI1, stress-inducible protein, is a protein conserved among different species and is up-regulated under stress conditions. It is associated with other proteins such as HSPs 70 and 90 and PrP^C triggers different functions. This protein has been found with increased expression in various cancers such as pancreatic, hepatocellular, ovarian and glioma. Thus, the quantification of STI1 by ELISA, a technique of sensitivity, specificity, accuracy, simple to execute, low cost and speed, it becomes an important tool for the study of STI1 in tumors. In this work we tested two types of ELISA: the indirect and the antigen competitive. In indirect ELISA the standardization dilutions of primary (anti-STI1) and secondary (anti-rabbit IgG) antibodies was of 1:2000. The total extract of mouse encephalon after preparation was tested as a possible source of the STI1 antigen in its native form. This sample was prepared by centrifugation, then the supernatant was frozen and after its thaw was used in experiments. The linear range of detection was in µg/ml of: 3.9, 2, 1 and 0.5. Problems with precipitation recombinant STI1 antigen were partially resolved by storage solution of antigen in 20% glycerol. The sample of MEM with and without fetal bovine serum plus recombinant STI1 (rec.) was also tested, but the absorbance of 1200 ng/ml STI1 rec. in both types of MEM compared to standard curve was lower. Thus it was decided to perform the antigen competitive ELISA. For the same, in the plate Nunc MaxiSorp, determination of the amount of rabbit IgG anti-STI1 was 2.5 µg/ml, dilution of HRP-extravidina was 1:2000 and OPD concentration was 0.8 mg/ml. The standard curve of recombinant STI1 and STI1 recombinant biotinylated, with saturation limit at 150 ng/ml, was partially similar to the curve described the detection of cGMP by enzyme immunoassay (guide), requiring more trials to get a better curve and check the reproducibility. Nevertheless, the supernatant of total extract of mouse encephalon sample, the same of indirect ELISA, was tested and did not result in a curve like the standard curve, logarithmic, but the amount of sample and consequently STI1 increased when the absorbance diminished, like was expected for the antigen competitive ELISA. So it is necessary to conduct more tests to get a curve of this sample similar to the standard curve. The pure MEM without bovine fetal serum sample was also tested in antigen competitive ELISA. The detection of STI1 in this sample was lower when compared with the standard curve. But when it was added 1200ng/ml of biotinylated STI1 in 50% of MEM without fetal bovine serum MEM and 50% PBS-BSA 0.1%, and 25% of MEM without fetal bovine serum and 75% PBS-BSA 0.1%, and this conditions compared with 0.1% BSA-PBS with 1200 ng / ml of biotinylated STI1, the absorbance value were similar. In this way, the MEM sample could be diluted to detect STI1, but further tests should be conducted to prove the evidence.

Key words: STI1, indirect ELISA and antigen competitive ELISA, supernatant of total extract of mouse brain, MEM.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	- Albumina sérica bovina
IgG	- Imunoglobulina do tipo G
kDa	- Quilodáton
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógenos
MEM	- Minimum Essential Médium
OPD	- o - fenilenodiamina
PBS	- Solução salina tamponada (pH=7,4) com fosfato
PKA	- Proteína quinase A
PMSF	- fenilmetilsulfonil fluoreto
Vn	- Vitronectina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 STI1	6
1.2 PRESENÇA DE STI1 EM TUMORES.....	9
1.3 MÉTODO ELISA.....	11
2 OBJETIVOS	15
OBJETIVO GERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 ANTICORPOS E STI1 RECOMBINANTE.....	16
3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	16
3.2.1 Extrato total de encéfalo de camundongo.....	16
3.2.1.1 Sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo.....	16
3.2.2 MEM.....	16
3.3 ELISA INDIRETO.....	17
3.3 BIOTINILAÇÃO DE STI1 RECOMBINANTE PARA O ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO.....	18
3.3.1 Diálise.....	18
3.3.2 ELISA para confirmação da biotinilação.....	18
3.6 ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 ELISA INDIRETO.....	21
4.2 BIOTINILAÇÃO DA STI1 RECOMBINANTE.....	30
4.3 ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO.....	31
5 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 STI1

A proteína STI1, *stress-inducible protein 1*, tem aproximadamente 66 kDa (ZANATA *et al.*, 2002). Ela foi descrita pela primeira vez na levedura *Saccharomyces cerevisiae* como mediadora da resposta ao choque térmico de alguns genes Hsp 70 (NICOLET; CRAIG, 1989).

Os mutantes de STI1 da levedura *S. cerevisiae*, demonstraram crescimento prejudicado, em temperaturas extremas. Além disso, um aumento na expressão de STI1 foi observado quando a temperatura é aumentada nas leveduras mutadas (NICOLET; CRAIG, 1989). Recentemente foi descrito que STI1 aumenta a termotolerância e a longevidade do verme *C. Elegans*, tendo sido demonstrado que sob elevadas temperaturas há aumento da expressão de STI1 neste organismo (SONG *et al.*, 2009). Em condições onde não há estresse térmico, encontrou-se a expressão da isoforma 0 (neutro) e (-1) em células NIH3T3 com plasmídeo de GST fusionado a STI1 murina (mSTI1). Porém, o tratamento com temperaturas mais elevadas nessas células provocou expressão da isoforma mais ácida (+1) e da isoforma mais básica (-1) (LÄSSLE *et al.*, 1997).

A mSTI1, 60 kDa, possui identidade aminoacídica de 97% com a IEF SSP 3521, ou seja, a STI1 humana, a qual é também conhecida como Hop (Hsp organizer protein). Outras comparações de mSTI1 com outros organismos mostram um grau de identidade de 44% com a STI1 da soja (*Glycine max*), 42% com a STI1 da levedura, 32% com a STI1 do parasita *Leishmania donovani*. A estrutura da mSTI1 é formada por 10 supostos motivos TPR em idêntico arranjo com IEF SSP 3521, porém em alguns há sobreposição de função. Por isso somente 6 possam ser funcionais (BLATCH *et al.*, 1997). Na mSTI1, há também seis potenciais sítios de caseína quinase II, havendo fosforilação pelas respectivas enzimas em ensaios *in vitro*. Há uma suposta sequência de aminoácidos de sinal nuclear, na mSTI1, compartilhada entre STI1 humana e soja. A STI1 pode estar envolvida no transporte de proteínas entre o compartimento nuclear e citosólico, uma vez que foi detectada nesses compartimentos por imunofluorescência e por supostamente possuir a sequência de aminoácidos de sinal nuclear (LÄSSLE *et al.*, 1997).

A mSTI1 já foi encontrada no citoplasma de células NIH3T3 (LÄSSLE *et al.*, 1997), na membrana celular de células HEK293T e neurônios (Zanata *et al.*, 2002) e na membrana e sobrenadante de frações de células HpL3-4-EM e HpL3-4-PrP (SAKUDO *et al.*, 2005).

Um dos outros papéis da STI1 é realizar a transferência de substratos entre as Hsps (Heat shock protein) 70 e 90, sendo uma ponte entre elas. As Hsps são chaperonas moleculares com função de montagem, dobramento, transporte, ativação de proteínas. A STI1 possui os motivos repetidos de tetratricopeptídeos (TPR) de uma sequência de 34 aminoácidos. Tais motivos são importantes tanto para sua ligação com as Hsps como para a manutenção da conformação de STI1. A região C-terminal de Hsp 70 interage com o motivo TPR1 enquanto a região C-terminal de Hsp 90 liga-se ao motivo TPR2a (FIGURA 1), sendo que a afinidade e a modulação da atividade de cada Hsp é regulada independentemente uma da outra (ODUNUGA *et al.*, 2003; SONG; MASISON, 2005).

Os resíduos Lys⁸, Asn¹², Asn⁴³, Lys⁷³ e Arg⁷⁷ compõem o domínio TPR1 de STI1, sendo os dois primeiros críticos para a ligação entre mSTI1 e Hsc70. Para que ocorra a completa e firme interação, os resíduos Ala⁴⁹ e Lys⁵⁰ são necessários para a ligação com outras regiões fora do domínio de TPR. A dupla mutação nos aminoácidos Leu¹⁵, Ala⁴⁹ leva a diminuição da interação entre STI1 e Hsc70, porém aumenta a interação da primeira com Hsp90 (ODUNUGA *et al.*, 2003).

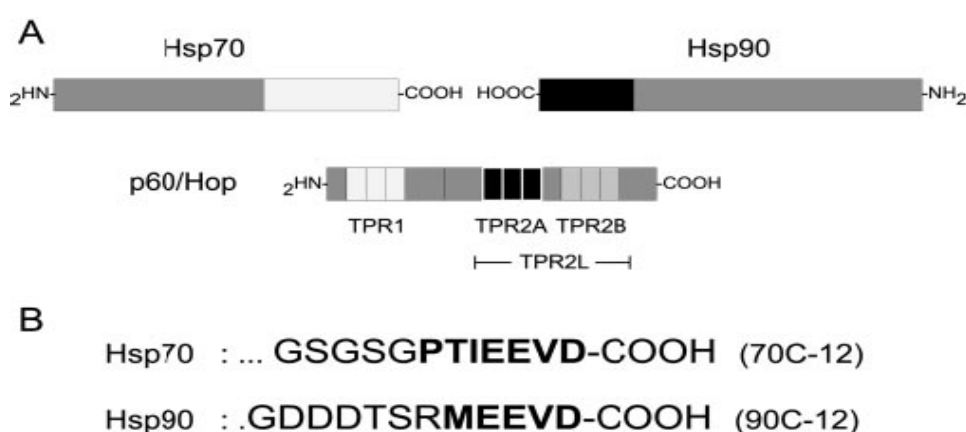


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DO COMPLEXO HSP 70-HOP-HSP 90 (BRINKER *ET AL.*, 2002).

A STI1 pode participar de complexos como heterocomplexo receptor glucocorticóide-hsp90 composto por Hsp70, Hsp40, Hop, Hsp 90, p23 e receptor glucocorticóide (GR). Este heterocomplexo forma um receptor de esteróides. Nele a Hsp 70 interage com GR na presença de Hsp 40 e ATP, na primeira etapa da montagem do heterocomplexo. Então a Hop acopla-se, em seguida a Hsp 90, na presença de ATP e por fim a p23. A presença de Hsp 70, Hsp 90 e ATP são essenciais para a formação do complexo. Além disso, a conformação dependente de ATP de Hsp 90 é necessária para que o esteróide seja acessível ao complexo. Neste contexto a proteína Hop aumenta a eficiência do complexo, estabilizando-o, porém a mesma aparentemente não é essencial para a ligação do esteróide (MORISHIMA *et al.*, 2000).

STI1 também interage com a proteína prion celular (PrP^C), a qual possui uma isoforma anormal (PrP^{SC}). PrP^{SC} é o constituinte dos prions, causador das encefalopatias espongiformes transmissíveis em humanos e animais. O PrP^C liga-se a membrana da célula através de âncora de glicosil fosfatidil inositol ou GPI (OESCH *et al.* 1985, apud MERLIN, 2005).

A interação de STI1 e PrP^C desencadeia várias ações diferentes como: a sobrevivência celular e diferenciação de astrócitos, pela via PKA e via ERK 1/2, respectivamente. Contudo, a STI1 regula a proliferação de astrócitos, inibindo esta ação, independente da interação com o PrP^C (ARANTES *et al.*, 2009). A associação das duas proteínas também induz a neuritogênese, dependente da via MAPK, aumentando o número de células com neuritos no hipocampo, mas sem modificar a média do número e comprimento de neuritos por célula. A STI1 associada ao PrP^C, promove ainda neuroproteção através da via PKA nos neurônios do hipocampo (LOPES *et al.*, 2005). No trabalho de Beraldo *et al.* (2010), a associação de STI1 e PrP^C ativa o canal de $\alpha 7$ nAChR, liberando Ca²⁺, o qual ativa as vias ERK 1/2 e PKA, as quais promovem a neuritogênese e a neuroproteção, respectivamente (BERALDO *et al.*, 2010).

No trabalho de Roffé *et al.* (2010) foi evidenciada que a interação de PrP^C e STI1 estimula o início da tradução neuronal, aumentando a sua síntese protéica, através das vias ERK1/2 e PI3K-mTOR, sendo esta última via utilizada tanto na neuroproteção quanto na neuritogênese. Nesta pesquisa, as linhagens de células neuronais N2a e SN-56 foram infectadas com PrP^{SC} resultando na redução da síntese de proteína e aumento da fosforilação de eIF2alfa, que reprime o início da tradução, independente da presença de

STI1.

A sinalização de STI1 aciona o sequestro de PrP^C, o qual é endocitado para ativar a via ERK 1/2. Porém a STI1 não precisa interagir com PrP^C para ser internalizada pelos neurônios (CAETANO *et al.*, 2008). Outra função na interação de STI1 e PrP^C é na formação da memória de curta duração e a consolidação da memória de longa duração (COITINHO *et al.*, 2007). A cooperação entre PrP^C e STI1 também aumenta a atividade da enzima superóxido mutase (SOD), inibindo a morte celular (SAKUDO *et al.*, 2005).

A expressão de STI1, PrP^C e Vn, foi investigada por Hajj *et al.* (2009) na vida embrionária de rato, do estágio E8 ao E18. A Vn é uma proteína da matriz extracelular e ligante de PrP^C. A expressão de STI1 foi observada em todos os órgãos e mantida em níveis constantes no desenvolvimento, iniciando em E8 até E10. Esta ampla distribuição é compatível com seu papel fisiológico de co-chaperona. PrP^C, STI1 e Vn também estavam presentes no coração, indicativa de que estas proteínas além de atuarem no sistema nervoso, podem possuir outros papéis como o de diferenciação e sobrevivência celular em outros tecidos. Em animais nocaute para PrP^C, as proteínas STI1 e Vn apresentaram o mesmo modelo de expressão observado em animais selvagens, na maioria dos tecidos. Isso poderia ser atribuído a interação da STI1 e Vn com outros receptores celulares, substituindo a perda do PrP^C.

Dados do grupo de Neurobiologia da UFPR ainda não publicados mostram que a proteína STI1 está presente em plaquetas e micropartículas humanas. Outros dados, desse mesmo grupo, apresentam que STI1 pode interagir especificamente com a GTPase de baixa massa molecular Rnd1 (MERLIN, 2005; SOUZA, 2007).

1.2 PRESENÇA DE STI1 EM TUMORES

Estudos demonstraram que a STI1 pode estar presente em tumores. Um deles revelou que há maior quantidade de Hsp90 associada ao complexo multi-chaperônico (Hsp40, Hsp70, Hop, p23) e maior atividade da ATPase de Hsp90 em células e tecidos tumorais, quando comparados com as células e tecidos normais. O complexo multi-chaperônico é encontrado somente em células tumorais. O inibidor 17-AAG sintético de Hsp90 possuía maior afinidade com Hsp90 e diminuía mais a atividade de ATPase de

tecidos e células tumorais em relação a células e tecidos normais, devido ao Hsp90 estar acoplado ao complexo. Dessa maneira, tal inibidor causa a morte seletiva de células tumorais, se tornando alvo potencial para tratamento do câncer (KAMAL *et al.*, 2003).

Outro estudo revelou que a STI1 induz a proliferação de gliomas de forma dependente da interação com PrPc, através das vias MAPK e PI3K. Entretanto, em astrócitos não tumorais, a STI1 não induz a proliferação deste tipo celular, levando a sugestão de que o complexo formado pelas proteínas Hsp40, Hsp70, Hsp90, Hop, p23 esteja presente somente em gliomas como explicado no caso acima (KAMAL *et al.*, 2003; ERLICH *et al.*, 2007).

As linhagens humanas HT-1080 (fibrosarcoma) e MDA-MD231 (carcinoma mamário) secretam Hsp90alfa e STI1, as quais podem formar um complexo junto com outras co-chaperonas ativando a MMP2 e ocorrendo, em seguida, a invasão tumoral (EUSTACE; JAY, 2010).

No trabalho de tecidos de carcinoma hepatocelular com infecção de vírus de hepatite B, através de eletroforese bidimensional (2D DIGE), detectou-se elevação da expressão das proteínas das famílias Hsp 70 e 90 e STI1, e hnRNP C1/C2 (correlacionada com a atividade da telomerase) enquanto decaiu a expressão de proteínas associadas ao metabolismo. A superexpressão de STI1 e de hnRNP C1/C2, foi confirmada por Western Blot e Imuno-histoquímica, levando a adquirirem um possível status de biomarcador para o tipo de tumor deste trabalho. (SUN *et al.*, 2007).

Em outro estudo proteômico de tumor pancreático, através da mesma técnica citada acima, detectou-se elevação de níveis das proteínas para o citoesqueleto (vimentina, vinculina, tubulina alfa-6, tubulina beta-tubulina, alfa-tubulina e gama actina), das famílias chaperonas (heat shock, MTHSP75, KIAA0098, STIP1) e proteínas associadas com tradução, transporte, sinalização, atividade de ligase. A redução de proteínas foi detectada para aquelas relacionadas a mitocôndrias (WALSH *et al.*, 2009).

Recentemente o grupo de Wang *et al.* (2010) mostrou que a STI1 é secretada por cânceres ovarianos, e detectada em sangue periférico. Assim esta proteína poderia adquirir o status de biomarcador para este tipo de câncer, mesmo em estágio inicial. O ELISA sanduíche, com o anticorpo detector biotinilado, foi uma das técnicas utilizadas neste estudo para quantificar a STI1 em soros de pacientes saudáveis e com câncer de ovário. A mínima sensibilidade de detecção do ELISA era 2 ng/ml. As pacientes com câncer de ovário apresentaram níveis mais altos de STI1 (137.4 ± 112.7 ng/ml, n=43) em relação as pacientes saudáveis (23.8 ± 15.1 ng/ml, n=43), sendo que ambos os grupos de

pacientes não apresentaram diferença estatística de idade. A STI1 é secretada pelos tecidos com câncer de ovário para o sangue. Outros estudos, *in vitro*, do mesmo grupo mencionado, sugeriram que a STI1 promove proliferação das células de cânceres ovarianos através da via ERK. Apesar dos resultados demonstrarem que a STI1 é um potencial biomarcador, não haveria uma indicação de qual tecido produz a proteína, pois há muitos outros tecidos tumorais que poderiam secretar STI1.

1.3 MÉTODO ELISA

A STI1 como citada acima é secretada por diferentes células tumorais, sendo uma possível proteína indicativa para a presença delas. Assim, neste trabalho foi realizada uma padronização de quantificação de STI1 pelo método imunoenzimático (EIA ou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)) baseado em microplacas, como uma possível ferramenta para detectar STI1 qualitativamente e quantitativamente, indicando ou não a presença de tumores. O trabalho de Wang *et al.* (2010) demonstrou isso através do ELISA sanduíche que detectou e quantificou STI1.

Os ensaios imunoenzimáticos podem ser divididos em 3 principais tipos. Há o ELISA indireto (FIGURA 2) que consiste em imobilizar o antígeno no poço, adicionar o anticorpo primário e depois o anticorpo secundário conjugado a uma enzima, seguido de agente cromogênico e o substrato. Após é realizada a leitura da absorbância. Neste tipo de ELISA, quanto maior a absorbância maior é a quantidade de antígeno. Há o ELISA de competição de antígeno e o de anticorpo. O ELISA de competição de antígeno (FIGURA 3) consiste em imobilizar o anticorpo no poço, adicionar o antígeno marcado e não marcado, seguido de agente cromogênico e o substrato. A competição entre antígeno marcado e não marcado (amostra) pelo mesmo anticorpo irá evidenciar ou não a presença do antígeno no analito. Nesse tipo de ELISA de competição quanto menor a absorbância maior é a quantidade do antígeno. Já no ELISA de competição de anticorpo (FIGURA 4), o antígeno é imobilizado, adiciona-se o anticorpo marcado e a amostra contendo ou não o antígeno. A competição entre o antígeno imobilizado e em solução, levará à ligação do anticorpo marcado pelo antígeno imobilizado ou pelo antígeno em solução. Os anticorpos marcados ligados ao antígeno de solução serão lavados e logo não serão detectados, assim quanto maior a quantidade de antígeno em solução menor é

absorbância. Após etapa de lavagem, adiciona-se o agente cromogênico e o substrato, para posterior leitura dos poços. Finalmente o ELISA sanduíche (FIGURA 5) consiste em imobilizar anticorpo no poço, adição da amostra contendo ou não o antígeno de interesse e por fim outro anticorpo específico marcado com enzima, seguido de agente cromogênico e o substrato. Neste último caso, anticorpo de captura e revelação devem especificamente reconhecer o antígeno, porém por epítopos diferentes, para não haver competição dos anticorpos pelo antígeno (SCROFERNEKER; POHEMANN, 1998). Neste tipo de ELISA, quanto maior a absorbância maior é a quantidade de antígeno. Neste projeto foi desenvolvido a padronização de dois desses tipos de ELISAs para detecção de STI1 em amostras biológicas. O primeiro ELISA testado foi o ELISA indireto e então o ELISA de competição de antígeno marcando a STI1 recombinante por biotilação.

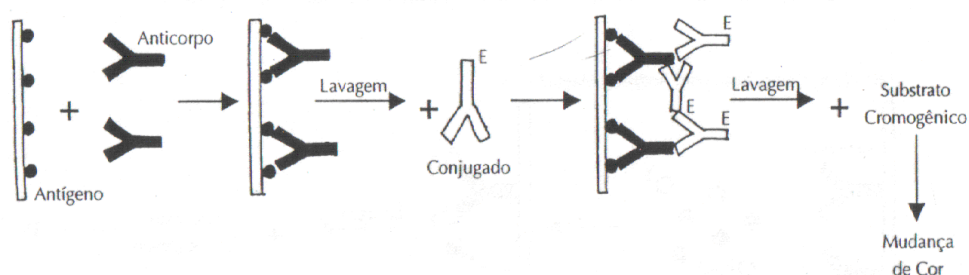


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELISA INDIRETO (SCROFERNEKER; POHEMANN, 1998).

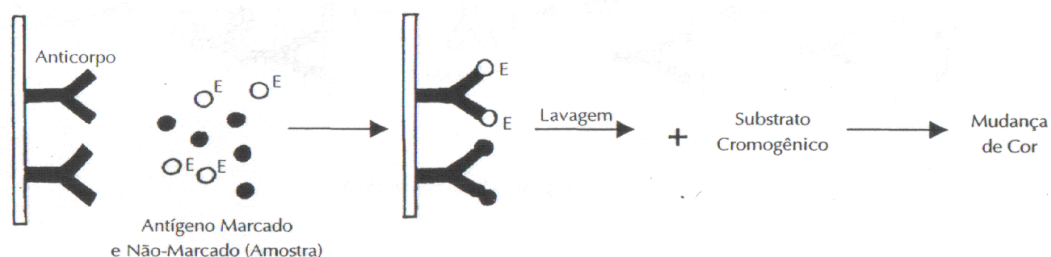


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO (SCROFERNEKER; POHEMANN, 1998).

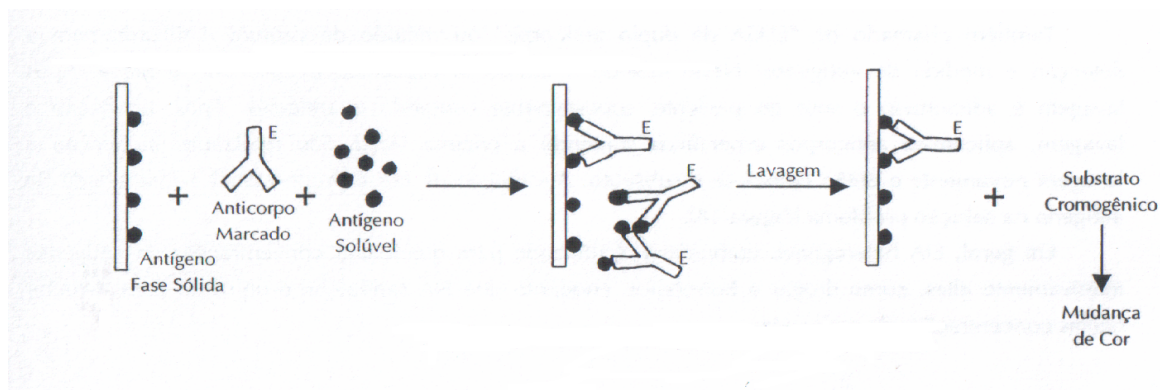


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTICORPO (SCROFERNEKER; POHEMANN, 1998).

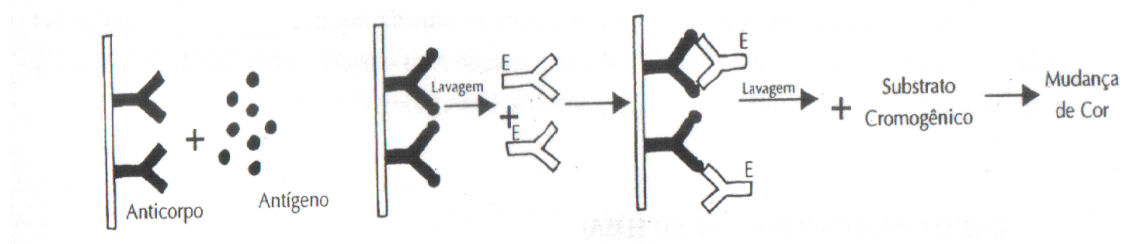


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELISA SANDUÍCHE (SCROFERNEKER; POHEMANN, 1998).

O grupo de Cai *et al.* (2009) utilizou o ELISA sanduíche para detectar a quantidade de vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos. Foi desenvolvido um anticorpo contra o nucleocapsídeo do vírus presente na população de suínos norte americanos e europeus. O ensaio detectou quantidades tão baixas como 0,4 ng a 0,8 ng. Apesar da STI1 não ter sido o antígeno de estudo neste trabalho, e ser utilizado o ELISA sanduíche, método não empregado no trabalho, o artigo demonstra a sensibilidade, especificidade e precisão do método ELISA.

Um modelo de cinética para simulação da curva de um ELISA de competição de antígeno foi desenvolvido, a fim diminuir a realização de experimentos que demandam

muito esforço e tempo, apesar do ELISA ser considerado um método rápido, de alta sensibilidade e de baixo custo. Através do cálculo da associação e dissociação do antígeno e antígeno conjugado a enzima, os quais dependem das suas difusões, podem ser calculadas as possíveis absorvâncias de determinadas concentrações. No modelo realizado foi calculado o limite de detecção, devendo ser baixo e o intervalo das quantidades, devendo ser amplo, além da precisão do perfil. O desenvolvimento do modelo de cinética requer conhecimento das taxas de associação e de dissociação de um anticorpo contra um antígeno, encontradas em bibliotecas de fago de anticorpo (CHOI *et al.*, 2007).

A sensibilidade, especificidade, precisão, simples execução, baixo custo e rapidez da técnica, como demonstrados nos trabalhos de Cai *et al.* (2009), Wang *et al.* (2010) e Choi *et al.* (2007) foram fatores para a escolha do ELISA como o método para padronização da detecção de ST11. No trabalho de Wang *et al.* (2010), por exemplo, a mínima de sensibilidade do ELISA sanduíche foi de 2 ng/ml. Outro exemplo é a mínima de sensibilidade de 0,4 ng a 0,8 ng no trabalho de Cai *et al.* (2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a quantificação de STI1 de amostras biológicas pelo método de ELISA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar a diluição dos anticorpos para o ELISA indireto.
- b) Padronizar a curva de STI1 recombinante (rec.), curva padrão, para o ELISA indireto.
- c) Padronizar a curva de detecção de STI1 de amostra biológica para o ELISA indireto.
- d) Padronizar condições para manutenção da estabilidade química dos reagentes durante seu armazenamento para o ELISA indireto.
- e) Estabelecer metodologia para biotilação de STI1 rec. para o ELISA de competição de antígeno.
- f) Padronizar a quantidade de anticorpo a ser imobilizado e a diluição da extravidina-HRP para o ELISA de competição de antígeno.
- g) Padronizar a curva de STI1 rec. biotilada, curva padrão, para o ELISA de competição de antígeno.
- h) Padronizar a curva de detecção de STI1 de amostra biológica para o ELISA de competição de antígeno.
- i) Padronizar condições para manutenção da estabilidade química dos reagentes durante seu armazenamento para o ELISA de competição de antígeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANTICORPOS E STI1 RECOMBINANTE

A proteína STI1 recombinante (rec.), anticorpo anti-STI1 policlonal (soro), anticorpo IgG coelho anti-STI1 purificado e soro pré-imune de coelho foram produzidos no laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor Ciências Biológicas, UFPR de acordo com Zanata *et al.* (2002).

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.2.1 Extrato total de encéfalo de camundongo

O extrato total de encéfalo de camundongo foi produzido no laboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor Ciências Biológicas, UFPR conforme Zanata *et al.* (2002).

3.2.1.1 Sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo

Após descongelamento do extrato total de encéfalo de camundongo, o mesmo foi centrifugado por 20 min. a 4°C a 23000xg (minicentrífuga Sorvall fresco), para eliminação das crioproteínas insolúveis.

3.2.2 MEM

O meio de cultivo de células eucarióticas (MEM) puro, que não provém de células

transfectadas, com e sem 10% de soro fetal bovino (Culti Lab. Campinas), foi acrescido de STI1 recombinante, ou STI1 recombinante biotinizada, nas concentrações indicadas em cada experimento nos resultados. A biotinição da STI1 recombinante será descrita a seguir.

3.3 ELISA INDIRETO

Os poços da placa (Imunolon II 96 microtiter plates (Dynatech)), foram imobilizados com STI1 rec. e o sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo ou MEM acrescido de STI1 rec., previamente diluídos em tampão carbonato (50 mM, pH 9,6), exceto o MEM acrescido de STI1 rec., num volume final de 50 µl por poço, em concentrações indicadas em cada experimento nos resultados, durante 16 horas a 4°C. Então os poços foram lavados 3 vezes com PBST (PBS (solução salina tamponada (pH=7,4) com fosfato) acrescido de 0,05% Tween), 5 min. cada vez. Após os poços foram incubados com PBS-BSA (1% BSA (Albumina sérica bovina)), num volume final de 200 µl por poço, durante 2 horas a 37°C. Depois os poços passaram por um novo ciclo de lavagem. Os poços foram incubados com anticorpo primário anti-STI1 policlonal (soro), e soro pré-imune de coelho como controle negativo, diluídos em PBS-BSA (0,1% BSA), num volume final de 100 µl por poço, em diluição indicada em cada experimento nos resultados, durante 2 horas a 37°C. Na sequência, os poços passaram por um novo ciclo de lavagem. Após, os poços foram incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (KPL) diluído em PBS-BSA (0,1% BSA), num volume final de 100 µl por poço, em diluição indicada em cada experimento nos resultados, durante 1 hora a 37°C. Os poços passaram por um novo ciclo de lavagem. Na etapa seguinte os poços foram incubados com a solução (0,2% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 0,2 mg/ml de OPD (o-fenilenodiamina) e tampão citrato), num volume final de 100 µl por poço, em local escuro. Após o aparecimento da coloração, foi adicionada 50 µl por poço da solução 1M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Finalmente a absorbância foi tomada em leitor de microplacas (Meridian modelo Elx800) com filtro 490 nm. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística em BrOffice.org Calc.

3.4 BIOTINILAÇÃO DE STI1 RECOMBINANTE PARA O ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO

Para a biotinilação da STI1 rec. foi utilizado o agente cross-ligante “Sulfo-NHS-LC-biotin” (Pierce Co.) seguindo o seu manual de instruções. A etapa de incubação no gelo, foi na câmara fria a 4°C por 2 horas, com homogeneização da solução (STI1 rec., PBS e o agente cross-ligante) no orbital. Após a etapa de acoplamento covalente da biotina foi realizada a diálise para eliminação da biotina livre e então o teste por ELISA para verificar se houve biotinilação.

3.4.1 Diálise

O conteúdo da biotinilação foi colocado num tubo de diálise pré-preparado (Prepared Dialysis Tubing, BRL) e amarrado firmemente com barbante. Então o tubo foi colocado em 2 litros de PBS e deixou-se agitando a 4°C por 2 horas. Após este tempo, foi trocado o PBS, com o mesmo volume e deixou-se agitando, por 16 horas a 4°C. No dia seguinte foi realizada uma nova troca de PBS, com o mesmo volume e deixou-se agitando por 2 horas a 4 °C. Após a diálise foi realizada a quantificação da concentração de STI1 rec. biotinilada pelo método de Bradford.

3.4.2 ELISA para confirmação da biotinilação

Os poços da placa (Imunolon II 96 microtiter plates (Dynatech)) foram imobilizados com 1200 ng/ml de STI1 rec. biotinilada, como positivo e 1200 ng/ml STI1 rec., como negativo, diluídos em tampão carbonato (50 mM, pH 9,6), num volume final de 50 µl por poço, durante 16 horas a 4° C. Então os poços foram lavados 3 vezes com PBST (PBS acrescido de 0,05% Tween), 5 min. cada vez. Após os poços foram incubados com PBS-BSA (1% BSA), 200 µl por poço, durante 2 horas a 37°C. Na sequência, os poços passaram por um novo ciclo de lavagem. Os poços foram incubados com extravidina-HRP (conjugada com peroxidase) (Sigma), diluída em PBS-BSA (0,1% BSA)

em 1:3000, num volume final de 100 µl por poço, durante 1 hora a 37°C. Os poços passaram por um novo ciclo de lavagem. Na seguinte etapa os poços foram incubados com a solução (0,2% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 0,2 mg/ml de OPD e tampão citrato), 100 µl por poço, em local escuro. Após o aparecimento da coloração, foi adicionada 50 µl por poço da solução 1M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Finalmente a absorbância foi tomada em leitor de microplacas (Meridian modelo Elx800) com filtro 490 nm.

3.4.3 ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO

Os poços da placa Nunc MaxiSorp F96 ou F8 foram previamente incubados com tampão carbonato, num volume de 50 µl por poço, durante 5 min. Após o anticorpo IgG coelho anti-STI1 purificado foi diluído em tampão carbonato, conforme concentração indicada em cada experimento nos resultados, num volume final de 50 µl por poço. Depois o anticorpo foi imobilizado na placa Nunc MaxiSorp F96 ou F8 a 4°C por 16 horas. Para o controle negativo (inespecífico) não foi imobilizado anticorpo. Então os poços foram lavados 3 vezes com PBS, 5 min. cada vez. Após os poços foram incubados com PBS-BSA (1% BSA), 200 µl por poço, durante 2 horas a 37°C. Depois os poços foram lavados 3 vezes com PBST (PBS acrescido de 0,05% Tween), 5 min. cada vez. Os poços foram incubados com STI1 rec. biotinizada + STI1 rec., e o sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo + STI1 rec. biotinizada ou MEM acrescido de STI1 rec. + STI1 rec. biotinizada, diluídos em PBS-BSA (0,1% BSA), em concentrações indicadas em cada experimento nos resultados, num volume final de 100 µl por poço, durante 2 horas a 37°C. Na sequência, os poços passaram por um novo ciclo de lavagem, como realizado com PBST. Os poços foram incubados com extravidina conjugada com peroxidase (Sigma), diluída em PBS-BSA (0,1% BSA), na diluição indicada em cada experimento nos resultados, num volume final de 100 µl por poço, durante 1 hora a 37°C. Os poços passaram por um novo ciclo de lavagem como realizado com PBST. Na seguinte etapa os poços foram incubados com a solução (0,2% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 0,2 mg/ml de OPD e tampão citrato), num volume final de 100 µl por poço, em local escuro. Após o aparecimento da coloração, foi adicionada 50 µl por poço da solução 1M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Finalmente a absorbância foi tomada em leitor de microplacas (Meridian

modelo Elx800) com filtro 490 nm. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística em BrOffice.org Calc.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ELISA INDIRETO

A padronização da quantificação da STI1 de amostras biológicas foi iniciada com a tentativa do ELISA indireto. Um experimento foi realizado, de acordo com a metodologia do ELISA indireto, para determinar a diluição de anticorpo primário anti-STI1 policlonal (soro), positivo, o soro pré-imune de coelho como controle negativo, e o anticorpo secundário anti-IgG coelho (FIGURA 6). A concentração de STI1 recombinante imobilizada em cada poço foi de 4 µg/ml. As diluições do anticorpo primário, anti-STI1 policlonal (soro), positivo e o soro pré-imune de coelho como controle negativo, foram de 1:1000, 1:2000, 1:4000. Estas diluições foram realizadas em diluição seriada. As diluições do anticorpo secundário foram de 1:1000, 1:2000, 1:4000 para cada diluição seriada do anticorpo primário. A quantidade de OPD não era fixa em todos os ensaios, já que não era pesada. Assim normalmente era empregada em excesso. A reação foi paralisada após 5 min. A paralisação da reação também variou de experimento para experimento, dependendo do aparecimento da coloração desejada. Pela análise do resultado, a melhor diluição tanto do anticorpo primário quanto de secundário foi de 1:2000, pois a absorbância (aproximadamente 2) não era tão alta quanto 3 (passado desse valor o leitor de placa não realiza a leitura) e nem tão baixa quanto 0,5 (absorbâncias baixas não são precisas). Dessa forma havia uma margem de segurança para absorbância variar. Esta diluição do anticorpo primário e secundário (1:2000) foi utilizada nos ensaios seguintes, por isso não será referida quando os próximos experimentos forem descritos, exceto se não seguir o padrão.

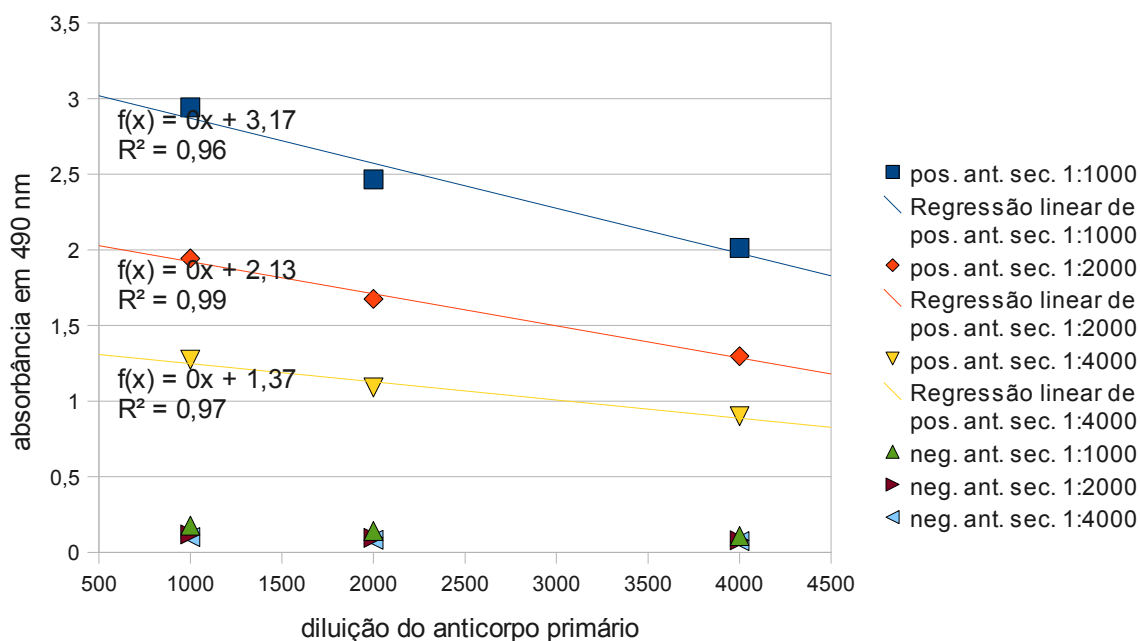


FIGURA 6 - DETERMINAÇÃO DAS DILUIÇÕES DOS ANTICORPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO
 FONTE: A autora (2010)

A concentração de STI1 recombinante imobilizada em cada poço foi de 4 µg/ml. As diluições seriadas do anticorpo primário, anti-STI1 soro policlonal (refere-se ao positivo na legenda do gráfico) e o soro pré-imune de coelho (refere-se ao negativo na legenda do gráfico) foram de 1:1000, 1:2000, 1:4000. As diluições do anticorpo secundário anti-IgG coelho foram de 1:1000, 1:2000, 1:4000 para cada diluição seriada do anticorpo primário. A reação foi paralisada após 5 min. O experimento foi realizado em monoplicata e n=1.

Após estabelecer as diluições do anticorpo primário e secundário foi testada a primeira amostra no ELISA indireto: o sobrenadante (SN) de extrato total de encéfalo de camundongo (ET.) que foi descongelado para utilizar em um novo ensaio. Neste, foi realizada também a curva padrão de STI1 rec. O experimento foi realizado, de acordo com o materiais e métodos do ELISA indireto imobilizando as concentrações em cada poço, em µg/ml: 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 de STI1 rec. e para o sobrenadante de ET. foram utilizadas as concentrações, por poço, em µg/ml: 1,4736; 1,1866; 0,594; 0,297; 0,1486. A STI1 rec. e o sobrenadante de ET. foram diluídos em tampão carbonato, num volume final de 50 µl/poço. A reação foi paralisada após 5 min. O ensaio foi realizado em duplicata e n=1 (resultados não apresentados). Na curva de STI1 rec. a linearidade iniciou no intervalo de 0,5 µg/ml a 0,25 µg/ml. Na curva de sobrenadante de ET. as absorvâncias aumentavam a medida que as quantidades correspondentes diminuía, provavelmente devido à presença do detergente, precipitação e a grande quantidade de proteínas. O detergente bloqueia os poços da placa impedindo que a STI1 adsorva nos poços. A precipitação impede que a STI1 se imobilize no poço fortemente, já que é insolúvel. A

quantidade de proteína presente no SN de ET. liga-se ao poço e menos STI1 é adsorvido.

Então, outro experimento foi realizado de acordo com materiais e métodos do ELISA indireto somente com sobrenadante de ET. e foram utilizadas as concentrações, por poço, em $\mu\text{g/ml}$: 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1 e 0,5, na etapa da imobilização do antígeno. As concentrações foram diluídas em 100 μl /poço de tampão carbonato, ao invés de 50 μl /poço, para diminuir os fatores interferentes (detergente, precipitação e grande quantidade proteína na amostra), os quais dificultavam a imobilização de STI1 da amostra nos poços (FIGURA 7). A reação foi paralisada após 5 min. Nesse ensaio, no intervalo de 500 a 62,5 $\mu\text{g/ml}$ de sobrenadante de ET. as absorbâncias aumentavam a medida que as quantidades correspondentes reduziam, por causa dos fatores citados acima. Então, no intervalo de 31,3 $\mu\text{g/ml}$ a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ as absorbâncias reduziam conforme as quantidades correspondentes diminuíam, possivelmente porque o sobrenadante de ET. diluiu o suficiente para não haver mais interferência das condições citadas. Pela análise do resultado a melhor faixa para determinar a quantidade de STI1 neste tipo de amostra foi de 31,3 $\mu\text{g/ml}$ a 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Esta faixa foi utilizada nos ensaios seguintes, por isso não será referida quando os próximos experimentos forem explicados, exceto se não seguir o padrão.

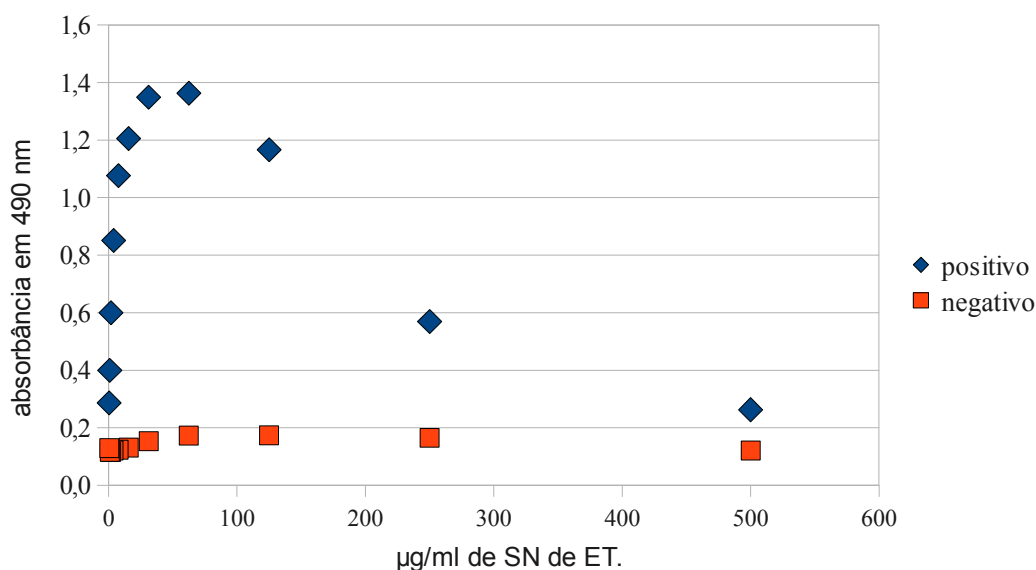


FIGURA 7 - DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE

CAMUNDONGO

FONTE: A autora (2010)

Foram utilizadas as concentrações de sobrenadante de ET., por poço, em $\mu\text{g/ml}$: 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1 e 0,5, na etapa da imobilização do antígeno. Os poços foram incubados após com anti-STI1 soro policlonal (positivo na legenda do gráfico) e com o soro pré-imune de coelho (negativo na legenda do gráfico). A reação foi paralisada após 5 min. O experimento foi realizado em triplicata e $n=1$.

Para melhor visualização da faixa que é possível quantificar STI1 (31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$) realizou-se a FIGURA 8.

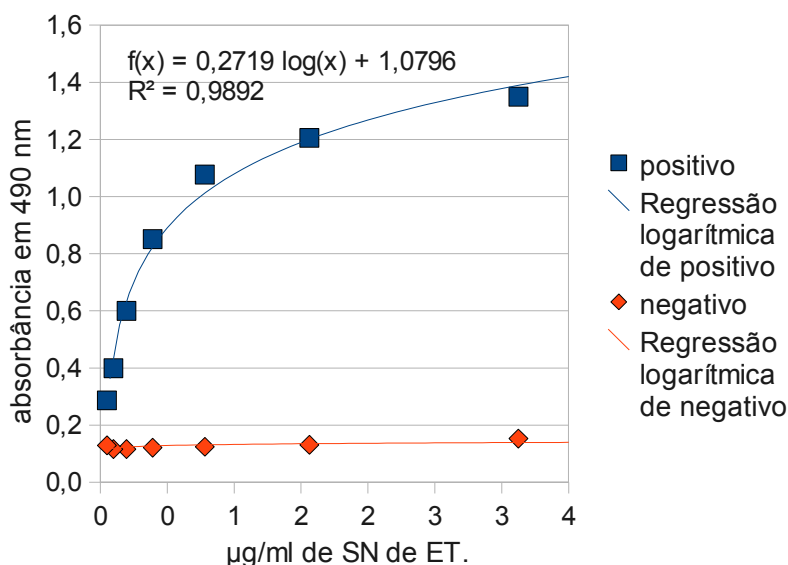


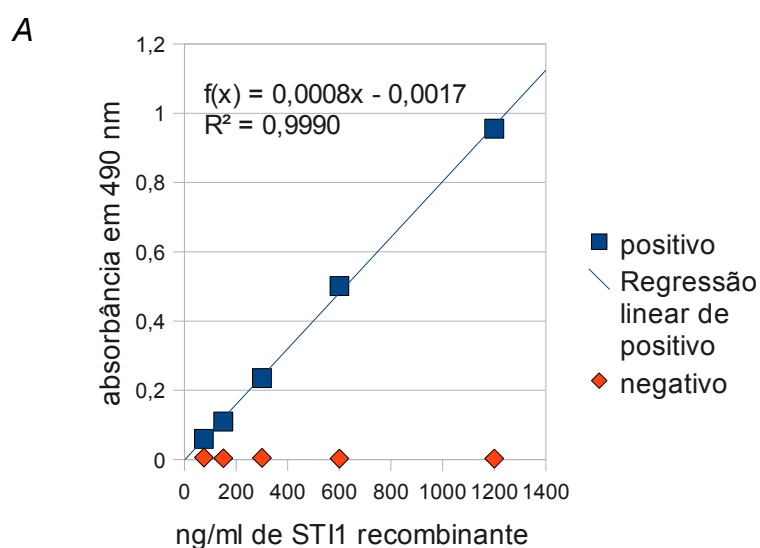
FIGURA 8 – CURVA DE SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO NA FAIXA DE 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Depois de estabelecer a faixa das quantidades de sobrenadante de ET., experimentos foram realizados com a curva padrão de STI1 rec. e o sobrenadante de ET.

Assim, um ensaio foi realizado (gráficos não apresentados) para a curva de STI1 rec., utilizando as concentrações em ng/ml , por poço: 300; 150; 75; 37,5; 19; 9,4 e 4,7. Para obter a equação da curva, os 5 primeiros pontos foram utilizados. Neste experimento, a curva do sobrenadante de ET. foi realizada também, conforme o estabelecido, podendo ser obtida a quantificação de STI1 nessa amostra a partir da curva de STI1 rec., a qual apresentou absorbâncias um pouco baixas, isto é, o primeiro ponto apresentando absorbância abaixo de 1. A reação foi paralisada após 5 min. O experimento foi realizado em duplicata e $n=1$.

Um novo ensaio (gráficos não apresentados) foi realizado, para obter maior

absorbância na primeira concentração, utilizando novas concentrações na curva de STI1 rec., em ng/ml, por poço: 600; 300; 150; 75; 37,5; 19; 9,4 e 4,7, na etapa de imobilização do antígeno. Para realizar a equação da curva utilizou-se os 5 primeiros pontos. As absorbâncias foram consideradas ainda um pouco baixas, isto é, o primeiro ponto apresentando absorbância abaixo de 1. A curva do sobrenadante de ET. também foi realizada, conforme o estabelecido. A reação foi paralisada após 15 min. O experimento foi realizado em duplicata e $n=1$. A partir do mesmo foi aumentada a quantidade de OPD para obter maiores absorbâncias. Por fim, no outro ensaio foi estabelecida a curva de STI1 rec. com as concentrações, por poço, em ng/ml: 1200; 600; 300; 150; 75; 37,5; 19 e 9,4, para garantir que a primeira concentração resultasse num valor de absorbância acima de 1. A equação da curva foi realizada utilizando os 5 primeiros pontos (FIGURA 9). Neste experimento, a curva do sobrenadante de ET. foi realizada também, conforme o estabelecido podendo ser obtida a quantificação de STI1 dessa amostra a partir da curva de STI1 rec. (TABELA 1). Com as concentrações em $\mu\text{g/ml}$, por poço: 39; 2; 1 e 0,5 do sobrenadante de ET. foi obtida uma curva linear (FIGURA 3), porém ainda imobilizava-se a amostra a partir da concentração de 31,25 $\mu\text{g/ml}$ para obter uma margem de segurança da absorbância. A reação foi paralisada após 15 min. Para calcular a quantidade de STI1 no sobrenadante de ET., utilizou-se a equação da curva de STI1 rec., substituindo o $f(x)$ dessa equação pela absorbância da curva de sobrenadante de ET. Os próximos experimentos foram realizados de acordo com este experimento. Exceto dois ensaios não seguiram esse padrão, o que será descrito no trabalho.



B

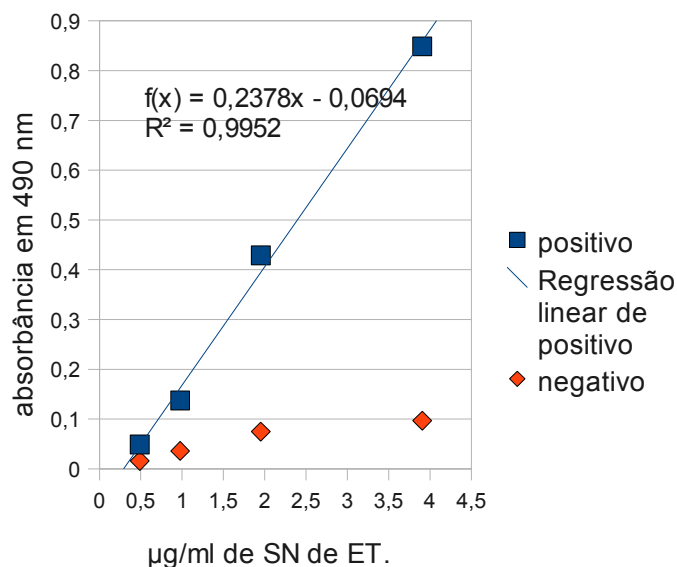


FIGURA 9 - CURVA PADRÃO DE STI1 RECOMBINANTE E SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO

FONTE: A autora (2010)

As quantidades de STI1 rec. e sobrenadante de ET. foram incubadas com anti-STI1 soro policlonal, (positivo na legenda dos gráficos) e com o soro pré-imune de coelho (negativo na legenda do gráfico). A reação foi paralisada após 15 min. O experimento foi realizado em duplicata e n=1. A, Curva de STI1 rec. com as concentrações em ng/ml, por poço: 1200; 600; 300; 150 e 75. B, Curva do sobrenadante de ET. com as concentrações em µg/ml, por poço: 3,9; 2; 1 e 0,5, que formam uma curva linear.

µg/ml de SN de ET.	ng de STI1
3,9	29,77
2	14,85
1	5,55

TABELA 1 - QUANTIDADE DE STI1 EM SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO

FONTE: A autora (2010)

Através da equação da curva de STI1 rec. foi calculada a quantidade de STI1 para 3,9; 2 e 1 µg/ml, por poço do sobrenadante de ET.

Outros experimentos foram realizados para confirmar a reprodutibilidade das curvas de STI1 rec. e sobrenadante de ET. A TABELA 2 e FIGURA 10 mostra a variação da quantidade de STI1 calculada para uma mesma quantidade de sobrenadante de ET.

entre os ensaios, incluindo os ensaios que foram realizados antes de estabelecer a curva de STI1 rec. Observou-se que a cada novo ensaio a quantidade de STI1 calculada para uma mesma quantidade de sobrenadante de ET. aumentava, utilizando a mesma alíquota de STI1 rec. e de sobrenadante de ET. Apesar dos valores das absorbâncias entre um experimento e outro não serem comparáveis, as absorbâncias da curva de sobrenadante de ET. variaram pouco enquanto as absorbâncias da curva de STI1 rec. diminuía a cada novo experimento utilizando a mesma alíquota de STI1 rec. e de sobrenadante de ET. Assim, uma hipótese foi levantada de que poderia estar ocorrendo precipitação da STI1 rec. ao congelar e descongelar a mesma alíquota, diminuindo a sua concentração e adsorvendo-se menos quantidade de STI1 rec. nos poços. A degradação da proteína seria menos provável já que proteínas recombinantes não se degradam facilmente.

Para tentar solucionar o problema trocou-se a alíquota de STI1 rec., primeiramente, mas as absorbâncias da curva de STI1 rec. a cada novo experimento persistiram a diminuir. Então, outros ensaios foram realizados, com 20 % de glicerol do volume final de uma nova alíquota de STI1 rec. A quantidade de STI1 calculada para uma mesma quantidade de sobrenadante de ET. continuou aumentando a cada novo experimento, mas com menores diferenças. Outros ensaios foram realizados utilizando uma nova alíquota de STI1 rec. a cada novo experimento. Porém ainda havia uma variação tanto aumentando quanto diminuindo a quantidade de STI1 para uma mesma quantidade de sobrenadante de ET. a cada novo ensaio. Outra possibilidade não testada seria realizar a quantificação da concentração de proteína pelo método de Bradford a cada novo experimento, mas antes foi testado acrescentar 20% de glicerol do volume final na alíquota de STI1 rec. e trocar a alíquota de STI1 rec. a cada novo ensaio para não precisar realizar o Bradford.

Experimento	Quantidade de STI1 em ng/ml em 2 µg/ml de sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo	Coefficiente de variação % intraespecífico
1	137,04 +/- 35,02	26
2	315,3 +/- 36,12	11
3	271,76 +/- 67,39	25
4	557,9 +/- 92,18	17

5	1016,19 +/- 349,06	34
6	458,58 +/- 63,47	13
7	722,06 +/- 62,57	9
8	846,59 +/- 54,45	6
9	504,72 +/- 67,35	13
10	212,62 +/- 59,39	28

TABELA 2 - QUANTIDADE DE STI1 (ng/ml) EM 2 µg/ml DE SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO. Dados calculados pelo programa de gráficos GNUPLLOT.

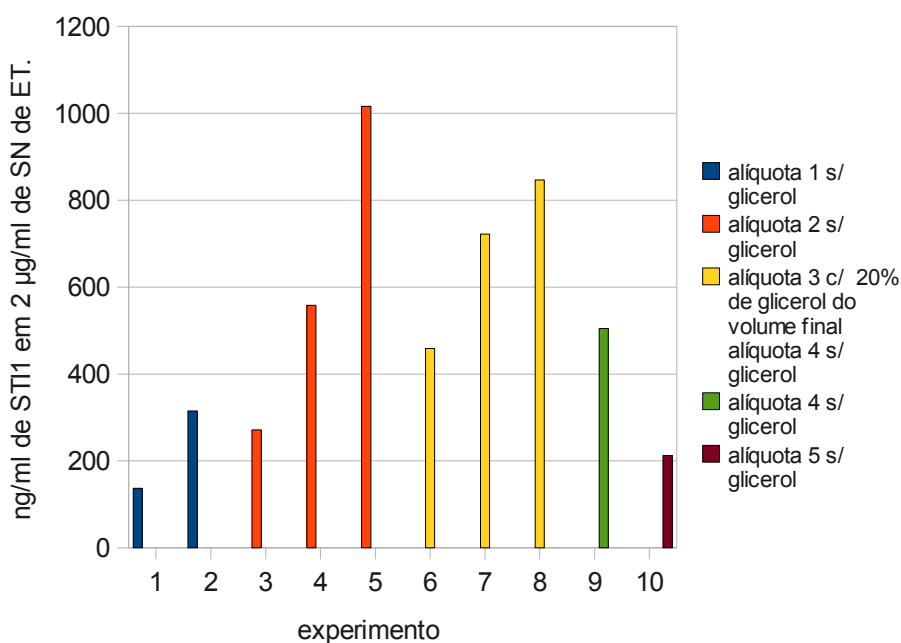


FIGURA 10 - QUANTIDADE DE STI1 (ng/ml) EM 2 µg/ml DE SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO

FONTE: A autora (2010)

Nos experimentos 1 e 2 foi utilizada uma mesma alíquota de STI1 rec. (1). No experimento 1 a curva de STI1 rec. iniciou a partir de 150 ng/ml, realizando uma diluição seriada, sendo que no ponto seguinte a quantidade era a metade em relação da anterior. No experimento 2 a curva de STI1 rec. iniciou a partir de 300 ng/ml, realizando uma diluição seriada, sendo que no ponto seguinte a quantidade era a metade em relação da anterior. A partir do experimento 3 em diante a curva de STI1 rec. iniciou a partir de 600 ng/ml, realizando uma diluição seriada, sendo que no ponto seguinte a quantidade era a metade em relação da anterior. Nos experimentos 3, 4 e 5 foi utilizada outra alíquota (2). Nos experimentos 6, 7 e 8 foi utilizada uma outra alíquota (3) de STI1 rec. com 20 % de glicerol do volume final. Nos experimentos 9 e 10, foi utilizada uma alíquota diferente para cada um (4 e 5, respectivamente) de STI1 rec. Em relação a curva de sobrenadante de ET. as concentrações utilizadas, em µg/ml, por poço, foram: 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1 e 0,5 do experimento 1 ao 8. Nos experimentos 9 e 10 as quantidades de sobrenadante de ET., em µg/ml, por poço, foram: 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1 e 0,5. Observou-se que as absorbâncias nos experimentos 9 e 10 do sobrenadante de ET. diminuíram possivelmente devido a diluição realizada para fazer uma nova alíquota de sobrenadante de ET. Isto contribuiu para que a quantificação de STI1 em sobrenadante de ET. variasse mais. Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e totalizando n=10 com todos os experimentos e a reação foi paralisada entre 10 a 15 min.

A média da quantidade de STI1 em 2 µg/ml de sobrenadante de ET. dos experimentos do gráfico foi de 504,28 +/- 287 ng/ml de STI1. O coeficiente de variação foi de 57%, um valor acima do aceitável (20%). O coeficiente de variação intraespecífico médio foi de 17%, um valor aceitável pois está abaixo de 20%. Os R² das curvas de STI1 rec. e sobrenadante de ET. variaram entre 0,96 e 0,9999. Os experimentos 1, 3, 5 e 10 deveriam ter sido excluídos, pois seus coeficientes intraespecíficos foram maiores que 20%, porém estes são apresentados no gráfico para demonstrar que se utilizasse uma mesma alíquota de STI1 recombinante, a quantidade de STI1 aumentava de um experimento para o próximo, para uma mesma quantidade de sobrenadante de ET., no caso dos experimentos 1, 3 e 5. O experimento 10 foi mantido, pois se comparar com o experimento 9 ambos tiveram uma razoável diferença quando utilizou-se uma alíquota diferente de STI1 rec. em cada experimento. Se os experimentos 1, 3, 5 e 10 fossem excluídos a nova média seria de 567,52 +/- 190,41 ng/ml de STI1 em 2 µg/ml de sobrenadante de ET. O coeficiente de variação seria de 34%, bem menor que 57%, porém acima de 20%. Ao utilizar uma mesma alíquota a cada novo experimento, utilizando os valores dos experimentos 3, 4 e 5, a média seria de 615,28 +/- 375,52 ng/ml de STI1 em 2 µg/ml de sobrenadante de ET. e o coeficiente de variação seria de 61%. Apesar do desvio padrão ter sido feito com 3 valores, o mesmo foi calculado para se ter uma noção do coeficiente de variação. Se fosse utilizar a metodologia de utilizar uma nova alíquota a cada novo experimento, a média dos experimentos 1, 3, 6, 9, e 10 seria de 332,2 +/- 189,75 ng/ml de STI1 em 2 µg/ml de sobrenadante de ET. Somente estes experimentos seriam utilizados pois cada um possui uma alíquota de STI1 rec. diferente. O coeficiente de variação seria de 57%, acima de 20% ainda. Este dado demonstra que trocando as alíquotas diminuiu um pouco o coeficiente de variação entre os experimentos. Já a média entre os experimentos somente com glicerol (6, 7 e 8) foi de 675,74 +/- 198,11 ng/ml de STI1 em 2 µg/ml de sobrenadante de ET. e o coeficiente de variação de 29%. Nos 3 valores desses 3 experimentos também foi calculado o desvio padrão pelo mesmo motivo do cálculo do desvio padrão com os experimentos 3, 4 e 5. O dado demonstra que utilizar o glicerol é a metodologia que diminui mais a variação entre os experimentos, mas não menos que 20%. Assim seria necessário testar outras metodologias como quantificar STI1 rec. com a técnica de Bradford a cada novo experimento ou aumentar a concentração de glicerol nas alíquotas para obter a reprodutibilidade dos ensaios.

Um ensaio foi realizado com a curva padrão de STI1 rec. estabelecida e empregando meio de cultivo de células eucarióticas (MEM) puro, que não provém de células transfectadas, sem soro fetal bovino e adição de 1200 ng/ml, por poço, de STI1 rec., sem diluir em tampão carbonato. Este experimento foi feito uma vez, que há evidências experimentais que STI1 pode ser secretado no meio de cultivo de algumas linhagens celulares. Assim, o ELISA poderia ser utilizado tanto como método de detecção qualitativo como quantitativo neste tipo de amostra. Também foi empregado meio MEM puro, que não provém de células transfectadas, com 10 % de soro fetal bovino, com adição de 1200 ng/ml, por poço, de STI1 rec., sem diluir em tampão carbonato. O MEM com 10 % de soro fetal bovino é uma das condições mais corriqueiras de cultivo celular de linhagens estabelecidas.

A absorbância da concentração 1200 ng/ml de STI1 rec. do MEM puro sem soro e com soro fetal bovino foi menor que a absorbância da concentração 1200 ng/ml na curva padrão de STI1 rec., possivelmente devido a uma alta quantidade de proteína no MEM, a qual provavelmente impediu a adsorção de STI1 rec. no poço (TABELA 3). A absorbância da STI1 rec. no MEM puro com soro fetal bovino em relação ao sem soro fetal bovino, também foi menor, corroborando com a hipótese acima levantada.

Absorbância x concentração	1200 ng/ml de STI1 rec. na curva padrão	1200 ng/ml de STI1 rec. no MEM puro sem soro fetal bovino	1200 ng/ml de STI1 rec. no MEM puro com 10% de soro fetal bovino
Média da absorbância (duplicata)	2,18	0,48	0,082

TABELA 3- ABSORBÂNCIAS DE 1200 NG/ML DE STI1 RECOMBINANTE, POR POÇO, DA CURVA PADRÃO E MEM PURO COM E SEM SORO FETAL BOVINO ACRESCIDO DE 1200 NG/ML DE STI1 RECOMBINANTE, POR POÇO.

4.2 BIOTINILAÇÃO DA STI1 RECOMBINANTE

Como os resultados do MEM não foram satisfatórios optou-se em realizar o ELISA de competição de antígeno. Para este propósito foi necessária a obtenção de STI1 rec. marcada com biotina.

Após obtenção da proteína biotinilada, um experimento, em triplicata, foi realizado para confirmar a biotinilação da STI1, de acordo com o materiais e métodos. A absorbância após 5 min. foi muito alta e não pode ser lida no leitor de placas, por isso foi realizada uma diluição. A média da absorbância diluída foi de 2,29. Assim o ELISA confirmou que a reação de biotinilação da STI1 foi eficiente.

4.3 ELISA DE COMPETIÇÃO DE ANTÍGENO

Alguns experimentos de ELISA de competição de antígeno em placa Immunolon, foram realizados mas as absorbâncias obtidas foram muito baixas, por isso foi utilizada a placa da Nunc MaxiSorp, a qual é especialmente desenvolvida para ensaios imunoenzimáticos.

Um experimento foi realizado para determinar a diluição da extravidina-HRP, de acordo com o materiais e métodos do ELISA de competição de antígeno, utilizando a concentração de 5 µg/ml de IgG de coelho anti-STI1 purificada, por poço, na placa F96 da Nunc MaxiSorp (FIGURA 11), na etapa de imobilização do anticorpo. As concentrações de STI1 rec. biotinilada, em ng/ml, por poço, foram: 1000; 500; 250; 125; 62,5. As diluições da extravidina-HRP foram de 1:1000, 1:2000 e 1:4000. A concentração de OPD utilizada foi maior que 0,2 mg/ml, pois não foi pesada e a reação foi paralisada após 30 min. da adição do substrato. A melhor diluição da extravidina-HRP, pela análise dos resultados, foi de 1:2000, pois comparando com a curva de diluição de 1:1000 as absorbâncias eram muito próximas e assim, optou-se pela diluição maior. Esta concentração foi empregada nos próximos experimentos e não será referida quando os mesmos forem explicados, exceto se não estiver no mesmo padrão.

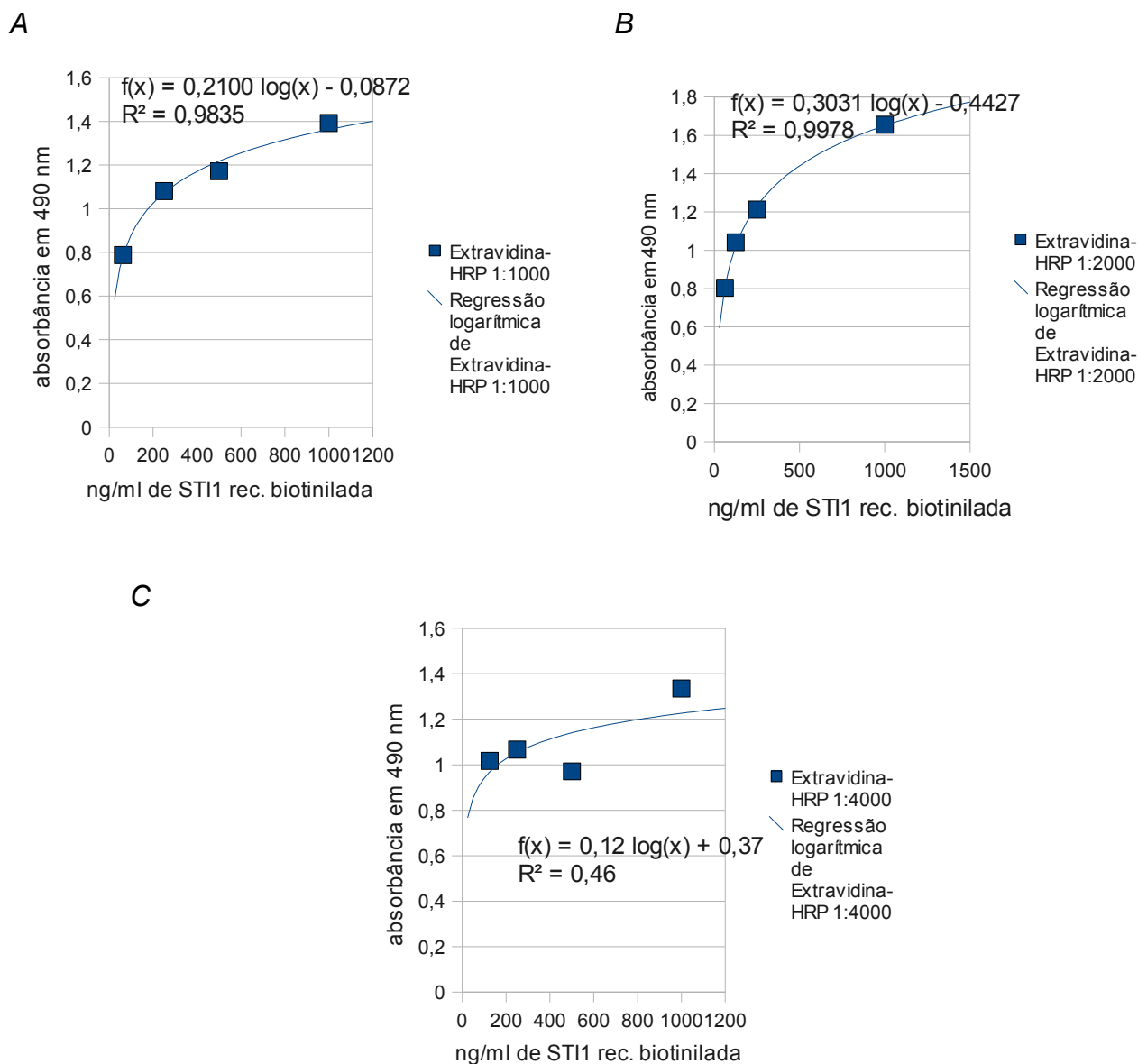


FIGURA 11 - DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO DA EXTRAVIDINA-HRP

FONTE: A autora (2010)

O experimento foi realizado utilizando concentrações de 5 µg/ml, por poço, de IgG de coelho anti-STI1 purificada. Após foram incubadas as concentrações, em ng/ml, por poço: 1000; 500; 250; 125; 62,5 de STI1 rec. biotinilada. Depois incubou-se a extravidina-HRP nas diluições 1:1000, 1:2000 e 1:4000. A reação foi paralisada após 30 min. da adição do substrato. O experimento foi realizado em monocapata e n=1. Descontou-se o valor da absorbância referente à inespecificidade (sem anticorpo) do positivo, por isso não há o negativo. A, Diluição da extravidina-HRP 1:1000 - o ponto 125 ng/ml de STI1 rec. biotinilada foi excluído, pois ficou fora da curva. B, Diluição da extravidina-HRP 1:2000 - o ponto 500 ng/ml de STI1 rec. biotinilada foi excluído, pois ficou fora da curva. C, Diluição da extravidina-HRP 1:4000 - o ponto 62,5 ng/ml foi perdido no momento da realização do experimento.

Após, um ensaio foi feito para determinar a quantidade de anticorpo a ser imobilizada na placa da Nunc MaxiSorp (FIGURA 12). Foram utilizadas diferentes concentrações de IgG de coelho anti-STI1 purificada, por poço, em µg/ml: 20; 15; 10; 5;

2,5; 1,25. Então incubou-se a STI1 rec. biotinilada na concentração de 4 µg/ml, por poço. Duas concentrações diferentes de OPD foram utilizadas: 0,2 mg/ml e 1,36 mg/ml e depois a reação foi paralisada após 13 e 19 min., respectivamente. Pelos resultados foi estabelecido utilizar, nos próximos experimentos, a concentração de 2,5 µg/ml de IgG de coelho anti-STI1 purificada e 0,8 mg/ml de OPD para revelação da reação antígeno-anticorpo, pois está aproximadamente no meio de 0,2 mg OPD/ml e 1,3 mg/ml e a absorbância permaneceu numa faixa aceitável, próxima a 1. Dessa maneira essas concentrações não serão referidas nos próximos ensaios, exceto se não seguir padrão.

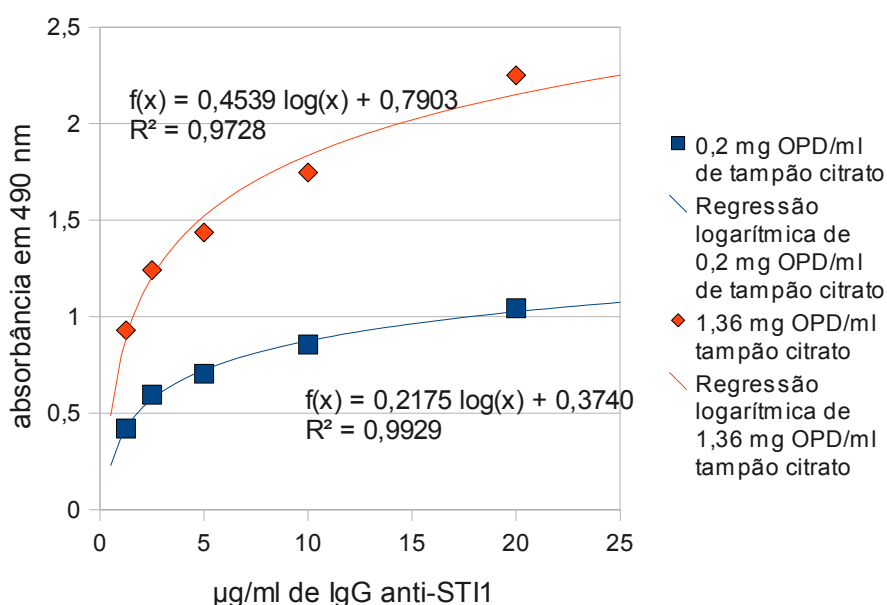


FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE IgG DE COELHO ANTI-STI1 PURIFICADA, EVIDENCIADA POR DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES DE OPD

FONTE: A autora (2010)

Foram utilizadas diferentes concentrações de IgG de coelho anti-STI1 purificada, por poço: 20; 15; 10; 5; 2,5; 1,25 µg/ml. Foi incubada a concentração de 4 µg/ml, em cada poço, de STI1 rec. biotinilada. Duas quantidades de OPD foram utilizadas: 0,2 mg/ml e 1,36 mg/ml. A reação foi paralisada após 13 e 19 min., respectivamente. O experimento foi realizado em duplicata e n=1. Descontou-se o valor da absorbância referente à inespecificidade (sem anticorpo) do positivo. O ponto de 15 µg/ml de IgG de coelho anti-STI1 purificada foi retirado, pois ficou fora das curvas.

Outros ELISAs de competição de antígeno foram realizados a fim de descobrir a quantidade do limite de saturação de STI1 rec. biotinilada necessária para competir com STI1 rec. Dois experimentos foram realizados, incubando-se, por poço, em ng/ml: 500; 250; 125; 62,5; 31,3 e 15,6 de STI1 rec. biotinilada. A reação foi paralisada de 20 a 30 min. Pela média dos dois ensaios (FIGURA 13) a melhor concentração de saturação foi

de 150 ng/ml de STI1 rec. biotinilada, um pouco acima de 125 ng/ml para garantir a saturação dos anticorpos.

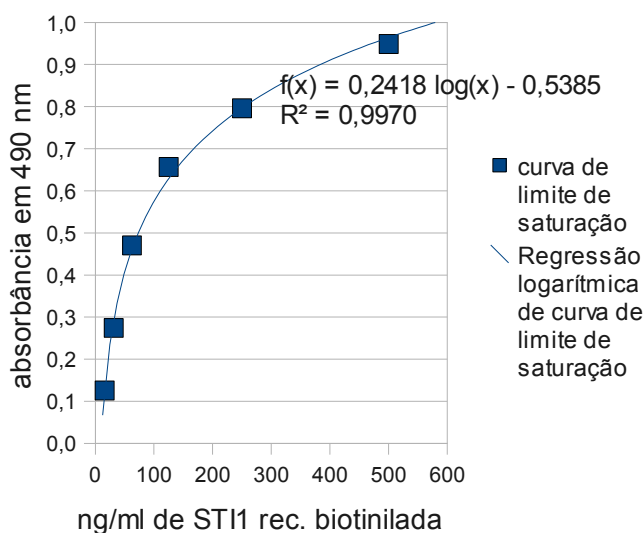


FIGURA 13 - DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE SATURAÇÃO DE STI1 RECOMBINANTE BIOTINILADA
 FONTE: A autora (2010)

Dois ensaios diferentes foram realizados e o gráfico apresenta a média dos ensaios. As concentrações, por poço, em ng/ml: 500; 250; 125; 62,5; 31,2 e 15,6 de STI1 rec. biotinilada foram incubadas. A reação foi paralisada após 20 a 30 min. Descontou-se o valor da absorvância referente à inespecificidade (sem anticorpo) do positivo. O primeiro experimento foi realizado em monoplicata e o segundo em duplicata.

Experimentos preliminares de competição entre STI1 rec. biotinilada e STI1 rec. foram realizados, entretanto não foram reproduzidos em número suficiente para comprovar sua eficiência na determinação de STI1. Em um único experimento, as concentrações de STI1 rec. foram, por poço, em ng/ml: 0; 50; 75; 100; 150; 225; 300; 450 e 600 competindo com 150 ng/ml de STI1 rec. biotinilada para cada condição. A reação foi paralisada após 20 min. Os dados foram apresentados na forma de gráfico de modo semelhante aquele descrito para a detecção de cGMP por ensaio imunoenzimático (Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System – GE Biosciences, 2005) (FIGURA 14). Comparando a curva realizada com as curvas do manual, ela está parcialmente semelhante. Porém nunca serão totalmente semelhantes pois cada ensaio foi realizado em condições diferentes, mas a comparação é realizada para obter um parâmetro. Para melhor comparação, alguns pontos entre 0 e 50 ng/ml de STI1 rec. deveriam ter sido realizados.

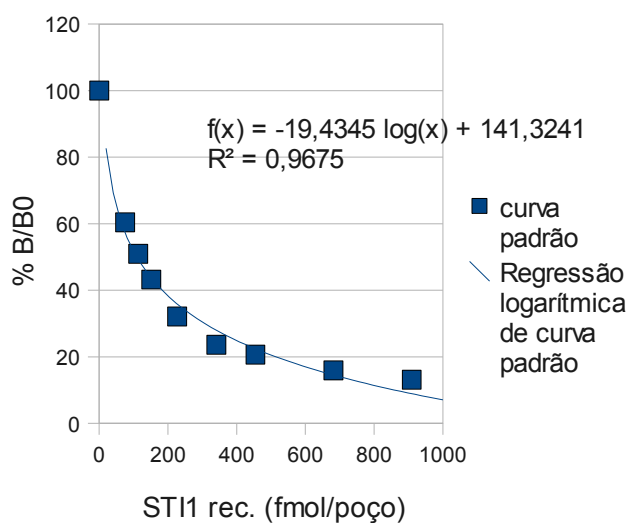


FIGURA 14 - CURVA PADRÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE STI1 RECOMBINANTE E STI1 RECOMBINANTE BIOTINILADA

FONTE: A autora (2010)

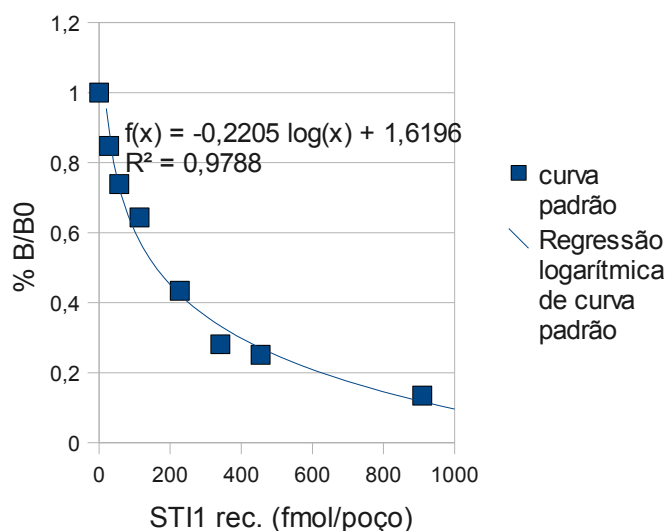
As concentrações de STI1 rec. foram, por poço, em ng/ml: 0; 50; 75; 100; 150; 225; 300; 450 e 600 com 150 ng/ml de STI1 rec. biotinizada para cada condição. A reação foi paralisada após 20 min. O experimento foi realizado em duplicata e $n=1$.

A % B/B0 representa a relação:

$$\frac{\text{absorbância de um ponto da curva} - \text{absorbância do seu inespecífico}}{\text{absorbância do zero da curva padrão} - \text{absorbância do seu inespecífico}} \times 100$$

Foram feitos ELISAs de competição de antígeno empregando-se as amostras de interesse, ou seja, sobrenadante de ET. e MEM sem soro fetal bovino, sendo que estas duas últimas amostras não foram diluídas em PBS-BSA 0,1%. Num experimento, incubou-se as concentrações de STI1 rec. (nova alíquota), por poço, em ng/ml: 0; 18,8; 37,5; 75; 150; 225; 300; 600 com 150 ng/ml de STI1 rec. biotinizada para cada condição (FIGURA 15). Incubou-se o sobrenadante de ET. nas concentrações, por poço, em $\mu\text{g/ml}$: 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5, com 150 ng/ml de STI1 rec. biotinizada em cada concentração. A reação foi paralisada após 20 min. A curva padrão de STI1 rec. e STI1 rec. biotinizada deste experimento não foi utilizada para realizar a média junto a curva padrão de competição entre STI1 rec. e STI1 rec. biotinizada, pois não foram utilizados as mesmas quantidades de STI1 rec. Porém a curva deste experimento foi semelhante a anterior. A curva de sobrenadante de ET. em relação a curva padrão deste experimento é mais linear. Isto provavelmente ocorreu porque a quantidade de STI1 rec. na alíquota de sobrenadante de ET. era menor que na alíquota de STI1 rec.

A



B

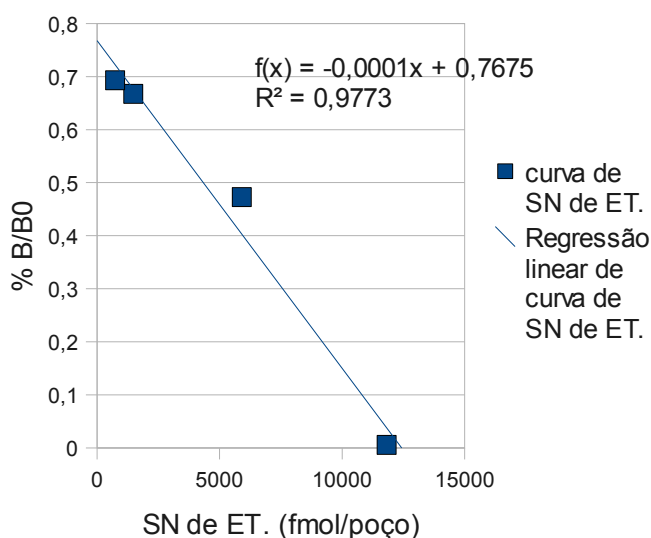


FIGURA 15 - CURVA PADRÃO DE COMPETIÇÃO ENTRE STI1 RECOMBINANTE E STI1 RECOMBINANTE BIOTINILADA E CURVA DE SOBRENADANTE DE EXTRATO TOTAL DE ENCÉFALO DE CAMUNDONGO E STI1 RECOMBINANTE BIOTINILADA

FONTE: A autora (2010)

Incubou-se as concentrações de STI1 rec., por poço, em ng/ml: 0; 18,8; 37,5; 75; 150; 225; 300; 600 com 150 ng/ml de STI1 rec. biotilada para cada condição. Incubou-se o sobrenadante de ET. nas concentrações, por poço, em µg/ml: 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5, com 150 ng/ml de STI1 rec. biotilada em cada concentração. O ponto 1 µg/ml foi excluído, pois ficou fora da curva. A reação foi paralisada após 20 min. O experimento foi realizado em n=1. A, Curva padrão da competição entre STI1 recombinante e STI1 recombinante biotilada, em monoplicata. B, Curva do sobrenadante de extrato total de encéfalo de camundongo mais STI1 rec. biotilada, em duplicata.

Um outro experimento foi realizado, adicionando-se, 150 ng/ml de STI1 rec. biotinilada, por poço, em: 100% de MEM sem soro fetal bovino, 50 % de MEM sem soro fetal bovino e 50% PBS-BSA 0,1%, 25% de MEM sem soro fetal bovino e 75% de PBS-BSA 0,1% e 100% de PBS-BSA 0,1%, em duplicata cada condição, porém o inespecífico não foi realizado. A reação foi paralisada após 20 min. Somente as absorvâncias em 50 % de MEM e 50% PBS-BSA 0,1%, 25% de MEM e 75% de PBS-BSA 0,1% foram próximas ao de 100% PBS-BSA 0,1% (FIGURA 16). Desta forma conclui-se que há algum interferente no MEM sem soro fetal bovino que impede, nestas condições experimentais, a detecção direta de STI1 por este tipo de ELISA.

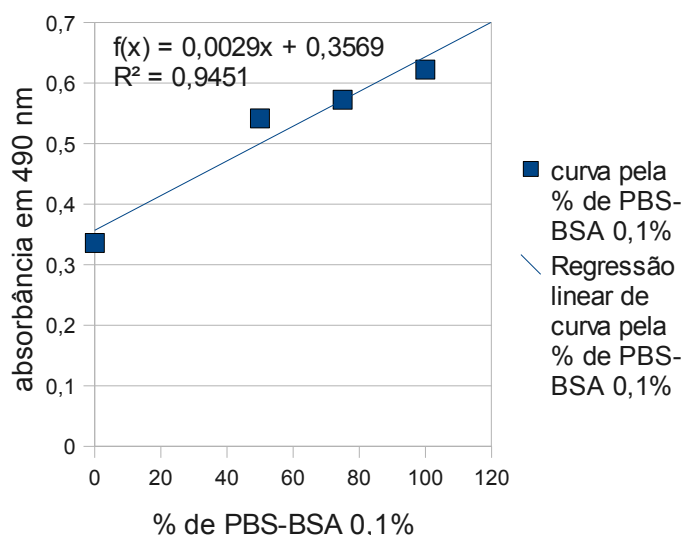


FIGURA 16 - CURVA DE DETECÇÃO DE STI1 RECOMBINANTE BIOTINILADA EM DIFERENTES DILUIÇÕES DE MEM SEM SORO FETAL BOVINO

FONTÉ: A autora (2010)

Adicionou-se 150 ng/ml de STI1 rec. biotinilada, por poço, em: 100% de MEM sem soro fetal bovino, 50 % de MEM sem soro fetal bovino e 50% PBS-BSA 0,1%, 25% de MEM sem soro fetal bovino e 75% de PBS-BSA 0,1% e 100% de PBS-BSA 0,1%, em duplicata cada condição e n=1, porém o inespecífico não foi realizado. A reação foi paralisada após 20 min.

5 CONCLUSÃO

- A padronização da diluição dos anticorpos para o ELISA indireto foi obtida em 1:2000.
- A padronização da curva de STI1 rec. para o ELISA indireto foi obtida com mais de 0,2 mg/ml de OPD e na placa Immunolon.
- A padronização da curva para detecção de STI1 em sobrenadante de ET. para o ELISA indireto foi obtida. A padronização da curva para detecção de STI1 em MEM puro para o ELISA indireto não foi obtido, provavelmente pois o MEM contém muita proteína que impede a imobilização da STI1.
- A padronização das condições para manutenção da estabilidade química dos reagentes durante seu armazenamento para quantificar STI1 em sobrenadante de ET. no ELISA indireto foi parcialmente obtida já que as condições testadas diminuíram a variação de um experimento para outro, mas não em menos de 20%.
- O estabelecimento da metodologia para biotilação de STI1 rec. para o ELISA de competição de antígeno foi obtido.
- A padronização da quantidade de anticorpo a ser imobilizado e a diluição da extravidina-HRP para o ELISA de competição de antígeno foi obtida em 2,5 µg/ml e 1:2000, respectivamente.
- A padronização da curva de STI1 rec. biotilada para o ELISA de competição de antígeno com 0,8 mg/ml de OPD na placa Nunc MaxiSorp foi parcialmente obtida, já que é necessário realizar mais experimentos para testar a reprodutibilidade.
- A padronização da curva para detecção de STI1 em sobrenadante ET. para o ELISA de competição de antígeno foi parcialmente obtida pois a curva do sobrenadante de ET. foi parcialmente semelhante a padrão e é preciso realizar mais ensaios para obter a reprodutibilidade. A padronização da curva para detecção de STI1 em MEM não foi obtida, possivelmente porque o MEM puro sem soro fetal bovino possui algum interferente que impede a ligação de STI1 com o anticorpo. A amostra MEM sem soro fetal bovino pode ser diluída para detectar STI1, contudo mais ensaios deverão ser realizados para comprovar a evidência.
- No ELISA de competição de antígeno a padronização das condições para manutenção da estabilidade química dos reagentes durante seu armazenamento não foi realizada porque não foram realizados experimentos suficientes.

REFERÊNCIAS

AMERSHAN BIOSCIENCES (Part of GE Healthcare). **cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System**. UK RPN226PL (Rev AG), 2005.

ARANTES, C.; NOMIZO, R.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; LIMA, F. R.; MARTINS, V. R. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia**, v. 57, n. 13, p. 1439-1449, out. 2009.

BERALDO, F. H.; ARANTES, C. P.; SANTOS, T. G.; QUEIROZ, N. G.; YOUNG, K.; RYLETT, R. J.; MARKUS, R. P.; PRADO, M. A.; MARTINS, V. R. Role of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in Calcium Signaling Induced by Prion Protein Interaction with Stress-inducible Protein 1. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 47, p. 36542-36550, nov. 2010.

BLATCH, G. L.; LÄSSLE, M.; ZETTER, B. R.; KUNDRA, V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**, v. 194, n. 2, p. 277-282, jul. 1997.

BRINKER, A.; SCHEUFLER, C.; VON DER MULBE, F.; FLECKENSTEIN, B.; HERRMANN, C.; JUNG, G.; MOAREFI, I.; HARTL, F. U. Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 22, p. 19265 – 19275, maio 2002.

CAETANO, F. A.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; MACHADO, C. F.; PINTO, A. C.; MAGALHAES, A.C.; VIEIRA, M. P.; AMERICO, T. A.; MASSENSINI, A. R.; PRIOLA, S. A.; VORBERG, I.; GOMEZ, M. V.; LINDEN, R.; PRADO, V. F.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 26, p. 6691–6702, jun. 2008.

CAI, J. P.; WANG, Y. D.; TSE, H.; XIANG, H.; YUEN, K. Y.; CHE, X. Y. Detection of asymptomatic antigenemia in pigs infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by a novel capture immunoassay with monoclonal antibodies against the nucleocapsid protein of PRRSV. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 12, p.1822-1828, 2009.

CHOI, D. H.; KARAKURA, Y.; MATSUDA, R.; HAYASHI, Y.; NINOMIYA, K. Simulation model for predicting limit of detection and range of quantitation of competitive enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 103, n. 5, p. 427–431, 2007

COITINHO, A. S.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; ROSSATO, J. I.; FREITAS, A. R.; CASTRO, C. C.; CAMMAROTA, M.; BRENTANI, R. R.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. **Neurobiol. Dis.**, v. 26, n. 1, p. 282–290, 2007.

ERLICH R. B.; KAHN, S. A.; LIMA, F. R. S.; MURAS, A. G.; MARTINS R. A. P.; LINDEN, R.; CHIARINI, L. B.; MARTINS, V. R.; NETO, V. M. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia**, v. 55, n.16, p.1690–1698, dez. 2007.

EUSTACE, B. K.; JAY, D. G. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle**, v. 9, n. 23, p. 4769, 2010.

HAJJ, G. N.; SANTOS, T. G.; COOK, Z. S.; MARTINS, V. R. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **J. Comp. Neurol.**, v. 517, n. 3, p. 371-384, nov. 2009.

KAMAL, A.; THAO, L.; SENSINTAFFAR, J.; ZHANG, L.; BOEHM, M. F.; FRITZ, L. C.; BURROWS, F. J. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 407–410, 2003.

LÄSSLE, M.; BLATCH, G. L.; KUNDRA, V.; TAKATORI, T.; ZETTER, B. R. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 3, p. 1876-1884, jan. 1997.

LOPES, M. H.; HAJJ, G. N.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R. M.; RIBEIRO, K. C.; BRENTANI, R. R.; LINDEN, R.; MARTINS, V.R. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 49, p. 11330–11339, dez. 2005.

MERLIN, C. H. **Presença de PrPc e seu ligante STI1 em plaquetas e micropartículas humanas**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MORISHIMA, Y.; MURPHY, P. J.; LI, D.P.; SANCHEZ, E. R.; PRATT, W. B. Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 24, p. 18054-18060, jun. 2000.

NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible

gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, n. 9, p. 3638-3646, set. 1989.

ODUNUGA, O. O.; HORNBY, J. A.; BIES, C.; ZIMMERMANN, R.; PUGH, D. J., AND BLATCH, G. L. Tetratricopeptide Repeat Motif-mediated Hsc70-mSTI1. Interaction molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 9, p. 6896-6904, fev. 2003.

ROFFÉ, M.; BERALDO, F. H.; BESTER, R.; NUNZIANTE, M.; BACH, C.; MANCINI, G.; GILCH, S.; VORBERG, I.; CASTILHO, B. A.; MARTINS, V. R.; HAJJ, G. N. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 29, p. 13147-13152, jul. 2010.

SAKUDO, A.; LEE, D. C.; LI, S.; NAKAMURA, T.; MATSUMOTO, Y.; SAEKI, K.; ITOHARA, S.; IKUTA, K.; ONODERA, T. PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, n. 1, p. 14-19, março 2005.

SCROFERNEKER, M.L.; POHLMANN P.R. **Imunologia Básica e Aplicada**. 1.ed., Sagra Luzzatto, Porto Alegre, 1998. 578 p.

SONG, HO.; LEE, W.; AN, K.; LEE, H.; CHO, J. H.; PARK, ZY. *C.elegans* STI-1, the homolog of Sti1/Hop, is involved in aging and stress response. **J. Mol. Biol.**, v. 390, n. 4, p. 604-617, 2009.

SONG, Y.; MASISON, D. C. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34178-34185, 2005.

SOUZA, L. E. R. **Estudo da interação *in vitro* da Rho GTPase de baixa massa molecular Rnd1 e a proteína STI1 (stress-inducible protein 1)**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SUN, W.; XING, B.; SUN, Y.; DU, X.; LU, M.; HAO, C.; LU, Z.; MI, W.; WU, S.; WEI, H.; GAO, X.; ZHU, Y.; JIANG, Y.; QIAN, X.; HE, F. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. **Mol. Cell Proteomics**, v. 6, n. 10, p. 1798-1808, out. 2007.

WALSH, N.; O'DONOVAN, N.; KENNEDY, S.; HENRY, M.; MELEADY, P.; CLYNES, M.; DOWLING, P. Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic

analysis. **Proteome Sci.**, v. 7, p. 3, fev. 2009.

WANG, TH.; CHAO A., TSAI, CL.; CHANG, CL.; CHEN, SH.; LEE, YS.; CHEN, JK.; LIN, YJ.; CHANG, PY.; WANG, CJ.; CHAO AS.; CHANG, SD.; CHANG, TC.; LAI, CH.; WANG, HS. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. **Mol. Cell Proteomics**, v. 9, n. 9, p. 1873-84, 2010.

ZANATA S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; HAJJ, G. N.; CHIARINI, L. B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A. R.; CABRAL, A. L.; LEE, K. S.; JULIANO, M. A.; OLIVEIRA E.; JACHIERI, S. G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. **EMBO J.**, v. 21, n. 13, p. 3307-3316, jul. 2002.