

MONICA VISNIESKI ALCANTARA

**PRODUÇÃO DE DOMÍNIOS RECOMBINANTES DA PROTEÍNA ADAM23 E DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ADAM23**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata

CURITIBA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Silvio Marques Zanata, por quem tenho grande admiração por suas conquistas e pela facilidade com que faz ciência.

À CAPES, ao projeto REUNI e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Às professoras Dra. Adriana Mercadante e Lia Nakao, por suas contribuições durante a execução do projeto.

À Michele Dietrich, pela colaboração direta na execução deste trabalho e por sempre compartilhar sua experiência e conhecimentos.

Aos amigos Alessandra, Axel, Beatriz, Elizabeth, Giuseppe, Karime, Max e Sílvia por tornarem o trabalho mais divertido e pelo companheirismo em tempos difíceis.

Ao grande amigo Luís Eduardo Rizzo (ou Luizito), pelos conselhos, incentivos, e principalmente pelo exemplo de conduta, caráter, profissionalismo e competência científica.

Às alunas de iniciação científica Caroline e Gabriela, pela ajuda e pela seriedade que demonstraram durante a realização de suas tarefas.

Às amigas Daniele, Fabíola, Heloísa e Juliana pelos velhos e saudosos tempos.

Aos demais colegas do Laboratório de Neurobiologia, pelas horas compartilhadas durante o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular, especialmente à Olga pelas imunizações.

Ao Breno, pelas atuações como médico veterinário.

Ao Dr. Juliano Borgignon, cujas contribuições foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao colega Giovanni Mazzarotto, pelo tempo e ajuda dispensada com os animais no biotério e com as células.

À minha família, pela compreensão e por sempre acreditarem em mim.

E ao meu amado companheiro Rafael Luís Kessler, por estar ao meu lado sempre, pelo apoio e por compreender os meus maus momentos.

“O senhor saiba: eu toda a minha vida pensei por mim, forro, sou nascido diferente. Eu sou é eu mesmo. Divirjo de todo o mundo... Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa. O senhor concedendo, eu digo: para pensar longe, sou cão mestre - o senhor solte em minha frente uma idéia ligeira, e eu rastreio essa por fundo de todos os matos, amém.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Uma ADAM é uma proteína com aproximadamente 750 aminoácidos de comprimento e com multidomínios, que incluem o pró-domínio, o domínio metaloprotease, o domínio desintegrina, o domínio rico em cisteína, o domínio semelhante a fator de crescimento epidermal (EGF-like), a região transmembrânica e a cauda citoplasmática. A proteína ADAM23 (MDC3), dentro do seu domínio metaloprotease, não possui o sítio ativo de aminoácidos para a ligação de zinco, o qual é crítico para a atividade proteásica. É altamente expressa no encéfalo, mas é detectada apenas fracamente ou não detectada em outros tecidos. Neste trabalho foram expressos satisfatoriamente os domínios recombinantes da proteína ADAM23 desintegrina e metaloprotease+desintegrina fusionados a GST em bactérias *E. coli* cepa DH5 α , mas só foi possível purificar a proteína recombinante GST-desintegrina. Já a proteína recombinante 6-His-desintegrina+rico em cisteína foi expressa mais significativamente em bactérias *E. coli* cepa BL21(DE3)STAR em comparação com a cepa BL21(DE3)pLysS, e sua purificação ocorreu de forma apropriada. A imunização de camundongos Balb/c com a proteína recombinante GST-desintegrina não mostrou-se satisfatória, enquanto a imunização com a proteína recombinante 6-His-desintegrina+rico em cisteína levou a produção de anticorpos policlonais específicos para ADAM23. Foi realizada uma fusão entre os esplenócitos de camundongo imunizado e células de mieloma, levando a obtenção de hibridomas. Apenas um hibridoma demonstrou-se secretor de anticorpos monoclonais específicos para ADAM23, entretanto não apresentou estabilidade compatível com a produção ilimitada e reprodutível de anticorpos monoclonais.

Palavras-chave: ADAM23, proteínas recombinantes, anticorpos policlonais, hibridomas, anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

An ADAM protein have about 750 aminoacids of length and contains multidomains, which includes the prodomain, the metalloprotease domain, the disintegrin domain, the cystein rich domain, the epidermal growth factor like domain (EGF-like), the transmembranic region and the cytoplasmic tail. The ADAM23 (MDC3) protein does not contain the zinc-binding motif within the metalloprotease domain, which is critical for the protease activity. ADAM23 is highly expressed in the brain, but is weakly or not detected in other tissues. At the present work, the recombinat domains disintegrin and metalloprotease+disintegrin of the ADAM23 protein, fused to GST, were well expressed in *E. coli* DH5 α , but only the GST-disintegrin protein could be purified. The recombinant protein 6-His-disintegrin+cystein rich was more expressed in *E. coli* BL21(DE3)STAR than in BL21(DE3)pLysS, and the purification occurred appropriately. The Balb/c mice immunization with the GST-disintegrin protein did not occurred satisfactorily, while the immunization with 6-His-disintegrin+cystein rich lead to the production of polyclonal antibodies specific for ADAM23. A fusion between the splenic cells from the immunized mice and the mieloma cells was performed to obtain hybridomas. Only one hybridoma secreted monoclonal antibodies specific for ADAM23, however this hybridoma was not compatible to the ilimited and reproducible production of monoclonal antibodies, because of its instability.

Key words: ADAM23, recombinant proteins, polyclonal antibodies, hybridomas, monoclonal antibodies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ADAM.....	8
1.1.1. Pró-domínio.....	9
1.1.2. Domínio Metaloprotease.....	9
1.1.3. Domínio Desintegrina.....	12
1.1.4. Domínio Rico em cisteína.....	15
1.1.5. Cauda Citoplasmática.....	16
1.1.6. ADAMs expressas no Sistema Nervoso.....	16
1.2. A PROTEÍNA ADAM23.....	17
2. OBJETIVOS	24
3. JUSTIFICATIVAS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. OBTENÇÃO DOS VETORES.....	26
4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS RECOMBINANTES DA PROTEÍNA ADAM23.....	26
4.2.1. GST-Desintegrina recombinante.....	26
4.2.2. GST-metaloprotease+desintegrina.....	28
4.2.3. 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína.....	29
4.2.3.1. Bactérias BL21 (DE3) pLys S.....	29
4.2.3.2. Bactérias BL21 (DE3) STAR.....	31
4.3. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	32
4.3.1. Imunização com GST-Desintegrina recombinante.....	32
4.3.2. Imunização com 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína recombinante.....	33
4.4. ENSAIOS DE IMMUNOBLOT.....	33
4.5. ENSAIOS DE ELISA (<i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>) DE CAPTURA DE ANTICORPOS.....	34
4.6. EXPERIMENTO DE FUSÃO PARA A OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS.....	35
4.6.1. Cultivo de células de mieloma.....	35
4.6.2. Obtenção das células do animal imunizado (linfócitos B).....	35
4.6.3. Reação de fusão.....	36
4.6.4. Manutenção das células após a fusão.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38

5.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA	38
5.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-METALOPROTEASE+DESINTEGRINA	40
5.3. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	45
5.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA.....	46
5.4.1. Bactérias BL21 (DE3) pLys S.....	46
5.4.2. Bactérias BL21 (DE3) STAR	51
5.5. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	53
5.6. OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ADAM23	54
6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS ADAM

Uma ADAM é uma proteína com aproximadamente 750 aminoácidos de comprimento e com multidomínios, que incluem o pró-domínio, o domínio metaloprotease, o domínio desintegrina, o domínio rico em cisteína, o domínio semelhante a fator de crescimento epidermal (EGF-like), a região transmembrânica e a cauda citoplasmática (PRIMAKOFF e MYLES, 2000) (Figura 1). Os cDNAs codificantes dos membros desta recém-descoberta família de proteínas de superfície são referidos como ADAMs devido aos domínios estruturais chave dessas proteínas: desintegrina e metaloprotease (A Desintegrin And Metalloprotease domain) (WOLFSBERG *et al*, 1995).

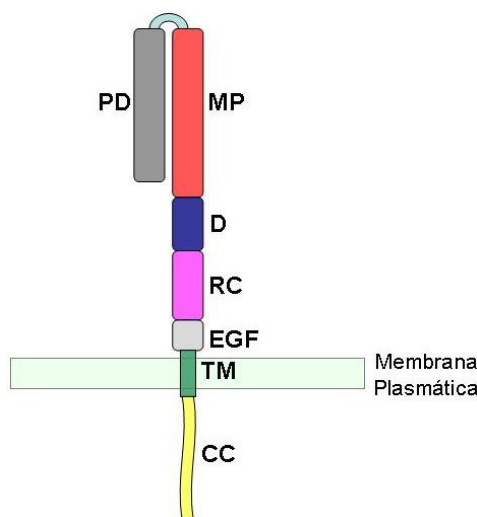


FIGURA 1 – MODELO ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS ENCONTRADOS NAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM.

De N-terminal para C-terminal: **PD**: pró-domínio; **MP**: domínio metaloprotease; **D**: domínio desintegrina; **RC**: domínio rico em cisteína; **EGD**: domínio semelhante a fator de crescimento epidermal; **TM**: região transmembrânica; **CC**: cauda citoplasmática. FONTE: adaptado de WHITE, 2003.

As ADAMs surgem como reguladoras chave na superfície celular. Elas podem influenciar interações célula-célula e podem influenciar interações célula-matriz pela clivagem e remodelamento de proteínas da MEC e, possivelmente, pela interação com moléculas de adesão da matriz (WHITE, 2003).

1.1.1. Pró-domínio

Um processo de ativação dependente de protease tipo furina é comum a todas as metaloproteases, incluindo as ADAMs, o qual consiste na clivagem e remoção do pró-domínio pela furina, ativando o domínio metaloprotease. Essa clivagem ocorre durante a passagem das proteases desde o Golgi até a membrana e pode ser bloqueada por inibidores da via secretória (NOVAK, 2004). Para examinar o processamento de ADAM28 na via secretória, experimentos pulso-caça foram realizados com células COS-7 transientemente transfectadas com ADAM28 full-length. Os resultados obtidos sugerem que, como outras ADAMs, ADAM28 é processada depois da passagem através do compartimento medial de Golgi e que a atividade catalítica de ADAM28 tem papel na sua própria maturação, mais provavelmente pela remoção autocatalítica do pró-domínio (HOWARD *et al*, 2000). O pró-domínio da proteína ADAM12, por sua vez, permanece associado não-covalentemente com a enzima madura, ou seja, após sua clivagem, sob condições fisiológicas e *in vitro* (SÖRENSEN *et al.*, 2008). Além disso, a ADAM12 foi demonstrada possuir um domínio chamado interruptor molecular, formado pelo pró-domínio e pelo domínio metaloprotease, regulado por heparan sulfato e heparina exógenos, mas também por proteoglicanos endógenos de superfície. As funções catalíticas de ADAM12 seriam reguladas por esse interruptor (SÖRENSEN *et al.*, 2008).

1.1.2. Domínio Metaloprotease

ADAMs e SVMPs (*snake venom metalloproteases*) compartilham uma sequência extensa no sítio catalítico: HEXGHXXGXXHD. Análises estruturais sugerem que as três histidinas ligam a zinco, a segunda glicina permite um giro, e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico (WOLFSBERG *et al*, 1995). Algumas SVMPs e ADAMs foram demonstradas clivar (*in vitro*) moléculas de matriz extracelular assim como proteínas de superfície celular. Além disso, como todas as metaloproteases dependentes de Zn^{2+} , as proteases ADAMs são inibidas por EGTA e o-fenantrolina, reagentes que quelam íons Zn^{2+} . Funções genéticas propostas para proteases ADAMs incluem a degradação de matriz, a migração celular e o *shedding* localizado

de várias proteínas, incluindo citocinas e fatores de crescimento, ou precursores ancorados na membrana (BLACK e WHITE, 1998). ADAM17 (TACE: *TNF α converting enzyme*), ADAM10 (Kuzbanian) e ADAM9 (MDC9) são três metaloproteases ADAM para as quais uma função foi encontrada e que atuam como “sheddases” (PRIMAKOFF e MYLES, 2000).

As metaloproteases são englobadas em quatro subgrupos, dependendo de seus domínios estruturais (NOVAK, 2004). As metaloproteases de matriz (MMPs) são enzimas secretadas, as quais possuem um domínio hemopexina em sua região C-terminal e um peptídeo sinal de aproximadamente 22 aminoácidos na região N-terminal. Metaloproteases ligadas à matriz (MT-MMPs) diferem das MMPs por possuírem um domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. Essas proteínas estão dessa forma ancoradas à membrana plasmática. ADAM (metaloproteases com um domínio desintegrina) e ADAMTS (proteínas ADAM com um ou mais domínios trombospondina) são proteínas que possuem uma estrutura similar às MMPs e às MT-MMPs, mas diferem dessas por não possuírem um domínio hemopexina e por possuírem um domínio desintegrina seguido de um domínio rico em cisteína. Proteínas ADAMTS não possuem um domínio transmembrana, mas estão ligadas à membrana com o auxílio de um ou muitos motivos trombospondina. Seus genes, embora agrupados, estão espalhados por muitos cromossomos (NOVAK, 2004).

Candidatos potenciais para substrato da ADAM10 em sua atividade proteolítica incluem, mais notavelmente, Notch e ligantes do receptor EGF, além de muitos outros (YANG *et al*, 2006). Kuzbanian (ADAM10) é também uma “sheddase” que foi encontrada como liberadora de uma forma solúvel de Delta, um ligante de Notch. Kuzbanian pode também clivar Notch, mas esta clivagem não resulta na liberação do domínio extracelular de Notch. No processo de neurogênese, várias células da vizinhança possuem o potencial para se diferenciarem em células neuronais, mas relativamente poucas o fazem. Essas poucas células inibem a diferenciação neuronal das células ao redor através de um processo chamado “inibição lateral”, que é mediado pelo receptor de superfície Notch e pelo seu ligante Delta solúvel. As células que carregam o gene de ADAM10 mutante não recebem o sinal inibitório e diferenciam-se em células neuronais excessivas (PRIMAKOFF e MYLES, 2000). ADAM10 foi também demonstrada processar algumas efrinas.

ADAM17 foi identificada como uma protease que cliva especificamente o precursor de TNF, o qual possui um papel chave na mobilização das defesas do hospedeiro, mas pode causar danos severos quando produzido em excesso ou em contextos autoimunes. O TNF é traduzido como uma proteína transmembrana de 26kDa. Uma clivagem proteolítica específica no domínio extracelular libera uma forma solúvel de 17kDa. ADAM17 foi purificada baseada na sua habilidade de clivar a forma inteira do TNF, assim como o peptídeo representando o sítio de processamento (BLACK e WHITE, 1998). Em fibroblastos, ADAM17 foi identificada como uma candidata para a clivagem extracelular N-terminal do TGF α , enquanto outra enzima não identificada é responsável pelo processamento C-terminal. TGF α no SNC é produzido por astrócitos e neurônios como uma pró-proteína ligada à membrana plasmática que requer a clivagem em ambas as porções N- e C-terminal para ser funcional. *In vitro*, ADAM17 também pode clivar Notch1. A proteína APP (precursor da proteína amilóide), a qual tem um papel importante na promoção da proliferação de células embrionárias, pode ser processada por ADAM9, 10 e 17 (YANG *et al*, 2006). Camundongos nocautes para TACE (ou células do camundongo nocaute) são inaptos a clivar o receptor TNF, a molécula de adesão L-selectina e o precursor de proteína amilóide (APP), sugerindo que TACE é uma secretase com múltiplos substratos (PRIMAKOFF e MYLES, 2000).

O ativador de plasminogênio urokinase (uPA) é uma serino-protease responsável pela ativação de plasminogênio primário e que está envolvido em processos de remodelamento de tecidos. O uPA é composto por três domínios: fragmento amino-terminal (ATF), kringle (K) e fragmento carboxi-terminal (CTF), cada um deles é distinto e biologicamente ativo. Bakken e colaboradores (2009) demonstraram que ATF pode induzir fortemente a migração de VSMCs (células de músculo liso vascular humanas) independente de plasmina *in vitro*. Essa migração pode ser bloqueada pela inibição de EGFR, e a incubação com siRNA de ADAM9 e ADAM10 reduziu significativamente a ativação de EGFR em resposta a ATF. Portanto, esse estudo demonstra que ATF requer EGFR para a migração celular. Além disso, demonstraram que essa resposta é mediada por G $\beta\gamma$ (proteínas G) e por ADAM9 e ADAM10 (BAKKEN *et al*. 2009).

Alguns estudos demonstram o envolvimento das metaloproteases ADAM com o câncer (MURPHY, 2009). ADAM9, por exemplo, é expressa por miofibroblastos estromais de fígado, particularmente aqueles situados próximos à

fronte invasiva. ADAM17 é superexpressa em carcinoma de cólon humano primário, sem dizer respeito ao estágio tumoral e o estado de diferenciação. Em modelos murinos de tumores de mama, próstata e cólon, ADAM12 foi localizada em uma subpopulação de células estromais positivas para α -actina de músculo liso que eram adjacentes a células epiteliais tumorais. ADAM12 é essencial para o desenvolvimento e progressão tumoral no modelo murino de câncer de próstata. Ela também foi descrita como uma candidata a oncogene numa análise mutacional em câncer de mama. Mutuamente, a super-regulação de ADAM15 em células tumorais foi descrita em adenocarcinomas agressivos, e deve ter um papel regulatório essencial na progressão metastática em ambos os cânceres de próstata e de mama (MURPHY, 2009).

1.1.3. Domínio Desintegrina

Em algumas ADAMs, incluindo as ADAMs 2, 3, 4, 5, 11, 22 e 23, a sequência catalítica clássica no domínio metaloprotease está ausente, sugerindo que elas estão principalmente envolvidas em sinalização direta célula-célula pela ligação a outras proteínas, por exemplo, através de seu domínio desintegrina (YANG *et al* 2006).

ADAMs são as únicas entre as proteínas de superfície celular contendo um domínio desintegrina (WHITE, 2003). Este domínio possui alta homologia com a sequência de peptídeos de uma classe de desintegrinas solúveis presentes em veneno de serpente (SVMPs) (PRIMAKOFF e MYLES, 2000). Estas SVMPs são chamadas desintegrinas pois interagem com integrinas através de seu loop de desintegrina, formado por uma sequência de 13 aminoácidos que contém uma sequência de ligação a integrina (RGD) no topo. Os loops de desintegrina de todas as ADAMs e P-III SVMPs (formadas pelo processamento proteolítico de P-II SVMPs) contêm uma cisteína extra em comparação com aqueles de P-II SVMPs. Esta cisteína, que provê ao domínio semelhante a desintegrina um número incomum de cisteínas, deve ser livre ou formar uma ponte dissulfeto com uma cisteína do domínio rico em cisteína, o qual também contém um número incomum de cisteínas (WOLFSBERG *et al*, 1995). Em cultura, domínios desintegrina de ADAM podem interagir com integrinas em células vizinhas, mas ainda não é sabido se elas podem

interagir com integrinas na mesma célula. Enquanto algumas interações entre ADAMs e desintegrinas requerem ativação da integrina, outras não necessitam (WHITE, 2003).

As proteínas codificadas por ADAMs 1 e 2, fertilinas α e β , são encontradas como um heterodímero de superfície de espermatozóide. Ambas as proteínas são sintetizadas no testículo como precursoras e são processadas proteoliticamente durante o desenvolvimento do espermatozóide. O heterodímero de fertilina α/β está envolvido na ligação e na fusão do espermatozóide ao óvulo. O complexo α/β compartilha características com certas proteínas de fusão virais, e peptídeos análogos ao domínio desintegrina da fertilina β inibem a ligação e a fusão do espermatozóide ao óvulo (WOLFSBERG *et al.*, 1995). A clonagem de cDNAs codificando as subunidades das fertilinas revelaram a presença de um suposto domínio desintegrina na subunidade β e um suposto peptídeo de fusão na subunidade α . Isto levou à hipótese de que a fertilina se liga a uma integrina na superfície do óvulo via domínio desintegrina da sua subunidade β e que então a subunidade α medeia a união das membranas plasmáticas opostas (HUOVILA *et al.*, 1996). A primeira interação ADAM-integrina suspeitada foi entre o heterodímero ADAM1/2 de espermatozóide e uma integrina de óvulo (WHITE, 2003). Foi também descrito que a região transmembrana da proteína ADAM1 é capaz de formar oligômeros, principalmente homotrímeros (GAN *et al.*, 2007). É possível que a forma estrutural homotrimérica de ADAM1 esteja presente durante a interação do espermatozóide com o óvulo. Alternativamente, a oligomerização de ADAM1 pode ser importante para regular as atividades de ADAM1 em outros tecidos, já que ela é também expressa em menores níveis em uma variedade de tecidos como cérebro, coração, rins, fígado, pulmões, músculo esquelético, baço e ovário (GAN *et al.*, 2007).

Metargidina (ADAM15) humana é a única ADAM identificada até agora contendo uma sequência RGD dentro de seu domínio desintegrina. Zhang e colaboradores (1998) demonstraram, utilizando ensaios de adesão e afinidade cromatográfica, que o domínio desintegrina recombinante da ADAM15 fusionado a GST especificamente interage com a integrina $\alpha\beta3$. A interação entre o domínio desintegrina recombinante e a integrina $\alpha\beta3$ é dependente do tripeptídeo RGD no sítio hipotético de ligação a integrina (ZHANG *et al.*, 1998).

Em 1999, Nath e colaboradores, utilizando a proteína metargidina fusionada a Fc humana além de uma combinação de ensaios bioquímicos e com anticorpos bloqueantes, demonstraram que metargidina pode se ligar a $\alpha v\beta 3$ em células U937 (linhagem celular de monócito) e a $\alpha 5\beta 1$ em células MOLT-4 (linhagem de célula T). De fato, foi demonstrado que a ligação é dependente de RGD, sugerindo que a metargidina pode funcionar como uma molécula de adesão celular via seu domínio desintegrina. Evidência direta para a especificidade dessas interações foi obtida por ensaios de adesão em fase-sólida. Portanto, a ligação em ambas as linhagens celulares foi mediada, pelo menos em parte, pelo domínio desintegrina da metargidina, já que peptídeos sintéticos baseados na sequência RGD bloquearam completamente a ligação celular (NATH *et al*, 1999).

A ADAM15 não é expressa *in vivo* em vasos normais, mas é regulada em lesões de aterosclerose, onde muitos macrófagos estão presentes. É possível que a ADAM15 ativada em células endoteliais interaja com $\alpha v\beta 3$ em leucócitos durante a aterogênese através da exposição do seu domínio desintegrina. Foi demonstrado que a integrina $\alpha v\beta 3$ está envolvida na progressão do melanoma e na indução de nova vascularização por células tumorais. Antagonistas de $\alpha v\beta 3$ promovem a redução tumoral pela indução da apoptose de vasos sanguíneos angiogênicos. É possível que a MDC-15 ativada e a $\alpha v\beta 3$ em células endoteliais interajam uma com a outra, levando a agregação homotípica de células endoteliais durante a angiogênese (ZHANG *et al*, 1998).

Eto e colaboradores (2000) demonstraram que a integrina $\alpha 9\beta 1$ reconhece o domínio desintegrina da ADAM15 numa maneira independente de RGD. Foi demonstrado que a sequência requerida para a interação entre a ADAM15 e esta integrina é a sequência RX_6DLPEF presente no domínio desintegrina da ADAM15. Estes resíduos são conservados entre os domínios desintegrina de quase todas as ADAMs de mamíferos, exceto para ADAM10, que tem a sequência RX_5AREGI , e ADAM17, que tem a sequência QX_7KGVSY , nesta região. Portanto, hipotetizaram que a integrina $\alpha 9\beta 1$ é um receptor comum para muitos, se não todos, domínios desintegrina de ADAMs com esta sequência. Encontraram que células CHO expressando $\alpha 9$ aderem a domínios desintegrina das ADAMs 1, 2, 3 e 9 assim como ao de ADAM15 utilizado como controle positivo. Essas células não aderiram significativamente aos domínios desintegrina das ADAMs 10 ou 17. Esses resultados

indicam que $\alpha 9\beta 1$ deve ser um receptor comum aos domínios desintegrina de ADAMs com sequências semelhantes a RX_6DLPEF (ETO *et al*, 2002).

1.1.4. Domínio Rico em cisteína

Foi demonstrado que células mesenquimais aderiram a ADAM12 apresentando uma morfologia espalhada e achatada (IBA *et al.*, 2000), padrão esse de adesão celular também observado quando as células foram plaqueadas em laminina ou fibronectina. As células aderiram eficientemente a uma proteína recombinante contendo os domínios desintegrina e rico em cisteína de ADAM12 (rADAM12-DC), mas o espalhamento celular pareceu menos eficiente que sobre uma outra proteína recombinante contendo apenas o domínio rico em cisteína (rADAM12-cys). As células mesenquimais totalmente espalhadas formaram adesões focais e continham um elaborado citoesqueleto de actina quando plaqueadas em rADAM12-cys. Além disso, a adesão de células mesenquimais a rADAM12-cys e rADAM12-DC foi criticamente dependente do heparan sulfato de superfície celular e os resultados obtidos indicaram sindecana-4 como um potencial receptor de adesão para rADAM12-cys (IBA *et al.*, 2000). Portanto, o domínio rico em cisteína da ADAM12 dá suporte à adesão celular mediada por sindecana.

Integrinas e sindecans cooperam com a estimulação da ligação de células a proteínas da MEC, portanto a habilidade de ADAMs interagirem com integrinas, sindecans e proteínas da MEC sugere que as ADAMs poderiam ter papéis-chave na modulação de interações célula-matriz (WHITE, 2003). ADAMs, integrinas e sindecans poderiam cooperar em cis para modular a função de protease das ADAMs. Interações entre o domínio desintegrina de uma ADAM com integrinas e interações entre o domínio rico em cisteína com sindecans poderiam também ajudar a liberar a integrina e o sindecana de suas interações com uma proteína da matriz extracelular e posicionar o domínio protease para clivar alguma proteína da MEC (WHITE, 2003).

1.1.5. Cauda Citoplasmática

ADAMs possuem caudas citoplasmáticas incomuns, muitas ricas em prolina, serina, ácido glutâmico e/ou lisina. As caudas das ADAMs poderiam estar envolvidas em oligomerização ou, talvez, em sinalização (WOLFSBERG *et al*, 1995). A habilidade de uma ADAM de liberar um substrato poderia ser modulada por fosforilação ou pela ligação de proteínas acessórias às suas caudas citoplasmáticas. As modificações da cauda citoplasmática de uma ADAM poderiam afetar sua expressão na superfície celular, localização em um domínio específico de membrana, associação com outras proteínas de superfície, estabilidade, ou sua habilidade de clivar substratos específicos em resposta a estímulos específicos (WHITE, 2003). A cauda citoplasmática de algumas das ADAMs contém sítios de ligação SH3 os quais podem interagir com e potencialmente ativar domínio SH3 contendo moléculas de sinalização como src e grb (YANG *et al*, 2006).

1.1.6. ADAMs expressas no Sistema Nervoso

A expressão de algumas ADAMs é detectada em encéfalo de mamíferos (NOVAK, 2004). ADAM8, além de ser expressa em macrófagos e células B, é expressa em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, no encéfalo e na medula espinhal; sua principal função deve residir na regulação das respostas imunes e inflamatórias pela regulação da infiltração de leucócitos e do *shedding* de L-selectina. Embora a ADAM9 seja amplamente expressa e esteja presente em encéfalo, camundongos deficientes em ADAM9 desenvolvem-se em adultos inférteis sem maiores anormalidades. Portanto isto sugere que outros membros da família ADAM podem substituí-la funcionalmente (NOVAK, 2004).

No embrião de camundongo, a proteína ADAM10 é expressa principalmente em precursores neurais simpatoadrenais e olfatórios. Já ADAM15 é expressa em neurônios do neocórtex, do hipocampo, do corpo caloso e no plexo coróide, nos neurônios granulares do cerebelo e nas células Purkinje, e nos neurônios motores na medula espinhal. Células de Schwann purificadas e astrócitos também expressam ADAM15 (NOVAK, 2004). A expressão de ADAM19 na embriogênese de camundongo pode ser encontrada no gânglio crânio-facial e dorso-basal e nos

córneos ventrais da medula espinhal. A expressão de ADAM19 foi também identificada como um marcador de diferenciação de células dendríticas (NOVAK, 2004).

ADAM22 parece ser expressa exclusivamente no encéfalo. O gene para ADAM23, localizado no cromossomo 2q33, é predominantemente expresso no encéfalo, com alguma expressão também no coração e no músculo esquelético (NOVAK, 2004). A expressão de ADAM11 está associada com o desenvolvimento do SNP (sistema nervosa periférico) em mamíferos, mas o gene de ADAM11 de mamífero demonstra um padrão de expressão embrional espalhado, incluindo o SNC (sistema nervoso central) em desenvolvimento e alguns tecidos não-neuronais. No SNC adulto, o gene de ADAM11 foi expresso em campos neuronais em todos os níveis do eixo neural (RYBNIKOVA *et al.*, 2002).

Durante o desenvolvimento do embrião de galinha, foi analisada a expressão de membros da família ADAM (LIN *et al.*, 2008). Detectaram que ADAM9 é expressa em vasos sanguíneos, no plexo coróide, por partes do neuroepitélio e em regiões da substância cinzenta em diferenciação, sugerindo que ADAM9 desempenha múltiplas funções desconhecidas durante o desenvolvimento cerebral. Também demonstraram que ADAM10 é principalmente expressa pelos vasos sanguíneos em desenvolvimento assim como em regiões restritas do neuroepitélio e na substância cinzenta em diferenciação. Já a proteína ADAM12 é expressa em regiões restritas do neuroepitélio, sugerindo um papel na regionalização cerebral. Especialmente impressionante é a sua expressão altamente restrita em poucas estruturas da substância cinzenta (LIN *et al.*, 2008).

1.2. A PROTEÍNA ADAM23

Sagane e colaboradores (1998) clonaram dois novos cDNAs provenientes de encéfalo humano. Análises das sequências de aminoácidos deduzidas revelaram que ambos possuem estruturas típicas de desintegrinas celulares e exibem alta similaridade de sequência com a proteína humana MDC/ADAM11. Estes cDNAs foram denominados MDC2/ADAM22 e MDC3/ADAM23. O cDNA predito para a MDC3 humana codifica uma proteína de 832 aminoácidos, incluindo um domínio hidrofóbico transmembrânico e oito sítios potenciais de N-glicosilação. Como outras

desintegrinas celulares, MDC2 e MDC3 têm múltiplos domínios estruturais incluindo um pró-domínio, um domínio semelhante a metaloprotease, um semelhante a desintegrina, um rico em cisteína, um semelhante a fator de crescimento epidermal, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático. Dentro do domínio metaloprotease, ambas as MDCs 2 e 3 não possuem o sítio ativo de aminoácidos HEXXHXXGXXH para a ligação de zinco, o qual é crítico para a atividade proteásica (SAGANE *et al*, 1998).

Em 2004, Sun e colaboradores clonaram dois novos cDNAs de ADAM23. A sequência de aminoácidos deduzida de um desses cDNAs, com aproximadamente 250pb, demonstrou uma estrutura de domínio conservada consistindo de um peptídeo-sinal, um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina e um domínio rico em cisteína, mas detectaram a ausência do domínio transmembrana. Portanto, a proteína resultante deve ser uma forma secretada. Designaram este novo clone como ADAM23 γ . O quadro de leitura da ADAM23 γ muda depois do domínio rico em cisteína comparado à ADAM23 α (MDC3/ADAM23 clonada por SAGANE *et al*, 1998). ADAM23 α e ADAM23 γ compartilham a mesma região 3'-UTR, mas as sequências de aminoácidos para a cauda citoplasmática são diferentes. Encontraram ambos os transcritos expressos em encéfalo de embriões e de adultos. Para o fragmento clonado de 350bp (tamanho correspondente ao da ADAM23 clonada por Sagane), duas sequências diferentes foram obtidas. Uma delas é consistente com a de ADAM23 α , a outra tem 91pb diferentes no sítio divergente, e foi denominada ADAM23 β . Os 91 nucleotídeos divergentes codificam para o domínio transmembrana que, portanto, em ADAM23 β são diferentes dos de ADAM23 α . ADAM23 α e ADAM23 β compartilham 54% de similaridade na região transmembrana. Considerando a significativa similaridade entre a ADAM23 α , β e γ , todas os três cDNAs devem representar transcritos diferentes do mesmo gene mais do que genes parálogos diferentes (SUN *et al*, 2004).

Goldsmith e colaboradores (2004) descreveram que um anticorpo anti domínio desintegrina de ADAM23 (α Dis) reconhece uma banda de aproximadamente 70kDa em três regiões diferentes do encéfalo (bulbo, cerebelo e córtex), que está ausente em todos os outros tecidos testados (fígado, rim, músculo esquelético, coração e pulmão). Confirmaram que células granulares cerebelares (CGCs) expressam a proteína ADAM23 *in vitro* por RT-PCR, imunocitoquímica e immunoblotting e encontraram que, sob condições redutoras, α Dis incubado com

lisado de encéfalo reage fortemente com uma proteína de aproximadamente 70kDa e também com uma proteína menos abundante cuja massa é de aproximadamente 100kDa. Esses dados sugerem que CGCs provavelmente expressam duas formas de ADAM23. Como a ADAM23 contém uma sequência RRKR de reconhecimento pela pro-proteína convertase (PC) entre seu pro-domínio e seu domínio metaloprotease, o grupo hipotetizou que a banda de 100kDa representaria a forma imatura longa da proteína, enquanto a banda de 70kDa corresponderia à forma madura de ADAM23, na qual o pró-domínio está ausente. Demonstraram de forma consistente que d-RVKR-CMK, um peptídeo inibidor de enzimas do tipo furina, induziu uma diminuição significativa na quantidade de ADAM23 de 70kDa presente em CGC, o que sugere que a ADAM23 de 100kDa é clivada por furina, ou enzima relacionada, e que a geração da proteína ADAM23 contendo o domínio citoplasmático, mas sem o pró-domínio, é uma consequência deste evento de processamento. Também obtiveram resultados que suportam a hipótese de que ambas as formas não processada e processada de ADAM23 são glicosiladas (GOLDSMITH *et al* 2004).

As três ADAMs 11, 22 e 23 são altamente expressas no encéfalo, mas são detectadas apenas fracamente ou não detectadas em outros tecidos (SAGANE *et al*, 1998). Foi demonstrado que ADAM23 é extensivamente expressa por todo o encéfalo de rato e pode ser detectada em níveis particularmente altos em regiões específicas. Dentro do hipocampo, por exemplo, ADAM23 parece ser expressa nos campos CA1 e CA3, assim como em neurônios piramidais. No cerebelo, é observada forte marcação em células Purkinje. Além disso, transcritos de ADAM23 são igualmente distribuídos através de todas as camadas do córtex cerebral (GOLDSMITH *et al* 2004).

Baseados na expressão de um gene repórter substituindo o gene de ADAM23, Mitchell e colaboradores (2001) demonstraram que ADAM23 é altamente expressa em células Purkinje no cerebelo e no gânglio basal de camundongo. Além disso, demonstraram que a ausência de ADAM23 causa tremores severos e ataxia nos camundongos homozigotos para a substituição, os quais morriam duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al*. 2001). Leighton e colaboradores (2001) demonstraram, com uma técnica semelhante, a forte expressão de ADAM23 no estriado do encéfalo de camundongo.

Lin e colaboradores (2008) revelaram os padrões complexos de expressão das duas ADAMs 22 e 23 no encéfalo em desenvolvimento de galinha. Ambas as ADAMs são expressas em regiões restritas do neuroepitélio, e seus padrões de expressão no neuroepitélio e na substância cinzenta diferem entre si, mas se sobrepõem parcialmente. Em algumas estruturas cerebrais, como por exemplo a glândula pineal e o plexo coróide, o padrão de expressão das duas ADAMs é oposto. Esses resultados sugerem que as duas ADAMs, apesar de suas sequências nucleotídicas proximamente homólogas, possuem papéis distintos nas diferentes estruturas cerebrais (LIN *et al.*, 2008).

Cal e colaboradores (2000) descreveram que ADAM23 interage especificamente com a integrina $\alpha\beta 3$. A especificidade da interação entre ADAM23 e $\alpha\beta 3$ foi confirmada por ensaios de ligação direta utilizando proteínas purificadas. Células aderentes a ADAM23 demonstram diferenças na morfologia quando comparadas com aquelas aderidas a proteínas características da matriz extracelular como fibronectina. Essas diferenças incluem a presença de pequenas projeções em células crescendo sobre ADAM23 assim como uma organização distinta de filamentos de actina (CAL *et al.*, 2000).

Foi também demonstrado que a ADAM23 não somente tem papel na diferenciação de células neurais, mas também tem papel na determinação do destino celular. ADAM23 está provavelmente envolvida na formação de neuritos e está assimetricamente distribuída na parte proximal de neuritos (SUN *et al.*, 2007).

A proteína LGI1 (*Leucine-rich glioma inactivated 1*) de camundongo foi descrita como uma ligante específica de ADAM11, ADAM22 e ADAM23, e a interação mais forte foi observada entre LGI1 e ADAM23 (SAGANE *et al.*, 2008). Houve uma interação moderada para ADAM22 e uma interação mais fraca com ADAM11. A proteína LGI4 é outra ligante para estas ADAMs. Quando comparada a interação entre LGI4 e ADAM22, ADAM23 ou ADAM11, a interação mais forte foi observada com ADAM22, mas houve também uma interação moderada com ADAM11 e ADAM23, o que sugere que LGI4 interage não somente com ADAM22, mas também com ADAM11 e ADAM23 (SAGANE *et al.*, 2008). Ozkaynak e colaboradores (2010) descreveram que LGI4 e ADAM22 são expressas em células de Schwann assim como em neurônios sensoriais e que LGI4 liga-se diretamente a ADAM22 sem a necessidade de fatores adicionais associados à membrana. Demonstraram que as células de Schwann são a principal fonte de LGI4 no nervo

em desenvolvimento, que ADAM22 é necessária nos axônios e revelaram um novo eixo de sinalização parácrina na mielinização de nervos periféricos no qual LGI1 secretada por células de Schwann age através da ligação com ADAM22 axonal para dirigir a diferenciação de células de Schwann (OZKAYNAK *et al.*, 2010).

Em 2009, Owuor e colaboradores investigaram a função de LGI1 através de uma procura imparcial ampla no genoma por sítios de ligação de superfície celular, e identificaram ADAM23, o que valida a noção de que a família ADAM23/22/11 é o sítio primário da ação de LGI1. Encontraram que LGI1 aumenta o crescimento de neuritos em um mecanismo dependente de ADAM23 *in vivo* e *in vitro*. Além disso, camundongos com ausência de ADAM23 exibem atividade epiléptica e camundongos heterozigotos para esta mutação em ADAM23 possuem um percentual de epilepsia diminuído em relação aos nocautes. Postularam que uma mutação em LGI1 resulta numa diminuição da função de ADAM23 e num circuito cerebral alterado que sustenta a propensão a epilepsia em indivíduos com ADPEAF (*autosomal dominant partial epilepsy with auditory features*) (OWUOR *et al.*, 2009).

A Proteína Príon Celular (PrP^c) foi caracterizada recentemente pelo nosso grupo como um novo parceiro molecular para ADAM23 através de ensaios de *pull-down* e co-imunoprecipitação, os quais demonstraram uma interação física entre ADAM23 e PrP^c endógena ou recombinante. Ensaios de ligação *in vitro* sugeriram que o domínio desintegrina de ADAM23 é capaz de interagir diretamente com PrP^c (COSTA *et al.*, 2009).

Foram encontradas evidências para a regulação negativa epigenética do gene de ADAM23 em alguns tipos de câncer, como câncer de mama (COSTA *et al.*, 2004), câncer gástrico (TAKADA *et al.*, 2005) e câncer colorretal (CHOI *et al.*, 2009). Metilação aberrante foi verificada em 69,2% dos casos de tumores de mama primários analisados. Esses resultados sugerem que ADAM23 deve ser regulada negativamente durante a progressão do câncer de mama, já que a expressão de ADAM23 foi detectada no tecido normal, mas não pôde ser detectada ou foi detectada em níveis menores em 66,7% das linhagens celulares tumorais examinadas (COSTA *et al.*, 2004). Takada e colaboradores (2005) observaram a deleção homozigota de ADAM23 em cânceres gástricos primários, apesar de infreqüente. Entretanto, a expressão desse gene também foi perdida na maioria das linhagens celulares de câncer gástrico sem a perda homozigota, embora houvesse expressão de mRNA de ADAM23 no estômago normal. Esses resultados sugerem

que a inativação de ADAM23 epigenética ou geneticamente deve estar relacionada com carcinogênese gástrica (TAKADA *et al.*, 2005). Choi e colaboradores (2009), por sua vez, analisaram a expressão de ADAM23 em linhagens celulares de câncer colorretal e examinaram o estado de metilação do DNA em tecidos com este tipo de câncer e seus tecidos normais correspondentes. Encontraram que ADAM23 foi silenciado aberrantemente ou expresso em níveis muito baixos em 88% das linhagens celulares de câncer colorretal. Análise por MSP (PCR metilação-específica) demonstrou que o gene de ADAM23 estava metilado em 91% das linhagens celulares de câncer colorretal, e a expressão atenuada de ADAM23 deve estar relacionada com a hipermetilação de sua região promotora (CHOI *et al.*, 2009).

A possibilidade de que a interação entre ADAM23 e a integrina $\alpha\beta 3$ poderia modular negativamente a ativação da integrina $\alpha\beta 3$ durante a progressão metastática foi investigada por Verbisck e colaboradores (2009). Demonstraram que a diminuição da expressão de ADAM23 aumentou a ativação da integrina $\alpha\beta 3$ e células que sofreram *knockdown* desta proteína apresentaram aumento na migração e na adesão a ligantes clássicos da integrina $\alpha\beta 3$. A ausência da expressão de ADAM23 também aumentou a interrupção de células tumorais pulmonares em camundongos imunodeficientes. Os resultados obtidos dão suporte a um papel funcional de ADAM23 durante a progressão metastática através da modulação negativa da ativação da integrina $\alpha\beta 3$ (VERBISCK *et al.*, 2009).

Foi demonstrado, através de ensaios de microarranjo e PCR em tempo real, que ADAM23 é altamente expressa em células endoteliais provenientes de tecidos neoplásicos (carcinomas de ovário e de rim) quando comparada com a sua expressão em células endoteliais de tecidos não neoplásicos (glândulas adrenais e pele) (GHILARDI *et al.*, 2008). Os resultados obtidos também demonstraram que ADAM23 não é expressa nas células tumorais analisadas. Esses resultados sugerem que esta proteína deve ser importante para a formação de novos vasos sanguíneos no interior do tumor (GHILARDI *et al.*, 2008).

Utilizando a tecnologia do microarranjo, Djouad e colaboradores (2007) investigaram o perfil de expressão gênica de células tronco mesenquimais (MSCs) humanas derivadas de medula óssea por 21 dias, antes e depois de sua diferenciação em condrócitos. Então investigaram se tais genes devem ser modulados durante o curso da condrogênese e se têm papel no processo de diferenciação. Constataram que ADAM23, dentre outras proteínas da família ADAM,

é expressa em MSCs e que há aumento de sua expressão nos estágios tardios da condrogênese. Portanto, ADAM23 deve estar envolvida na comunicação das células tronco mesenquimais com componentes da matriz extracelular durante o processo de condrogênese (DJOUAD *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

- Expressar e purificar diferentes domínios de ADAM23 em sistema heterólogo recombinante de *E. coli*;
- Imunizar camundongos BALB/C com as proteínas purificadas;
- Testar os soros dos camundongos imunizados quanto a produção de anticorpos policlonais específicos para ADAM23;
- Produzir anticorpos monoclonais anti-ADAM23 através da fusão de células de baço dos camundongos hiperimunes com células de mieloma.

3. JUSTIFICATIVAS

A proteína ADAM23 foi descrita recentemente na literatura e pouco ainda se sabe a respeito de suas funções. Sua importância é notada pela sua ampla distribuição no Sistema Nervoso Central, pelo fato de que camundongos nocautes para esta proteína não sobrevivem mais do que duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001) e pelo alto grau de conservação desta proteína entre as espécies. Ainda são necessárias investigações a respeito dos possíveis parceiros moleculares desta proteína para que sejam elucidados os seus mecanismos de ação. Além disso, dados a respeito da localização subcelular desta molécula ainda necessitam ser esclarecidos.

Devido à sua descrição recente, ainda há poucas ferramentas disponíveis para o estudo de ADAM23. Portanto, é necessária a construção de ferramentas que possam reconhecer ou mimetizar a proteína ADAM23 em diversas abordagens bioquímicas e de funcionalidade biológica. Proteínas recombinantes com diversos domínios desta proteína podem mimetizar as funções da proteína como um todo e desvendar as funções específicas de cada domínio. Anticorpos policlonais e monoclonais, por sua vez, são ferramentas imunoquímicas de bastante utilidade em abordagens bioquímicas devido à sua alta especificidade de ligação à proteína de interesse.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS VETORES

Os três vetores utilizados neste trabalho, contendo os insertos codificantes para os domínios desintegrina, metaloprotease+desintegrina e desintegrina+rico em cisteína da proteína ADAM23 humana, foram construídos pela aluna de doutorado Michele Dietrich Moura Costa (dados em preparação).

4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS RECOMBINANTES DA PROTEÍNA ADAM23

A produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo recombinante de *E. coli* foi realizada como descrito por Sambrook *et al.* (2001).

4.2.1. GST-Desintegrina recombinante

Bactérias eletrocompetentes *E. coli* (Sambrook *et al.*, 2001), cepa DH5 α , recebiam aproximadamente 25ng de plasmídeo pGEX2T com construção que codifica para o domínio desintegrina da proteína ADAM23 humana. As bactérias eram submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporação). As células eram então recuperadas em 1ml de meio 2X YT (5g/l NaCl; 10g/l extrato de levedura; 16g/l triptona, pH 7,0) por 1h a 37°C. Subsequentemente, a cultura era plaqueada em meio sólido (2XYT-Ágar com 17g/l de ágar) contendo antibiótico ampicilina na concentração de 100 μ g/ml para selecionar as bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse, já que este provê à bactéria resistência a esta droga.

Colônias selecionadas provenientes do plaqueamento eram inoculadas em 2ml de meio 2XYT/Amp e cultivadas durante 16 horas a 37°C. Esta cultura saturada era submetida à diluição de 1:50 em 10 ml de meio 2XYT/Amp (pré-inóculo) e agitação constante a 37°C para crescimento até fase exponencial. Ao atingir a absorbância de aproximadamente 0,6 a 600nm, 0,1mM de IPTG (isopropil- β -D-

tiogalactosídeo) era adicionado para a indução da expressão da proteína recombinante, processo denominado de “mini-expressão”. A indução transcorria a 37°C por 2h. As bactérias eram coletadas por centrifugação a 4000xg por 10 minutos a 4°C e o precipitado então era ressuspensionado em 100µl de tampão de amostra redutor duas vezes (62mM Tris-HCl pH 6.8, 2% de SDS, 40% glicerol, 0,2% azul de bromofenol e 200mM β-Mercaptoetanol), submetido a SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970) e corado com azul de Coomassie para verificação dos clones de alta expressão.

Clones com alta taxa de expressão dos domínios recombinantes da proteína ADAM23 eram expandidos em meio de cultura líquido, sob agitação, a 37°C. Quando as culturas atingissem a absorbância desejada (aproximadamente 0,6), eram submetidas à indução com 0,1mM de IPTG por 2h, etapa esta denominada de “expressão em larga escala”.

As bactérias eram novamente sedimentadas por centrifugação a 4000xg por 10 minutos, o precipitado ressuspensionado em tampão de lise nativa gelado (PBS, 2mM PMSF, 1mg/ml de lisosima), em banho de gelo, e em seguida feita a lise mecânica (1000psi) em prensa de French. O lisado resultante era então centrifugado a 10000xg por 30 minutos a 4°C e a fração solúvel era filtrada em membrana de 0,8µm. Tween 20 era adicionado na concentração final de 0,5%. A mistura era então incubada por 30 minutos, sob agitação a 4°C, com 200µL de matriz cromatográfica de glutathiona-sepharose 4B (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com PBS acrescido de Triton X-100 (concentração final igual à do tampão utilizado para lisar as bactérias). Em seguida, a matriz era recuperada por centrifugação (5000 rpm) e ocorria uma seqüência de seis lavagens com PBS gelado. A proteína ligada na resina era eluída com tampão de glutathiona reduzida (10mM de glutathiona reduzida em 50mM de Tris-HCl pH 8,0) em cinco frações de 200µL. As frações eluídas eram submetidas a diálise contra 6L de PBS a 4°C para a retirada da glutathiona livre. A concentração da proteína após a diálise era mensurada pelo método de Bradford (1976).

4.2.2. GST-metaloprotease+desintegrina

Para expressar os domínios metaloprotease + desintegrina, bactérias eletrocompetentes *E. coli* (Sambrook et al., 2001), cepa DH5 α , recebiam aproximadamente 25ng de plasmídeo pGEX2T com construção que codifica para os domínios metaloprotease e desintegrina da proteína ADAM23 humana. A eletroporação ocorria como descrito acima, assim como a recuperação em meio 2XYT e o subsequente plaqueamento em meio sólido (2XYT/amp) para a seleção das bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse.

As colônias selecionadas também eram submetidas aos métodos descritos anteriormente para induzi-las a expressar a proteína recombinante no processo de mini-expressão. As bactérias eram subsequentemente coletadas por centrifugação a 4000xg por 10 minutos a 4°C e o precipitado então era ressuspendido submetido a SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970), assim como descrito acima, e corado com azul de Coomassie para verificação dos clones de alta expressão. Estes eram expandidos em meio de cultura líquido, sob agitação, a 37°C. A indução da expressão desta proteína recombinante ocorreu em duas diferentes absorbâncias, uma correspondente à fase de crescimento exponencial (aproximadamente 0,6) e outra correspondente à fase estacionária (0,9).

As bactérias eram novamente sedimentadas por centrifugação a 4000xg por 10 minutos, o precipitado ressuspendido em tampão de lise nativa gelado (PBS, 2mM PMSF, 1mg/ml de lisosima, 2% de Tween 20), em banho de gelo, e em seguida feita a lise mecânica (1000psi) em prensa de French. O lisado resultante era então centrifugado a 9000xg por 30 minutos a 4°C e a fração solúvel era filtrada em membrana de 0,8 μ m. Este sobrenadante então era incubado por 16 horas, sob agitação a 4°C, com 200 μ L de matriz cromatográfica de glutathiona-sepharose 4B (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com PBS acrescido de 2% de Tween 20. Em seguida, a matriz era recuperada por centrifugação (5000rpm), ocorria uma seqüência de seis lavagens com PBS gelado e a proteína ligada na resina era eluída com tampão de glutathiona reduzida (10mM de glutathiona reduzida em 50mM de Tris-HCl pH 8,0) em cinco frações de 200 μ L. As frações eluídas eram submetidas a diálise contra 6L de PBS a 4°C e a sua concentração era mensurada pelo método de Bradford (1976).

4.2.3. 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína

4.2.3.1. Bactérias BL21 (DE3) pLys S

Para expressar os domínios desintegrina + rico em cisteína, bactérias eletrocompetentes *E. coli* (Sambrook et al., 2001), cepa BL21 (DE3) pLys S, recebiam aproximadamente 25ng de plasmídeo pET28a com construção que codifica para os domínios desintegrina e rico em cisteína da proteína ADAM23 humana. A eletroporação ocorria como descrito anteriormente. A recuperação transcorria em meio LB (10mg/ml triptona, 5mg/ml extrato de levedura, 10mg/ml NaCl) e o subsequente plaqueamento era em meio sólido LB com antibióticos Kanamicina (30µg/ml) e Cloranfenicol (34µg/ml) para a seleção das bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse (plasmídeo confere resistência à Kanamicina e a bactéria possui resistência ao Cloranfenicol).

As colônias selecionadas eram inoculadas em 2ml de meio LB/Kan+Clor e cultivadas durante 16 horas a 37°C; eram submetidas à diluição de 1:50 em 10ml de meio LB/Kan+Clor (pré-inóculo) e a agitação constante a 37°C para crescimento até fase exponencial (absorbância de aproximadamente 0,6 a 600nm); e eram induzidas a expressar a proteína recombinante com 1mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) a 37°C por 3h (mini-expressão). As bactérias eram coletadas por centrifugação a 5000xg por 15 minutos a 4°C e o precipitado então era ressuspenso e submetido a SDS-PAGE 10%, assim como descrito acima, e corado com azul de Coomassie para verificação dos clones de alta expressão.

Os clones com alta taxa de expressão da proteína de interesse eram expandidos em meio de cultura líquido, sob agitação, a 37°C. Quando as culturas atingissem a absorbância desejada (aproximadamente 0,6), eram submetidas à indução com 1mM de IPTG por 4h a 24°C (expressão em larga escala).

4.2.3.1.1 Purificação sob condições nativas

As bactérias eram novamente sedimentadas por centrifugação a 5000xg por 15 minutos, o precipitado ressuspenso em tampão de lise nativa (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 2mM PMSF, pH 8.0), em banho de gelo, e em seguida feita a lise mecânica (1000psi) em prensa de French. O lisado resultante era então centrifugado

a 3000xg por 15 minutos a 4°C e a fração solúvel era filtrada em membrana de 0,8µm. Este sobrenadante então era incubado por 1 hora, sob agitação, com 750µL de matriz cromatográfica de Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com o tampão de lise nativa. Em seguida, a matriz era recuperada em um aparato para formar uma coluna e ocorria uma seqüência de cinco lavagens com tampão de lise nativa mais 40mM de imidazol (análogo à histidina). A proteína ligada na resina era eluída com tampão de eluição (tampão de lise nativa mais 250mM de imidazol). Para melhorar a qualidade da purificação, foi também realizada a eluição com concentrações crescentes de imidazol. As frações eluídas eram submetidas à diálise contra 6L de PBS a 4°C para a retirada do imidazol. A concentração da proteína após a diálise era mensurada pelo método de Bradford (1976).

4.2.3.1.2 Purificação sob condições híbridas

O precipitado obtido a partir da centrifugação à qual foi submetido o lisado de bactérias era ressolubilizado com tampão 6M de hidrocloreto de guanidina, 500mM de NaCl, 20mM de fosfato de sódio, pH 7,8, sob agitação por 10min em temperatura ambiente. Ocorria, então, uma centrifugação da solução ressolubilizada por 15min a 3000xg. O sobrenadante obtido era incubado com 750µL de matriz cromatográfica de Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com tampão 8M de uréia, 20mM de fosfato de sódio, 500mM de NaCl, pH 7,8, por 30min, sob agitação, em temperatura ambiente. A matriz cromatográfica era submetida a duas lavagens com o mesmo tampão 8M de uréia, 20mM de tampão fosfato, 500mM de NaCl, pH 7,8, a outras duas lavagens com tampão 8M de uréia, 20mM de tampão fosfato, 500mM de NaCl, pH 6,0 e a quatro lavagens com tampão 50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, pH 8,0, 40mM de imidazol (tampão de lise nativa). A eluição da proteína ligada à matriz cromatográfica era realizada com o mesmo tampão de lise nativa, mais 250mM de imidazol, e as frações eluídas eram também submetidas a SDS-PAGE, a diálise e à mensuração da concentração pelo método de Bradford (1976).

4.2.3.2. Bactérias BL21 (DE3) STAR

Da mesma forma que as bactérias da linhagem BL21 (DE3) pLys S, bactérias eletrocompetentes da cepa BL21 (DE3) STAR recebiam aproximadamente 25ng de plasmídeo pET28a com construção que codifica para os domínios desintegrina e rico em cisteína da proteína ADAM23 humana e sofriam eletroporação. A recuperação também transcorria em meio LB (10mg/ml tripton, 5mg/ml extrato de levedura, 10mg/ml NaCl) e o subsequente plaqueamento era em meio sólido LB somente com o antibiótico Kanamicina (30µg/ml), pois esta cepa não possui resistência a antibiótico algum.

As colônias selecionadas sofriam o mesmo processo descrito anteriormente para selecionar os clones com maior taxa de expressão da proteína 6-His-Desintegrina+Rico em cisteína, os quais eram submetidos à expressão em maior escala para a purificação da proteína.

As bactérias, sedimentadas por centrifugação após a expressão induzida por 1mM de IPTG (que transcorria por 3h a 37°C), eram também ressuspensas em tampão de lise nativa (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 2mM PMSF, pH 8.0), e submetidas à lise mecânica (1000psi) em prensa de French. O protocolo utilizado a seguir foi adaptado de Patra e colaboradores (2000). O lisado resultante era centrifugado a 8000rpm por 15min a 4°C. O precipitado (corpos de inclusão) era então submetido a lavagem com 8ml de tampão 50mM tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8, a 8 ciclos de sonicação de 30s e a centrifugação a 9000xg por 30min a 4°C. O precipitado resultante era lavado novamente com o mesmo tampão com 1% de Triton X-100, sonicado e centrifugado como descrito anteriormente para a obtenção de um precipitado com menor teor de proteínas contaminantes, o qual era ressolubilizado em 5ml de tampão 250mM NaH₂PO₄, 2,5M NaCl, 2M uréia, 10% glicerol, 5% sucrose, 2mM PMSF, pH 12,5 e permanecia sob agitação a 4°C. Água ultrapura (5ml) era adicionada a cada 20min sobre a amostra ressolubilizada, que permanecia sob agitação, até diluí-la 5 vezes em relação ao volume inicial (volume final: 25ml). O pH da solução diluída era então ajustado para pH 8. A solução era então centrifugada a 3000xg por 15min e o sobrenadante era então filtrado em filtro de 0,45µm (PATRA *et al.*, 2000).

O sobrenadante filtrado era então incubado com resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com o tampão de lise nativa, por 1h a 20°C sob agitação. A matriz era então recuperada em aparato para formar uma coluna, onde ocorria uma seqüência de cinco lavagens com tampão de lise nativa mais 40mM de imidazol. A proteína ligada na resina era eluída com tampão de eluição (tampão de lise nativa com 250mM de imidazol). As frações eluídas eram analisadas por SDS-PAGE e posteriormente submetidas à diálise contra 6L de PBS a 4°C. A concentração da proteína após a diálise era mensurada pelo método de Bradford (1976).

4.3. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Os procedimentos que utilizam animais realizados neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em *“Guide for the Care and Use of Experimental Animal (Canadian Council on Animal Care)”*, e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Paraná, certificado nº214.

4.3.1. Imunização com GST-Desintegrina recombinante

Dois camundongos Balb/c foram submetidos a 3 imunizações com a proteína recombinante GST-desintegrina. Na primeira imunização foram inoculados em cada camundongo, pela via intra-peritoneal, 10µg da proteína recombinante e 16µl de hidróxido de alumínio (1mg no total) diluídos em PBS (tampão fosfato) totalizando um volume de solução hidrofílica de 100µL, e mais 100µL de adjuvante completo de Freund, levando a um volume final de 200µL de emulsão água em óleo. Na segunda e na terceira imunização, que foram efetuadas 14 e 28 dias após a primeira, respectivamente, foram inoculados em cada camundongo 10µg de GST-desintegrina recombinante e 16µL de hidróxido de alumínio diluídos em PBS para 100µL, mais 100µl de óleo mineral. Sete dias após a última imunização os camundongos foram sangrados através da extremidade da cauda. Os soros obtidos

após o sangramento foram testados, em diversas diluições, através de ensaios *immunoblot*.

4.3.2. Imunização com 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína recombinante

Cinco camundongos Balb/c foram submetidos a 3 imunizações com a proteína recombinante 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína. Na primeira imunização foram inoculados em cada camundongo, pela via intra-peritoneal, 50µg da proteína recombinante e 16µl de hidróxido de alumínio (1 mg no total) diluídos em PBS (tampão fosfato) totalizando um volume de solução hidrofílica de 100µL, e mais 100µL de adjuvante completo de Freund, levando a um volume final de 200µL de emulsão água em óleo. Na segunda e na terceira imunização, que foram efetuadas 14 e 28 dias após a primeira, respectivamente, foram inoculados em cada camundongo 50µg da proteína recombinante e 16µL de hidróxido de alumínio diluídos em PBS para 100µL, mais 100µl de óleo mineral. Quatorze dias após a última imunização os camundongos foram sangrados através da extremidade da cauda. Os soros obtidos após o sangramento foram testados, em diversas diluições, através de ensaios *immunoblot*.

4.4. ENSAIOS DE IMMUNOBLOT

Ensaios de *immunoblot* foram realizados para testar os soros dos camundongos imunizados e os sobrenadantes dos hibridomas. O *immunoblot* consistia em submeter à separação eletroforética extrato de células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pcDNA que codifica para a proteína HA-ADAM23, em gel com 12% de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, os géis eram submetidos a eletro-transferência para membrana de nitrocelulose. Essas membranas, por sua vez, eram bloqueadas durante 1h em solução de TBST (tampão tris) com 5% de leite em pó desnatado (TBST-leite). Após o bloqueio, eram adicionados os soros dos camundongos a serem testados, submetidos a diversas diluições, ou os sobrenadantes das culturas dos hibridomas, os quais eram incubados na membrana por aproximadamente 16h a 4°C. As membranas eram então submetidas a cinco lavagens com TBST 0,05%. O anticorpo secundário, anti-

IgG de camundongo com enzima peroxidase conjugada, era incubado por 1h na diluição de 1:3000 em TBST-leite a 20°C. As membranas eram submetidas a mais cinco lavagens com TBST 0,05% e a reação era evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (West Pico, PIERCE CO.) sobre a membrana, a qual era exposta a um filme para raios-X (Kodak). Os mesmos métodos eram utilizados para as células 293T transfectadas com plasmídeo pcDNA vazio, as quais eram utilizadas como controle negativo para as reações de *immunoblot*.

4.5. ENSAIOS DE ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*) DE CAPTURA DE ANTICORPOS

Para analisar quais eram os hibridomas secretores de anticorpos, ensaios de ELISA de captura de anticorpo foram empregados. Cada poço da placa de ELISA era sensibilizada com 0,1µg da proteína recombinante 6-His-Desintegrina+Rico em cisteína (antígeno) em 50µL de tampão carbonato 50mM pH 9,7 a 4°C por aproximadamente 16 horas. Subsequentemente, ocorria uma lavagem com solução de PBST 0,05%. A placa era então bloqueada por 1h a 37°C com 200µL da solução de bloqueio PBS-BSA 1%. Após o descarte da solução de bloqueio, 100µL dos sobrenadantes dos hibridomas a serem testados eram adicionados a cada poço da placa de ELISA e incubados por 2 horas a 37°C. Em seguida, a placa era lavada com PBST 0,05%, e em cada poço era incubada 100µL da solução de anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado à enzima peroxidase (1:5000) em solução de PBS-BSA 0,1%, por 45 minutos a 37°C. Novamente a placa era lavada e então adicionava-se a cada poço 100µL da solução de revelação: tampão citrato (50mM fosfato dissódico monoácido, 24mM ácido cítrico, pH 5,2), OPD (o-fenildiamina) (0,2mg/mL de tampão citrato) e peróxido de hidrogênio 30% (2 µL/mL de tampão citrato). Após 15 min de incubação no escuro, em temperatura ambiente, a revelação era interrompida com 50µL de solução de ácido sulfúrico 2M por poço, possibilitando a leitura em leitor de microplacas com filtro de 490nm.

4.6. EXPERIMENTO DE FUSÃO PARA A OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS

4.6.1. Cultivo de células de mieloma

Células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653 foram cultivadas em meio de cultura RPMI com 10% SFB (soro fetal bovino), 2mM de glutamina e 0,04mg/mL de garamicina até a obtenção de uma quantidade adequada de células para a obtenção de hibridomas. Para a certificação de que essas células não eram resistentes ao meio de cultura de seleção (meio HAT), foi realizado um cultivo das mesmas em meio HAT onde foi verificada 100% de morte celular (dados não mostrados).

4.6.2. Obtenção das células do animal imunizado (linfócitos B)

O camundongo M099, previamente imunizado com a proteína recombinante 6-His-Desintegrina+Rico em cisteína e cujo soro foi testado quanto à secreção de anticorpos específicos anti-ADAM23, foi imunizado com a mesma proteína pela via intra-venosa (última imunização). A imunização intra-venosa foi realizada aproximadamente 2 meses após a última imunização intra-peritoneal, e foram inoculados por esta via 10 μ g da proteína recombinante diluída em solução de PBS.

Três dias após imunização intra-venosa, o animal foi sangrado para a obtenção dos anticorpos policlonais, que seriam posteriormente utilizados como controle positivo para os testes imunológicos com os hibridomas obtidos.

Imediatamente após a sangria, o camundongo foi sacrificado e seu baço (órgão linfóide) foi retirado e mergulhado em meio RPMI com 0,04mg/mL de Garamicina, sem soro. Duas lâminas foram utilizadas para dissociar as células da “cápsula” do órgão. Os grumos de células foram desfeitos com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e o meio de cultura contendo as células do baço foi filtrado com filtro de *nylon*.

O meio filtrado repleto de células foi então centrifugado por 10 minutos a 400xg. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado, com as células, foi desfeito. A lise de heritrócitos foi realizada com a adição de 5mL de uma solução de

cloreto de amônio (165mM), aguardando-se 5 minutos, com as células em banho de gelo, para que a lise ocorresse com sucesso. Adicionou-se 25mL de meio RPMI sem soro para posterior centrifugação a 400xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso em meio RPMI sem soro e novamente centrifugado. Esse último passo foi novamente repetido para que a retirada total da solução de lise de eritrócitos.

Ao final da última centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspenso em 20mL de meio RPMI sem soro para a contagem do número total de células obtidas do baço.

4.6.3. Reação de fusão

As células de mieloma e as células do baço foram unidas em um mesmo frasco com RPMI sem soro, numa proporção de 5 células de baço para 1 célula de mieloma. Essa mistura de células foi centrifugada a 400xg por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente retirado e o precipitado de células foi desfeito com batidas no fundo do frasco.

O frasco com as células foi então colocado em banho-maria, a aproximadamente 37°C (dentro do fluxo laminar), e 1mL da solução de PEG (polietilenoglicol) foi gotejada, durante 2 min, enquanto o frasco era submetido a movimentos circulares. Em seguida, 1mL de meio RPMI sem soro foi adicionado durante 1 min, o que se repetiu mais uma vez. Então, foram adicionados mais 7mL de meio durante o período de 2 min. Essa solução foi centrifugada a 400xg por 5 min.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em meio RPMI 20% SFB, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de garamicina e 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina de forma que houvesse $2,5 \times 10^6$ células por mL de meio. O volume final obtido foi distribuído em 3 placas de cultura de 96 poços, de forma que cada poço recebesse 100µL da solução de células.

4.6.4. Manutenção das células após a fusão

Vinte e quatro horas após a fusão foi adicionado às células o meio de seleção RPMI-HAT 20% SFB, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de gamicina e 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina. O meio de cultura era trocado de 48 em 48 horas, de forma que por mais 4 trocas o meio de seleção continuou sendo adicionado.

A partir da 5ª troca o meio adicionado não era mais o meio de seleção, mas sim o meio RPMI-HT 20% SFB, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de gamicina 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina, e permaneceu assim por 5 trocas consecutivas de meio. Daí por diante o meio de cultura adicionado era o meio de cultura RPMI 20% SFB, 2mM de glutamina, 0,04mg/mL de gamicina e 50 unidades/mL de estreptomicina/penicilina.

As células eram frequentemente verificadas quanto ao crescimento, e os poços com 80% de confluência celular ou mais eram submetidos a testes para a verificação da produção ou não de anticorpos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As proteínas recombinantes produzidas neste trabalho estão ilustradas na figura 2.

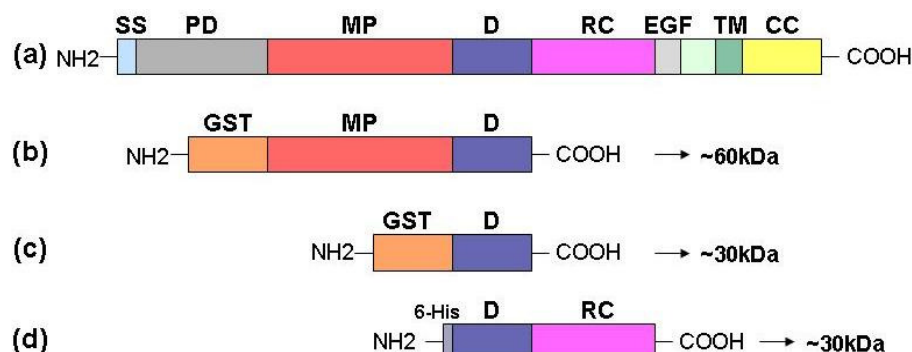


FIGURA 2 – MODELO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA ADAM23 E DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS NO PRESENTE TRABALHO (Adaptado de HUOVILA *et al.*, 1996).

(a): Proteína ADAM23 inteira. **(b):** Proteína recombinante GST-metaloprotease+desintegrina produzida a partir de plasmídeo pGEX2T e seu peso molecular aproximado. **(c):** Proteína recombinante GST-desintegrina produzida também a partir de pGEX2T e seu respectivo peso molecular esperado. **(d):** Proteína recombinante 6-His-desintegrina+rico em cisteína produzida a partir de plasmídeo pET28a e seu peso molecular aproximado. **SS:** sequência-sinal. **PD:** pró-domínio. **MP:** domínio metaloprotease. **D:** domínio desintegrina. **RC:** domínio rico em cisteína. **EGF:** domínio semelhante a fator de crescimento epidermal. **TM:** região transmembrana. **CC:** cauda citoplasmática. **GST:** proteína de fusão GST (Glutathione S-transferase).

5.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA

A transformação das bactérias eletrocompetentes DH5 α com o plasmídeo pGEX2T que possui a construção do domínio desintegrina (figura 2, **(c)**) ocorreu de forma satisfatória. O resultado da mini-expressão da proteína recombinante GST-desintegrina é apresentado na figura 3 onde pode ser observada uma banda de expressão predominante, se não restrita, nas colônias que foram submetidas à indução de expressão com IPTG. O padrão eletroforético de migração da banda de expressão única é compatível com a massa molecular esperada para a proteína de fusão (30kDa).

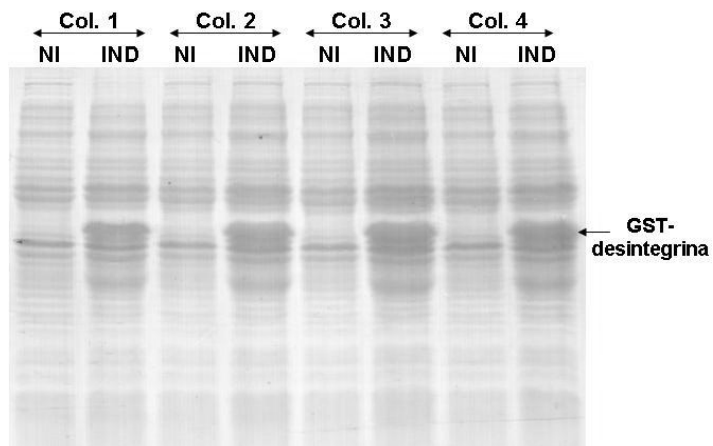


FIGURA 3 - MINI-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA.

As bactérias transformadas com o vetor pGEX2T-GST-desintegrina foram induzidas a expressar a proteína recombinante com 0,1mM de IPTG. **NI**: precipitado de bactérias anteriormente à indução com IPTG (não induzidas). **IND**: precipitado de bactérias após 2h de indução com IPTG a 37°C. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse. **Col. 1-4**: colônias 1-4.

A colônia com maior nível de expressão em cada mini-expressão era escolhida para o procedimento de expressão em larga escala e purificação. Como observado na figura 4, a purificação da proteína recombinante GST-desintegrina era eficaz, pois os eluatos possuem uma banda única, com o perfil eletroforético esperado para essa proteína, e alta concentração final.

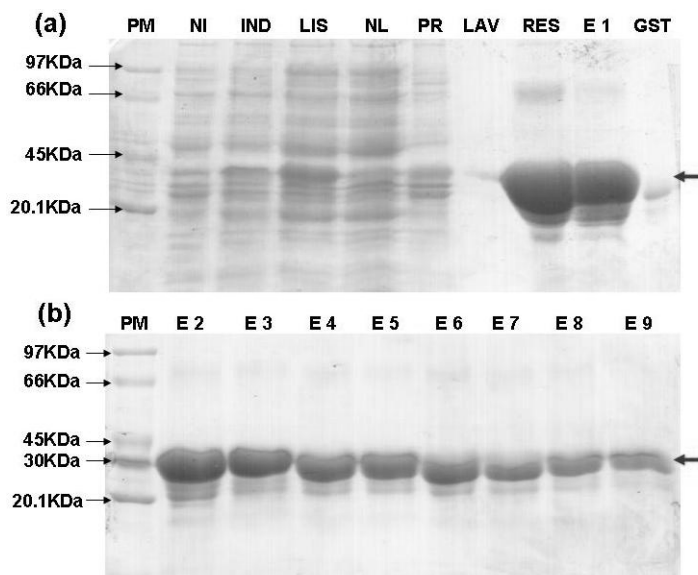


FIGURA 4 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA.

Perfil eletroforético de diferentes amostras coletadas durante o processo de purificação da proteína recombinante GST-desintegrina. **(a)**: gel com as seguintes amostras: bactérias não induzidas com IPTG (**NI**), bactérias induzidas por 3h a 24°C com 0,1mM de IPTG (**IND**), o produto da lise das bactérias (**LIS**), porção do lisado que não se ligou à resina (**NL**), porção do lisado que foi precipitada (**PR**), porção coletada da lavagem com tampão PBS gelado (**LAV**), resina (**RES**), eluato 1 (**E1**) e proteína recombinante GST (**GST**). **(b)**: gel com os eluatos 2 a 9 (**E2-9**). Pode-se observar uma banda única nos eluatos, de aproximadamente 30KDa, indicada pela seta. **PM**: marcador de massa molecular.

Decidiu-se então utilizar a proteína recombinante purificada para a imunização de camundongos e para possíveis ensaios bioquímicos.

5.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-METALOPROTEASE+DESINTEGRINA

A transformação das bactérias DH5α com o plasmídeo pGEX2T, que possui a construção para os domínios metaloprotease e desintegrina (figura 2, (b)) , ocorreu adequadamente. O gel apresentado na figura 5 corresponde à mini-expressão da proteína recombinante GST- metaloprotease+desintegrina e apresenta uma banda correspondente ao perfil eletroforético esperado para essa proteína (60kDa) em todas as colônias induzidas à expressão com IPTG, banda essa que se sobressai em relação às outras devido a sua quase total ausência nas mesmas colônias antes de induzidas (figura 5). Isso indica que a transformação ocorreu de forma correta, que a colônia transformada expressa a proteína de forma específica e que a

proteína expressa provavelmente é a desejada uma vez que possui padrão de migração eletroforético coerente ao esperado.

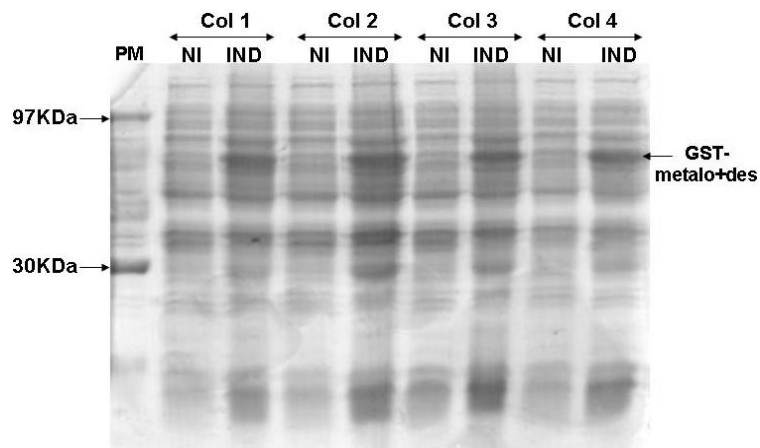


FIGURA 5 - MINI-EXPRESSION DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-METALOPROTEASE+DESINTEGRINA.

Colônias de bactérias transformadas com plasmídeo de interesse foram induzidas com 0,1mM de IPTG a expressarem a proteína recombinante GST-metaloprotease+desintegrina. **NI**: bactérias antes da indução da expressão com IPTG. **IND**: bactérias após a indução com o IPTG. **Col 1-4**: colônias 1-4. **PM**: marcador de massa molecular. A seta indica a banda correspondente ao esperado para a proteína recombinante GST-metaloprotease+desintegrina.

Novamente, a colônia com maior nível de expressão era a escolhida para a expressão da proteína recombinante em maior escala. Inicialmente, a absorbância escolhida para o início da indução era de aproximadamente 0,6 a 600nm, e a expressão induzida por 3h a 24°C. Como observado na figura 6, a maior parte da proteína expressa pela bactéria permanecia no precipitado do lisado da bactéria, o que indica que a proteína está insolúvel em corpos de inclusão (SINGH; PANDA, 2005). Além disso, uma concentração muito baixa de proteína era purificada devido à baixa disponibilidade de proteína solúvel para se ligar à resina.

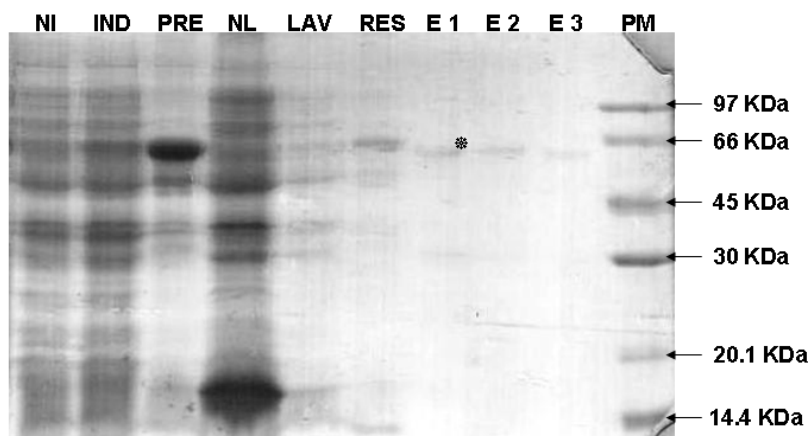


FIGURA 6 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-METALOPROTEASE+DESINTEGRINA.

Bactérias não induzidas com IPTG (**NI**), bactérias induzidas por 3h a 24°C com 0,1mM de IPTG após atingir a absorbância de aproximadamente 0,6 (**IND**), porção do lisado que foi precipitada (**PRE**), porção do lisado que não se ligou à resina (**NL**), porção coletada da lavagem com tampão PBS gelado (**LAV**), resina (**RES**) e eluatos 1-3 (**E1-3**). O asterisco indica a banda correspondente à proteína GST-metaloprotease+desintegrina purificada. **PM**: marcador de massa molecular.

Para aumentar a solubilidade da proteína, decidimos por iniciar a indução da sua expressão durante a fase estacionária de crescimento das bactérias, como descrito por Flick e colaboradores, 2004. Portanto, a indução iniciava-se a partir da absorbância 0,9 e seguia por 3h a 24°C. Como observado na figura 7, houve um pequeno aumento na concentração de proteína purificada, mas a maior parte da proteína expressa continua em corpos de inclusão. Além disso, pode-se observar a presença de bandas de massa molecular maior que o da proteína desejada nos eluatos, o que indica a presença de proteínas contaminantes co-purificadas. A presença destes contaminantes prejudica a imunização, levando a uma baixa produção de imunoglobulinas específicas para o antígeno de interesse, uma vez que as proteínas contaminantes são produtos endógenos de bactéria e normalmente muito mais antigênicos que as proteínas recombinantes de interesse (as quais são de mamíferos). No caso da proteína ADAM23, a sua sequência bastante conservada entre as espécies de mamíferos, como observado pelo alto grau de identidade entre ADAM23 de *Mus musculus* e de *Homo sapiens* (figura 8), torna-a relativamente pouco imunogênica quando comparada aos contaminantes acima citados. Portanto, decidiu-se por não utilizar esta proteína para a imunização dos animais, apesar desta construção produzir uma proteína recombinante maior que a construção GST-desintegrina e, conseqüentemente, ser mais imunogênica.

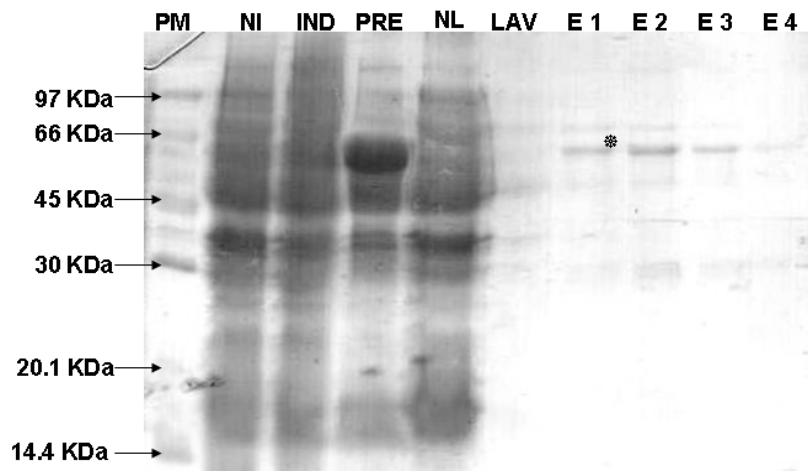


FIGURA 7 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-METALOPROTEASE+DESINTEGRINA.

Perfil eletroforético de diferentes amostras coletadas durante o processo de purificação da proteína recombinante GST-metalloprotease+desintegrina. Bactérias não induzidas com IPTG (**NI**), bactérias induzidas por 3h a 24°C com 0,1mM de IPTG após crescimento até fase estacionária (**IND**), porção do lisado que foi precipitada (**PRE**), porção do lisado que não se ligou à resina (não ligado – **NL**) e eluatos 1-3 (**E1-3**). O asterisco indica a banda correspondente à proteína GST-metalloprotease+desintegrina purificada. **PM**: peso molecular.

Outro problema enfrentado com esta proteína recombinante é sua baixa concentração após a purificação e sua grande tendência de precipitação, a qual foi observada em todas as etapas de produção da proteína: a proteína expressa permaneceu em corpos de inclusão e após a purificação da pequena fração solúvel houve precipitação durante e após a diálise, além de esta tendência ter sido observada quando as amostras dialisadas foram centrifugadas em tubos AMICON (Milipore Co) com membranas semi-permeáveis para concentrar as frações purificadas. Após esta centrifugação, a qual levou à diminuição do volume da amostra purificada, e ao contrário do que se esperava, a tomada da concentração protéica demonstrou uma diminuição na quantidade de proteína solúvel nesta amostra, portanto um indício de que parte da proteína precipitou.

5.3. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

A proteína GST-desintegrina foi utilizada como antígeno para induzir a produção de anticorpos policlonais em camundongos Balb/c de forma que as imunoglobulinas produzidas reconheçam especificamente a proteína ADAM23 humana. O soro dos animais imunizados foi coletado sete dias após a última imunização e a reatividade destes soros foi analisada por *immunoblot*, como apresentado na figura 9. O soro do camundongo M104 reage positivamente com o extrato de células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pcDNA com inserto codificante da proteína ADMA23 humana inteira, mais uma sequência de aminoácidos correspondentes à hemaglutinina (HA) (COSTA *et al.*, 2009; CAL *et al.*, 2000). Pode-se observar também que uma das bandas com a qual o soro reage é correspondente à massa molecular da banda observada no controle positivo (anticorpo anti-HA) que sabidamente reage com a sequência da hemaglutinina (HA). Além disso, o soro não reage com as células transfectadas com o plasmídeo vazio, as quais não expressam concentrações significantes de ADAM23 endógena e, por isso, são utilizadas como controle negativo. Esses resultados indicam a especificidade dos anticorpos presentes no soro do animal M104, o que demonstra que a proteína ADAM23 é de fato imunogênica. Entretanto, a concentração de anticorpos presentes neste soro que reagem com a proteína em questão é baixa, já que há reatividade significativa apenas na diluição do soro de 1:300. Em contrapartida, este soro reage mais efetivamente com a proteína recombinante GST sozinha (dados não mostrados). Isso se deve ao fato de a porção GST da proteína GST-desintegrina ser mais imunogênica que a porção desintegrina, já que a proteína GST é proveniente de *Schistosoma japonicum* e pouco conservada entre as espécies, enquanto a sequência humana de ADAM23 é bastante conservada entre mamíferos (exemplificado na figura 8). Outra desvantagem é o tamanho dos peptídeos, pois o polipeptídeo GST e o polipeptídeo desintegrina possuem praticamente o mesmo tamanho. Isso leva a uma resposta imunológica preferencial contra o antígeno proveniente do protozoário.

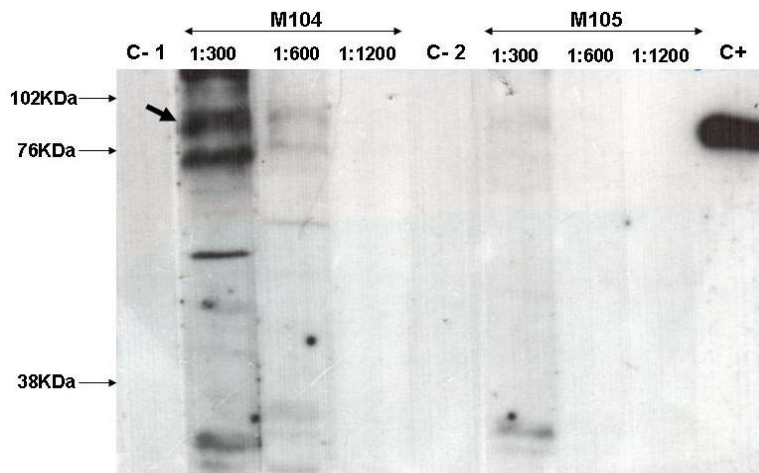


FIGURA 9 - TESTE DE IMMUNOBLOT PARA VERIFICAR A REATIVIDADE DOS SOROS DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-DESINTEGRINA.

Soros provenientes dos camundongos **M104** e do camundongo **M105** foram submetidos a diluições seriadas de **1:300**, **1:600** e **1:1200** e foram incubados em membranas contendo extrato de células HEK 293T super-expressando HA-ADAM23. Os controles negativos 1 e 2 (**C- 1** e **C- 2**) correspondem aos soros dos camundongos M104 e M105, respectivamente, incubados na diluição de 1:300 com membrana contendo extrato de células HEK 293T transfectadas com plasmídeo vazio. O controle positivo (**C+**) corresponde a anticorpo monoclonal anti-HA (ZYMED – Invitrogen) incubado com membrana contendo extrato de célula HEK 293T super-expressando HA-ADAM23. A seta indica a banda de massa molecular correspondente à do controle positivo, portanto o soro do camundongo M104 reage especificamente com a proteína HA-ADAM23.

Por esses motivos, decidiu-se por não utilizar o camundongo em questão para a realização da fusão, pois a grande reatividade do soro contra a proteína GST indica que há predominância de células B secretoras de anticorpos anti-GST e isso levaria a uma diminuição considerável da probabilidade de obtenção de um hibridoma secretor de anticorpo específico para o domínio desintegrina de ADAM23 humana após a fusão destas células com células de mieloma.

5.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA

5.4.1. Bactérias BL21 (DE3) pLys S

Devido aos problemas enfrentados com a purificação da proteína GST-metaloprotease+desintegrina e com a imunização dos camundongos com a proteína GST-desintegrina, optamos por utilizar a construção com os domínios Desintegrina e Rico em Cisteína (menos hidrofóbicos que o Metaloprotease) em plasmídeo pET. O

plasmídeo pET confere à proteína recombinante uma cauda de 6 histidinas, a qual possui baixa imunogenicidade, além de permitir a purificação da proteína recombinante sob condições nativas e desnaturantes (solubilização de corpos de inclusão).

A expressão da proteína recombinante 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína em BL21 pLys S não ocorreu de maneira satisfatória, já que a concentração da proteína recombinante após indução com IPTG era praticamente imperceptível no gel correspondente à mini-expressão (figura 10).

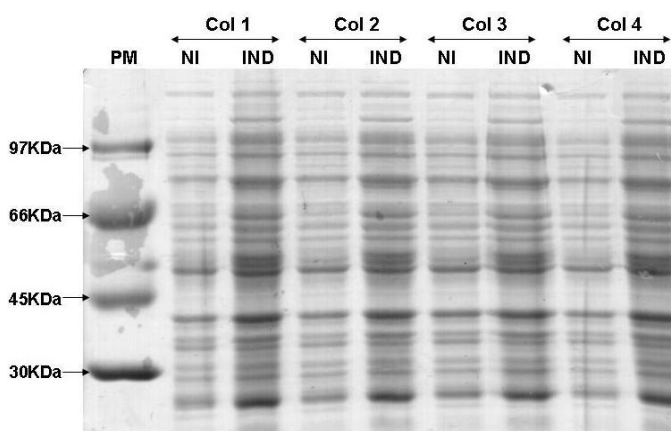


FIGURA 10 - MINI-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA EM BL21 (DE3) PLYS S.

PM: peso molecular. **NI:** extrato de bactérias antes da indução com 1mM de IPTG. **IND:** extrato de bactérias após 3h de indução com IPTG. **Col 1-4:** colônias 1-4. Não é possível verificar uma banda de aproximadamente 30kDa predominantemente expressa nas colônias induzidas com IPTG.

Apesar da baixa taxa de expressão verificada na mini-expressão, foi decidido realizar a expressão em larga escala. A purificação ocorreu através de dois métodos: purificação sob condições híbridas e purificação sob condições nativas.

Um problema enfrentado com a purificação sob condições nativas é a presença de proteínas contaminantes co-purificadas com a proteína de interesse, mesmo após lavagens repetidas com tampão de lise nativa com 40mM de imidazol (figura 11).

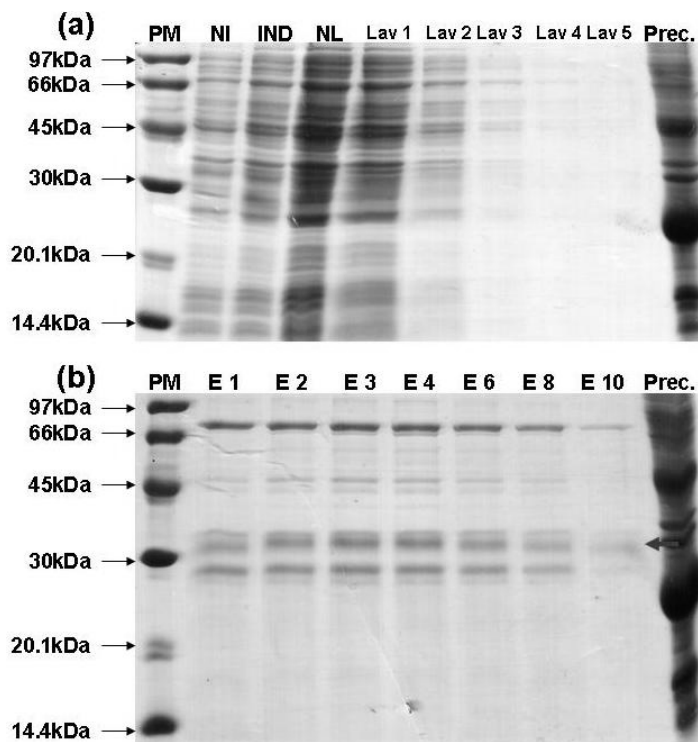


FIGURA 11 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA ATRAVÉS DE CONDIÇÕES NATIVAS.

(a): **PM:** massa molecular. **NI:** extrato de bactérias antes da indução com IPTG. **IND:** extrato de bactérias após indução com IPTG. **NL:** porção do lisado não ligado à resina. **Lav 1-5:** lavagens 1-5 com tampão de lise nativa mais 40mM de imidazol. **Prec.:** porção do lisado que foi precipitada. **(b):** **PM:** peso molecular. **E 1-10:** frações eluídas com tampão de lise nativa mais 250mM de imidazol. **Prec.:** porção do lisado que foi precipitada. Como observado em **(a)** as lavagens não retiram todos os contaminantes, que permanecem em **(b)** nos eluatos, já que não é obtida uma banda única nas frações purificadas. A seta indica a banda correspondente à proteína de interesse.

Na figura 12 pode-se observar a diferença entre a purificação sob condições nativas e a purificação sob condições híbridas (a qual utiliza o precipitado resultando do extrato de bactérias lisadas, ou seja, os corpos de inclusão). Em condições nativas observa-se, como citado acima, a presença de proteínas contaminantes co-purificadas com a proteína de interesse, as quais podem prejudicar a imunização de animais e ensaios funcionais utilizando a proteína recombinante. Já sob condições híbridas a proteína de interesse apresenta-se pura em todas as frações. Portanto, a proteína recombinante obtida sob essas condições foi inicialmente a escolhida para a imunização dos animais (coelhos e camundongos).

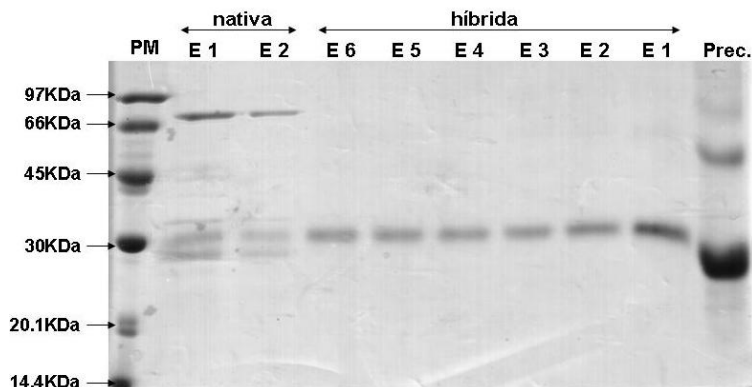


FIGURA 12 - COMPARAÇÃO ENTRE PURIFICAÇÃO SOB CONDIÇÕES NATIVAS OU HÍBRIDAS. **PM:** massa molecular. **E1 e E2 nativa:** frações 1 e 2 eluídas com 250mM de imidazol sob condições nativas. **E 1-6 híbrida:** frações 1-6 eluídas com 250mM de imidazol sob condições híbridas. **Prec.:** porção do lisado (lise nativa) que foi precipitada. Como observado, a purificação sob condições híbridas foi mais eficaz que a sob condições nativas, já que é observada uma banda única nas frações obtidas sob condições híbridas enquanto há contaminantes na purificação sob condições nativas.

Entretanto, a proteína obtida desta forma sofre processos de desnaturação com 6M de hidrocloreto de guanidina (para ressolubilizar os corpos de inclusão) e com 8M de uréia, e é levada a renaturar-se com lavagens seguidas com tampão de lise nativa. Este processo de desnaturação e renaturação rápidos podem levar a um enovelamento incorreto da proteína, a qual, portanto, precipita. Isso prejudica o processo de purificação, já que a proteína precipita enquanto ainda está ligada à resina, o que impede que ela seja eluída pelo tampão com imidazol. Além disso, a proteína que foi desligada da resina (eluída) pode apresentar uma conformação final diferente da proteína *in vivo*, devido à desnaturação e renaturação rápidas, o que pode prejudicar os ensaios realizados com a proteína recombinante. Por esse motivo houve a necessidade de aperfeiçoar a purificação da proteína sob condições nativas.

Para tanto, foi utilizado o método de purificação com concentrações crescentes de imidazol. Este método leva em consideração que diferentes proteínas possuem diferente afinidade pela resina de níquel e, portanto, são eluídas com diferentes concentrações do imidazol. Como observado na figura 13, a proteína de interesse possui maior afinidade pela matriz cromatográfica que a maioria das proteínas contaminantes, as quais foram eluídas com concentrações menores de imidazol. Já a proteína 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína aparece nas eluições com concentrações acima ou igual a 150mM de imidazol e, embora em uma concentração aparentemente baixa, encontra-se mais pura que nas purificações

anteriores. Entretanto, a proteína obtida através deste método não pode ser utilizada nas imunizações devido à persistência de contaminantes co-purificados.

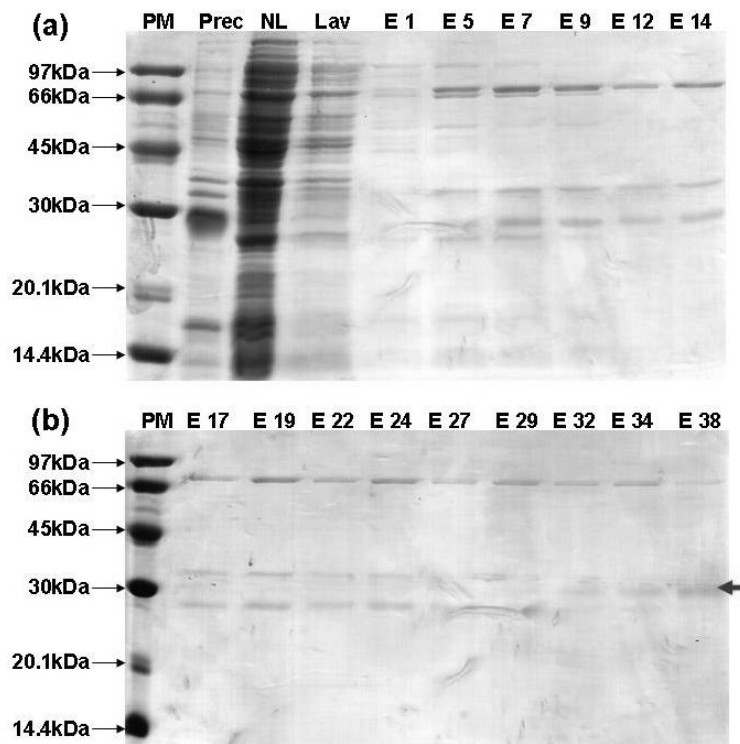


FIGURA 13 - PURIFICAÇÃO DE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA SOB CONDIÇÕES NATIVAS E COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE IMIDAZOL.

(a): PM: padrão de massa molecular. NL: porção do lisado não ligada à resina. Lav: lavagem. E1 e E5: frações eluídas com 50mM de imidazol. E7 e E9: frações eluídas com 60mM de imidazol. E12 e E14: frações eluídas com 70mM de imidazol. (b): PM: peso molecular. E17 e E19: frações eluídas com 80mM de imidazol. E22 e E24: frações eluídas com 90mM de imidazol. E27 e E29: frações eluídas com 100mM de imidazol. E32 e E34: frações eluídas com 150mM de imidazol. E38: fração eluída com 200mM de imidazol. Como pode-se observar em (a) e (b), até a fração 29 (100mM de imidazol) não é observada a presença da proteína desejada, a qual está presente a partir da fração 32 (indicada pela seta). Isto indica que a proteína de interesse tem mais afinidade pela resina Ni-NTA que as proteínas contaminantes.

Embora a proteína de interesse tenha sido purificada sob condições híbridas, a concentração final de proteína recombinante obtida era sempre muito baixa: em média 0,06µg/µl de proteína pura. Esta baixa concentração de proteína era resultado de dois fatores: da baixa expressão da proteína pela cepa de bactéria utilizada e da grande quantidade de proteína que permanecia ligada à resina após a eluição devido a sua precipitação, principalmente na purificação sob condições híbridas (resultados não mostrados).

5.4.2. Bactérias BL21 (DE3) STAR

Para solucionar o problema da baixa expressão da proteína recombinante 6-His-Desintegrina+Rico em Cisteína, outra cepa de bactéria foi utilizada: BL21 (DE3) STAR. Essa cepa tem por característica a ausência da expressão de RNAses e proteases, as quais estão presentes na cepa BL21 (DE3) pLys S e podem degradar o RNA ou a proteína produzidos pelo plasmídeo inserido na bactéria.

A mini-expressão foi realizada da mesma forma que em BL21 (DE3) pLys S e o resultado pode ser observado na figura 14.

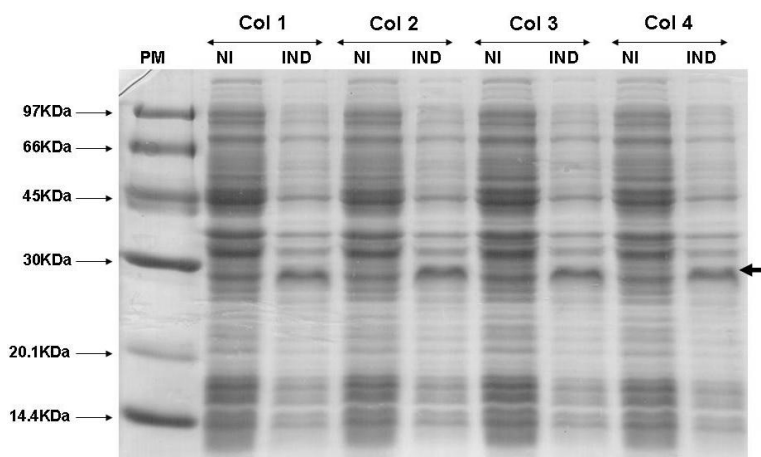


FIGURA 14 - MINI-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA EM BL21(DE3)STAR.

PM: peso molecular. **NI:** precipitado de bactérias não induzidas à expressão com IPTG. **IND:** precipitado de bactérias induzidas à expressão com 1mM de IPTG. **Col 1-4:** colônias 1 a 4. Os asteriscos vermelhos indicam a banda da proteína expressa somente nas colônias induzidas com IPTG, a qual apresenta o peso molecular predito para a proteína de interesse (aproximadamente 30kDa).

Como observado com a figura 15, houve uma expressão satisfatória da proteína nesta cepa. Portanto o problema da baixa expressão foi solucionado.

A proteína expressa por esta cepa foi encontrada predominantemente no precipitado obtido do lisado destas bactérias e não na sua porção solúvel (dados não mostrados), portanto a purificação da proteína recombinante foi realizada a partir dos corpos de inclusão.

Para resolver o problema da precipitação da proteína durante a purificação, outro método de ressolubilização do precipitado de bactérias (corpos de inclusão) foi utilizado. Algumas das vantagens de se utilizar os corpos de inclusão para a purificação da proteína de interesse é que nessas frações a proteína permanece

protegida de degradação e há menos proteínas contaminantes, o que reduz a probabilidade de co-purificação de outras proteínas (SINGH; PANDA, 2005). Esta probabilidade pode ser reduzida ainda mais se os corpos de inclusão são lavados sequencialmente. Singh e Panda (2005) sugerem a utilização de formas de desnaturação mais brandas para ressolubilizar os corpos de inclusão: uma menor concentração de agente caotrópico (2M de uréia ao invés de 8M de uréia ou de 6M de hidrocloreto de guanidina), contrabalançada pela utilização de um pH mais alcalino (pH12,5 ao invés de pH8,0). Logo após a ressolubilização sob essas condições ocorreu a diluição da solução em água ultrapura (solução foi diluída cinco vezes) para que fosse diminuída a concentração de uréia antes de a proteína ter se ligado à resina, evitando a sua precipitação durante as etapas de lavagem. Além disso, após a diluição o pH foi ajustado para 8,0, para que a afinidade da proteína à resina não fosse afetada. O resultado do método pode ser observado na figura 15.

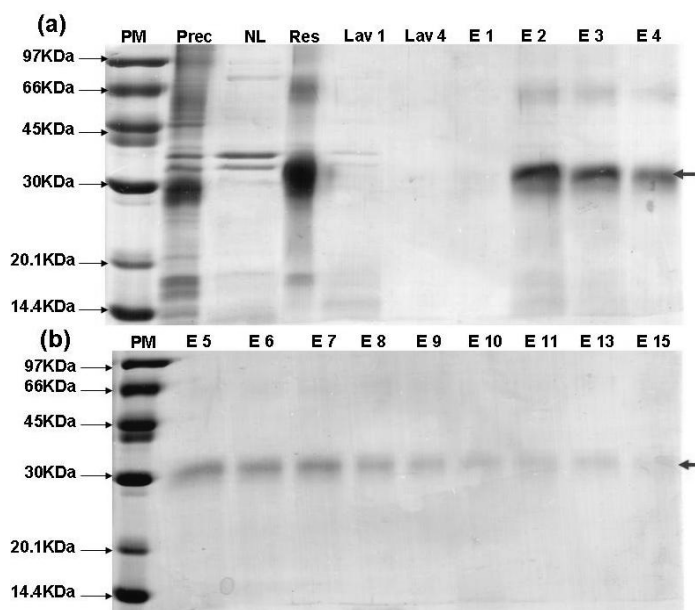


FIGURA 15 - PURIFICAÇÃO DE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO DE BL21(DE3)STAR.

(a) **Prec:** precipitado. **NL:** não ligado (porção do extrato ressolubilizado que não ligou-se à resina). **Res:** resina de Ni-NTA após eluição. **Lav 1 e 4:** lavagens 1 e 4. **E 1-4:** eluatos 1 a 4 (com 250mM de imidazol). (b) **E 5-15:** eluatos 5 a 15. **PM:** peso molecular. As setas indicam a banda correspondente à proteína purificada.

Como observado, os eluatos resultantes desta purificação estão tão puros quanto os eluatos provenientes da purificação sob condições híbridas (figura 12). Embora ainda tenha permanecido bastante proteína ligada à resina, a concentração final de proteína eluída nesta purificação foi melhor: 0,1µg/µl.

Para aumentar a quantidade de proteína eluída da resina (diminuir a precipitação) o extrato foi incubado com o dobro do volume da resina e o volume final de tampão utilizado para ressolubilizar os corpos de inclusão foi o dobro do utilizado anteriormente, resultando numa solubilização mais eficaz. O resultado desta purificação está representado na figura 16. A concentração final de proteína obtida nesta purificação foi de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e não foi observada precipitação de proteína na resina (a precipitação pode ser observada com a mudança de coloração da resina de níquel: a resina que antes era azul adquire um tom marrom-avermelhado).

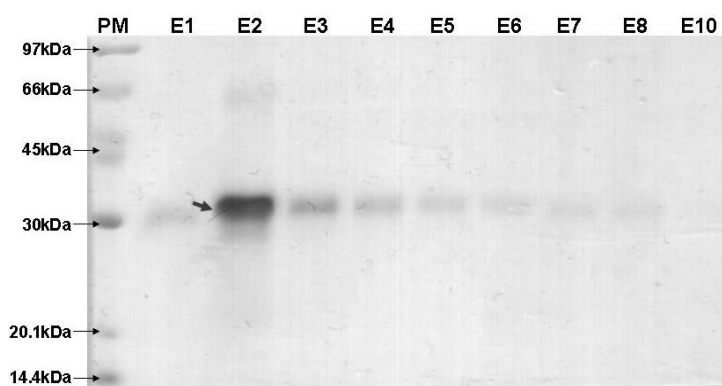


FIGURA 16 - PURIFICAÇÃO DE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO EM BL21 (DE3) STAR.

E 1-10: eluatos 1 a 10 (com 250mM de imidazol). **PM:** peso molecular. A seta indica a banda correspondente à proteína purificada. A concentração final da proteína obtida foi de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5.5. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Cinco camundongos Balb/c, denominados M098, M099, M100, M101 e M103, foram imunizados com a proteína recombinante 6-His-Desintegrin+Rico em cisteína. O soro dos animais imunizados foi coletado quatorze dias após a última imunização e a reatividade destes soros foi testada através de um ensaio de *immunoblot* (figura 17). O soro do camundongo M099 é o único a reagir especificamente com uma banda única cujo perfil de corrida eletroforética é correspondente ao da proteína HA-ADAM23 em extrato de células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pcDNA contendo inserto codificante da proteína ADAM23 humana inteira. Além disso, este soro não reage com as células

transfectadas com o plasmídeo vazio, utilizadas como controle negativo, o que indica a especificidade dos anticorpos presentes neste soro, o qual possui reatividade detectável até a diluição de 1:400 (asterisco vermelho na figura 17, **(a)**). Embora os soros M098 e M101 possuam também uma reatividade detectável com uma banda única, esta banda possui uma massa molecular diferente da proteína da desejável. Portanto, o camundongo M099 foi o escolhido para os experimentos de fusão para a produção de anticorpos monoclonais.

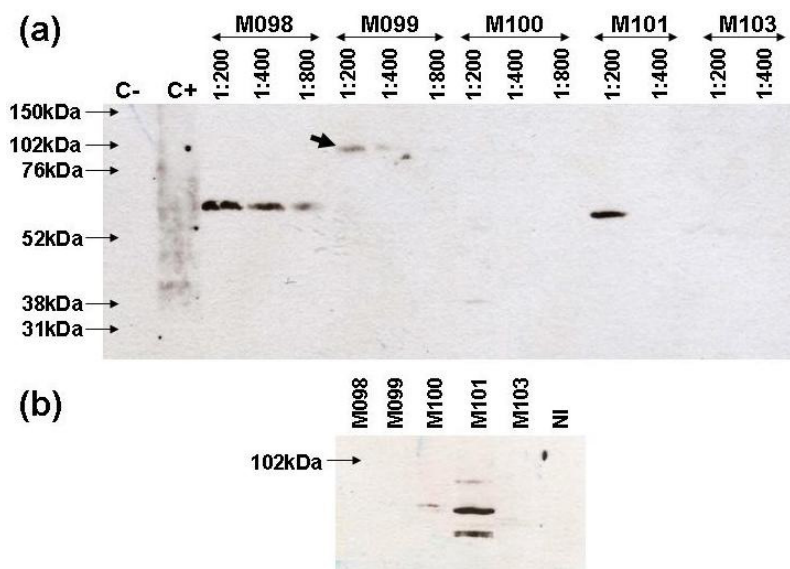


FIGURA 17: IMMUNOBLOT PARA VERIFICAR A REATIVIDADE DOS SOROS DOS CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE 6-HIS-DESINTEGRINA+RICO EM CISTEÍNA.

(a) Membranas eletrotransferidas com extrato de células HEK 293T super-expressando HA-ADAM23 foram incubadas com os soros provenientes dos camundongos **M098**, **M099**, **M100**, **M101** e **M103** submetidos a diluições seriadas de **1:200**, **1:400** ou **1:800**, com soro de camundongo Balb/c não imunizado (controle negativo: **C-**) e com anticorpo monoclonal anti-HA (ZYMED – Invitrogen) incubado na diluição 1:1000 (**C+**: controle positivo). **(b)** Membranas eletrotransferidas com extrato de células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pcDNA vazio foram incubadas com os soros dos camundongos **M098**, **M099**, **M100**, **M101** e **M103** e com soro de camundongo não imunizado (**NI**). A seta em **(a)** indica a banda de massa molecular correspondente à da proteína HA-ADAM23 (aproximadamente 90kDa) a qual está ausente em **(b)**, o que evidencia que o soro do camundongo M099 contém anticorpos policlonais que reagem especificamente com a proteína ADAM23. Obs.: não houve reação do anticorpo utilizado como controle positivo (C+) em (a).

5.6. OBTENÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ADAM23

Após a verificação do camundongo com resposta imune positiva para ADAM23, o mesmo foi submetido a imunização intra-venosa. Três dias após esta imunização, o baço do camundongo M099 foi utilizado para a obtenção de linfócitos

B secretores de anticorpos específicos para a proteína ADAM23, os quais foram fusionados com células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653. Os hibridomas resultantes da fusão foram plaqueados em 3 placas de 96 poços, denominadas P1, P2 e P3. Duas semanas após a fusão já era possível observar nestas placas de cultura dos hibridomas poços os quais continham confluência celular maior que 80%, células essas sobreviventes ao meio de seleção HAT, o que as caracteriza como hibridomas. Portanto, iniciaram-se os testes para selecionar os clones secretores de anticorpos monoclonais.

Inicialmente foram realizados ensaios de ELISA com o sobrenadante das células oriundas da fusão. A figura 18 contém gráficos correspondentes a 3 ensaios de ELISA independentes. Os clones P1C9 e P2A12 em (a), P2B11 em (b) e P2A11 em (c) responderam positivamente à proteína recombinante nestes ensaios e, portanto, foram expandidos e retestados em ensaios de ELISA subseqüentes. Além disso, todos foram submetidos a diluição limitante.

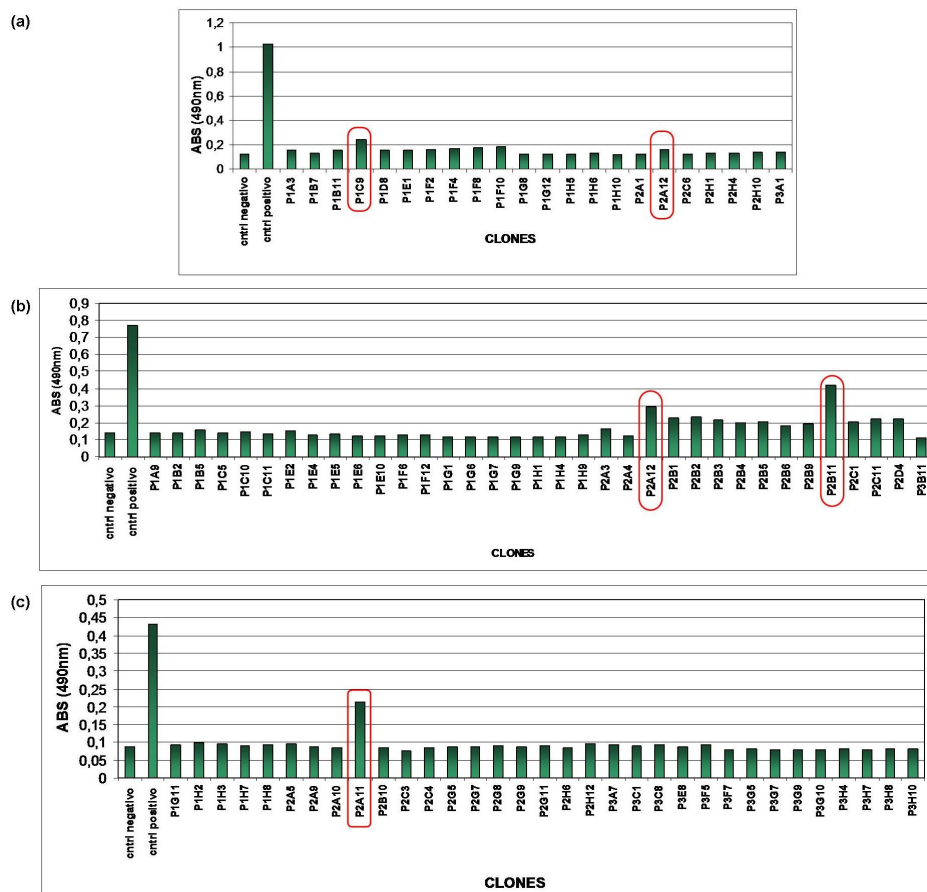


FIGURA 18 - ENSAIOS DE ELISA COM OS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DOS HIBRIDOMAS.

Os três gráficos são correspondentes a três ensaios de ELISA independentes. **Cntrl negativo:** controle negativo – sobrenadante da cultura de células não secretoras de anticorpos. **Cntrl positivo:** controle positivo – soro do camundongo M099 contendo anticorpos policlonais anti-ADAM23 na diluição de 1:400. Os hibridomas testados estão identificados pelo número da placa (**P1**, **P2** ou **P3**) e pela posição do poço correspondente (**A-H**, **1-12**). Os retângulos vermelhos estão destacando os clones considerados positivos nestes ensaios. Em **(a)** os clones **P1C9** e **P2A12** tiveram uma reatividade significativa e, por isso, foram expandidos e retestados. Em **(b)** o clone **P2B11** reagiu positivamente e o clone **P2A12**, retestado neste ensaio, foi novamente positivo. Em **(c)** o clone **P2A11** reagiu significativamente e, por isso, foi considerado positivo para a produção de anticorpos monoclonais anti-ADAM23.

Para a confirmação da especificidade destes anticorpos, os mesmos foram testados através de ensaios de *immunoblot* (figura 19). O sobrenadante do clone 2A12 reagiu positivamente com membrana contendo extrato de células 293T transfectadas com plasmídeo contendo inserto para HA-ADAM23 (**293T-HA-ADAM23**), mas o perfil eletroforético da banda obtida não corresponde ao da proteína HA-ADAM23 (indicado pelo controle positivo **α -HA**). Além disso, o mesmo reage com membrana contendo extrato de células 293T transfectadas com plasmídeo sem o inserto para HA-ADAM23 (**293T-pCDNA**), a qual corresponde ao controle negativo da reação, o que é mais um indício de que este não reage

especificamente com a proteína ADAM23. O sobrenadante do clone 2B11, por sua vez, reagiu positivamente com uma banda com o perfil eletroforético desejado (indicado pela seta) e não reage com a membrana utilizada como controle positivo.

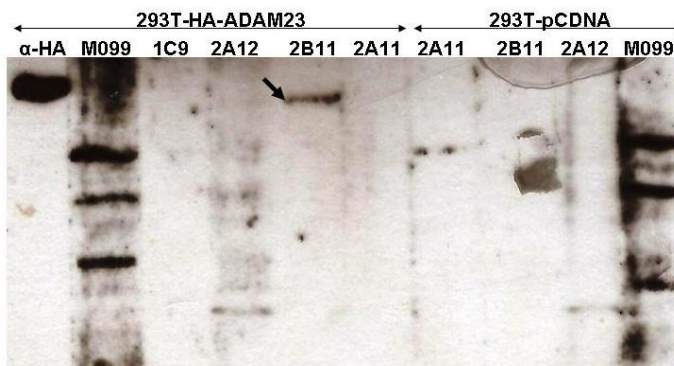


FIGURA 19 - ENSAIO DE IMMUNOBLOT PARA TESTAR SOBRENADANTES DE CULTURAS DE HIBRIDOMAS.

Porção à esquerda: Membranas contendo extrato de células 293T transfectadas com plasmídeo contendo inserto para HA-ADAM23 (**293T-HA-ADAM23**) foram incubadas com anticorpo anti-HA (Zymed – INVITROGEN) (α -HA: controle positivo na diluição 1:1000), com soro hiper-imune proveniente do camundongo **M099** na diluição 1:400 e com os sobrenadantes da cultura dos clones **1C9**, **2A12**, **2B11** e **2A11** respectivamente. A seta indica o clone **2B11** reagindo positivamente com uma banda única com perfil eletroforético semelhante à da proteína presente no controle positivo α -HA, indicando que o clone **2B11** produz anticorpos monoclonais específicos para a proteína HA-ADAM23. **Porção à direita:** Membranas contendo extrato de células 293T transfectadas com plasmídeo sem o inserto para HA-ADAM23 (**293T-pCDNA**) foram incubadas com os clones **2A11**, **2B11** e **2A12**, respectivamente, e com o soro hiper-imune do camundongo M099. O clone **2B11** não reagiu com este controle negativo, o que é mais um indício da especificidade deste anticorpo monoclonal.

Os clones que reagiram negativamente neste ensaio de *immunoblot* também deixaram de responder nos ensaios de ELISA subseqüentes, portanto foram descartados. Além disso, os clones oriundos das diluições limitantes também responderam negativamente.

O clone 2B11, devido à sua resposta positiva no ensaio de *immunoblot* e em ensaios de ELISA subseqüentes, foi submetido a congelamento, descongelamento e a testes subseqüentes de ELISA e de *immunoblot*. De forma inesperada, os clones provindos da diluição limitante e os clones não submetidos a tal demonstraram-se clones instáveis, ou seja, deixaram de secretar o anticorpo de interesse, o que foi verificado em ensaios de ELISA e de *immunoblot* subseqüentes. O mesmo ocorreu com as células que sofreram congelamento e descongelamento, portanto não foi possível obter um clone estável secretor de anticorpos monoclonais anti-ADAM23 a partir desta fusão.

O fenômeno de perda de produção de anticorpos pelos hibridomas é comum nos estágios iniciais de crescimento dos hibridomas devido à sua tendência de perder cromossomos (ETHAN e LERNER, 1981). Além disso, fatores como taxa de crescimento, porcentagem de soro no meio de cultura, estresse celular e concentrações de substratos como glicose e glutamina foram demonstrados influenciar positivamente ou negativamente a produção de anticorpos dependendo das linhagens celulares obtidas (PÖRTNER e SCHÄFER, 1996). Portanto, há fatores no meio de cultura que influenciam a expressão gênica destes hibridomas durante seu crescimento, expansão e diluição limitante, os quais terão efeitos diferenciados dependendo da célula de hibridoma obtida, tornando o processo de estabilização de produção de anticorpos monoclonais intrínseco ao clone obtido e, por isso, bastante difícil de controlar.

6. CONCLUSÕES

A proteína recombinante GST-desintegrina foi expressa em sistema heterólogo de *E. coli* e purificada de forma satisfatória e em altas concentrações;

A imunização de animais com a proteína GST-desintegrina não ocorreu como desejado, pois, apesar dos camundongos responderem à proteína de interesse, houve uma resposta muito mais significativa à região GST, o que prejudicaria a produção de anticorpos monoclonais, no caso da seleção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais;

Não foi possível obter quantidades adequadas da proteína recombinante GST-metaloprotease+desintegrina, pois praticamente toda a proteína expressa pela bactéria permaneceu em corpos de inclusão, e a pequena porção de proteína solúvel purificada precipitou nas fases seguintes de diálise ou quando submetida a um concentrador;

A proteína recombinante 6-His-Desintegrina+rico em cisteína é expressa em maiores quantidades nas bactérias *E. coli* da cepa BL21(DE3)STAR quando comparada à cepa BL21(DE3)pLysS, sendo que em ambas ela permanece em corpos de inclusão;

A purificação da proteína 6-His-Desintegrina+rico em cisteína é mais eficiente pelo método de Singh e Panda (2005) do que pelos métodos de purificação sob condições nativas ou híbridas, pois as concentrações de proteína purificada pelo primeiro método são maiores em comparação com os outros métodos citados;

A imunização de camundongos com a proteína recombinante 6-His-desintegrina+rico em cisteína levou a produção de anticorpos policlonais específicos para a proteína ADAM23 em apenas um camundongo, do qual foi retirado o baço para a realização da fusão com células de mieloma;

A fusão dos linfócitos B provenientes do camundongo imunizado com as células de mieloma ocorreu satisfatoriamente, levando à obtenção de hibridomas, dentre os quais apenas um produziu anticorpos monoclonais específicos para a proteína ADAM23, o qual posteriormente mostrou-se instável e parou de secretar anticorpos.

REFERÊNCIAS

BAKKEN, A. M.; PROTACK, C. D.; ROZTOCIL, E.; NICHOLL, S. M.; DAVIES, M. G. Cell migration in response to the amino-terminal fragment of urokinase requires epidermal growth factor receptor activation through an ADAM-mediated mechanism. **Journal of Vascular Surgery**, v. 49, n. 5, p. 1296-1303, 2009.

BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 654-659, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CAL, S.; FREIJE, J.M.P.; LÓPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM23/MDC3, a Human Disintegrin that Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha\beta$ 3 Integrin through an RGD-independent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.

CHOI, J.-S.; KIM, K.-H.; JEON, Y.-K; KIM, S.-H.; JANG, S.-G.; KU, J.-L.; PARK, J.-G. Promoter hypermethylation of the ADAM23 gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. **Int. J. Cancer**, v. 124, p. 1258-1262, 2009.

COSTA, F. F.; VERBISCK, N. V.; SALIM, A. C. M.; IERARDI, D. F.; PIRES, L. C.; SASAHARA, R. M.; SOGAYAR, M. C.; ZANATA, S. M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON, A. J. G.; CAMARGO, A. A. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, p. 1481-1488, 2004.

COSTA, M. D. M.; PALUDO, K. S.; KLASSEN, G.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; MARTINS, V. R.; CAMARGO, A. A.; NAKAO, L. S.; ZANATA, S. M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461, p. 16-20, 2009.

DJOUAD, F.; DELORME, B.; MAURICE, M.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; LOUIS-PLENCE, P.; CANOVAS, F.; CHARBORD, P.; NOËL, D.; JORGENSEN, C. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n.2, p. 1-12, 2007.

ETHAN, A.; LERNER, B. A. How to make a hybridoma. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 4, p. 387-402, 1981.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T.; KUPRIYANOV, S.; LIUS, H.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; ZHANG, X.; SHEPPARD, D.; ENGVALLS, E.; TAKADA, Y. Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin $\alpha 9\beta 1$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17804-17810, 2002.

GAN, S. W.; XIN, L.; TORRES, J. The transmembrane homotrimer of ADAM 1 in model lipid bilayers. **Protein Science**, v. 16, p. 285-292, 2007.

GHILARDI, C.; CHIORINO, G.; DOSSI, R.; NAGY, Z.; GIAVAZZI, R.; BANI, M. Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **BMC Genomics**, v. 9, n. 201, p. 1-18, 2008.

GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FERNANDEZ-CONSTANT, C. ADAM23 is a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Central Nervous System Neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v.78, p. 647-658, 2004.

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 1. ed. Cold Spring Harbor Laboratory: USA. 1998.

HOWARD, L.; MACIEWICZ, R. A.; BLOBEL, C. P. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. **The Biochemical Journal**, v. 348, p. 21-27, 2000.

HUOVILA, A.-P. J.; ALMEIDA, E. A. C.; WHITE, M. J. ADAMs and cell fusion. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 692-699, 1996.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.; FRÖHLICH, C.; LOECHEL, F.; ZOLKIEWSKA, A.; ISHIGURO, K.; KOJIMA, T.; LIU, W.; IBA, J. K.; SANDERSON, R. D.; BRAKEBUSH, C.; FÄSSLER, R.; WEWER, U. M.; The Cystein-rich domain of Human ADAM 12 Supports Cell Adhesion Through Syndecans and Triggers Signaling Events that Lead to $\beta 1$ Integrin-dependent Cell Spreading. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, p. 1143-1155, 2000.

LEIGHTON, P. A.; MITCHELL, K. J.; GOODRICH, L. V.; LU, X.; SHERZ, P.; SCARNES, W. C.; TESSIER-LAVIGNE, M. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. **Nature**, v. 410, p. 174-179, 2001.

LIN, J.; LUO, J.; REDIES, C. Differential expression of Five members of the ADAM family in the developing chicken brain. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 360-375, 2008.

MITCHELL, K. J.; PINSON, K. I.; KELLY, O. G.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERZ, P.; LEIGHTON, P. A.; GOODRICH, L. V.; LU, X.; AVERY, B. J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.; WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SKARNES, W. C. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**, v. 28, p. 241-249, 2001.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumor microenvironment. **Nature Reviews/Cancer**, v. 8, p. 929-941, 2008.

NATH, D.; SLOCOMBE, P. M.; STEPHENS, P. E.; WARN, A.; HUTCHINSON, G. R.; YAMADA, K. M.; DOCHERTY, A. J. P.; MURPHY, G. Interaction of metargidin (ADAM15) with $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins on *different* haemopoietic cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 579-587, 1999.

NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 227-235, 2004.

OZKAYNAK, E.; ABELLO, G.; JAEGLE, M.; VAN BERGE, L.; HAMER, D.; KEGEL, L.; DRIEGEN, S.; SAGANE, K.; BERMINGHAM, J. R. Jr.; MEIJER, D. Adam22 is a major neuronal receptor for Lgi4-mediated Schwann cell signaling. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 3857-3864, 2010.

OWUOR, K.; HAREL, N. Y.; ENGLLOT, D. J.; HISAMA, F.; BLUMENFELD, H.; STRITTMATTER, S. M. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 42, p. 448-457, 2009.

PATRA, A. K.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN, A.; GARG, L. C.; PANDA, A. K. Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 182-192, 2000.

PÖRTNER, R.; SCHÄFER, T. Modelling hybridoma cell growth and metabolism - a comparison of selected models and data. **Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 119-135, 1996.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetic**, v. 16, n. 2, p. 83-87, 2000.

RYBNIKOVA, E.; KÄRKKÄINEN, I.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.-P. J. Developmental regulation and neuronal expression of the cellular disintegrin

ADAM11 gene in mouse nervous system. **Neuroscience**, v. 112, n.4, p. 921-934, 2002.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, desintegrin-like, cysteine-rich proteins MCD2 and MCD3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem. J.**, v. 334, p. 93-98, 1998.

SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H. LGI1 and LGI4 binds to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **Int. J. Sci.**, v. 4, p. 387-396, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001. 3 v.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005.

SØRENSEN, H. P.; VIVES, R. R.; MANETOPOULOS, C.; ALBRECHTSEN, R.; LYDOLPH, M. C.; JACOBSEN, J.; COUCHMAN, J. R.; WEWER, U. M. Heparan Sulfate Regulates ADAM12 through a Molecular Switch Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**. v.283, n°46, p. 31920–31932, 2008.

SUN, Y.P.; DENG, K.J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. (2004). Two novel isoforms of *ADAM23* expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 325, p. 171-178, 2004.

SUN, Y. P.; WANG, Y.; ZHANG, J.; TAO, J. WANG, C.; JING, N.; WU, C., DENG, K.; QIAO, S. ADAM23 Plays Multiple Roles in Neuronal Differentiation of p19 Embryonal Carcinoma cells. **Neurochemistry Research**, 2007.

TAKADA, H.; IMOTO, I.; TSUDA, H.; NAKANISHI, Y.; ICHIKURA, T.; MOCHIZUKI, H.; MITSUFUJI, S.; HOSODA, F.; HIROHASHI, S.; OHKI, M.; INAZAWA, J. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene**, v. 24, p. 8051-8060, 2005.

VERBISCK, N. V.; COSTA, E. T.; COSTA, F. F.; CAVALHER, F. P.; COSTA, M. D.; MURAS, A.; PAIXÃO, V. A.; MOURA, R.; GRANATO, M. F.; IERARDI, D. F.; MACHADO, T.; MELO, F.; RIBEIRO, K. B.; CUNHA, I. W.; LIMA, V. C.; MACIEL, M. do S.; CARVALHO, A. L.; SOARES, F. F.; ZANATA, S.; SOGAYAR, M. C.; CHAMMAS, R.; CAMARGO, A. A. ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3)

integrin activation during metastasis. **Cancer Research**, v. 69, p. 13, p. 5546-5552, 2009.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Current Opinion in cell biology**, v. 15, p. 598-606, 2003.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, 1995.

YANG, P., BAKER, K.A., HAGG, T. The ADAMs family: Cordinators of nervous system development plasticity and repair. **Progress in Neurobiology**, v. 79, p. 73-94, 2006.

ZHANG, X.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. Specific Interaction of the Recombinant Disintegrin-like Domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM15) with Integrin $\alpha\beta 3$. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7345-7350, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)