ANGELA ALICE AMADEU MEGALE

**DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE FOSFATO DEPENDENTE
DE SÓDIO NaPi2b**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

ANGELA ALICE AMADEU MEGALE

**DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE FOSFATO DEPENDENTE
DE SÓDIO NaPi2b**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Megale, Angela Alice Amadeu.

Desenvolvimento de anticorpos anti-peptídeos sintéticos derivados da proteína transportadora de fosfato dependente de sódio NaPi2b / Angela Alice Amadeu Megale. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de anticorpos anti NaPi2b.

Versão do título para o inglês: Development of anti-synthetic peptides antibodies derived from sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b protein.

1. Peptídeos 2. Moléculas carreadoras 3. Proteína 4. NaPi2b 5. Anticorpos 6. Câncer ovariano I. Silva, Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0172/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Angela Alice Amadeu Megale.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de anticorpos anti-peptídeos sintéticos derivados da proteína transportadora de fosfato dependente de sódio NaPi2b.

Orientador(a): Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **127** nas fls. **12** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Wilmar Dias da Silva**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Anticorpos IgY identificadores do câncer ovariano: Produção e validação: Estudo Piloto*" do qual participam o(s) aluno(s) **Angela Alice Amadeu**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **19.11.2013**, com validade de **4** anos.

São Paulo, 21 de novembro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEUA. 041.14.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 127/2013/CEUA, datado de 19.11.13, e por solicitação da Prof. Dr. **Wilmar Dias da Silva**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo *a troca de linhagem de 30 camundongos BALB/ para 30 camundongos High III, para a produção de anticorpos anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 conjugados com proteína "y" ao Projeto de Pesquisa "Anticorpos IgY identificadores do câncer ovariano: Produção e validação: Estudo Piloto"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 30 de abril de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Anticorpos IgY identificadores do câncer ovariano: Produção e validade: Estudo Piloto", **protocolo nº 1021/13**, sob a responsabilidade de Wilmar Dias da Silva e Angela Alice Amadeu – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/02/2014.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
04/2013 - 06/2014 Laboratório de Imunoquímica	30 camundongos High III (M) – Substituição – fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Imunogenética 10 aves Rhode Island (F) - 12 sem - 2,5-3 Kg; 40 camundongos Balb/c 4-6 sem - 18-20g (M); 6 coelhos CNZ 6meses - 2-3kg (M)	Substituição de linhagem de camundongos Balb/c por camundongos High III

São Paulo, 25 de fevereiro de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 28 de novembro de 2012.

PARECER 1092/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 22.11.2012, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Anticorpos IgY Identificadores de Câncer Ovariano: Produção e Validação: Estudo Piloto*" dos autores **WILMAR DIAS DA SILVA e ANGELA ALICE AMADEU**.

Cabe a Pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 22.11.2013.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/04/2011, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 129/11 intitulado: "ANTICORPOS IGY IDENTIFICADORES DE CÂNCER OVARIANO: PRODUÇÃO E VALIDAÇÃO: ESTUDO PILOTO" apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira"

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Max Senna Mano, Paulo Marcelo Gehm Hoff; Wilmar Dias da Silva

Pesquisador (a) Executante: Max Senna Mano

CEP-FMUSP, 14 de Abril de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 18 de outubro de 2012

Referente ao estudo:

Estudo clínico piloto para avaliar a sensibilidade e especificidade dos Anticorpos IgY anti-peptídeos como identificadores de biomarcadores de câncer de ovário

Declaramos para os devidos fins que a utilização das amostras de soro coletadas para o estudo supracitado é autorizada pela instituição, conforme resolução CNS 196/96 e mediante consentimento livre e esclarecido do voluntário doador.

Atenciosamente,

Maria Del Pilar Estevez Diz
Investigador Responsável

Roberto Jun Arai
Investigador Colaborador

Prof. Dr. Paulo M Hoff
Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo M Hoff
Diretor

Ao meu orientador, professor Wilmar Dias da Silva

Primeiramente, por ter confiado em minha capacidade, e pela paciência que me ensina uma Imunologia que não encontro nos livros e, sem dúvida, por ser para mim uma constante inspiração.

À minha querida mãe, Josefa Alice Amadeu

Por me ensinar, com muito amor e paciência, a ser quem sou e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu amado esposo, Joel José Megale Gabrili

Por me apoiar em tudo que preciso, por me dar forças quando não as tenho mais, por me amar da maneira que sou e me ajudar a cada dia ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela proteção, força, companhia e pelos anjos que coloca em minha vida, tornando minha caminhada mais fácil;

Ao meu orientador, **Dr. Wilmar Dias da Silva** que acreditou em mim desde o primeiro dia. Nunca esquecerei do dia que conheci o senhor e fui apresentada ao projeto peptídeos, quando eu disse que achava o projeto e suas ideias maravilhosas, mas que sabia muito pouco de Imunologia, e o senhor me disse que isso não era problema, pois me ensinaria tudo que fosse preciso. E de fato, foi o que aconteceu. Obrigada por toda a paciência, por suas aulas e todos os ensinamentos. Muito Obrigada! É um privilégio conviver com alguém como o senhor, que além de um excelente cientista, é um ser humano admirável;

Agradeço à professora **Dra. Denise Tambourgi**, por gentilmente ter aberto as portas do laboratório e por seus pertinentes conselhos;

Ao **Dr. Osvaldo Sant'anna**, pela ajuda para obtenção dos camundongos da linhagem High III e da sílica SBA-15, e, principalmente por me ajudar no protocolo de imunização e por me passar um pouco de sua ampla experiência;

À **Dra. Leticia Batista Azevedo Rangel**, por colaborar de maneira fundamental com este projeto, cedendo as sequências de aminoácidos dos peptídeos Let#1 e Let#2;

Ao **Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)**, pela colaboração com a coleta, armazenamento e envio das amostras de soro humano para análise, principalmente a toda a equipe do setor de pesquisa clínica coordenado pelo **Dr. Roberto Jun Arai**;

À banca de qualificação, **Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto**, **Dra. Maristela Martins de Camargo** e **Dr. Enéas de Carvalho**, pela contribuição dada a este projeto. Sem dúvida, foram de grande importância a avaliação, as correções e os conselhos passados. Em especial, agradeço o **Dr. Enéas** pela indispensável contribuição para a conclusão desta etapa do trabalho;

À minha amada e insubstituível mãe, **Josefa Alice Amadeu**, por toda paciência, carinho, educação, força e amor incondicional. Que Deus te proteja sempre e que eu possa te dar muito orgulho para tentar retribuir tudo que a senhora fez e faz por mim. Te amo imensuravelmente;

Ao meu melhor amigo e esposo, **Joel José Megale Gabrili**, que me mostra o melhor lado da vida e divide comigo todos os momentos, os tornando únicos. Te amo por tudo que você é e por estar sempre do meu lado. Sem dúvida, te conhecer e conviver com você me torna uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada por existir e por me dar mais uma linda família para amar;

Às minhas lindas e amadas irmãs, **Ana Paula Amadeu dos Santos** e **Ana Cristina Amadeu Pinho**, pela ajuda e apoio em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, faltaria um pedaço de mim. Muito obrigada por todo amor e pelos anjos que colocaram em minha vida: **Mateus, Yasmim, Francisco e Joely**. Amo vocês!;

À toda minha amada **família**, em especial, à minha segunda mãe, **Severina Alice da Conceição**, por todo seu amor, compreensão e dedicação. Te amo muito tia;

Às minhas amigas irmãs, **Camila Dias Silva Gregório, Giselle Casagrande Nabarro, Micheli Kavatoko Schettini** e **Thalita Primão Reis**, pelos mais de dez anos de amizade, por toda compreensão, carinho e paciência. Amadurecemos, aprendemos, erramos, mas sem dúvida, rimos muito juntas. Vocês fazem parte da minha vida. Amo todas vocês e as quero sempre comigo, em todos os momentos, como sempre. Obrigada por serem minhas **AMIGAS** s2;

À **Dra. Priscila Hess Lopes**, pela ajuda com a cultura de células, com a citometria de fluxo e com as análises estatísticas e, principalmente, pela amizade e por todo carinho e atenção em todos os momentos. Muito obrigada Pri, você é muito especial!;

Pelo auxílio com o manejo, sangria e eutanásia dos animais experimentais, agradeço ao meu orientador, **Dr. Wilmar Dias da Silva**, a **Dra. Karina Scaramuzzi**, ao **Dr. Estevam José Baldon**, ao **MSc Felipe Raimondi Guidolin** e aos biólogos **Joel José Megale Gabrili** e

Felipe Silva de França. Vocês foram fundamentais. Muito obrigada pelos ensinamentos e pelo apoio;

À **Dra. Fernanda Portaro**, e aos seus alunos **Alexandre** e **Daniela**, pela ajuda com a análise dos peptídeos sintéticos e por serem sempre tão prestativos;

À **Dra. Carla Cristina Squaiella Baptistão**, por sempre estar disposta a me ajudar e me passar um pouco dos seus conhecimentos;

Ao **Dr. Jorge M. Ferreira Jr.**, por seus conselhos e pelo auxílio com a citometria de fluxo;

À **Dra. Giselle Pidde Queiroz**, por ser a primeira responsável pela minha chegada ao Laboratório de Imunoquímica e por toda ajuda e atenção;

Ao **MSc. Felipe Raimondi Guidolin**, que me ajudou muito no ingresso ao Laboratório. Agradeço os ensinamentos, a paciência e a amizade;

À **Elaine Rodrigues** e a **Lia Aguiar**, por toda a ajuda e simpatia. Vocês são ótimas!;

À todos os funcionários do Laboratório de Imunoquímica: **Ana Freire, Marcinha, Ana Cláudia, Fabinho, Cinthya, Guilherme, Gabriela, Alécio, Ricardo, Osmair e Ramos**, muito obrigada pela companhia, amizade e ajuda. Todos, sem exceção, foram fundamentais para a conclusão deste projeto. A estrutura e organização do laboratório são impecáveis;

À todos os alunos e amigos do Laboratório de Imunoquímica: **Joel, Priscila, Felipe França, Isadora, Mariana, Estevam, Dani Myamoto, Carla, Gisele, Marie, Aurélio, Felipe Guidolin, Vivian, Lygia, Daniel, Karina e Dani Paixão**, pelas experiências compartilhadas, pelo incentivo, pela amizade e por tornarem meus dias mais leves e agradáveis. Agradeço imensamente;

Por fim, agradeço a **FAPESP** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

*“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

MEGALE, A. A. A. **Desenvolvimento de anticorpos anti-peptídeos sintéticos derivados da proteína transportadora de fosfato dependente de sódio NaPi2b**. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Dois peptídeos com quinze resíduos de aminoácidos cada, designados Let#1 e Let#2, foram delineados usando como modelo sequências de aminoácidos presentes no segundo laço extracelular da proteína NaPi2b. Os peptídeos Let#1 e Let#2 não foram reconhecidos pelo anticorpo monoclonal OC-125, desenvolvido contra a glicoproteína CA-125, nem pelo anticorpo policlonal anti-SLC34A2, desenvolvido contra a porção C-terminal de NaPi2b, indicando que os anticorpos comerciais não reconhecem de maneira cruzada os epítomos sintéticos derivados da sequência da proteína NaPi2b. A baixa imunogenicidade dos peptídeos foi ultrapassada conjugando-os a moléculas carreadoras estratégicas. Quando associadas a adjuvantes imunológicos e usadas como imunógenos em camundongos e coelhos, induzem resposta imune detectada pela presença de anticorpos circulantes anti-Let#1 e anti-Let#2. Para alguns experimentos, anticorpos IgG foram isolados pelo método de precipitação com sulfato de amônio a 29%. As preparações de IgG foram dialisadas contra salina e as concentrações em proteínas totais mensuradas pelo método de BCA. Os anticorpos IgG anti-peptídeos presentes em preparações purificadas e nos soros originais foram titulados por ELISA. Os anticorpos com maiores títulos, produzidos em camundongos High III, foram selecionados para ensaios complementares. Estes anticorpos reconheceram os peptídeos conjugados aos carreadores pelos métodos de ELISA e WB, não havendo reação cruzada quando testados com a proteína carreadora livre. Também se mostraram específicos, não havendo reação cruzada do anticorpo anti-Let#1 com o peptídeo Let#2 e vice-versa, bem como não mostraram reatividade quando avaliados com peptídeo sintético inespecífico. O anticorpo anti-Let#1 apresentou maior afinidade pelo antígeno sintético quando comparado ao anticorpo anti-Let#2. Após a completa validação, foi possível observar que os anticorpos anti-peptídeos reconhecem NaPi2b nativa, presente na superfície de células da linhagem OV-CAR. Experimentos utilizando amostras de soro de pacientes com diagnóstico definido de carcinoma ovariano e pacientes controle, devidamente coletados e cedidos pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), foram realizados. Utilizando em paralelo o controle com o anticorpo comercial OC-125, os anticorpos anti-peptídeos mostraram reconhecimento de um alvo comum em todos os soros analisados, mesmo quando o soro era considerado negativo para carcinoma ovariano pelo teste comercial. Este reconhecimento não foi observado quando as amostras foram analisadas pelo soro pré-imune dos animais teste, sugerindo então um reconhecimento específico dos anticorpos produzidos. O mesmo reconhecimento não ocorreu quando estes soros foram avaliados com o anticorpo comercial anti-NaPi2b, sugerindo que apenas as porções extracelulares de NaPi2b sejam liberadas no soro. Como na maioria das neoplasias, o diagnóstico precoce do câncer de ovário favorece o tratamento e garante mais conforto aos pacientes durante o tratamento, por isso, o desenvolvimento de novos anticorpos que permitam identificar marcadores circulantes ou apenas em células cancerosas obtidas de biópsias deve ser estimulado.

Palavras-chave: Peptídeos. Moléculas carreadoras. Proteína. NaPi2b. Anticorpos. Câncer ovariano.

ABSTRACT

MEGALE, A. A. A. **Development of anti-synthetic peptides antibodies derived from sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b protein.** 2014. 115 p. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Two peptides with fifteen amino acid residues each, designated Let#1 and Let#2 were outlined using as a model the amino acid sequences present in the second extracellular loop of the NaPi2b protein. The Let#1 and Let#2 peptides were not recognized by OC-125 monoclonal antibody developed against CA-125 glycoprotein, or by polyclonal anti-SLC34A2, developed against the C-terminal portion of NaPi2b, indicating that commercial antibodies do not recognize crosswise synthetic epitopes derived from the sequence of the NaPi2b protein. The low immunogenicity of peptides was overtaken by conjugating them to strategic carrier molecules. When associated with immune adjuvants and used as immunogens in mice and rabbits, induced immune response detected by the presence of circulating anti-Let#1 and anti Let#2 antibodies. For some experiments, IgG antibodies were isolated by precipitation method with ammonium sulfate at 29%. The IgG preparations were dialyzed against saline and the total protein concentration measured by BCA method. The anti-peptide IgG antibodies present in purified preparations and in the original sera were titrated by ELISA. Antibodies with higher titers, produced in High III mice, were selected for testing. These antibodies recognized the conjugated peptides by ELISA and WB, with no cross-reactivity when tested with the free carrier protein. Were also specific, with no cross-reaction of anti-Let#1 antibody with Let#2 peptide and vice versa, and both showed no reactivity when assessed with non-specific synthetic peptide. The anti-Let#1 antibody showed higher affinity for synthetic antigen when compared to anti-Let#2 antibody. After thorough validation, we observed that the anti-peptide antibodies recognize native NaPi2b, present on the surface of cells of OV-CAR strain. Experiments using serum samples from patients with a definite diagnosis of ovarian carcinoma and control patients, properly collected and disposed of by the Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP), were performed. Using commercial OC-125 antibody as a parallel control, anti-peptide antibodies showed recognition of a common target for all sera tested, even when the serum was regarded as negative for ovarian cancer by the commercial test. This recognition was not observed when the samples were analyzed by the preimmune serum of test animals, so suggesting specific recognition of antibodies produced. The same recognition did not occur when these sera were assessed with anti-NaPi2b commercial antibody, suggesting that only extracellular portions of NaPi2b be released in sera. As with most cancers, early diagnosis of ovarian cancer favors treatment and ensures more comfort to patients during treatment, so the development of new antibodies to identify attached or circulating markers in cancer cells obtained from biopsies should be encouraged.

Keywords: Peptides. Carriers molecules. Protein. NaPi2b. Antibodies. Ovarian cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Homeostase do fosfato.....	23
Figura 2 - Topologia esquemática de NaPi2b	25
Figura 3 – Modelo esquemático da molécula de anticorpo.....	32
Figura 4 - Perfil cromatográfico dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2.....	41
Figura 5 - Protocolo de imunização e sangria de coelhos	44
Figura 6 - Protocolo de imunização e sangria de camundongos BALB/c.....	46
Figura 7 - Protocolo de imunização e sangria de camundongos High III	49
Figura 8 – Reatividade cruzada dos peptídeos Let#1 e Let#2 livres e conjugados com anticorpo monoclonal OC-125	60
Figura 9 - Titulação de anticorpos IgG purificados anti-peptídeos sintéticos, produzidos em coelhos	61
Figura 10 - Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, no soro total de coelhos.	62
Figura 11 - Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, no soro total de camundongos BALB/c dos grupos 3 e 4	64
Figura 12 - Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, no soro total de camundongos High III.....	65
Figura 13 - Resposta de anticorpos a proteínas carreadoras.....	67
Figura 14 - Reatividade dos anticorpos anti-peptídeos, com peptídeos sintéticos livres e conjugados.....	68
Figura 15 - Reatividade cruzada dos anticorpos anti-peptídeos.....	70
Figura 16 – Reatividade dos anticorpos anti-peptídeos com antígeno inespecífico Let#3 ..	71
Figura 17 - Determinação da afinidade dos anticorpos anti-peptídeos	73
Figura 18 - Perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos conjugados e das proteínas carreadoras livres.....	75
Figura 19 - Reconhecimento dos peptídeos sintéticos pelos anticorpos anti-peptídeos por <i>Western blotting</i>	77
Figura 20 - Reconhecimento da proteína NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos ...	79
Figura 21 - Reconhecimento da proteína NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos em diferentes diluições	80
Figura 22 - Análise do soro de pacientes com o anticorpo monoclonal CA-125.....	81

Figura 23 - Análise de NaPi2b no soros de pacientes e doadoras controle com anticorpos anti-peptídeos	82
Figura 24 - Controle com peptídeos sintéticos conjugados com proteína carreadora C	83
Figura 25 - Análise de NaPi2b no soros de pacientes e controles com anticorpo comercial anti-NaPi2b.....	84
Figura 26 - Análise de NaPi2b no soros de pacientes e doadoras controle utilizando anticorpos anti-peptídeos em conjunto ou separadamente	85
Figura A.1 – Comparação entre IgY de aves e IgG de mamíferos.....	105
Figura A.2 – Galinhas imunizadas com peptídeos sintéticos	107
Figura A.3 – Detecção e caracterização de IgY por SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de grupos para imunização de coelhos	43
Tabela 2 - Esquema de grupos para imunização de camundongos BALB/c	45
Tabela 3 - Cálculos para encapsulação de antígenos a SBA-15	47
Tabela 4 - Esquema de grupos para imunização de camundongos High III	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Proteínas transportadoras de fosfato dependente de sódio	23
1.2 Proteína transportadora de fosfato dependente de sódio do tipo 2b (NaPi2b)	24
1.2.1 <i>Expressão de NaPi2b em tecidos normais</i>	25
1.2.3 <i>Expressão de NaPi2b no câncer ovariano</i>	26
1.2.3.1 <u>Principais características do câncer ovariano</u>	27
1.3 Anticorpos como ferramenta para detecção de alvos moleculares	28
1.3.1 <i>Produção e principais características dos anticorpos</i>	28
1.3.1.1 <u>Estrutura e isótipos dos anticorpos</u>	30
1.3.2 <i>Anticorpos anti-peptídeos sintéticos</i>	33
1.3.3 <i>Conjugação de peptídeos sintéticos com proteínas carreadoras</i>	34
1.3.4 <i>Utilização de anticorpos para detecção de marcadores tumorais</i>	36
1.3.4.1 <u>Marcadores tumorais</u>	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 <i>Objetivo geral</i>	39
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Animais experimentais	40
3.2 Peptídeos sintéticos	40
3.3 Conjugação dos peptídeos sintéticos com proteínas carreadoras	41
3.4 Análise do reconhecimento dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 pelo anticorpo monoclonal CA-125	42
3.5 Preparo do Adjuvante Marcol Montanide para imunização de coelhos e camundongos BALB/c	42
3.6 Protocolo de imunização, coleta e processamento das amostras para análise	43
3.6.1 <i>Protocolo de imunização e coleta de sangue em coelhos</i>	43
3.6.2 <i>Protocolo de imunização e coleta de sangue em camundongos BALB/c</i>	44
3.6.3 <i>Protocolo de imunização e coleta de sangue em camundongos High III</i>	47
3.6.4 <i>Obtenção e processamento do soro</i>	49
3.6.5 <i>Purificação de IgG de coelho com sulfato de amônio</i>	50
3.6.5.1 <u>Preparo da solução saturada de sulfato de amônio</u>	50
3.6.5.2 <u>Processo de purificação</u>	50

3.6.5.3 Dosagem de anticorpos IgG purificados pelo método de BCA.....	51
3.7 Titulação de anticorpos anti - peptídeos sintéticos por ELISA indireto	51
3.8 Ensaios complementares para validação dos anticorpos com títulos mais elevados.	
.....	52
3.8.1 <i>Análise da resposta a proteínas carreadoras dos anticorpos produzidos em camundongos High III</i>	52
3.8.2 <i>Análise da reação cruzada e resposta a peptídeos livres e conjugados</i>	53
3.8.3 <i>Determinação da afinidade dos anticorpos</i>	53
3.9 Caracterização do perfil eletroforético dos antígenos sintéticos e análise da especificidade dos anticorpos por WesternBlotting	54
3.9.1 <i>Caracterização do perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos conjugados e análise da especificidade dos anticorpos IgG anti-peptídeo</i>	54
3.9.1.1 <u>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</u>	54
3.9.1.2 <u>Impregnação por nitrato de prata</u>	55
3.9.1.3 <u>Western blotting para análise da especificidade de anticorpos</u>	55
3.10 Reconhecimento de NaPi2b nativa pelos anticorpos anti peptídeos	56
3.10.1 <i>Cultivo de células OV-CAR</i>	56
3.10.2 <i>Análise do reconhecimento de NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos</i>	56
3.11 Análise da possível presença da proteína NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle	57
3.11.1 <i>Amostras de soro humano</i>	58
3.11.2 <i>Análise do soro de pacientes e doadoras controle com anticorpo monoclonal OC-125</i>	58
3.11.3 <i>Análise da possível liberação de NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle utilizando anticorpos anti-peptídeos</i>	58
3.12 Análise estatística	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Reconhecimento dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 pelo anticorpo monoclonal OC-125	60
4.2 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos por ELISA indireto	61
4.2.1 <i>Titulação de anticorpos IgG purificados com sulfato de amônio anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, produzidos em coelhos</i>	61
4.2.2 <i>Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, presentes no soro total de coelhos</i>	62

4.2.3 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, presentes no soro total de camundongos BALB/c	63
4.2.3.1 Título de anticorpos dos grupos 1 e 2.....	63
4.2.3.2 Título de anticorpos dos grupos 3 e 4.....	63
4.2.4 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, presentes no soro total de camundongos High III.....	64
4.3 Ensaios complementares para validação dos anticorpos com maiores títulos anti-peptídeos.....	66
4.3.1 Resposta dos anticorpos produzidos em camundongos High III a proteínas carreadoras	66
4.3.2 Resposta dos anticorpos contra peptídeos livres e conjugados	67
4.3.3 Reação cruzada dos anticorpos.....	69
4.3.4 Reação cruzada dos anticorpos com peptídeo sintético controle	71
4.3.5 Determinação da afinidade dos anticorpos	72
4.4 Análise do perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos e da especificidade dos anticorpos selecionados	73
4.4.1 Análise do perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos por SDS-PAGE seguido por impregnação com nitrato de prata.....	74
4.4.2 Análise da especificidade dos anticorpos.....	76
4.5 Reconhecimento da proteína NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos	78
4.6 Análise da possível presença da proteína NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle	81
4.6.1 Análise do soro de pacientes e doadoras controles pelo anticorpo monoclonal OC-125	81
4.6.2 Análise da possível liberação de NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle utilizando anticorpos anti-peptídeos	82
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE – Validação de anticorpos IgY anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 produzidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas transportadoras de fosfato dependente de sódio

O fosfato desempenha papel crucial no metabolismo celular, atuando no crescimento e desenvolvimento das células, na formação dos ácidos nucleicos e da membrana plasmática, bem como no processo de mineralização óssea. A diminuição deste ânion no organismo pode levar a quadros de anemia, problemas cardíacos, lesões do músculo esquelético, fraqueza, anorexia, além de causar alterações nas funções das plaquetas, leucócitos, rins, fígado e cérebro ¹⁻⁴, por isso, seus aspectos fisiológicos e patológicos são alvos de intensos estudos ⁵⁻⁸.

O fosfato é o íon mais abundante encontrado no corpo humano. Aproximadamente 85% dele está presente nos ossos e dentes, 15% no interior das células, e menos de 1% é encontrado do ambiente extracelular. O controle de fosfato extracelular é mantido estável através de sua absorção pelo intestino, da reabsorção pelos rins após o processo de filtração e pelo metabolismo ósseo e celular (Figura 1), e esse balanço é essencial para o desenvolvimento celular, ósseo e para a integridade muscular ^{4, 9-11}.

Figura 1- Homeostase do fosfato

O fosfato sérico é mantido pela absorção intestinal, reabsorção renal e pelo equilíbrio deste íon entre os fluídos extracelulares e o fosfato intracelular e ósseo. Pi: Fosfato inorgânico (Adaptado de: FUKUMOTO, 2014 ⁴).

A maior parte da captação do fosfato é mediada por uma classe de proteínas denominadas transportadoras de fosfato dependentes de sódio (NPTs). Estas proteínas são expressas em diferentes órgãos e tecidos, como por exemplo, na borda apical das células do intestino e na borda apical das células dos túbulos renais, desempenhando papel fundamental na homeostase do fosfato no organismo ^{5, 6, 12}.

Estas transportadoras dependem de íons sódio, pois utilizam a energia provida pelo gradiente eletroquímico destes íons, por sua vez, mantido pela ação de enzimas ATPases, que são indiretamente responsáveis pelo influxo de fosfato ^{10, 13, 14}.

Três tipos de transportadoras de fosfato dependentes de sódio são responsáveis por estas funções nos vertebrados: Tipo I, codificada pelo gene SLC17; tipo II, codificada pelo gene SLC34; e tipo III, codificada pelo gene SLC20, todas ainda por mecanismos moleculares distintos, dependendo do órgão em que foi expressa ¹⁴⁻¹⁶. Devido à diversidade e complexidade de suas funções e tamanha importância no metabolismo celular, todas estas proteínas vêm sendo estudadas com relação aos seus aspectos fisiológicos e patológicos ^{1-3, 17, 18}. Dentre elas, destaca-se NaPi2b, pertencente a classe II, que tem seus mecanismos de ação mais elucidados.

1.2 Proteína transportadora de fosfato dependente de sódio do tipo 2b (NaPi2b)

Membro da família de transportadoras de fosfato do tipo 2 e codificada pelo gene SLC34A2, NaPi2b é uma glicoproteína de membrana composta por 690 resíduos de aminoácidos. Em sua configuração funcional, apresenta oito domínios transmembrânicos e quatro laços extracelulares, com as porções C e N-terminais encontradas no citoplasma (Figura 2). Seu peso molecular varia entre 77-108 kDa, dependendo do grau de glicosilação ^{17, 19-22}.

Figura 2 - Topologia esquemática de NaPi2b

Diagrama esquemático da possível topologia de membrana da proteína transportadora de fosfato dependente de sódio do tipo 2b (Adaptado de YIN; KIYAMOYA; CHUA et al., 2008²²).

1.2.1 Expressão de NaPi2b em tecidos normais

NaPi2b, no nível de mRNA, tem uma vasta expressão nos pulmões, intestino delgado, rins, fígado, placenta, pâncreas, próstata, ovários, tireoide, útero, glândulas salivares, testículos e glândulas mamárias^{23, 24}. No nível de proteína foi encontrada nos pulmões^{18, 24-26}, intestino^{6, 27}, epidídimo²⁸, glândulas mamárias^{26, 29, 30}, tireoide²⁹, glândulas salivares³¹, fígado³², rins, útero²⁹; ossos e dentes³³.

Entre suas funções inclui-se a participação na síntese de agentes de atividade superficial no pulmão, conhecidos como surfactantes. Estas substâncias formadas por fosfolípídeos, proteínas e glicosaminoglicanos, são produzidas pelas células alveolares do tipo II e são responsáveis por evitar o colapamento dos alvéolos. Foi observado uma predominante expressão de NaPi2b na membrana apical das células tipo II do epitélio alveolar, evidenciando a crucial participação de NaPi2b para a captação de Pi para a síntese dos surfactantes pulmonares¹⁸. Além disso, dois estudos independentes mostram que mutações no gene SLC34A2, responsável pela expressão de NaPi2b, causam uma doença hereditária denominada microlitíase alveolar pulmonar, caracterizada pela deposição de fosfato de cálcio nos alvéolos pulmonares, por sua vez, causada pela perda da capacidade de

NaPi2b transportar íons fosfato para dentro das células e manter o balanço homeostático de fosfato^{8, 34}.

Estudos também apontam NaPi2b como a principal via de absorção de Pi no intestino delgado, responsável por mais de 90% da captação de Pi, sendo amplamente responsável pela homeostasia sistêmica de fosfato³⁵. No fígado, esta proteína também parece ser a principal envolvida na reabsorção de Pi³².

Além de suas funções fisiológicas, NaPi2b vem sendo apontada como um potencial marcador molecular de alguns tipos de câncer, como o de tireoide, e, principalmente, o câncer de ovário^{15, 26, 36-38}.

1.2.3 Expressão de NaPi2b no câncer ovariano

A primeira relação estabelecida entre o aumento da expressão de NaPi2b e o câncer ovariano ocorreu em meados de 2003. Na busca de transcritos específicos para o carcinoma ovariano (COV), utilizando ferramentas de hibridização e bibliotecas de expressão gênica, foi observado um aumento significativo da expressão do gene SLC34A2 quando comparado com tecidos ovarianos normais³⁶.

Curiosamente, na busca de marcadores tumorais ovarianos, Mattes et al. em 1987²⁵, imunizaram camundongos com misturas de carcinomas ovarianos frescos, na tentativa de detectar antígenos diferentemente expressos. Neste trabalho foi observado que um dos hibridomas, denominado MX35, era capaz de detectar um antígeno diferentemente expresso em 16 dos 18 carcinomas ovarianos testados, no entanto, ainda não se sabia nada a respeito da estrutura deste antígeno. Também foi observado que o antígeno reconhecido pelo anticorpo MX35 está presente em 90% dos tumores ovarianos de origem epitelial¹⁵. Porém, apenas após anos de estudos, foi possível caracterizar NaPi2b como antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal MX35, concretizando, de fato, a relação desta proteína com tumores de ovário. A partir destas abordagens, muitos estudos vêm sendo realizados tendo NaPi2b como foco e sua relação com o carcinoma ovariano^{22, 39}.

Ao contrário do que acontece nos tumores ovarianos com aumento da expressão da proteína NaPi2b em comparação com o tecido normal, quando avaliados tecidos da mama, de pulmão e de útero por imunohistoquímica, foi observado que estes tecidos expressam mais NaPi2b em condições normais, havendo uma diminuição da expressão deste transportador quando as células destes tecidos se tornam neoplásicas²⁶.

NaPi2b, especificamente, dentre tantos outros tipos de transportadoras de fosfato, parece ser a única cuja expressão é diferenciada entre amostras normais e amostras derivadas de câncer ovariano, sugerindo uma grande influência de NaPi2b para o desenvolvimento desta neoplasia. Além disso, este aumento foi observado particularmente em tumores de ovário de origem epitelial (COV), principalmente de células claras e serosas, sendo esta última a mais frequente causa de malignidade ⁴⁰.

1.2.3.1 Principais características do câncer ovariano

Os três principais tipos de tumores ovarianos podem ser originados das células germinativas, das células estromais do tecido conectivo ou a partir das células epiteliais que revestem a superfície externa do ovário, sendo este último o mais comum, prevalecendo em mais de 90% dos casos. A classificação dos tumores epiteliais de ovário, também referido como carcinomas ovarianos ou COVs, de acordo com o perfil histológico, é dividida em três grupos principais: tumores mucinosos, endometrióides, e, o mais comum, tumores serosos ^{41, 42}.

Embora menos frequente que o câncer de colo de útero, o câncer ovariano é considerado o mais letal entre as neoplasias ginecológicas, e seu alto índice de mortalidade é decorrente do diagnóstico em estádios avançados (FIGO III e IV), devido a ausência de sintomas no início da doença, bem como, pela falta de ferramentas para o diagnóstico precoce ⁴³⁻⁴⁵.

Na tentativa de ultrapassar estas barreiras e, considerando a prevalência, agressividade e diagnósticos em estágios avançados em mais de 70% dos casos, estudos avançam na busca de antígenos diferentemente expressos em COVs, visando desenvolver métodos para diagnósticos em estágios iniciais (FIGO I e II), bem como tratamentos mais específicos, na tentativa de obter melhores prognósticos ^{25, 46-48}.

Estudos em fase clínica pré-clínica e fase I, apontam sucesso em tratamentos de COV utilizando o anticorpos anti-NaPi2b acoplado a drogas anti-tumorais ^{49, 50}, enfatizando o potencial de NaPi2b como alvo na busca de alternativas para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de ovário.

1.3 Anticorpos como ferramenta para detecção de alvos moleculares

1.3.1 Produção e principais características dos anticorpos

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Igs), são proteínas circulantes produzidas por células B como resposta a exposição a antígenos. Estas células, altamente especializadas, são geradas na medula óssea e migram para os tecidos linfoides secundários após seu amadurecimento. Expressam uma grande quantidade de moléculas de anticorpo em sua membrana, cada célula possuindo cerca de 10^5 moléculas de Igs com a mesma especificidade ⁵¹.

A capacidade dos anticorpos de se ligar especificamente a um grande número de diferentes antígenos é reflexo de sua diversidade, que em conjunto formam o repertório de anticorpos do indivíduo. Os mecanismos genéticos envolvidos neste vasto repertório de receptores de antígenos ocorrem exclusivamente nos linfócitos ⁵².

A diversidade conferida a estes receptores está relacionada ao processo de recombinação gênica das cadeias variáveis dos anticorpos, conhecida como recombinação V(D)J, onde os genes da linhagem germinativa são recombinados aleatoriamente, seguidos da adição de sequências aleatórias de nucleotídeos, processo esse completamente independente de contato prévio com antígenos ^{53, 54}.

Os linfócitos B maduros possuem dois tipos de imunoglobulinas de membrana, a IgM e a IgD, que funcionam como receptores de antígeno. Estes receptores possuem uma cauda citoplasmática muito curta, sendo incapazes de traduzir sinal para ativação da célula B, por isso, duas cadeias capazes de mediar sinais, denominadas Ig α e Ig β , unidas por pontes dissulfeto, estão associadas não covalentemente com as imunoglobulinas de membrana, formando o complexo do receptor de célula B (BCR) ⁵⁵.

Após a maturação, os linfócitos B migram para os órgãos linfoides secundários, onde têm vida curta, salvo se entrarem em contato com o antígeno. Deste modo, o antígeno tem papel seletivo, pois pode induzir a expansão clonal e a diferenciação dos linfócitos B, cujos receptores interagem especificamente com ele. Portanto, quando os linfócitos B são ativados nos órgãos linfoides secundários, devido ao reconhecimento de um antígeno específico pelo BCR, pode ocorrer expansão clonal, posterior diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos e a geração de células B de memória. Os plasmócitos sintetizam e secretam imunoglobulinas intensamente e trocam a classe (isótipo) da imunoglobulina produzida, dependendo da natureza do antígeno, mantendo sempre a especificidade inicial ⁵¹.

A resposta imune é um processo extremamente complexo e depende de interações de diferentes populações celulares, como os linfócitos B e T e as células apresentadoras de antígeno (APC): macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. A resposta imune humoral (resposta de anticorpos) pode ser direcionada a dois tipos de antígenos: os antígenos timo-independentes e os antígenos timo-dependentes, que culminam ou não na interação entre células B, T e APCs ⁵⁶.

Os antígenos timo-independentes, geralmente carboidratos e lipopolissacarídeos, estimulam linfócitos B da zona marginal e linfócitos B-1, na ausência de linfócitos T. Estes antígenos possuem vários epítomos antigênicos idênticos (polivalentes), que são capazes de promover ligações cruzadas do complexo BCR em células B específicas e ativar o complemento, levando a ativação sem necessitar do auxílio de células T. A resposta aos antígenos timo-independentes é limitada, sendo constituída usualmente de anticorpos IgM, com mudança de isótipo restrita a apenas a alguns subtipos de IgG, e normalmente é desprovida de memória imunológica ⁵⁷.

Já os antígenos timo-dependentes, de natureza proteica, incluindo a grande maioria dos antígenos, necessitam da presença dos linfócitos TCD4⁺ para ativar a diferenciação de linfócitos B foliculares em plasmócitos. Na resposta a estes antígenos podem ser produzidos anticorpos de outros isótipos, como IgG, IgA e IgE, bem como IgM, além de ocorrer um processo conhecido como maturação de afinidade, que seleciona os plasmócitos produtores de anticorpos de maior afinidade, e a geração de memória imunológica ⁵⁶.

Os linfócitos TCD4⁺, diferentemente dos linfócitos B, não reconhecem antígenos livres. Seus receptores, conhecidos como TCRs, reconhecem pequenas moléculas associadas ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), mais precisamente o MHC de classe II. Estas pequenas moléculas são resultantes do processamento antigênico realizado pelas células APCs, e ficam expostas na membrana destas células associadas ao MHC de classe II, onde então podem ser apresentadas e reconhecidas pelos linfócitos TCD4⁺ específicos ⁵⁸.

A primeira etapa para interação entre linfócitos T e B é o reconhecimento de um antígeno proteico por ambos. A célula T reconhece o antígeno capturado e processado por APCs, geralmente células dendríticas (DCs), e com os segundos sinais proporcionados pelo reconhecimento de moléculas co-estimuladoras expressas pelas DCs, é ativada e induzida a expressar citocinas, proteínas de membrana (CD40L) e quimiocinas, que induzem a migração das células T para a região de contato com o linfócito B. Por sua vez, os linfócitos B ativados processam o antígeno para ser apresentado para os linfócitos T, e iniciam a expressão de quimiocinas específicas que promovem a aproximação entre os linfócitos T e B ativados.

Concomitantemente, os linfócitos B aumentam a expressão de MHC classe II, coestimuladores, como B7-2 (CD-86) e B7-1 (CD-80), e receptores para citocinas derivadas das células TCD4⁺, o que faz com que os linfócitos B antígeno-específicos respondam aos sinais da célula T. Na região de contato entre células T-B, estes linfócitos interagem pela ligação da molécula de CD-40, constitutivamente expressa nos linfócitos B, com seu receptor CD-40L, expresso nos linfócitos T ativados. As citocinas produzidas pelas células T têm papel essencial para a troca de isótipo da cadeia pesada dos anticorpos. Por exemplo, o principal fator de troca de isótipo para IgE é a interleucina-4 (IL-4), e para subclasses de IgG, o interferon gama (IFN- γ), tendo a célula T um importante papel no controle da resposta imune⁵⁸.

Após a interação, as células B ativadas migram de volta para o local de células B, os folículos germinativos, formando os centros germinativos, locais de extensa mudança de isótipo, maturação de afinidade e geração de células B de memória⁵¹.

O processo de maturação de afinidade dos anticorpos é decorrente de hipermutação somática que ocorre nos genes de Ig, seguida da sobrevivência seletiva das células B produtoras de anticorpos com maior afinidade. Esta seleção acontece após exposição de antígenos na superfície de células dendríticas foliculares (FDCs), que promovem sinais de sobrevivência aos linfócitos que produzem anticorpos de alta afinidade⁵⁹. Após esta maturação, as células selecionadas deixam o centro germinativo e se desenvolvem em células B de memória ou se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos de alta afinidade.

Por fim, ocorre o fenômeno denominado “*feedback* de anticorpos”, que ocorre devido a ligação de imunocomplexos, formados pelo antígeno/anticorpos específicos, nos receptores Fc das células B específicas para o antígeno. Este é um mecanismo fisiológico de controle da resposta imune humoral, sendo desencadeado pela produção crescente de anticorpos secretados que bloqueiam a produção adicional de anticorpos quando o estímulo inicial já foi contido⁶⁰.

1.3.1.1 Estrutura e isótipos dos anticorpos

Os anticorpos pertencem a uma família de glicoproteínas relacionadas estruturalmente, a família das imunoglobulinas, e, como dito anteriormente, são produzidos pelos plasmócitos a partir de um estímulo desencadeado por antígeno específico⁵².

A estrutura global dos anticorpos é composta por duas cadeias leves (L), cada uma com aproximadamente 25 kDa, e duas cadeias pesadas (H), com cerca de 55 kDa cada,

unidas por pontes dissulfeto. A cadeia L é composta por uma região variável (V) e uma região constante (C), já a cadeia H é formada por uma região V e de três a quatro regiões C, dependendo do subtipo do anticorpo. As regiões V são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno e as regiões C responsáveis pelas ações efectoras. Ambas possuem estruturas homólogas características, composta por cerca de 110 aminoácidos, os chamados domínios de imunoglobulinas, responsáveis pelo nome da família, encontrados sob a forma de estruturas globulares decorrente de um dobramento da molécula desencadeado por pontes dissulfeto^{52, 61}. A maior parte das diferenças encontradas nas regiões V das cadeias L e H dos anticorpos está relacionada a três domínios hipervariáveis, conhecidos como regiões determinantes de complementariedade (CDRs), que são alças protusas formadas pela conexão de filamentos das proteínas que formam a região V. Estas CDRs estão situadas entre quatro regiões com sequências de aminoácidos mais conservadas, as chamadas “*frameworks*” (FR), que são responsáveis pelo dobramento de regiões V para a formação das CDRs^{52, 62} (Figura 3).

Os anticorpos são divididos em classes denominadas isótipos, que são determinados pelo tipo de cadeia pesada. Cada isótipo é representado por uma letra grega correspondente a cadeia pesada: cadeia γ (IgG), cadeia μ (IgM), cadeia δ (IgD), cadeia ϵ (IgE) e cadeia α (IgA), e cada um desempenha uma determinada função. As regiões C das cadeias pesadas de todas as moléculas de anticorpo de um mesmo isótipo apresentam essencialmente a mesma sequência de aminoácidos, que se difere em outros isótipos. Nas Igs de membrana, a região C da cadeia pesada é composta por quatro domínios Ig em cadeia, com um segmento carboxiterminal hidrofóbico que ajuda a ancorar a proteína na membrana; já as Igs secretadas contêm apenas 3 domínios Ig, sendo o domínio carboxiterminal hidrofílico. As imunoglobulinas podem ser secretadas em forma de monômeros (IgG, IgE e IgA), dímeros (IgA), trímeros (IgA), pentâmeros e hexâmeros (IgM)⁵².

Figura 3 - Modelo esquemático da molécula de anticorpo

Modelo esquemático da molécula de anticorpo contendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, com suas porções variáveis encontradas na região amino terminal e regiões constantes encontradas na porção C terminal da molécula. A região Fab é formada pelas cadeias leves juntamente com as regiões variáveis e um domínio constante da cadeia pesada, já a porção Fc consiste apenas dos domínios constantes da cadeia pesada depois da região da dobradiça. Nas regiões variáveis se encontram as CDRs e *frameworks*. Também é possível observar as pontes dissulfeto responsáveis pela união das cadeias, além da região da dobradiça, onde são mostradas as regiões clivadas pelas enzimas papaína e pepsina. Região superior mostra a estrutura da imunoglobulina no nível gênico e a região inferior no nível de proteína. H: cadeia pesada; L: cadeia leve; N: amino terminal; C: carboxiterminal; s-s: pontes dissulfeto; Gm e Km: Alótipos (Marcadores genéticos) ⁵².

A IgG é a imunoglobulina que ocorre em maior concentração no soro, sendo o subtipo mais utilizado em imunodiagnóstico. Existem quatro classes de IgG, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que podem ainda ser divididas em subclasses de acordo com o número de pontes dissulfeto encontradas na região da dobradiça. Todas as subclasses de IgG têm a capacidade de atravessar a placenta, tendo um importante papel na imunidade neonatal. Este isótipo também é importante para opsonização, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo e inibição das células B por *feedback* ⁵².

Os isótipos IgM e IgD são receptores de antígeno (BCR) de células B virgens. A IgD é raramente encontrada em sua forma secretada e suas funções são principalmente atribuídas a sua forma ancorada a membrana, podendo influenciar nos estágios de desenvolvimento e ativação das células B. Já a IgM, além das funções semelhantes a IgD quando ancorada a membrana, é normalmente secretada e age na opsonização de antígenos e tem papel importante na ativação do sistema complemento ⁵².

A IgE está presente em baixas concentrações no soro, mas é um isótipo muito potente. Está associada à hipersensibilidade imediata, nas reações alérgicas e atua na defesa contra parasitas helmínticos. Por fim, a imunoglobulina A é encontrada nas superfícies das mucosas e nas secreções, contribuindo para a imunidade neonatal através do leite materno e agindo na imunidade das mucosas ⁵².

Além de suas funções fisiológicas, os anticorpos, principalmente IgG, são reagentes comumente utilizados em imunodiagnóstico e na imunoterapia de diversas doenças de origem infecciosa, autoimunes e também na detecção e tratamento de tumores ⁶³⁻⁶⁶.

1.3.2 Anticorpos anti-peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos vêm sendo utilizados visando a produção de reagentes imunológicos cada vez mais específicos. São utilizados como imunógenos para produção de anticorpos ^{67, 68}, para indução de respostas imunológicas, devido seu potencial como adjuvante ⁶⁹, bem como agente antitumoral ^{69, 70}.

Duas principais estratégias são comumente utilizadas para a produção de anticorpos. A primeira, utilizando DNA complementar (cDNA), ou uma sequência gênica que codifica a proteína de interesse, onde são produzidas proteínas recombinantes em diversos organismos, principalmente em bactérias, que são posteriormente purificadas e utilizadas como imunógenos. Outra maneira é utilizando pequenos peptídeos sintéticos contendo a sequência de aminoácidos da proteína de interesse como imunógenos. Estes anticorpos anti-peptídeos reconhecem com uma alta frequência a proteína nativa, cuja sequência de aminoácidos foi extraída ⁷¹⁻⁷³.

No entanto, alguns cuidados são primordiais na escolha da sequência de peptídeos sintéticos. Deve ser considerado, por exemplo, se a região que compreende a sequência do peptídeo sintético contém modificações pós-traducionais, como uma fosforilação, pois se existir, o peptídeo sintético também deverá ser fosforilado ^{67, 68}, do contrário, os anticorpos produzidos provavelmente não reconhecerão a proteína nativa madura. O tamanho do

peptídeo também deve ser levado em consideração. Preferencialmente ele deve ter de 10-20 resíduos de aminoácidos, pois peptídeos muito pequenos terão dificuldades em funcionar como epítomos, e peptídeos muito grandes podem adotar uma conformação própria, muitas vezes diferente da proteína intacta. Além disso, a acessibilidade do epítomo na superfície externa da proteína é uma das características mais importante para haver reconhecimento da proteína nativa pelos anticorpos anti-peptídeos⁷³.

Com relação à síntese, pode-se dizer que os peptídeos hidrofílicos, mais solúveis, são mais fáceis de sintetizar, além de provavelmente estarem localizados na superfície externa da molécula intacta, visto que as regiões hidrofóbicas tendem a estar inseridas na dupla camada da membrana celular e no citoplasma. Parece não haver necessidade de peptídeos com alto grau de pureza para a produção de anticorpos policlonais, no entanto, o recomendado é uma pureza igual ou superior a 75%^{73, 74}.

Em suma, as vantagens de se utilizar pequenos peptídeos sintéticos como imunógenos para a produção de anticorpos são variadas. Mesmo sendo policlonal, o anticorpo produzido será monoespecífico, isto é, reconhecerá apenas um sítio da molécula alvo, podendo ser apenas regiões conservadas, sítios ativos, domínios extracelulares ou intracelulares, regiões resultantes de modificações pós-traducionais, como por exemplo, sítios de fosforilação, ou até mesmo reconhecer um produto de um gene novo, diretamente específico para o sítio de interesse. Além disso, a validação dos anticorpos anti-peptídeos é facilitada pela disponibilidade do imunógeno sintético, que, por sua vez, também pode ser utilizado em sua forma livre como competidores específicos no bloqueio dos sítios de reconhecimento do anticorpo para demonstrar a especificidade, bem como pode ser acoplado a um suporte sólido gerando uma matriz de afinidade para a purificação dos anticorpos⁷³.

1.3.3 Conjugação de peptídeos sintéticos com proteínas carreadoras

Em geral, pequenos peptídeos ou haptenos, moléculas de baixo peso molecular ou com estrutura simples, não são imunogênicos e precisam ser conjugados com proteínas carreadoras para então induzir a resposta humoral. Esta carreadora deve ter epítomos reconhecidos por células TCD4+, naturalmente no contexto de MHC classe II, para ativar células T, e o hapteno deve conter epítomos reconhecidos pelos linfócitos B^{58, 75-78}. Portanto, para que ocorra produção de anticorpos específicos para o hapteno, este deve estar fisicamente ligado a uma molécula proteica que estimule respostas de linfócitos T.

A hemocianina de lapa californiana (KLH)^{67, 71}, albumina de soro bovino (BSA)^{68, 79} e ovalbumina (OVA)⁸⁰, são exemplos de carreadoras comumente utilizadas para aumentar a imunogenicidade de peptídeos sintéticos para a produção de anticorpos. Dentre os métodos mais utilizados para a conjugação estão o glutaraldeído, o carbodiimida (EDC) e o ácido maleimidobenzóico (MBS), que promovem conjugações via grupamentos amina, grupamentos carboxílicos, ou através de interações com resíduos de cisteína presentes no hapteno, respectivamente. Apesar de todas as técnicas de conjugação geralmente apresentarem sucesso para a formação do conjugado, muitas vezes ela não é capaz de induzir anticorpos que reconheçam a proteína nativa. Nestes casos, é aconselhável testar mais de um método de conjugação^{76, 81}.

Para a validação dos anticorpos anti-peptídeos sintéticos conjugados, cuidados devem ser tomados para que não ocorram ligações inespecíficas do anticorpo com a proteína carreadora, potencialmente presente em reagentes utilizados para os experimentos de validação. Por exemplo, o uso de BSA como proteína carreadora para a produção de anticorpos não é recomendado quando os experimentos de validação incluem células, por sua vez, cultivadas em meios de cultura contendo soro fetal bovino, ou etapas de bloqueio que contenham BSA^{73, 76, 82}. Além disso, é crucial conjugar os peptídeos sintéticos com duas proteínas carreadoras distintas, para um conjugado ser utilizado na imunização e produção de anticorpos e outro para a validação dos mesmos, evitando assim reações cruzadas⁸⁰.

Portanto, haptenos conjugados com proteínas carreadoras irão estimular resposta humoral para o hapteno de interesse, bem como para a carreadora utilizada. Estes anticorpos específicos para a carreadora são removidos por processos de purificação, no entanto, se mais de 90% deles forem específicos para a carreadora, os ensaios posteriores poderão ficar comprometidos devido à pequena quantidade de anticorpos específicos para o antígeno alvo⁸⁰.

O critério para a escolha das moléculas carreadoras utilizadas no presente trabalho, preconiza que elas não sejam imunogênicas por si mesmas para o sistema imune do organismo imunizado, mas que sejam veículos de transporte dos peptídeos para a células apresentadoras de antígenos onde os peptídeos seriam processados, naturalmente conjugados com produtos do complexo principal de histocompatibilidade e apresentados às células T e B que possuam receptores TCRs e BCRs já organizados. Considerando tais aspectos, o sistema imune não investiria na produção de anticorpos contra a proteína carreadora, podendo então

produzir maiores títulos de anticorpos contra o antígeno de interesse (em fase de elaboração^{*}).

1.3.4 Utilização de anticorpos para detecção de marcadores tumorais

Por ser possível produzir anticorpos contra praticamente qualquer tipo de antígeno, as técnicas baseadas em anticorpos podem ser utilizadas para estudar e diagnosticar uma infinidade de moléculas diferentes. Devido a alta especificidade, o uso de anticorpos é uma das ferramentas mais utilizadas para detecção de alvos tumorais, podendo ser utilizados em uma ampla variedade de técnicas de imunodiagnóstico, como o radioimunoensaio (RIA)⁸³, ELISA⁸⁴, *Western blotting*⁸⁵, entre outros.

Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais⁸⁶, as abordagens de detecção e tratamento de tumores se intensificaram. Com estes avanços, a busca por marcadores tumorais específicos abre uma nova era para o diagnóstico precoce e tratamentos personalizados contra o câncer.

1.3.4.1 Marcadores tumorais

Os marcadores ou biomarcadores tumorais são macromoléculas encontradas no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionadas com o surgimento e/ou crescimento de células neoplásicas. Estes marcadores podem auxiliar o diagnóstico, estadiamento, escolha e avaliação do tratamento, detecção de recidivas e no prognóstico da doença^{87, 88}.

O primeiro indício de marcador tumoral surgiu em 1847, com a descoberta da proteína Bence-Jones, também conhecida como paraproteína ou proteína M, encontrada em pacientes com mieloma múltiplo. Estas proteínas são cadeias leves de imunoglobulinas monoclonais produzidas por tumores de células B. Foi primeiramente relacionada a uma doença óssea denominada osteomalácia, caracterizada pelo enfraquecimento e desmineralização óssea, mas após estudos, foi possível observar que a osteomalácia era na verdade decorrente de alterações acarretadas pela neoplasia de plasmócitos, que afetavam a absorção de cálcio pelos rins, entre outras coisas. Estes plasmócitos afetam a produção das células normais na medula óssea e produzem apenas cadeias leves de imunoglobulinas, que

^{*} Dias da Silva, W. **Proteínas carreadoras alternativas para conjugação de haptenos**. São Paulo, 2014.

são encontrados em excesso na urina e no sangue de pacientes portadores de tumor de células B^{89, 90}.

A partir disso, muitos marcadores sorológicos surgiram, como o antígeno prostático específico (PSA), utilizado para o diagnóstico do câncer de próstata⁹¹, o antígeno carcinoembrionário (CEA), utilizado para monitoramento da recorrência e da resposta ao tratamento do câncer colorretal⁹², bem como a alfafetoproteína, a gonadotrofina coriônica humana (β -HCG) e a lactato desidrogenase (DHL), utilizados no monitoramento de tumores não seminomatosos das células germinativas⁸⁸.

Um exemplo de marcador encontrado em tecidos é a proteína P-53, relacionada à presença de vários tipos de câncer, principalmente o câncer colorretal. O gene P-53 é um gene supressor de tumor, capaz de bloquear o processo de mitose e induzir apoptose de células alteradas, impedindo a proliferação descontrolada destas células. Mutações neste gene impedem estas funções, geralmente levando ao crescimento de células neoplásicas. A presença da proteína P-53 no tecido geralmente é efêmera, e mutações no gene de P-53 podem gerar proteínas de vida longa, que estimulam a produção de anticorpos anti-P-53. Portanto, a detecção de mutações no gene de P-53 e alterações no nível de expressão da proteína podem ser feitas por PCR e imunohistoquímica, respectivamente, e a dosagem no sangue periférico de anticorpos anti P-53 pode ser realizada por ELISA^{93, 94}.

Os biomarcadores também podem ser úteis para identificação de uma determinada população de risco. Por exemplo, no caso de mulheres com histórico familiar de câncer de mama e ovário, uma análise genética pode ser realizada para avaliar mutações nos genes BRCA 1, que aumentam o risco de desenvolvimento destes tipos de câncer. Em caso positivo, podem optar por procedimentos que diminuam o risco, como rastreamento intensivo e quimioterapia preventiva^{88, 95}.

Com relação ao câncer de ovário, vários marcadores foram desenvolvidos, dentre eles estão o CA-125, o CA-15-3, o TAG-72, o CA19-9, entre outros. No entanto, o marcador tumoral mais utilizado para o acompanhamento do câncer ovariano é o antígeno CA-125, uma glicoproteína de alto peso molecular reconhecida pelo anticorpo monoclonal OC-125⁴⁸. Este marcador é eficiente para o acompanhamento da progressão e reincidência tumoral. Para o diagnóstico não é usualmente utilizado, pois sozinho não é capaz de detectar a presença de tumores de ovário em estágios iniciais, além de ter seus níveis plasmáticos aumentados em casos sem malignidade. Além disso, em 20% dos casos de tumores de ovário há a diminuição ou ausência da expressão de CA-125, tornando necessária a busca por novos marcadores que, combinados ao CA-125, auxiliem o bom prognóstico da doença^{36, 96, 97}.

O conceito de ferramentas personalizadas e adaptadas, capazes de detectar alvos moleculares específicos de um tumor, surgiu a mais de 100 anos com Paul Erlich. Com os avanços obtidos nos campos da genética e da biologia molecular, drogas cada vez mais específicas vêm surgindo. De fato, um grande representante destas ferramentas são os anticorpos, capazes de detectar diversos antígenos devido sua alta especificidade, auxiliando na detecção e tratamento de doenças ^{66, 98}.

O câncer epitelial de ovário lidera em número de mortes causadas por câncer em mulheres e é o maior causador de mortes entre os tumores ginecológicos ⁴⁵. Devido indisponibilidade de ferramentas sensíveis e ocorrência de sintomas apenas em estádios tardios, os COVs não são diagnosticados nos estágios iniciais, dificultando o bom prognóstico da doença. Por isso, e considerando o avanço da biologia molecular, novos alvos, como NaPi2b, são cruciais na tentativa de rastrear precocemente a doença, bem como, auxiliar no prognóstico e tratamento, agindo como ferramenta para elucidar os mecanismos moleculares agindo no desenvolvimento do tumor. Visando estes aspectos, o presente trabalho teve como foco a produção e validação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, denominados Let#1 e Let#2, derivados do segundo laço extracelular da proteína NaPi2b, cuja expressão é relacionada ao desenvolvimento tumoral ²⁵. Após validação, estes anticorpos foram utilizados para avaliar a possível presença de NaPi2b no soro de pacientes portadoras de carcinoma ovariano, bem como em soro humano controle. Esta abordagem visou avaliar a possibilidade de realizar o diagnóstico das pacientes por uma via não invasiva, a partir de amostras de soro coletadas em exames de rotina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produção de anticorpos policlonais e monoespecíficos anti-peptídeos sintéticos derivados do segundo laço extracelular da proteína NaPi2b.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Validação de anticorpos IgY anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 (APÊNDICE);
- ✓ Produção e validação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2;
- ✓ Análise da reatividade dos anticorpos anti-peptídeos com NaPi2b nativa, presente na membrana plasmática de células da linhagem OV-CAR, derivada de carcinoma ovariano humano;
- ✓ Avaliação dos anticorpos IgG anti-peptídeos Let#1 e Let#2 como identificadores de possíveis marcadores produzidos por células do câncer de ovário em ensaios *in vitro* utilizando amostras de soro de pacientes com câncer ovariano e pacientes controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, coordenado pela Dra. Vânia Gomes de Moura Mattaraia. O projeto foi submetido para avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, registrado como n°127, fls. 12 do livro 3, bem como pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, aprovado sob protocolo n° 1021/13. Após análise dos resultados de alguns experimentos, houve a necessidade de alteração da linhagem de 30 camundongos BALB/c para 30 camundongos da linhagem High III, selecionados para alta produção de anticorpos⁹⁹. Tal alteração foi devidamente aprovada pelos comitês de ética acima referidos.

Coelhos da linhagem White New Zealand (WNZ) com aproximadamente 7 meses de idade e camundongos da linhagem BALB/c com 4-6 semanas de idade, todos do sexo masculino, foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, onde o padrão sanitário é periodicamente controlado. Os camundongos High III fêmeas foram cedidos pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os coelhos, mantidos em gaiolas individuais, e os camundongos BALB/c, acondicionados em caixas de polipropileno com lotação máxima de 5 animais cada, foram mantidos em biotério convencional localizado no Laboratório Especial Piloto de Pesquisas e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários (“Fazendinha”), Instituto Butantan, sob a coordenação do Dr. Celso Pereira Caricati. Já os camundongos da linhagem High III, mantidos sob as mesmas condições citadas anteriormente, foram acondicionados no Biotério do Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, sob a coordenação do veterinário responsável, Dr. Fábio Carlos Magnoli.

A alimentação foi composta por ração balanceada específica para cada espécie (NuviLab), em regime de ingestão de água e ração “*Ad Libitum*”. O acesso à sala foi restrito aos pesquisadores e pessoal de apoio envolvido no projeto.

3.2 Peptídeos sintéticos

Cada peptídeo sintético, Let#1 ou Let#2, é composto por quinze aminoácidos, cujas sequências são completamente distintas entre si e pareáveis com regiões encontradas no segundo laço extracelular da proteína transportadora de fosfato dependente de sódio tipo 2b

(NaPi2b). Além destes dois peptídeos alvo, um terceiro peptídeo denominado Let#3, composto por quatorze aminoácidos e bastante semelhante ao peptídeo Let#2, com alteração apenas no sétimo resíduo da cadeia de aminoácidos, foi incluído como controle negativo em algumas etapas *in vitro* do projeto. Uma parte dos peptídeos foi mantida liofilizada na forma livre e o restante foi conjugado com diferentes proteínas carreadoras. O processo de síntese foi realizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, sob a coordenação da Dra. Maria Aparecida Juliano.

Antes do processo de conjugação, o perfil cromatográfico dos peptídeos Let#1 e Let#2 livres foi analisado por HPLC-18 (Figura 4), mostrando grau de pureza superior a 80%, considerado satisfatório para conjugação e utilização nas imunizações e testes *in vitro* neste projeto (92% = Let#1 e 83% = Let#2). Ambos também foram avaliados por espectrometria de massas, onde a massa do peptídeo Let#1, obtida como MS2, resultou em 1702,6 Da, sendo muito semelhante a sua massa teórica de 1703,0 Da., de acordo com a plataforma *BLAST*¹⁰⁰. A massa do peptídeo Let#2, obtida como MS3, foi de 1719,6 Da., também bastante similar a sua massa teórica de 1718,8 Da (dados não mostrados).

Figura 4 - Perfil cromatográfico dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2

(A) Perfil cromatográfico em HPLC C-18 do peptídeo Let#1 livre, em gradiente de 10-60%/20 minutos, como indicado pela linha azul. Grau de pureza de 92%. (B) Perfil cromatográfico em HPLC C-18 do peptídeo Let#2 livre, em gradiente de 10-60%/20 minutos, como indicado pela linha azul. Grau de pureza de 83%.

3.3 Conjugação dos peptídeos sintéticos com proteínas carreadoras

Três diferentes proteínas carreadoras foram selecionadas para a conjugação dos peptídeos sintéticos via glutaraldeído. Para o estabelecimento de comparações, grupos controle foram imunizados com peptídeos conjugados com proteína carreadora comumente

utilizada. Devido ao processo de patente estar em preparação, as proteínas carreadoras utilizadas foram citadas apenas por siglas. Para a imunização de coelhos, foram utilizados peptídeos sintéticos conjugados com proteína carreadora A (PC-A) e para a imunização de camundongos, os peptídeos foram conjugados com proteínas carreadoras B e C (PC-B e PC-C, respectivamente). As proteínas carreadoras A e B são os alvos da patente, e a proteína C é a proteína controle, a saber, Ovalbumina (Sigma-Aldrich, MO, EUA). O processo de conjugação dos peptídeos foi realizado pela empresa “Célula B – Serviço de Produção de Anticorpos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul”, sob a coordenação do Dr. Itabajara Vaz Júnior. A concentração de peptídeo no conjugado foi ajustada para 1 mg/mL e as alíquotas foram mantidas congeladas a -20 °C até a sua utilização. Os peptídeos livres foram ajustados para 2 mg/mL em PBS estéril (8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4) e mantidos a 4°C até a utilização.

3.4 Análise do reconhecimento dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 pelo anticorpo monoclonal CA-125

O ensaio foi realizado de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do kit de ELISA para dosagem do antígeno CA-125 (IBL International GMBH, Hamburg, Germany), utilizando 1 µg/poço de peptídeo sintético livre ou conjugado diluído em 50 µL de tampão carbonato de sódio (0,015 M Na₂CO₃; 0,035 M NaHCO₃; pH 9.6) como amostra teste e 50 µL de cada ponto da curva padrão e controles, todos em duplicata.

3.5 Preparo do Adjuvante Marcol Montanide para imunização de coelhos e camundongos BALB/c

Para o preparo do adjuvante Marcol Montanide (MMT80) completo foram utilizados os reagentes a seguir com as devidas proporções: 2 mL de Marcol Montanide ISA 50 (Seppic, Puteaux, Paris, França), 1 mg de BCG inativada (cedida pela seção de soros do Instituto Butantan), 1 mL de Tween 80, 1,2 mM de NaCl e água milli-q estéril em quantidade suficiente para 8 mL de solução final. Primeiramente foi preparada a solução salina dissolvendo o NaCl em 5 mL de água milli-q. Para obtenção da emulsão, os reagentes foram homogeneizados separadamente. Em um tubo Falcon estéril, foi emulsionado 1 mg de BCG em 2 mL de Marcol Montanide ISA 50. Em outro tubo, o antígeno de interesse foi emulsionado em 1 mL de solução salina. Em seguida, o Tween 80 foi homogeneizado com 4 mL de solução salina. Por fim, as três soluções foram misturadas até a completa

homogeneização e o volume final ajustado para 8 mL com água milli-q. O preparo do adjuvante Marcol Montanide incompleto foi realizado da mesma maneira, exceto pela ausência de 1 mg de BCG inativada. Como recomendado, o preparo dos adjuvantes foi realizado no mesmo dia das imunizações.

3.6 Protocolo de imunização, coleta e processamento das amostras para análise

3.6.1 Protocolo de imunização e coleta de sangue em coelhos

Antes do início das imunizações, amostras de sangue foram coletadas para serem utilizadas como fonte de soro pré-imune para controle subsequentes. Os coelhos foram divididos em dois grupos experimentais com 2 animais cada. O grupo 1 foi imunizado com peptídeo Let#1 e o grupo 2 imunizado com peptídeo Let#2. Em cada imunização foram injetados de 40-50 µg de peptídeo conjugado por animal, contendo 10 µg de peptídeo a cada 100 µL de diluente, ambos conjugados com proteína carreadora A (Tabela 1).

Tabela 1 - Esquema de grupos para imunização de coelhos

Coelhos - New Zealand White			
Animal	Antígeno	Quantidade de antígeno e diluente	Via de inoculação
1	Let#1	40 µg Ag em 400 µL de diluente para as 2 primeiras imunizações e 50 µg Ag em 500 µL de diluente para as imunizações subsequentes – MMT80 completo para a primeira imunização, incompleto para a segunda e apenas NaCL 0,15M estéril para as demais imunizações.	Subcutânea – em pontos distintos do dorso do animal, com 100 µL de solução em cada ponto.
2	Let#1		
3	Let#2		
4	Let#2		

Obs.: Todos os peptídeos conjugados com proteína carreadora A.

Após depilação, os imunógenos foram inoculados em pontos distintos na região dorsal do animal pela via subcutânea (s.c.), com intervalo de duas semanas entre as três primeiras imunizações, e intervalos semanais nas imunizações subsequentes (Figura 5). A

primeira imunização foi realizada com os imunógenos emulsionados em adjuvante Marcol Montanide completo, a segunda em Marcol Montanide incompleto e as demais imunizações com os antígenos emulsionados apenas em solução de NaCl 0,15M estéril.

Figura 5 - Protocolo de imunização e sangria de coelhos

Antes do início das imunizações, amostras de sangue foram coletadas para serem utilizadas como fonte de soro pré-imune para controles subsequentes. Entre a primeira e a terceira imunização, os intervalos foram quinzenais, alternados por sangria exploratória. Já, a partir da terceira imunização, os intervalos foram abreviados para uma semana, com sangria exploratória realizada no mesmo dia de cada reforço. Uma semana após a décima segunda imunização foi realizada sangria total.

A coleta de sangue foi realizada por punção da veia central da orelha utilizando scalp de 21G. Por coleta foram retirados em média 10 mL de sangue de cada animal. As amostras de soro de cada grupo, coletadas uma semana depois ou no mesmo dia do reforço (Figura 5), foram processadas e armazenadas em freezer -20 °C até sua utilização. Uma semana após a décima segunda imunização, os animais foram eutanasiados com solução de dietilbarbiturato de sódio a 2% pela via intraperitoneal (i.p.), na concentração de 30 mg/kg, e, logo em seguida, foi realizada a sangria total por punção cardíaca e posterior processamento e armazenamento das amostras de soro.

3.6.2 Protocolo de imunização e coleta de sangue em camundongos BALB/c

Da mesma maneira realizada com os coelhos, antes do início das imunizações, amostras de sangue foram coletadas para serem utilizadas como fonte de soro pré-imune para controle dos ensaios posteriores. Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais com 5 animais cada. Os grupos 1 e 2 foram imunizados com 4 µg de peptídeos

Let#1 ou Let#2, respectivamente, e os grupos 3 e 4 imunizados com 10 µg de peptídeos Let#1 ou Let#2, respectivamente. Todos os antígenos estavam conjugados com proteína carreadora B (Tabela 2).

Tabela 2 - Esquema de grupos para imunização de camundongos BALB/c

Camundongos – BALB/c			
Grupo	Antígeno	Quantidade de antígeno e diluente	Via de inoculação
1	Let#1	4 µg/Ag em 200 µL de diluente - MMT80 completo para a primeira	Intraperitoneal –
2	Let#2	imunização, incompleto para a segunda e apenas NaCl 0,15 M estéril para as demais imunizações.	200 µL em um único ponto.
3	Let#1	10 µg/Ag em 200 µL de diluente - MMT80 incompleto para a primeira	Intraperitoneal –
4	Let#2	imunização, e apenas NaCl 0,15 M estéril para as demais imunizações.	200 µL em um único ponto.

Obs.: Todos os peptídeos conjugados com proteína carreadora B.

Os imunógenos foram inoculados em apenas um ponto do animal pela via intraperitoneal (i.p.), com intervalo de duas semanas entre as três primeiras imunizações, e intervalos semanais nas imunizações subsequentes nos grupos 1 e 2, com sangrias exploratórias realizadas uma semana depois ou no mesmo dia do reforço (Figura 6a). Já nos grupos 3 e 4, os intervalos entre as imunizações foram sempre semanais, com sangria apenas após a sexta, sétima e oitava imunizações, realizadas uma semana após cada reforço (Figura 6b). Nos grupos 1 e 2 a primeira imunização foi realizada com os imunógenos emulsionados em adjuvante Marcol Montanide completo, a segunda em Marcol Montanide incompleto e as demais com os imunógenos emulsionados apenas em solução de NaCl 0,15 M estéril. Para os grupos 3 e 4 a única diferença foi a ausência de BCG inativada desde a primeira imunização, isto é, primeira imunização foi realizada com Marcol Montanide incompleto e as demais com os imunógenos emulsionados apenas em solução de NaCl 0,15M estéril.

Figura 6 - Protocolo de imunização e sangria de camundongos BALB/c

Antes do início das imunizações, amostras de sangue foram coletadas para serem utilizadas como fonte de soro pré-imune para posteriores controles. **A)** O grupo 1 foi imunizado com peptídeo Let#1 e o grupo 2 imunizado com peptídeo Let#2, ambos conjugados com proteína carreadora B (4 µg/animal/imunização). Entre a primeira e a terceira imunização, houve intervalos quinzenais, alternados por sangria exploratória. Já, a partir da terceira imunização, os intervalos foram abreviados para uma semana, com sangria exploratória realizada no mesmo dia de cada reforço. Uma semana após a décima segunda imunização foi realizada sangria total. **B)** O grupo 3 foi imunizado com peptídeo Let#1 e o grupo 4 imunizado com peptídeo Let#2, ambos conjugados com proteína carreadora B (10 µg/animal/imunização). As imunizações foram realizadas semanalmente até a sexta imunização. Entre a sexta e a oitava imunização os intervalos foram quinzenais, alternados pelas sangrias exploratórias após a sexta e a sétima imunização, seguida de sangria total uma semana após a oitava imunização.

A coleta de sangue foi realizada por punção do plexo sub-mandibular utilizando lanceta de aço inoxidável estéril ou pela via retro-orbital com pipeta Pasteur autoclavada. Por coleta, foram retirados em média 200 µL de sangue de cada animal. Após a décima segunda imunização dos grupos 1 e 2 e a oitava imunização dos grupos 3 e 4, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e, logo em seguida, foi realizada a sangria total por punção

cardíaca. As amostras de soro de cada grupo, coletadas no mesmo dia ou uma semana após cada reforço, foram processadas e armazenadas em freezer -20 °C até sua utilização.

3.6.3 Protocolo de imunização e coleta de sangue em camundongos High III

Da mesma maneira descrita para os animais anteriores, antes do início das imunizações, amostras de sangue foram coletadas para serem utilizadas como fonte de soro pré-imune. Nestes grupos, todos os antígenos foram previamente encapsulados em sílica SBA-15, que atuou como adjuvante. A proporção utilizada de antígeno/SBA-15 foi de 1:25, 1 parte de antígeno para 25 partes de sílica, proporção estabelecida para obtenção da maior taxa de encapsulação¹⁰¹, conforme cálculo a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 - Cálculos para encapsulação de antígenos a SBA-15

Grupo	Antígeno	Quantidades	Cálculo
1	Let#1 conjugado com proteína B	Para 6 animais – 1 de sobra 200 µL/animal Total: 1200 µL/solução	120 µL de Let#1+ 300 µL de SBA-15+ 780 µL de PBS
2	Let#2 conjugado com proteína B	Para 6 animais – 1 de sobra 200 µL/animal Total: 1200 µL/solução	120 µL de Let#2+ 300 µL de SBA-15+ 780 µL de PBS
3	Let#1+ Let#2 conjugados com proteína C	Para 5 animais – 1 de sobra 200 µL/animal Total: 1.000µL/solução	50 µL de Let#1+ 50 µL de Let#2+ 250 µL de SBA-15+ 650 µL de PBS
4	Let#1 + Let#2 livres	Para 5 animais – 1 de sobra 200 µL/animal Total: 1.000 µL/solução	50 µL de Let#1+ 50 µL de Let#2+ 250 µL de SBA-15+ 650 µL de PBS

Importante: TODOS os grupos foram imunizados com peptídeos encapsulados em SBA-15; Peptídeos: Livres (2 mg/mL) e Conjugados (1 mg/mL); **Solução estoque de sílica (SBA-15):** 10 mg/mL. Todas as soluções foram diluídas em PBS estéril.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais com 5 animais cada. Os grupos 1 e 2 foram imunizados com 20 µg de peptídeos Let#1 ou Let#2 conjugados com proteína B, respectivamente. O grupo 3 imunizado com 10 µg peptídeo Let#1 e 10 µg de

Let#2 conjugados com proteína C e o grupo 4 imunizado com 20 µg peptídeo Let#1 e 20 µg de Let#2 livres (Tabela 4).

Tabela 4 - Esquema de grupos para imunização de camundongos High III

Camundongos –High III			
Grupo	Antígeno	Quantidade de antígeno e diluente	Via de inoculação
1	Let#1	20 µg/Ag por animal em 200 µL de diluente – PBS estéril e sílica SBA-	Subcutânea - 200 µL em um único ponto.
2	Let#2	15 nas proporções indicadas na tabela 3.	
Obs.: Peptídeos conjugados com proteína carreadora B.			
3	Let#1 + Let#2	10 µg de cada Ag por animal em 200 µL de diluente – PBS estéril e sílica SBA-15 nas proporções indicadas na tabela 3.	Subcutânea – 200 µL em um único ponto.
Obs.: Peptídeos conjugados com proteína carreadora C.			
4	Let#1 + Let#2	20 µg de cada Ag por animal em 200 µL de diluente – PBS estéril e sílica SBA-15 nas proporções indicadas na tabela 3.	Subcutânea – 200 µL em um único ponto.
Obs.: Peptídeos livres.			

Os imunógenos foram inoculados em apenas um ponto do animal pela via subcutânea (s.c.), com intervalos quinzenais alternados entre imunizações e sangrias até a quarta imunização. A partir da quinta imunização, os intervalos foram mensais, com sangria realizada no sétimo dia após cada reforço (Figura 7). Em cada imunização foram injetados 20 µg peptídeo conjugado ou 40 µg de peptídeo livre por animal, emulsionados em 200 µL de diluente. O protocolo de encapsulação dos antígenos a SBA-15, realizado conforme cálculo da tabela 3, sempre foi realizado um dia antes de cada imunização e a emulsão mantida com homogeneizações periódicas.

Figura 7 - Protocolo de imunização e sangria de camundongos High III

Antes do início das imunizações, amostras de sangue foram coletadas para serem utilizadas como fonte de soro pré-imune para posteriores controles. O grupo 1 foi imunizado com peptídeo Let#1 e o grupo 2 imunizado com peptídeo Let#2, ambos conjugados com proteína carreadora B (20 µg/animal/imunização). O grupo 3 foi imunizado com 10 µg de peptídeo Let#1 e 10 µg de Let#2 conjugados com proteína C e o grupo 4 imunizado com 20 µg de peptídeo Let#1 e 20 µg de Let#2 livres. Todos os antígenos foram previamente encapsulados em sílica SBA-15, que atuou como adjuvante. Entre a primeira e a quarta imunização, houve intervalos semanais, alternados entre imunizações e sangrias. Já, a partir da quinta imunização, os intervalos foram mensais, com sangria realizada uma semana após cada reforço. A sangria total foi realizada após sete dias da sexta imunização.

A coleta de sangue foi realizada por punção do plexo retro-orbital utilizando pipeta Pasteur estéril. Em cada coleta foram retirados em média 200 µL de sangue de cada animal. Após a sexta imunização os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e, logo em seguida, foi realizada a sangria total por punção cardíaca. As amostras de soro de cada grupo foram processadas e armazenadas em freezer -20 °C até sua utilização.

3.6.4 Obtenção e processamento do soro

As amostras de sangue foram mantidas em repouso em estantes para tubos a 37 °C durante 2 horas. Após incubação, as amostras foram centrifugadas à 1500 rpm por 15 minutos à 4 °C. O soro sobrenadante foi removido cuidadosamente e centrifugado novamente, seguindo a mesma metodologia do primeiro processamento, para remoção do conteúdo insolúvel restante. Em seguida, o soro foi devidamente aliquotado e armazenado em freezer -20°C. Amostras de soro de coelho foram submetidas à purificação com solução saturada de sulfato de amônio, de acordo com metodologia descrita a seguir. Os testes feitos

com amostras oriundas de camundongos foram sempre realizados utilizando soro total como fonte de anticorpos.

3.6.5 Purificação de IgG de coelho com sulfato de amônio

Foi realizada purificação de anticorpos a partir do soro imune de coelhos decorrentes da primeira, segunda, sexta e nona imunização. A purificação foi feita utilizando solução saturada de sulfato de amônio, preparada conforme metodologia abaixo:

3.6.5.1 Preparo da solução saturada de sulfato de amônio

Primeiramente foi pesado 55g de sulfato de amônio para ser diluído em 60 mL de água Milli-q. Após a mistura, a solução foi aquecida lentamente sob constante agitação até completa dissolução do sal. Ainda quente, a solução foi filtrada em papel filtro e deixada em repouso até esfriar. Em uma proveta, o volume foi ajustado para 100 mL com água Milli-q. Após repouso, foi observado o aparecimento de um precipitado de sal. Caso isso não ocorra, deve ser adicionada uma pequena quantidade de sulfato de amônio para constatar a saturação. A solução foi mantida em frasco com tampa plástica a 4 °C. Antes de ser usada, a solução foi levada à temperatura ambiente.

3.6.5.2 Processo de purificação

Antes do processo de purificação ser iniciado, o volume de soro foi medido e armazenado em tubos Falcon estéreis. Em seguida, foi adicionado igual volume de água Milli-q e homogeneizado levemente. Logo após, foi adicionado gota à gota, o volume da solução saturada de sulfato de amônio, correspondente ao volume original do soro, com leve e constante agitação. Após completa adição da solução saturada, a solução com soro foi mantida sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. Após completa homogeneização, a solução foi levada ao refrigerador em estantes para tubo e deixada em repouso durante uma noite, para precipitação dos sais ligados aos anticorpos. No dia seguinte, a solução foi centrifugada à 4 °C a 3000 rpm por 30 minutos, e o *pellet* ressuspensão, cuidadosamente, em 4 mL de solução aquosa de sulfato de amônio, composta por 2 mL de água Milli-q e 2 mL de solução saturada. Após novo processo de centrifugação, feito da mesma maneira que o anterior, o *pellet* restante foi ressuspensão em NaCl 0,15 M, na quantidade original do soro e

submetido a diálise contra este tampão até completa remoção do sulfato de amônio, utilizando sacos de diálise com poros de 12.000 Da (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Adicionando em um tubo transparente, 1 mL do tampão de diálise e 1 mL da solução de cloreto de bário 1%, a presença de sal foi analisada pelo teste de turvação. Se ao misturar as duas soluções o líquido turvar, significa que ainda há sulfato de amônio a ser removido da amostra. Após término da diálise, com teste de turvação negativo, a solução de IgG foi devidamente aliquotada e armazenada em freezer a -20 °C até sua utilização.

3.6.5.3 Dosagem de anticorpos IgG purificados pelo método de BCA

As soluções contendo anticorpos purificados produzidos em coelhos foram dosadas utilizando o kit BCA “*Protein Assay Kit*” (Pierce Biotechnology, IL, EUA), de acordo com especificações contidas no manual do kit. Todas as amostras tiveram sua concentração proteica ajustada para aproximadamente 5,5 mg/mL e foram aliquotadas e mantidas em freezer -20 °C até sua utilização.

3.7 Titulação de anticorpos anti - peptídeos sintéticos por ELISA indireto

Placas de poliestireno com superfície de alta ligação de 96 poços (Corning Inc. - NY, EUA) foram sensibilizadas com 1 µg/poço de peptídeos sintéticos conjugados com proteína carreadora, sempre diferente da utilizada para as imunizações, diluídos em tampão carbonato de sódio e mantidas a 4 °C de 12-16 h em câmara úmida. Os poços controles de placa sem antígeno foram sensibilizados apenas com tampão carbonato de sódio e mantidos sob as mesmas condições. Após a sensibilização os poços foram bloqueados com 200 µL/poço de PBS acrescido de 10% de leite desnatado e incubados por 2 horas à 37 °C em câmara úmida. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL/poço de PBS e incubadas com 100 µL/poço de anticorpo primário, IgG purificada ou soro total anti-peptídeos, diluídos em tampão PBS acrescido de 0,01% de leite desnatado, por 1 hora à 37 °C em câmara úmida, com diluições variando entre 1:500 até 1:128.000. Os poços controle de placa sem adição de anticorpo primário foram preenchidos com a mesma quantidade de tampão de diluição e mantidos sob as mesmas condições. Logo após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL/poço de tampão PBS acrescido de 0,05% de Tween 20. Em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de anticorpo secundário anti IgG de camundongo ou de coelho, dependendo do anticorpo primário testado, ambos conjugados com Peroxidase (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluídos 1:2.000 em tampão PBS/0,01% de leite desnatado, e mantidos por 1 hora à 37 °C em câmara úmida. Após 3 lavagens com 200 µL/poço de PBS/0,05% de Tween 20, os poços foram revelados com adição de 50 µL/poço de solução substrato contendo 5 mL de tampão citrato (0,1 M C₆H₈O₇; 0,2M NaH₂PO₄; pH 5,0), 2 mg de Ortofenilenodiamina (OPD) e 5 µL de H₂O₂ 30 volumes. As placas foram mantidas com solução substrato por 15 minutos ao abrigo da luz e a reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de solução *stop* (H₂SO₄ 4N) e lidas em leitor de microplacas acoplado ao software Gen5 (Elx800, BioTek, EUA), no comprimento de onda de 490nm. Todos os soros e anticorpos anti-peptídeos purificados foram titulados utilizando o cálculo de *EndPoint*, onde o título é encontrado na maior diluição do soro cuja densidade óptica (D.O.) é no mínimo duas vezes maior que a média de D.O. do soro pré-imune. Os resultados foram analisados e plotados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.1 para Windows, da GraphPad Software (San Diego, EUA). Os resultados só foram submetidos para análise quando os controles de placa foram satisfatórios, isto é, com D.O.s abaixo de 0,06. Os anticorpos com melhores títulos foram selecionados para a realização dos experimentos seguintes.

3.8 Ensaios complementares para validação dos anticorpos com títulos mais elevados

Para os testes seguintes foram selecionados os anticorpos produzidos em camundongos High III devido seus maiores títulos. No próximo ensaio, foram avaliados os anticorpos oriundos dos quatro grupos experimentais (ver tabela 4).

3.8.1 Análise da resposta a proteínas carreadoras dos anticorpos produzidos em camundongos High III

Esta etapa foi realizada por ELISA indireto convencional (ver item 3.7), utilizando como antígeno, além dos peptídeos sintéticos conjugados, as proteínas carreadoras livres, correspondendo à carreadora utilizada para conjugação dos peptídeos utilizados para imunização de cada grupo. Mais uma vez, é importante ressaltar, que para análise da resposta de anticorpos para os peptídeos sintéticos, as placas de ELISA sempre foram sensibilizadas com peptídeo conjugado com proteína carreadora diferente da utilizada para a imunização. A diluição dos anticorpos anti-peptídeos foi fixada em 1:500 e as demais etapas permaneceram inalteradas. Os anticorpos com melhores títulos anti-peptídeos e menores respostas contra a

proteína carreadora utilizada para a imunização, foram selecionados para a realização dos próximos experimentos.

3.8.2 Análise da reação cruzada e resposta a peptídeos livres e conjugados

O soro da sexta imunização dos grupos 1 (anti-Let#1) e 2 (anti-Let#2) de camundongos High III, previamente selecionados, foram avaliados quanto sua especificidade e capacidade de ligação com peptídeos sintéticos livres. As placas de poliestireno com superfície de alta ligação de 96 poços foram sensibilizadas com 1 µg/poço de peptídeos sintéticos livres ou conjugados. Para determinação da reação cruzada entre os anticorpos, foi realizada incubação do anticorpo anti-Let#1 nos poços sensibilizados com peptídeo Let#2 e vice-versa. Além disso, o peptídeo controle Let#3 também foi incluído nos testes. A diluição dos anticorpos anti-peptídeos e do anticorpo comercial anti NaPi2b, incluído como controle, foi fixada em 1:500 nestes experimentos. Para a análise da resposta dos anticorpos a peptídeos sintéticos livres, os mesmos foram utilizados para a sensibilização das placas de ELISA, na mesma quantidade utilizada para os peptídeos conjugados. Os anticorpos anti-peptídeos foram avaliados com diluições variando entre 1:500 até 1:128.000. As demais etapas permanecem inalteradas (ver item 3.7). Todos os peptídeos utilizados para a sensibilização das placas nestes experimentos estavam conjugados com PC-C.

3.8.3 Determinação da afinidade dos anticorpos

Os anticorpos acima referidos, oriundos da quinta e sexta imunização, foram submetidos a teste de afinidade. A determinação da afinidade destes anticorpos foi realizada por ELISA indireto, seguindo o método descrito no item 3.7, com as seguintes modificações. Os soros contendo anticorpos anti-peptídeos tiveram a sua diluição fixada em 1:4.000 para o anticorpo anti Let#1 e 1: 500 para o anticorpo Let#2, ambos com média de D.O. em torno de 0,5. Esta média de D.O. foi selecionada para que, quando houvesse a remoção de 50% dos anticorpos ligados decorrente da ação do agente caotrópico, a D.O. remanescente não fosse menor que 0,2, estabelecendo um grau de confiabilidade do teste. Houve a adição de uma etapa de eluição com tiocianato de potássio (KSCN, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que atuou como agente caotrópico¹⁰². O KSCN foi preparado em diluições crescentes de 0 M a 5 M, com intervalos de 0,5 M, e aplicado após a etapa de incubação com os anticorpos anti-peptídeos. Foram aplicados 100 µL/poço de cada diluição de KSCN, em duplicata. As placas

foram deixadas à temperatura ambiente por 30 min, e em seguida lavadas três vezes consecutivas com 200 µL/poço de PBS contendo 0,05% de Tween-20. A partir desta etapa, a reação prosseguiu como descrita no item 3.7. A afinidade de cada anticorpo foi medida como sendo a concentração de KSCN necessária para reduzir em 50% a densidade óptica obtida com os controles (poços onde foi aplicado KSCN 0M). Bem como citado na metodologia de ELISA para titulação dos anticorpos, os resultados foram analisados e plotados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.1 para Windows, da GraphPad Software (San Diego, EUA), e os resultados só foram submetidos para análise quando os controles de placa foram satisfatórios, isto é, com D.O.s abaixo de 0,06.

3.9 Caracterização do perfil eletróforético dos antígenos sintéticos e análise da especificidade dos anticorpos por *Western blotting*

Baseado nos ensaios anteriores, para as próximas etapas foram selecionados os anticorpos dos grupos 1 e 2, anti-Let#1 e anti-Let#2, respectivamente, produzidos em camundongos High III oriundos da sexta imunização.

3.9.1 Caracterização do perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos conjugados e análise da especificidade dos anticorpos IgG anti-peptídeos,

Os peptídeos sintéticos Let#1, Let#2 e o peptídeo controle Let#3, todos conjugados com PC-C, tiveram seus perfis eletroforéticos avaliados por SDS-PAGE. Após eletrotransferências destes antígenos para membranas de nitrocelulose, os anticorpos selecionados tiveram sua especificidade avaliada por *Western blotting*.

3.9.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise do perfil eletroforético dos peptídeos conjugados, foi realizada corrida em gel de poliacrilamida¹⁰³ e posterior eletrotransferência para membrana de nitrocelulose⁸⁵, conforme descrito a seguir: Os antígenos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS sob condições redutoras ou não redutoras. Os géis foram montados em placas de vidro, com gel de empacotamento e gel de corrida, contendo 5% e 10% de acrilamida, respectivamente. Foram utilizados 1 µg/poço de peptídeo sintético conjugado com PC-C, ou a mesma quantidade de PC-B ou PC-C livres. As amostras foram diluídas em tampão redutor, contendo β-mercaptoetanol, ou não redutor, na proporção de

1:1, ou na quantidade desejada de antígeno acrescida de tampão até atingir o volume máximo comportado pelo poço do gel. Foram aquecidas a 96 °C por 6 minutos e aplicadas no gel em poços individuais e submetidas a uma corrente constante de 90 V. Os géis foram corados por impregnação com nitrato de prata ou transferidos para membranas de nitrocelulose e submetidos à *Western blotting*, conforme descrito a seguir.

3.9.1.2 Impregnação por nitrato de prata

Os géis de poliacrilamida foram submetidos à impregnação por nitrato de prata, de acordo metodologia adaptada de Morrissey, 1981¹⁰⁴. Após a corrida, o gel foi colocado cuidadosamente em um recipiente limpo contendo solução fixadora e mantido por no mínimo dez minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi levado ao micro-ondas por 30 segundos e mantido por 5 minutos a temperatura ambiente sob constante agitação. Após a retirada da solução fixadora foi acrescentada solução de etanol a 30%, e o gel mantido sob as mesmas condições acima referidas. Para fixação do nitrato de prata, foi acrescentado solução de tiosulfato de sódio, que, após aquecimento, foi mantida sob agitação com o gel por dois minutos. Antes da adição da solução de prata, incubada sob as mesmas condições citadas para as etapas do fixador e do etanol, o gel foi lavado duas vezes com água destilada para remoção total do tiosulfato, com aquecimento de 30 segundos e agitação por dois minutos em cada lavagem. Após a retirada da prata, o gel foi lavado uma vez com água destilada, sendo aquecido por quarenta segundos no micro-ondas, e, em seguida, foi adicionada solução reveladora. O gel foi mantido sob constante agitação com esta solução até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida pela adição da solução de parada e posteriormente foi adicionada água destilada para evitar o ressecamento do gel. Os géis foram fotografados e as imagens obtidas pelo software Kodak MI (Gel Logic 100 – Imaging system, KODAK, Rochester, NY, EUA).

3.9.1.3 *Western blotting* para análise da especificidade de anticorpos

Após transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE, realizadas “overnight” a 4 °C, sob uma corrente constante de 150 mA, as membranas foram bloqueadas em PBS contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA), em quantidade suficiente para sua completa submersão, por 2h a 37 °C. Em seguida, foram lavadas rapidamente com PBS, e tratadas com soro teste na diluição determinada pelo título obtido por ELISA, anti-Let#1 na diluição de

1:64.000 e anti Let#2 na diluição de 1:2.000, diluídos em PBS acrescido de 0,1% de BSA. As membranas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente, e em seguida lavadas três vezes consecutivas com PBS/0,05% de Tween 20. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anti IgG de camundongo, na diluição de 1:7500 diluído em PBS/0,1% de BSA, por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS/0,05% de Tween-20, e colocadas em solução reveladora, contendo a cada 5 mL de tampão AP (100 mM $C_4H_{11}NO_3$; 100 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$; pH 9,5), 33 μ L de NBT (nitro blue tetrazolium, Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) e 16,5 μ L de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA), para cada membrana. Após 20 minutos de revelação, a reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.10 Reconhecimento de NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos

Utilizando os anticorpos previamente selecionados e anticorpo comercial anti-NaPi2b como controle, células da linhagem OV-CAR foram cultivadas e submetidas à citometria de fluxo para avaliação do reconhecimento de NaPi2b nativa.

3.10.1 Cultivo de células OV-CAR

Células das linhagens OV-CAR ¹⁰⁵ isolada de adenocarcinoma de ovário humano (ATCC[®]HTB-161[™]), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Alexandre Marzagão Barbuto do Laboratório de Imunobiologia de Tumores do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning Inc. - NY, EUA) contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute - Gibco, Invitrogen Corp., CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, SP, Brasil) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corp.), em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.10.2 Análise do reconhecimento de NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos

Células OV-CAR foram desaderidas da placa de cultivo utilizando 5 mL de solução de ATV (Trypsina 0,2% e Versene 0,02%) por garrafa, e incubadas por 10 minutos em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as suspensões celulares foram lavadas (1500 rpm, 4 °C, 10

minutos) com meio RPMI completo e ressuspendidas em tampão de FACS (PBS/BSA 1% acrescido de 0,01% de azida sódica), em quantidade suficiente para que a cada 50 μ L contenha 1×10^6 células. Foram adicionadas 50 μ L da solução com células em poços de microplacas com fundo em U e em seguida foi adicionado 50 μ L de da solução de anticorpo primário diluído em tampão de FACS (anticorpos anti-peptídeos nas diluições de 1:200, 1:250 e 1:300, bem como o soro pré-imune de camundongos High III). Após incubação de 30 minutos a 4 °C, as células foram lavadas três vezes em tampão de FACS (1300 rpm, 10 °C, 5 minutos), e em seguida incubadas com 50 μ L/poço de anticorpo secundário conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína – Pierce, IL, EUA), anti IgG de camundongo na diluição 1:100. Após incubação de 30 minutos a 4 °C, as células foram lavadas três vezes em tampão de FACS e ressuspendidas em 200 μ L de tampão de FACS acrescido de 1% de paraformaldeído. Para incubação das células com o anticorpo comercial anti-NaPi2b, houve a necessidade de permeabilização, visto que este anticorpo reconhece a porção C-terminal da proteína, localizada no interior das células, diferentemente da porção reconhecida pelos anticorpos anti-peptídeos, presente no segundo laço extracelular desta proteína. Para tal, uma etapa adicional foi empregada. Antes da incubação com o anticorpo anti-NaPi2b, as células foram tratadas com 200 μ L/poço solução de PBS/Paraformaldeído 0,5% e em seguida com 200 μ L/poço de PBS/Triton X-100 0,2%, para a fixação prévia e permeabilização, respectivamente. O processo de fixação deve ser realizado em temperatura ambiente por quarenta minutos, seguido de três lavagens e posterior incubação por cinco minutos com a solução de Triton X-100 para a permeabilização. Após lavagens, o anticorpo primário foi adicionado na diluição de 1:200 e o restante do procedimento foi realizado como descrito para as células não permeabilizadas, exceto pelo tempo e temperatura das incubações, que foi alterada para quarenta minutos a temperatura ambiente/cada. Como recomendado, as leituras foram realizadas logo após a fixação das células com paraformaldeído e a porcentagem de células marcadas foi determinada em citômetro de fluxo (FACSCantoTM, Becton Dickinson, CA, EUA).

3.11 Análise da possível presença da proteína NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle

3.11.1 Amostras de soro humano

Mulheres, pacientes com diagnóstico definido de neoplasia de ovário de origem epitelial e pacientes controle, mulheres sem doença em atividade, que haviam tratado tumores de mama e cólon, foram selecionadas. Antes de serem incluídas no protocolo foram informadas dos objetivos da proposta do estudo e, concordando com a participação, incluídas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Amostras de sangue foram coletadas por processos de rotina, duplamente identificadas, apenas com dados de registro do hospital e código. A coleta, processamento do soro e identificação das amostras foi realizada por funcionários especializados do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), sob a coordenação do Dr. Roberto Jun Arai, responsável pelo departamento de pesquisa clínica do hospital. Para o envio das amostras ao Instituto Butantan, realizado pela empresa SafeLab, o material foi devidamente acondicionado em pacotes contendo gelo seco, e no Laboratório de Imunoquímica, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até sua utilização. A presença de marcadores de câncer de ovário foi pesquisada em ensaios paralelos utilizando anticorpos IgG anti-peptídeos previamente selecionados, anticorpo monoclonal OC-125 anti CA-125 (IBL International, GmbH, Hamburg, Germany), e anticorpo policlonal anti NaPi2b produzido em coelho (Abcam®, Cambridge, MA, USA). Esta etapa do estudo foi aprovada pelo “Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo” e pelo “Comitê de Ética em Pesquisas Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”. Para utilização das amostras das pacientes em ensaios *in vitro* no Instituto Butantan, foi solicitado ao ICESP uma carta de autorização.

3.11.2 Análise do soro de pacientes e doadoras controle pelo anticorpo monoclonal OC-125

O ensaio foi realizado de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do kit de ELISA para dosagem do antígeno CA-125 (IBL International GMBH, Hamburg, Germany). Foram avaliados 10 amostras de soro, escolhidas de maneira aleatória. As amostras foram identificadas como: Soro de paciente (SPC)-1, SPC-2, SPC-3, SPC-4, SPC-5, SPC-50, SPC-52, SPC-53, SPC-54, e, por fim, SPC-55.

3.11.3 Análise da possível liberação de NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle utilizando anticorpos anti-peptídeos

Para análise da possível liberação da proteína NaPi2b no soro das pacientes, foi realizado ELISA indireto utilizando os anticorpos anti-peptídeos sintéticos selecionados no item 3.9, a saber, anti-Let#1 do grupo 1 e anti-Let#2 do grupo 2, ambos da sexta imunização e produzidos em camundongos da linhagem High III, e anticorpo comercial anti-NaPi2b como controle. A metodologia é similar a descrita no item 3.7, com as modificações descritas a seguir.

A sensibilização das placas foi realizada com soros diluídos 1:1 em PBS estéril em um volume final de 50 µL/poço. A diluição dos anticorpos anti-peptídeos foi fixada em 1:100 e a diluição de 1:200 foi fixada para o anticorpo comercial anti-NaPi2b. A diluição dos anticorpos secundários, anti IgG de camundongo ou anti IgG de coelho (para detecção do anticorpo anti-NaPi2b comercial), foi de 1:2.000.

Em todos os ensaios com soros teste foram adicionados controles positivos, isto é, peptídeos Let#1 e Let#2 conjugados com PC-C, e controles negativos, como o soro pré-imune de camundongos High III, além dos controles de placa sem anticorpo primário e sem antígeno. A análise de dados foi realizada pelo software Graph Pad Prism 5.

3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos como média +/- erro padrão e analisados estatisticamente com o auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.1 para Windows, da GraphPad Software (San Diego, EUA). As comparações entre mais de dois grupos em relação a uma variável foram realizadas pelo teste One Way ANOVA e as comparações múltiplas realizadas pelo post-hoc de Tukey HSD. Para todos os testes os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos por, no mínimo, duas vezes em dias independentes.

4 RESULTADOS

4.1 Reconhecimento dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 pelo anticorpo monoclonal OC-125

A verificação do possível reconhecimento cruzado dos peptídeos Let#1 e Let#2 pelo anticorpo comercial OC-125, foi realizada utilizando o kit comercial para dosagem do antígeno CA125. Foram testadas amostras de peptídeos sintéticos livres ou conjugadas com as três proteínas carreadoras utilizadas para imunização dos animais experimentais e para os testes *in vitro*. Como mostra a figura 8, não houve reconhecimento cruzado dos peptídeos sintéticos pelo anticorpo monoclonal OC-125 com nenhum dos peptídeos livres, bem como com os peptídeos conjugados, tanto com PC-A, PC-B ou com PC-C.

Figura 8 – Reatividade cruzada dos peptídeos Let#1 e Let#2 livres e conjugados com anticorpo monoclonal OC-125

Peptídeos sintéticos livres e conjugados com proteína PC-A, PC-B ou PC-C (1 µg/poço), foram incubados em placas high binding previamente revestidas com anticorpo de captura anti CA-125. Posteriormente foi adicionado o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase. Os controles positivo e negativo se referem a alta, >600U/mL e baixa, <35U/mL, concentração da proteína CA-125 recombinante. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de três experimentos independentes.

4.2 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos por ELISA indireto

4.2.1 Titulação de anticorpos purificados com sulfato de amônio anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, produzidos em coelhos

Anticorpos IgG anti peptídeos purificados do soro de coelho, a partir do método de purificação com solução saturada de sulfato de amônio, foram titulados por ELISA indireto. Estes anticorpos purificados, com dosagem proteica ajustada para aproximadamente 5,5 mg/ml, são correspondentes à primeira, segunda, sexta e nona imunizações. Na figura 9 é possível observar que apenas o coelho 4, imunizado com peptídeo Let#2 conjugado com proteína carreadora A, respondeu às imunizações, com títulos de anticorpos de 1:2.000 na sexta imunização e 1:500 na nona imunização, calculados pelo método de *end point*.

Figura 9 - Titulação de anticorpos IgG purificados anti-peptídeos sintéticos, produzidos em coelhos

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos conjugados com PC-C e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com diferentes diluições de anticorpo primário (1:500 – 1:128.000), IgG anti peptídeos sintéticos purificados de soro de coelho, da primeira, segunda, sexta e nona imunizações. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. Coelhos 1 e 2 imunizados com peptídeo Let#1 e coelhos 3 e 4 imunizados com peptídeo Let#2, ambos conjugados com PC-A. Ensaio realizado em duplicata representativo de dois experimentos independentes.

4.2.2 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, presentes no soro total de coelhos

Para avaliar o processo de purificação de anticorpos, foram realizados testes utilizando amostras de soro total de coelhos, com o intuito de identificar a melhor maneira de realizar os experimentos subsequentes. De fato, pode ser observada resposta de anticorpo em três dos quatro animais experimentais avaliados, quando utilizado soro total como fonte de anticorpo primário. Neste ensaio, o soro dos coelhos dois e três, imunizados com peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, respectivamente, ambos conjugados com proteína carreadora A, se mostraram responsivos, com títulos de 1:1.000 e 1:500 na nona imunização dos coelhos dois e três, respectivamente, e títulos de 1:500 na décima e na décima segunda imunização do coelho dois (Figura 10). O título de anticorpos do coelho quatro, imunizado com peptídeo sintético Let#2, também conjugado com proteína carreadora A, permaneceu com 1:2.000 na nona e décima imunizações, com queda deste título sendo observada na décima segunda imunização.

Figura 10 - Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, no soro total de coelhos

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos conjugados com PC-C e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com diferentes diluições do soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em coelho (1:500 – 1:128.000), da nona, décima e décima segunda imunização. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. Coelhos 1 e 2 imunizados com peptídeo Let#1 e coelhos 3 e 4 imunizados com peptídeo Let#2, ambos conjugados com PC-A. Ensaio realizado em duplicata representativo de dois experimentos independentes.

4.2.3 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, presentes no soro total de camundongos BALB/c

4.2.3.1 Título de anticorpos dos grupos 1 e 2

Os testes realizados com camundongos foram sempre com amostras de soro total, devido resultados preliminares em coelhos, para validação dos anticorpos com peptídeos sintéticos, mostrarem melhor reatividade do soro íntegro, quando comparado com os anticorpos purificados com sulfato de amônio. No entanto, não foi observado resultado positivo em nenhum dos animais do grupo 1, imunizados com Let#1, nem do grupo 2, imunizados com Let#2, ambos conjugados com PC-B, em todas as imunizações testadas por ELISA indireto, a saber: primeira, segunda, sétima e décima imunizações.

4.2.3.2 Título de anticorpos dos grupos 3 e 4

Nestes grupos experimentais, com camundongos BALB/c do grupo 3, imunizados com peptídeo Let#1, e do grupo 4, imunizados com peptídeo Let#2, ambos conjugados com PC-B, foi observado que apenas o animal 2 do grupo 3 respondeu as imunizações, sendo observado título de 1:16.000 e 1:500 na sétima e oitava imunização, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 - Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, no soro total de camundongos BALB/c dos grupos 3 e 4

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos conjugados com PC-C e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com diferentes diluições do soro total anti-peptídeos sintéticos (1:500 – 1:128.000) produzidos em camundongos BALB/c, da sexta, sétima e oitava imunização. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. Camundongos 1-5 imunizados com peptídeo Let#1 e camundongos 6-10 imunizados com peptídeo Let#2, ambos conjugados com PC-B. Ensaio realizado em duplicata representativo de dois experimentos independentes.

4.2.4 Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, presentes no soro total de camundongos High III

De acordo com resultados obtidos por ELISA indireto, avaliando os quatro grupos de camundongos da linhagem High III, foi observado que todos os grupos imunizados com peptídeos sintéticos conjugados, a saber, grupos 1, 2 e 3, responderam as imunizações, embora, com notável maior resposta de anticorpos no grupo 1. Neste grupo, cujos animais foram imunizados com peptídeo sintético Let#1 conjugado com proteína carreadora B, os títulos foram aumentando à partir da segunda imunização, iniciando com título de 1:500, com 1:16.000 na terceira e 1:32.000 na quarta imunização. À partir da quinta imunização o título se manteve em 1:64.000. O grupo 2, imunizado com peptídeo Let#2, também conjugado com proteína carreadora B, teve títulos de anticorpos crescentes à partir da quarta imunização, sendo 1:1.000 na quarta imunização, 1:4.000 na quinta e regredindo para 1:2.000 na sexta e última imunização. O grupo 3, por sua vez, imunizado com peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 juntos, ambos conjugado com proteína carreadora C, apresentou menor título de

anticorpos quando comparado com os grupos 1 e 2, imunizados respectivamente com os mesmos peptídeos, porém, conjugados com proteína carreadora distinta. Os títulos de anticorpos do grupo 3, quando testados contra o peptídeo Let#1, permaneceram 1: 4.000 da segunda à quarta imunização, com um aumento para 1:8.000 na quinta e com título de 1:16.000 na última imunização. Quando o soro deste mesmo grupo foi avaliado frente ao peptídeo sintético Let#2, os títulos foram ainda menores, sendo 1:500 na quarta imunização, 1:1.000 na quinta imunização e, por fim, 1:2.000 na última imunização. Os animais do grupo 4, imunizados com peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 livres, não responderam às imunizações (Figura 12).

Figura 12 - Titulação de anticorpos IgG anti-peptídeos sintéticos, no soro total de camundongos High III

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos conjugados com PC-C, para os grupos 1, 2 e 4, e com PC- B para o grupo 3, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com diferentes diluições do soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III (1:500 – 1:128.000), da primeira a sexta imunização. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. Camundongos dos grupos 1 e 2 imunizados com peptídeos Let#1 ou Let#2, respectivamente, ambos conjugados com PC-B, camundongos do grupo 3 imunizados com peptídeos Let#1 e Let#2 juntos conjugados com PC- C e grupo 4 imunizado com peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 juntos em sua forma livre. Ensaio realizado em duplicata representativo de dois experimentos independentes.

4.3 Ensaios complementares para validação dos anticorpos com maiores títulos anti-peptídeos

Após titulação dos anticorpos anti-peptídeos sintéticos oriundos de todos os grupos experimentais, foi observada melhor resposta de anticorpos nos grupos de camundongos da linhagem High III. Por isso, testes adicionais foram empregados para uma avaliação mais completa destes anticorpos, para posterior avaliação da proteína NaPi2b em sua forma nativa.

4.3.1 Resposta dos anticorpos produzidos em camundongos High III a proteínas carreadoras

Para avaliar se diferentes proteínas carreadoras interferem no nível de resposta ao antígeno específico, amostras de soro da sexta imunização dos quatro grupos experimentais de camundongos High III foram testadas por ELISA indireto. Para tal, as placas foram sensibilizadas com peptídeo sintético conjugado ou apenas com a proteína carreadora livre. O anticorpo do grupo 1, anti-Let#1 produzido com peptídeo conjugado com PC-B, foi testado com peptídeo Let#1 conjugado com PC-C ou apenas com PC-B livre. O grupo 2, com anticorpos anti-Let#2, produzidos com peptídeo Let#2 conjugado com PC-B, foi testado com peptídeo Let#2 conjugado com PC-C ou apenas com PC-B livre. Por fim, o grupo 3, imunizado com peptídeos Let#1 e Let#2 juntos, ambos conjugados com PC-C, foi testado com peptídeos Let#1 ou Let#2 conjugados com PC-B ou apenas com PC-C livre. De acordo com a figura 13, parece haver um gasto de energia excessivo quando há resposta à proteína carreadora interferindo na resposta ao antígeno alvo. Como pode ser observado no grupo 3, a resposta de anticorpos para a proteína carreadora foi mais elevada quando comparados com os grupos 1 e 2, imunizados com proteína carreadora B. Consequentemente, o grupo 3 produziu menos anticorpos específicos para os peptídeos sintéticos. Quando o soro pré-imune foi testado, não foi observada resposta com nenhum dos antígenos avaliados.

Figura 13 - Resposta de anticorpos a proteínas carreadoras

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos conjugados ou apenas com proteína carreadora livre, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III dos quatro grupos experimentais, oriundos da sexta imunização, na diluição de 1:500. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

4.3.2 Resposta de anticorpos contra peptídeos livres e conjugados

Considerando que os títulos de anticorpos anti-peptídeos dos grupos 1 e 2 de camundongos High III, foi mais elevado quando comparado aos demais, bem como não apresentaram resposta de anticorpos contra a proteína carreadora, estes foram selecionados para os testes seguintes. Para avaliar a resposta dos anticorpos anti-Let#1 e anti Let#2, dos grupos 1 e 2 respectivamente, oriundos da sexta imunização, frente aos peptídeos sintéticos livres, placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg/poço de peptídeo sintético Let#1 ou Let#2 livres ou com peptídeos conjugados com PC-C, atuando como controle. Em ambos foi possível observar ligação significativamente maior dos anticorpos quando a placa foi sensibilizada com peptídeo sintético conjugado, quando comparado com a ligação dos anticorpos apenas com peptídeo livre (Figura 14).

Figura 14 - Reatividade dos anticorpos anti-peptídeos, com peptídeos sintéticos livres e conjugados

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos livres ou conjugados com PC-C, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com diferentes diluições do soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III (1:500 – 1:128.000), da sexta imunização. **a)** Grupo 1, anticorpo anti-Let#1 testado com peptídeos Let#1 livres e conjugados; e **b)** Grupo 2, anticorpo anti-Let#2 testado com peptídeos Let#2 livres e conjugados. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na proporção de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

4.3.3 Reação cruzada dos anticorpos

A reação cruzada dos anticorpos anti-peptídeos dos grupos 1 e 2, oriundas da sexta imunização, foi avaliada por ELISA indireto utilizando peptídeos sintéticos conjugados com PC-C para a sensibilização das placas. Quando testada a ligação do anticorpo anti-Let#1 em placas sensibilizadas com peptídeo Let#2, não foi observada ligação cruzada (Figura 15a). O mesmo ocorreu com o anticorpo anti-Let#2, não mostrando sinal de ligação quando testado com peptídeo Let#1 (Figura 15b). Em ambos os testes, foram incluídos controles positivos, isto é, peptídeo sintético cujo anticorpo teste é específico.

Figura 15 - Reatividade cruzada dos anticorpos anti-peptídeos

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos conjugados com PC-C, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com diferentes diluições do soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III (1:500 – 1:128.000), da sexta imunização. **a)** Grupo 1, anticorpo anti-Let#1 testado com peptídeos Let#1 e Let#2; e **b)** Grupo 2, anticorpo anti-Let#2 testado com peptídeos Let#1 e Let#2. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

4.3.4 Reação cruzada dos anticorpos com peptídeo sintético controle

Além da avaliação da reação cruzada entre os dois peptídeos testes, os anticorpos IgG da sexta imunização dos grupos 1 e 2, anti-Let#1 e anti-Let#2, respectivamente, de camundongos High III, foi avaliada a especificidade destes anticorpos frente ao peptídeo controle Let#3 livre ou conjugado com PC-C. Este peptídeo é bastante similar ao peptídeo Let#2, com diferenças encontradas apenas nas posições 7 e 15 da cadeia de aminoácidos, além de ter seu tamanho em torno de 1,7 kDa, sendo bastante semelhante também ao peptídeo Let#1, com relação a massa molecular. No entanto, como mostra a figura 16, apesar destas semelhanças, não foi observada ligação cruzada de nenhum dos anticorpos testados, bem como com o soro pré-ímune e com o anticorpo comercial anti-NaPi2b. Peptídeos Let#1 e Let#2 conjugados com PC-C foram utilizados como controles.

Figura 16 - Reatividade dos anticorpos anti-peptídeos com antígeno inespecífico Let#3

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeo sintético Let#3 livre ou conjugado com PC-C ou com peptídeos sintéticos Let#1 ou Let#2, conjugados com PC-C, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III, da sexta imunização, anti Let#1, anti Let#2 ou soro pré-ímune, bem como com anticorpo comercial anti-NaPi2b, todos na diluição de 1:500. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo ou de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

4.3.5 Determinação da afinidade dos anticorpos

Para finalizar a validação dos anticorpos IgG anti-peptídeos dos grupos 1 e 2 de camundongos High III, foi realizado teste de afinidade com as duas últimas imunizações destes anticorpos. Utilizando tiocianato de potássio (KSCN) como agente caotrópico, foi possível observar que não houve diferença estatística entre a quinta e a sexta imunização dos dois anticorpos avaliados. No entanto, foi possível observar que o anticorpo anti-Let#1 tem uma afinidade maior que o anticorpo Let#2, tendo 50% dos anticorpos removidos apenas na presença de aproximadamente 3M de KSCN. Já com o anticorpo anti-Let#2, a remoção de 50% dos anticorpos já pode ser observada com aproximadamente 1M de KSCN (Figura 17). Baseado neste resultado, os anticorpos da sexta imunização foram selecionados, devido a maior quantidade de soro anti-peptídeos, por serem oriundos da sangria total dos animais experimentais, e por terem a mesma afinidade observada na quinta imunização. Estes anticorpos foram utilizados nos testes para verificação de NaPi2b em sua forma nativa e na análise dos soros das pacientes e doadoras controle.

Figura 17 - Determinação da afinidade dos anticorpos anti-peptídeos

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg de peptídeos sintéticos Let#1 ou Let#2 conjugados com PC-C, e bloqueadas com PBS/10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III, da quinta ou da sexta imunização, anti-Let#1 na diluição de 1:4.000 e anti-Let#2 na diluição de 1:250. Após lavagens, os poços foram incubados com diferentes concentrações de KSCN, variando de 0 a 5M. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. Os dados estão representados com média +/- erro padrão de duplicatas de dois experimentos independentes. Analisado estatisticamente por *Oneway* ANOVA seguido por pós-teste de Tukey HSD em comparação a quinta e a sexta imunização dos anticorpos anti-Let#1 e anti-Let#2. (*) Diferença significativa em entre as duas imunizações dos anticorpos ($p < 0,05$).

4.4 Análise do perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos e da especificidade dos anticorpos selecionados

Para as etapas seguintes, baseado nos resultados anteriores, foram selecionados os anticorpos anti-Let#1 e anti Let#2 de camundongos High III, da sexta imunização.

4.4.1 Análise do perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos por SDS-PAGE seguido por impregnação com nitrato de prata

A avaliação dos peptídeos Let#1, Let#2 e Let#3 conjugados com PC-C por SDS-PAGE, mostrou a presença de bandas bastante semelhantes entre eles, cujo peso molecular está entre 37 kDa a 49 kDa., o que era esperado, visto que ambos foram conjugados com PC-C, isto é, ovalbumina, com peso molecular aproximado de 42,7 kDa. Este perfil pode ser observado tanto com as amostras não reduzidas (Figura 18a), bem como, quando submetidas à redução (Figura 18b). A conjugação dos peptídeos, realizada via glutaraldeído, proporciona ligações, principalmente, entre grupamentos amina⁷⁶, justificando então a provável ligação de inúmeras moléculas de peptídeos apenas com um proteína carreadora, elevando o peso desta para aproximadamente 49 kDa. A PC-B, incluída nestes experimentos como controle (PC-B utilizada para a imunização dos camundongos High III dos grupos 1 e 2 e não para os testes *in vitro*), apresentou uma banda entre 64 kDa e 82 kDa, sendo sua massa molecular esperada a de 67 kDa (Figura 18). No gel não reduzido, a PC-B apresentou alguns agregados com alto peso molecular (Figura 18 a), o qual não foi mais observado quando a amostra foi submetida à redução (Figura 18b).

Figura 18 – Perfil eletroforético dos peptídeos sintéticos conjugados e das proteínas carreadoras livres

Amostras de peptídeos sintéticos conjugados com PC-C, e PC-C e B livres (1 μg /poço), tratadas com tampão redutor e não redutor foram aquecidas a 96 °C por 6 minutos, e submetidas a corrida eletroforética, em uma corrente constante de 90V. Posteriormente, as bandas foram reveladas por impregnação por nitrato de prata. **a)** Amostras não-reduzidas; **b)** Amostras reduzidas.

4.4.2 Análise da especificidade dos anticorpos

Após eletrotransferência dos antígenos separados por SDS-PAGE para membranas de nitrocelulose, os anticorpos anti-peptídeos tiveram sua especificidade avaliada por *Western blotting*.

De acordo com a figura 19, os anticorpos testados se mostraram bastante específicos, não apresentando ligação cruzada com outros antígenos. Nesta mesma figura, também é possível observar que não há reconhecimento de nenhuma banda pelo soro pré-imune (Figura 19 e - f).

Figura 19 - Reconhecimento dos peptídeos sintéticos pelos anticorpos anti-peptídeos por *Western blotting*

Após corrida eletroforética os peptídeos sintéticos conjugados com PC-C, ou PC-C e PC-B livres (1 µg/poço), foram transferidos para membranas de nitrocelulose e submetidos a *Western blotting*. Após bloqueio e lavagens foram incubados por 1 hora com anticorpo primário anti-peptídeos ou com soro pré-imune. Em seguida, após lavagens foram incubados por 1 hora com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:7500. A revelação foi realizada com a adição de solução substrato contendo tampão Ap, NBT e BCIP. **a)** Peptídeos não-reduzidos e **b)** Peptídeos reduzidos; ambos revelados com anticorpo anti-Let#1 diluído 1:64.000; **c)** Peptídeos não-reduzidos e **d)** Peptídeos reduzidos; ambos reveladas com anticorpo anti-Let#2 diluído 1:2.000; **e)** Peptídeos não-reduzidos e **f)** Peptídeos reduzidos, ambos revelados com soro pré-imune diluído 1:2.000.

4.5 Reconhecimento da proteína NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos

A fim de avaliar se os anticorpos validados com os peptídeos sintéticos, de fato, reconhecem a proteína NaPi2b em sua forma nativa, células da linhagem OV-CAR, sabidamente expressando NaPi2b em sua superfície, foram avaliadas por citometria de fluxo. Para este experimento, os anticorpos previamente selecionados, bem como o soro pré-imune desta linhagem e o anticorpo comercial anti-NaPi2b comercial, utilizado como controle, tiveram suas diluições fixadas em 1:200. De acordo com a figura 20a, é possível observar um reconhecimento específico dos anticorpos anti-peptídeos significativamente maior do que o soro pré-imune. Além disso, nota-se que o anticorpo comercial anti-NaPi2b não reconhece nenhum antígeno quando a célula não passou pelo processo de permeabilização. Em contrapartida, o anticorpo comercial reconhece 80% das células avaliadas quando submetidas a permeabilização com Triton X-100, mostrando a alta expressão de NaPi2b neste tipo celular (Figura 20b).

Na tentativa de remover o background observado no soro pré-imune (Figura 20), novas diluições de anticorpo primário foram testadas (Figura 21). Aparentando o mesmo perfil observado no primeiro experimento, os anticorpos anti-peptídeos mostram reconhecimento específico significativamente maior que o soro pré-imune, embora, tenha permanecido o background observado anteriormente. Além disso, parece ter havido uma redução da expressão da proteína NaPi2b na superfície das células OV-CAR, visto que a porcentagem de células marcadas diminuiu, tanto com relação à marcação com os anticorpos anti-peptídeos, bem como pelo anticorpo comercial anti-NaPi2b, reduzindo de 80% para apenas 35% de células marcadas.

Figura 20 - Reconhecimento da proteína NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos

Células da linhagem OV-CAR, derivadas de carcinoma ovariano humano, foram incubadas com anticorpos anti-Let#1, anti-Let#2, soro pré-imune ou anticorpo comercial anti-NaPi2b, diluídos 1:200 em tampão de FACS. Após lavagens, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC, diluído 1:100 em tampão de FACS. **a)** Células não permeabilizadas: Ensaio com anticorpos anti-peptídeos e controle com soro pré-imune e anti-NaPi2b comercial; **b)** Células permeabilizadas: Controle com anticorpo comercial anti-NaPi2b. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de três experimentos independentes. Analisado estatisticamente por *One-Way* ANOVA seguido por teste de Tukey HSD. (*) Diferença significativa em relação ao soro pré-imune (**a**) ou ao controle apenas com anticorpo secundário (**b**) ($p < 0,05$).

Figura 21 - Reconhecimento da proteína NaPi2b nativa pelos anticorpos anti-peptídeos em diferentes diluições

Células da linhagem OV-CAR, derivadas de carcinoma ovariano humano, foram incubadas com anticorpos anti-Let#1, anti-Let#2 ou soro pré-imune, diluídos 1:200, 1:250 e 1:300 em tampão de FACS. A diluição do anticorpo comercial anti-NaPi2b foi fixada em 1:200. Após lavagens, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC, diluído 1:100 em tampão de FACS. **a)** Células não permeabilizadas: Ensaio com anticorpos anti-peptídeos e controle com soro pré-imune diluídos 1:200; **b)** Células não permeabilizadas: Ensaio com anticorpos anti-peptídeos e controle com soro pré-imune diluídos 1:250; **c)** Células não permeabilizadas: Ensaio com anticorpos anti-peptídeos e controle com soro pré-imune diluídos 1:300; **d)** Células permeabilizadas: Controle com anticorpo comercial anti-NaPi2b. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de três experimentos independentes. Analisado estatisticamente por *One-Way* ANOVA seguido por teste de Tukey HSD. (*) Diferença significativa em relação ao soro pré-imune (**a**, **b** e **c**) ou ao controle apenas com anticorpo secundário (**d**) ($p < 0,05$).

4.6 Análise da possível presença da proteína NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle

Após validação dos anticorpos anti-peptídeos com peptídeos sintéticos, bem como a validação destes anticorpos como identificadores de NaPi2b em sua forma nativa, presente na superfície de células OV-CAR, os mesmos foram utilizados para avaliar a possível liberação da proteína NaPi2b no soro das pacientes e das doadoras controle.

4.6.1 Análise do soro de pacientes e doadoras controles pelo anticorpo monoclonal OC-125

Como controle, foi realizado o teste do soro das pacientes e das doadoras controle utilizando o kit comercial anti antígeno CA-125. Como mostra a figura 22, as amostras identificadas como SPC-5, SPC-50, SPC-52 e SPC-55 são sugestivas da presença de tumor ovariano. O resultado positivo final é confirmado apenas com exames complementares realizados pelo ICESP, que só serão revelados após completa validação dos anticorpos produzidos. O nível de corte de 35 U/mL não exclui totalmente a presença de tumores ovarianos.

Figura 22 - Análise do soro de pacientes com o anticorpo monoclonal CA-125

Soro de pacientes ou soro de doadoras controle (50 µL/poço) foram incubados em placas high binding previamente revestidas com anticorpo de captura anti CA-125. Posteriormente foi adicionado o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase. Os controles positivo e negativo se referem a alta, >600 U/mL e baixa, <35 U/mL, concentração da proteína CA-125 recombinante. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

4.6.2 Análise da possível liberação de NaPi2b no soro de pacientes e doadoras controle utilizando anticorpos anti-peptídeos

As amostras de soro de pacientes e doadoras controle submetidas a análise pelo anticorpo monoclonal CA-125, foram avaliadas quando a presença da proteína NaPi2b pelos anticorpos anti-peptídeos selecionados, e pelo anticorpo comercial anti-NaPi2b. O soro pré-imune de camundongos High III foi utilizado como controle. De acordo com a figura 23, os anticorpos anti-peptídeos reconhecem um antígeno presente em todas as amostras de soro, tanto das pacientes como das doadoras controle. No entanto, não há reconhecimento de nenhum antígeno presente nestas amostras de soro quando avaliadas com soro pré-imune, evidenciando um reconhecimento específico dos anticorpos anti-peptídeos, sendo sugestivo da presença de NaPi2b em todas as amostras de soro analisadas.

Figura 23 - Análise de NaPi2b no soros de pacientes e doadoras controle com anticorpos anti-peptídeos

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µL de soro de pacientes diluídos 1:1 em PBS, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III, da sexta imunização, anti Let#1, anti Let#2 ou soro pré-imune, todos na diluição de 1:100. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

Controles com placas sensibilizadas com peptídeos sintéticos conjugados com PC-C foram empregados em todos os testes com soro de pacientes, evidenciando novamente o reconhecimento específico dos anticorpos por seus antígenos, não havendo reconhecimento cruzado, nem reatividade dos peptídeos com o soro pré-imune (Figura 24).

Figura 24 - Controle com peptídeos sintéticos conjugados com proteína carreadora C

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg/poço de peptídeos sintéticos Let#1 ou Let#2, ambos conjugados com PC-C, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III, da sexta imunização, anti Let#1, anti Let#2 ou soro pré-imune, diluídos 1:100. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na proporção de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados com média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes.

Para avaliar o reconhecimento das amostras pelo anticorpo comercial anti-NaPi2b, duas amostras de soro, ambas sugestivamente negativa e positiva, de acordo com o teste do kit para dosagem do antígeno CA-125, foram submetidas a análise. Foi possível observar, que o anticorpo comercial não reconhece nenhum antígeno presente nos soros testados, tendo a D.O. similar a obtida quando utilizado o soro pré-imune de camundongos High III como anticorpo primário, ambas abaixo da faixa de corte do experimento, isto é, abaixo de 0,06 (Figura 25). Tal resultado, sugere que apenas porções da proteína NaPi2b sejam liberadas no soro, visto que novamente pode ser observado reconhecimento específico pelos anticorpos anti-peptídeos. Estas porções liberadas possivelmente estão localizadas nos laços extracelulares da proteína, região que engloba os antígenos Let#1 e Let#2. Já a porção C-

terminal, reconhecida pelo anticorpo comercial anti-NaPi2b, possivelmente permanece dentro da célula.

Figura 25 - Análise de NaPi2b no soros de pacientes e controles com anticorpo comercial anti-NaPi2b

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µL/poço de soro de pacientes diluídos 1:1 em PBS, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III, da sexta imunização, anti Let#1, anti Let#2 ou soro pré-imune, todos na diluição de 1:100, ou com anticorpo comercial anti-NaPi2b diluído 1:200. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário, anti IgG de camundongo ou anti IgG de coelho, conjugados com peroxidase na diluição de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H₂O₂. A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados como média +/- erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes. Analisado estatisticamente por *One-Way* ANOVA seguido por teste de Tukey HSD. (*) Diferença significativa em relação ao soro pré-imune ($p < 0,05$).

Por fim, foi avaliado se a união dos anticorpos anti-Let#1 e anti-Let#2, para a análise no soro das pacientes e das doadoras controle, poderia aumentar o sinal obtido nos experimentos anteriores. No entanto, de acordo com a figura 26, não houve diferença estatística entre o reconhecimento dos antígenos presentes nas amostras quando utilizado os anticorpos em conjunto ou separadamente.

Figura 26 - Análise de NaPi2b no soros de pacientes e doadoras controle utilizando anticorpos anti-peptídeos em conjunto ou separadamente

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de soro de pacientes diluídos 1:1 em PBS, e bloqueadas com PBS /10% de leite desnatado. Em seguida foram incubadas com soro total anti-peptídeos sintéticos produzidos em camundongos High III, da sexta imunização, anti Let#1, anti Let#2, juntos ou separados, ou soro pré-imune, todos na diluição de 1:100. Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na proporção de 1:2.000. Após incubação e lavagens, os poços foram revelados com adição de solução substrato contendo tampão citrato, OPD e H_2O_2 . A barra de corte representa a leitura basal das placas, a saber, 0,06. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão das duplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes. Analisado estatisticamente por *One-Way* ANOVA seguido por teste de Tukey HSD. Diferença significativa em relação aos anticorpos em conjunto ou separadamente ($p < 0,05$) não foi observada.

5 DISCUSSÃO

Anticorpos são ferramentas poderosas para detecção de moléculas, identificação de alterações estruturais e funcionais, bem como para servir de veículo para transporte de marcadores visualizados em exames de imagens ou de substâncias tóxicas para células alvo. Com base nessas propriedades, anticorpos dirigidos para produtos de células cancerosas estão sendo largamente empregados como recursos auxiliares no diagnóstico e tratamento de vários tipos de câncer ^{25, 37, 48}.

A produção de anticorpos envolve a escolha adequada dos imunógenos, a seleção dos animais produtores, a padronização dos esquemas de imunização, bem como de detecção e quantificação dos anticorpos que estão sendo produzidos e escolha adequada das fontes de material biológico para os quais os anticorpos estariam sendo dirigidos. Uma vez obtidos e padronizados no nível de laboratório de pesquisa, os anticorpos necessariamente têm que ser submetidos a ensaios clínicos antes de serem transferidos para a rotina médica.

Nosso projeto, como descrito em itens anteriores, visou desenvolver anticorpos específicos para regiões da proteína NaPi2b, embora normalmente expressa em células normais, porém, em maior quantidades em células de determinados tumores, como o carcinoma ovariano, provavelmente com mutações por substituição, deleção ou adição de bases no gene que a codifica ^{8, 34}.

Grande parte dos mecanismos básicos envolvidos na resposta imune humoral, pelo menos para o sistema imune murino, já estão bem esclarecidos.

Modificações complexas ao longo da maturação dos precursores de células B ocorrem inicialmente no nível gênico. Nas células B, os seguintes estágios de desenvolvimento são bem caracterizados: pró-B → pré-B → pré-B-II-1 → pré-B-II-2 → pré-B-II-3 → célula B imatura, estritamente presentes na medula óssea sem a presença de antígenos. Os rearranjos gênicos das regiões variáveis das cadeias L e H das imunoglobulinas ocorrem durante o último estágio de desenvolvimento das células B, sendo seguido pela transição destas células da medula óssea para os órgãos linfoides periféricos ¹⁰⁶. Durante o desenvolvimento, os genes que codificam as regiões variáveis da cadeia pesada das Igs, se reúnem para iniciar o rearranjo dos éxons presentes nos genes V_H , D_H e J_H , resultando primeiro na recombinação de $V_H D_H$ e posteriormente $V_H D_H J_H$. Em seguida, ocorre a recombinação dos genes $V_L J_L$ das porções variáveis da cadeia leve ¹⁰⁷. Estas regiões variáveis dos genes $V_H D_H J_H$ e $V_L J_L$, codificadas por genes em éxons separados, se unem as regiões constantes (C), também codificadas em éxons separados ¹⁰⁷.

Após o mecanismo de formação de receptores para reconhecimento de epítomos antigênicos específicos, a célula B madura deixa a medula óssea e migra para os tecidos linfoides periféricos, como baço, placas de peyer e linfonodos, onde ocorre o reconhecimento de antígenos e ativação destas células ¹⁰⁷.

Em atenção a esses fundamentos, foram utilizados dois peptídeos, cada um com 15 resíduos diferentes de aminoácidos, cuja imunogenicidade foi potencializada utilizando proteínas carreadoras adequadas. Foram selecionadas espécies e linhagens animais para produção dos anticorpos, e padronizados métodos imunoquímicos e celulares de caracterização dos anticorpos produzidos. Os anticorpos desenvolvidos foram, em seguida, validados como identificadores da proteína NaPi2b tanto em células de câncer ovariano como no soro sanguíneo de pacientes e controles humanos. Como a metodologia usada na produção de anticorpos policlonais visa desenvolver anticorpos monoclonais, a especificidade dos epítomos reconhecidos na proteína NaPi2b foi avaliada em ensaios comparativos em paralelo com anticorpos já disponíveis.

A utilização de peptídeos sintéticos como imunógenos para a produção de anticorpos cresce substancialmente, devido à facilidade da síntese dos peptídeos sintéticos, consequente maior quantidade de imunógeno, bem como, produção de anticorpos sítio-específicos ^{67, 68}.

A proteína NaPi2b tem sido apontada como um potencial marcador tumoral, e sua relação com o câncer ovariano vem sendo demonstrada em muitos trabalhos ^{22, 25, 36, 49}. Por sua vez, o câncer de ovário é uma doença silenciosa, apresentando sintomas apenas em estágios avançados, e seu diagnóstico em estágios iniciais é comprometido devido à ausência de ferramentas específicas. Portanto, considerando a relação da proteína NaPi2b com o câncer ovariano, a produção de anticorpos específicos para esta proteína poderia auxiliar no diagnóstico, acompanhar a evolução do tumor, identificar mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral, e eventualmente servir como meio de transporte de substâncias anti-cancerígenas dirigidas especificamente para células tumorais. Considerando tais aspectos, o presente trabalho teve como objetivo geral produzir anticorpos específicos para epítomos expressos na proteína NaPi2b e eventualmente, validar estes anticorpos como identificadores de marcadores produzidos por células de câncer de ovário.

Sabendo que moléculas de estrutura simples e de baixo peso molecular têm dificuldades em estimular a produção de anticorpos ^{58, 75-77}, os peptídeos sintéticos foram submetidos à conjugação pelo método do glutaraldeído, utilizando três proteínas carreadoras distintas, denominadas PC-A, PC-B e PC-C, sendo esta última ovalbumina, utilizada como controle. As proteínas carreadoras comumente utilizadas, como BSA, KLH e OVA, quando

conjugadas com haptenos não imunogênicos estimulam resposta imune tanto para o hapteno que transportam como para seus próprios epítomos. Como o peptídeo sintético normalmente representa uma pequena fração do peso molecular total do conjugado hapteno-carreadora, conseqüentemente, a quantidade de anticorpos específicos para o peptídeo pode representar apenas uma pequena parte do total de anticorpos produzidos ¹⁰⁸. Uma estratégia para ultrapassar este inconveniente é a utilização de moléculas carreadoras que acomodem, simultaneamente, alto poder de oferecer o hapteno acoplado como epítomo único reconhecível por receptores de linfócitos T e B já rearranjados e que seus próprios epítomos não sejam reconhecidos.

De fato, os peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 livres não estimularam produção de anticorpos em camundongos High III, linhagem geneticamente selecionada para produzir elevados níveis de anticorpos ⁹⁹.

Considerando tais aspectos, decidiu-se comparar a resposta imune induzida pelos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 livres ou conjugados com proteínas carreadoras imunologicamente tolerizadas ou imunogênicas para os animais usados na produção de anticorpos anti peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2.

Camundongos da linhagem High III imunizados com peptídeos sintéticos conjugados com uma proteína carreadora tolerizada rotulada PC-B, responderam com significativa produção de anticorpos apenas para os peptídeos sintéticos, com ausência de anticorpos detectáveis contra a proteína carreadora livre, bem como para epítomos virtuais formados pela interação hapteno-carreadora. Quando, entretanto, os camundongos da linhagem High III foram imunizados com peptídeos conjugados com carreadoras não tolerizadas os camundongos responderam com produção de anticorpos tanto para os peptídeos como para epítomos da própria molécula carreadora.

Os peptídeos livres também não foram eficientes para a validação dos anticorpos por ELISA, provavelmente por não terem aderido de maneira adequada à superfície da placa de poliestireno. Esta barreira foi ultrapassada sensibilizando as placas de ELISA com antígeno conjugado, sempre com proteína carreadora diferente da utilizada para a imunização, a fim de se detectar apenas anticorpos específicos para os peptídeos.

Além dos aspectos envolvendo a imunogenicidade dos antígenos utilizados, a escolha do protocolo de imunização é de suma importância. Para a produção de anticorpos anti-peptídeos, é recomendado o uso de diferentes grupos experimentais, na tentativa de ultrapassar barreiras como determinados animais serem melhores produtores de anticorpo do que outros, bem como a utilização de mais de um peptídeo derivado da proteína de interesse,

visando maximizar as chances da produção de anticorpos anti alvo específico ⁷³. Também, é importante minimizar as chances dos antígenos serem tolerizados pelo sistema imune, pois os antígenos podem ser administrados de tal forma que podem induzir preferencialmente tolerância do que, de fato, uma resposta imunológica efetiva.

Sabe-se que altas doses, bem como a persistência do antígeno, são fatores que determinam a tolerogenicidade de antígenos proteicos ¹⁰⁹. Com base nestas informações, é possível sugerir que o protocolo utilizado para a imunização de coelhos e camundongos da linhagem BALB/c, podem ter induzido tolerância devido ao elevado número e intervalos próximos entre as imunizações, caracterizando a persistência do antígeno, podendo justificar assim os baixos níveis de anticorpos anti-peptídeos nestes animais experimentais. Conforme esperado, nos camundongos High III, títulos mais elevados de anticorpos anti-peptídeos foram obtidos. O protocolo de imunização utilizado com estes animais foi diferente do protocolo acima referido, com intervalos de no mínimo duas semanas entre as imunizações, e menor número de reforços, semelhante à protocolos utilizados em alguns trabalhos ^{74, 80, 110}. No entanto, não é possível afirmar que os melhores títulos de anticorpos obtidos nesta linhagem foi decorrente do protocolo de imunização utilizado, visto que estes camundongos são intrinsecamente melhores produtores de anticorpos e, ao contrário dos coelhos e camundongos BALB/c, o adjuvante utilizado foi a sílica SBA-15 ao invés do Marcol Montanide. Portanto, não pode ser descartada a ideia de produzir anticorpos anti-peptídeos em coelhos e camundongos BALB/c utilizando o protocolo validado com os camundongos High III.

Apesar de ser obtida resposta de anticorpos para ambos imunógenos nos camundongos High III, o elevado título de anticorpos anti-Let#1, quando comparado com os anticorpos anti-Let#2, bem como sua maior afinidade, talvez possa ser justificado pelos ensaios de predição de imunogenicidade (POPI 2.0) ¹¹¹, que apontam este peptídeo como um imunógeno mais eficiente, tendo epítomos potencialmente reconhecidos por receptores de células TCD4⁺.

Os anticorpos produzidos em camundongos High III, utilizando peptídeos conjugados com PC-B, além de terem títulos mais elevados, se mostraram bastante específicos, não reagindo de maneira cruzada com outros antígenos avaliados, sugerindo que a metodologia empregada foi eficiente para o propósito do trabalho, validando estes anticorpos produzidos como potenciais identificadores da proteína NaPi2b nativa.

De acordo com HANCOCK (2005), de certa forma, é possível dizer que quase todas as sequências são imunogênicas quando apresentadas de maneira correta ao sistema imune e

podem desencadear resposta de anticorpos, no entanto, nem todas irão gerar anticorpos capazes de reconhecer a proteína nativa⁷³. Portanto, apesar do sucesso na validação dos anticorpos produzidos frente aos peptídeos sintéticos, outro desafio foi avaliar o reconhecimento da proteína nativa. Para tal, células da linhagem OV-CAR, sabidamente expressando altos níveis de NaPi2b em sua superfície^{22, 37, 46}, foram submetidas a análises por citometria de fluxo. Os resultados obtidos indicam que os anticorpos anti-peptídeos sintéticos reconhecem a proteína NaPi2b nativa, com diferença significativa observada entre os soros hiperimunes e o soro pré-imune, com marcação de aproximadamente 62% das células pelos anticorpos anti-peptídeos. Este reconhecimento revela que as possíveis mutações de NaPi2b provavelmente não estão situadas nas regiões que englobam os peptídeos sintéticos. Embora observada marcação significativa pelos anticorpos produzidos, houve *background* do soro pré-imune, que não foi removido mesmo após tentativas de maiores diluições dos soros, sugerindo a necessidade de purificação dos anticorpos anti-peptídeos para obtenção de melhores resultados.

É interessante ressaltar que houve uma aparente diminuição de expressão desta proteína conforme os experimentos foram sendo realizados. Esta diminuição foi enfatizada pela queda da porcentagem de células marcadas ocorrerem também quando utilizados diferentes alíquotas de anticorpo comercial para marcação. Foi observado uma diferença no tempo de expansão destas células em cultura, que foi proporcional a diferença de marcação de NaPi2b na superfície. No início dos testes, as células apresentaram crescimento lento e eram avaliadas antes de convergirem. Nestas condições, os experimentos de citometria utilizando o anticorpo comercial, resultavam em aproximadamente 80% de células marcadas, seguido de aproximadamente 62% de marcação com os anticorpos anti-peptídeos. Conforme as células foram se estabelecendo em cultura, a taxa de crescimento aumentou, com confluência sendo observada por volta de 3 dias após o repique. Nestas condições, quando avaliadas por citometria de fluxo, o índice de marcação, tanto dos anticorpos anti-peptídeos, como pelo anticorpo comercial, caiu pela metade. Para avaliar se a confluência destas células é o fator que determina o nível de expressão de NaPi2b, novos testes devem ser realizados, utilizando um novo lote de células e mantendo-as em cultura com diferentes procedimentos de repique, realizando e comparando testes de células mais jovens com células mantidas por mais tempo em cultura.

No intestino delgado a expressão de NaPi2b é inversamente proporcional a quantidade de Pi disponível. Isso foi demonstrado em animais mantidos com dietas pobres em fosfato, que aumentaram a expressão deste transportador¹¹². Então, ao contrário do

ocorrido no decorrer dos ensaios, se na garrafa de cultura contendo muitas células em confluência e consequentemente, menor quantidade de Pi disponível, o esperado seria ocorrer um aumento da expressão de NaPi2b. No entanto, pode ser plausível sugerir que o envelhecimento das células decorrente das passagens, pode induzir uma queda da expressão de NaPi2b. Esta queda de expressão relacionada a idade foi demonstrada em um estudo com ratos em diferentes etapas de desenvolvimento submetidos a perfusão intestinal com soluções contendo altas concentrações de glicose e frutose ¹¹³. Estes resultados apontam modificações no nível de expressão de NaPi2b dependente de determinados fatores externos, portanto, análises da expressão desta proteína em células OV-CAR em cultura deve ser estimuladas.

No lisado celular de OV-CAR, realizado a partir das primeiras expansões, obtido com tampão RIPA contendo inibidores de proteases, foi detectada a presença de NaPi2b pelos anticorpos anti-peptídeos pela técnica de Dot-Blot (dados não mostrados), porém, os ensaios de ELISA e *Western blotting* não foram padronizados até o momento, bem como testes para verificação da possível liberação de NaPi2b no sobrenadante das culturas.

Por fim, os anticorpos anti-peptídeos reconheceram epítomos presentes no soro das pacientes com neoplasia epitelial de ovário, bem como no soro das pacientes controle. Considerando a afinidade dos anticorpos anti-peptídeos demonstrada nos testes de validação, caracterizada pelo reconhecimento específico do antígeno alvo e não de outros antígenos avaliados, este resultado pode sugerir que os anticorpos possam estar reconhecendo epítomos da proteína NaPi2b, potencialmente liberada no soro de maneira fisiológica. Há indícios de que apenas porções desta proteína sejam liberadas, devido o não reconhecimento de epítomos nos soros quando testados com anticorpo comercial, específico para a porção C-terminal de NaPi2b, encontrada no citoplasma. Esta ideia pode ser enfatizada pela existência de proteases da família das ADAMs, cujo principal substrato são os domínios extracelulares de proteínas de membrana, promovendo a liberação destas porções no meio ^{114, 115}. Alguns membros desta família de proteases estão sendo apontados como potenciais marcadores tumorais, pois evidências indicam o sua participação na proliferação de células neoplásicas, agindo na liberação de fatores de crescimento ancorados a membrana celular ¹¹⁵, além de ter sido observado o aumento da expressão destas proteínas em pacientes com câncer de mama ¹¹⁶.

Além disso, análises de pareamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, comparadas com sequências presentes em diferentes bancos de dados, indicam 100% de similaridade apenas com a proteína NaPi2b humana, indicando menor possibilidade de reatividade cruzada dos anticorpos anti-peptídeos com outras substâncias presentes no soro humano. De acordo com esta análise, aparentemente não há

sítios de glicosilação nem de fosforilação na região que compreende as sequências dos peptídeos sintéticos, o que beneficia o reconhecimento da proteína nativa pelos anticorpos produzidos ¹¹⁷.

Ensaio de *Western blotting* para verificar a proteína reconhecida pelos anticorpos anti-peptídeos em amostras de soro humano ainda não foi padronizada, devido à presença de background do anticorpo secundário utilizado na reação. Apesar de diluí-lo em proporções acima do recomendado pelo fabricante, a ligação não foi removida, indicando que pode haver um forte reconhecimento de alguma proteína presente no soro humano pelo anticorpo secundário. Para comprovar esta hipótese, o anticorpo secundário deve ser incubado com o soro teste e posteriormente realizado o ensaio, para garantir que o anticorpo secundário não irá ligar inespecificamente em proteínas do soro humano, e sim, apenas no anticorpo primário ligado ao antígeno de interesse. Estas interferências são relativamente comuns em testes imunodiagnósticos e podem acontecer devido substâncias quimicamente diferentes, mas estruturalmente parecidas, que podem proporcionar ligações cruzadas de anticorpos; a existência de anticorpos heterófilos ou autoanticorpos e fator reumatoide são alguns dos interferentes mais encontrados ¹¹⁸.

Considerando os resultados aqui obtidos e admitindo-se que a expectativa de êxito no tratamento do câncer em geral, também válidos para COV, seja através de diagnósticos mais específicos e tratamentos personalizados, o enriquecimento do arsenal diagnóstico com técnicas e reagentes mais sensíveis, específicos, de fácil utilização e interpretação no dia-a-dia do atendimento aos pacientes, será, obviamente de grande utilidade. Se aos métodos de clínica médica, recursos de imagens e histopatologia de biópsias, atualmente bem dominados, associarem-se reagentes de qualidade para identificação precoce de marcadores, a expectativa de êxito terapêutico no tratamento deste tipo de câncer poderá aumentar.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que os peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2, conjugados com diferentes proteínas carreadoras pelo método do glutaraldeído, foram imunogênicos para coelhos e camundongos.

Os títulos mais elevados de anticorpos foram obtidos nos camundongos da linhagem High III, dentre estes, o peptídeo Let#1 induziu maiores títulos de anticorpos específicos, bem como de maior afinidade. Tais anticorpos se mostraram específicos para o peptídeo alvo, não reagindo de maneira cruzada com outros antígenos avaliados. Além disso, foi possível observar que nos animais desta linhagem, a proteína carreadora B foi mais eficiente para indução de resposta de células humoral específica para o antígeno, sem resposta de anticorpo para a carreadora. Já o grupo de animais imunizados com antígenos conjugados com proteína carreadora C, produziram menos anticorpos específicos para os peptídeos, com alta produção de anticorpos anti-proteína carreadora.

Para as etapas de validação os peptídeos conjugados se mostraram mais eficientes, visto que os peptídeos livres parecem não aderir de maneira satisfatória.

Os anticorpos produzidos reconhecem NaPi2b nativa, presente na superfície de células OV-CAR, e este reconhecimento revela que não há mutações presentes na região compreendida pelos peptídeos sintéticos. Além disso, estes anticorpos reconhecem epítomos presentes no soro das pacientes com carcinoma ovariano, bem como no soro das pacientes controle. Considerando que não há background do soro pré-imune quando avaliados com o soro humano, é possível sugerir que os anticorpos anti-peptídeos possam estar reconhecendo fragmentos da proteína NaPi2b potencialmente liberada de maneira fisiológica no soro das mulheres incluídas no estudo, tornando necessária a confirmação do epítopo e análise quantitativa do mesmo, a fim de avaliar se há diferença no nível de liberação desta proteína em pacientes saudáveis ou com câncer ovariano.

O provável progresso no tratamento do câncer está intimamente relacionado à combinação de melhores e mais específicos medicamentos e na melhor compreensão na biologia da doença. Portanto, estudos relacionados a marcadores sorológicos e de superfície das células tumorais devem continuar. Marcadores específicos para o carcinoma de ovário como a proteína NaPi2b, abrem caminho para a elucidação dos mecanismos envolvidos no surgimento e desenvolvimento do tumor, proporcionando modelos valiosos para estudos posteriores.

REFERÊNCIAS[†]

1. JACOB, H. S. Severe hypophosphatemia. A previously ignored cause of cellular dysfunction. **West J. Med.**, v. 122, n. 6, p. 501-502, 1975.
2. KNOCHEL, J.; BARCENAS, C.; COTTON, J.; FULLER, T.; HALLER, R.; CARTER, N. Hypophosphatemia and rhabdomyolysis. **J. Clin. Investig.**, v. 62, n. 6, p. 1240-1246, 1978.
3. BERNDT, T. J.; SCHIAVI, S.; KUMAR, R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, n. 6, p. F1170-F1182, 2005.
4. FUKUMOTO, S. Phosphate metabolism and vitamin D. **Bonekey Rep.**, v. 3, p. 1-5, 2014.
5. BACIC, D.; WAGNER, C. A.; HERNANDO, N.; KAISLING, B.; BIBER, J.; MURER, H. Novel aspects in regulated expression of the renal type IIa Na/Pi-cotransporter. **Kidney Int.**, v. 66, p. S5-S12, 2004.
6. XU, H.; INOUE, M.; MISSEY, T.; COLLINS, J. F.; GHISHAN, F. K. Functional characterization of the human intestinal NaPi-IIIb cotransporter in hamster fibroblasts and *Xenopus* oocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1567, n. 1-2, p. 97-105, 2002.
7. GIRAL, H.; CALDAS, Y.; SUTHERLAND, E.; WILSON, P.; BREUSEGEM, S.; BARRY, N.; BLAINE, J.; JIANG, T.; WANG, X. X.; LEVI, M. Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 297, n. 5, p. F1466-F1475, 2009.
8. CORUT, A.; SENYIGIT, A.; UGUR, S. A.; ALTIN, S.; OZCELIK, U.; CALISIR, H.; YILDIRIM, Z.; GOCMEN, A.; TOLUN, A. Mutations in SLC34A2 cause pulmonary alveolar microlithiasis and are possibly associated with testicular microlithiasis. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 79, n. 4, p. 650-656, 2006.
9. FARROW, E. G.; WHITE, K. E. Recent advances in renal phosphate handling. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 6, n. 4, p. 207-217, 2010.
10. PENIDO, M. G.; ALON, U. S. Phosphate homeostasis and its role in bone health. **Pediatr. Nephrol.**, v. 27, n. 11, p. 2039-2048, 2012.
11. MARKS, J.; DEBNAM, E. S.; UNWIN, R. J. Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 299, n. 2, p. F285-F296, 2010.

[†] De acordo com:

12. MURER, H. Homer Smith Award. Cellular mechanisms in proximal tubular Pi reabsorption: some answers and more questions. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 2, n. 12, p. 1649-1665, 1992.
13. FORSTER, I.; HERNANDO, N.; BIBER, J.; MURER, H. Proximal tubular handling of phosphate: a molecular perspective. **Kidney Int.**, v. 70, n. 9, p. 1548-1559, 2006.
14. VIRKKI, L. V.; BIBER, J.; MURER, H.; FORSTER, I. C. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 293, n. 3, p. F643-F654, 2007.
15. LITUIEV, D.; KIYAMOVA, R. Mutations in the gene of human type IIb sodium-phosphate cotransporter SLC34A2. **Biopolym. Cell**, v. 26, n. 1, p. 13-22, 2010.
16. WERNER, A.; DEHMELT, L.; NALBANT, P. Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. **J. Exp. Biol.**, v. 201, n. Pt 23, p. 3135-3142, 1998.
17. HAYES, G.; BUSCH, A.; LÖTSCHER, M.; WALDEGGER, S.; LANG, F.; VERREY, F.; BIBER, J.; MURER, H. Role of N-linked glycosylation in rat renal Na/Pi-cotransport. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 39, p. 24143-24149, 1994.
18. TRAEBERT, M.; HATTENHAUER, O.; MURER, H.; KAISLING, B.; BIBER, J. Expression of type II Na-P(i) cotransporter in alveolar type II cells. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. L868-L873, 1999.
19. MAGAGNIN, S.; WERNER, A.; MARKOVICH, D.; SORRIBAS, V.; STANGE, G.; BIBER, J.; MURER, H. Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. 13, p. 5979-5983, 1993.
20. LAMBERT, G.; TRAEBERT, M.; HERNANDO, N.; BIBER, J.; MURER, H. Studies on the topology of the renal type II NaPi-cotransporter. **Pflügers Arch.**, v. 437, n. 6, p. 972-978, 1999.
21. MURER, H.; FORSTER, I.; BIBER, J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. **Pflügers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 763-767, 2004.
22. YIN, B. W.; KIYAMOVA, R.; CHUA, R.; CABALLERO, O. L.; GOUT, I.; GRYSHKOVA, V.; BHASKARAN, N.; SOUCHELNYTSKYI, S.; HELLMAN, U.; FILONENKO, V.; JUNGBLUTH, A. A.; ODUNSI, K.; LLOYD, K. O.; OLD, L. J.; RITTER, G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. **Cancer Immun.**, v. 8, n. 3, p. 1-9, 2008.
23. XU, H.; BAI, L.; COLLINS, J. F.; GHISHAN, F. K. Molecular cloning, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal localization of a human, small intestinal sodium-phosphate (Na⁺-Pi) transporter (SLC34A2). **Genomics**, v. 62, n. 2, p. 281-284, 1999.
24. FEILD, J. A.; ZHANG, L.; BRUN, K. A.; BROOKS, D. P.; EDWARDS, R. M. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 258, n. 3, p. 578-582, 1999.

25. MATTES, M. J.; LOOK, K.; FURUKAWA, K.; PIERCE, V. K.; OLD, L. J.; LEWIS, J. L.; LLOYD, K. O. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. **Cancer Res.**, v. 47, n. 24, p. 6741-6750, 1987.
26. KIYAMOVA, R.; SHYIAN, M.; LYZOGUBOV, V.; USENKO, V.; GOUT, T.; FILONENKO, V. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues. **Exp. Oncol.**, v. 33, p. 157-161, 2011.
27. BOROWITZ, S. M.; GHISHAN, F. K. Phosphate transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. **Gastroenterology**, v. 96, n. 1, p. 4-10, 1989.
28. XU, Y.; YEUNG, C. H.; SETIAWAN, I.; AVRAM, C.; BIBER, J.; WAGENFELD, A.; LANG, F.; COOPER, T. G. Sodium-inorganic phosphate cotransporter NaPi-IIb in the epididymis and its potential role in male fertility studied in a transgenic mouse model. **Biol. Reprod.**, v. 69, n. 4, p. 1135-1141, 2003.
29. MATTES, M. J.; LOOK, K.; FURUKAWA, K.; PIERCE, V. K.; OLD, L. J.; LEWIS, J. L., JR.; LLOYD, K. O. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. **Cancer Res**, v. 47, 24 Pt 1, p. 6741-50, 1987.
30. MIYOSHI, K.; SHILLINGFORD, J. M.; SMITH, G. H.; GRIMM, S. L.; WAGNER, K. U.; OKA, T.; ROSEN, J. M.; ROBINSON, G. W.; HENNIGHAUSEN, L. Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. **J. Cell Biol.**, v. 155, n. 4, p. 531-542, 2001.
31. HOMANN, V.; ROSIN-STEINER, S.; STRATMANN, T.; ARNOLD, W. H.; GAENGLER, P.; KINNE, R. K. Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 9, p. 759-768, 2005.
32. FREI, P.; GAO, B.; HAGENBUCH, B.; MATE, A.; BIBER, J.; MURER, H.; MEIER, P. J.; STIEGER, B. Identification and localization of sodium-phosphate cotransporters in hepatocytes and cholangiocytes of rat liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 288, n. 4, p. G771-G778, 2005.
33. LUNDQUIST, P. Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis. **Swed. Dent. J. Suppl.**, v. 154, p. 1-52, 2002.
34. HUQUN; IZUMI, S.; MIYAZAWA, H.; ISHII, K.; UCHIYAMA, B.; ISHIDA, T.; TANAKA, S.; TAZAWA, R.; FUKUYAMA, S.; TANAKA, T. Mutations in the SLC34A2 gene are associated with pulmonary alveolar microlithiasis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 175, n. 3, p. 263-268, 2007.
35. SABBAGH, Y.; O'BRIEN, S. P.; SONG, W.; BOULANGER, J. H.; STOCKMANN, A.; ARBEENY, C.; SCHIAVI, S. C. Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, n. 11, p. 2348-2358, 2009.

36. RANGEL, L. B.; SHERMAN-BAUST, C. A.; WERNYJ, R. P.; SCHWARTZ, D. R.; CHO, K. R.; MORIN, P. J. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. **Oncogene**, v. 22, n. 46, p. 7225-7232, 2003.
37. LOPES DOS SANTOS, M.; YEDA, F. P.; TSURUTA, L. R.; HORTA, B. B.; PIMENTA, A. A., JR.; DEGAKI, T. L.; SOARES, I. C.; TUMA, M. C.; OKAMOTO, O. K.; ALVES, V. A.; OLD, L. J.; RITTER, G.; MORO, A. M. Rebmab200, a humanized monoclonal antibody targeting the sodium phosphate transporter NaPi2b displays strong immune mediated cytotoxicity against cancer: a novel reagent for targeted antibody therapy of cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2013.
38. GALEZA-KULIK, M.; ZEBRACKA, J.; SZPAK-ULCZOK, S.; CZARNIECKA, A. K.; KUKULSKA, A.; GUBALA, E.; STOJCEV, Z.; WIENCH, M. Expression of selected genes involved in transport of ions in papillary thyroid carcinoma. **Endokrynol. Pol.**, v. 57 Suppl A, p. 26-31, 2006.
39. WELSHINGER, M.; YIN, B. W.; LLOYD, K. O. Initial immunochemical characterization of MX35 ovarian cancer antigen. **Gynecol. Oncol.**, v. 67, n. 2, p. 188-192, 1997.
40. SOARES, I. C.; SIMOES, K.; DE SOUZA, J. E.; OKAMOTO, O. K.; WAKAMATSU, A.; TUMA, M.; RITTER, G.; ALVES, V. A. In silico analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 20, n. 2, p. 165-172, 2012.
41. SEROV, S. F.; SCULLY, R. E.; SOBIN, L. H. Histological typing of ovarian tumours. **World Health Organ.**, v. 9, p. 1-122, 1973.
42. AUERSPERG, N.; WONG, A. S.; CHOI, K.-C.; KANG, S. K.; LEUNG, P. C. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. **Endocr. Rev.**, v. 22, n. 2, p. 255-288, 2001.
43. GRYSHKOVA, V.; LITUYEV, D.; FILONENKO, V.; KIYAMOVA, R. Creation of cellular models for the analysis of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, a potential marker for ovarian cancer. **Biopolym. Cell**, v. 25, n. 2, p. 95-100, 2009.
44. GRYSHKOVA, V.; LITUIEV, D.; SAVINSKA, L.; OVCHARENKO, G.; GOUT, I.; FILONENKO, V.; KIYAMOVA, R. Generation of Monoclonal Antibodies Against Tumor-Associated Antigen MX35/sodium-Dependent Phosphate Transporter NaPi2b. **Hybridoma**, v. 30, n. 1, p. 37-42, 2011.
45. SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA. Cancer J. Clin.**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.
46. GRYSHKOVA, V.; GONCHARUK, I.; GURTOVYY, V.; KHOZHAYENKO, Y.; NESPRYADKO, S.; VOROBJOVA, L.; USENKO, V.; GOUT, I.; FILONENKO, V.; KIYAMOVA, R. The study of phosphate transporter NAPI2B expression in different histological types of epithelial ovarian cancer. **Exp. Oncol.**, v. 31, n. 1, p. 37-42, 2009.

47. COHEN, J. G.; WHITE, M.; CRUZ, A.; FARIAS-EISNER, R. In 2014, can we do better than CA125 in the early detection of ovarian cancer? **World J. Biol. Chem.**, v. 5, n. 3, p. 286-300, 2014.
48. BAST JR, R. C.; FEENEY, M.; LAZARUS, H.; NADLER, L.; COLVIN, R.; KNAPP, R. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. **J. Clin. Investig.**, v. 68, n. 5, p. 1331-1337, 1981.
49. RUBIN, S. C.; KOSTAKOGLU, L.; DIVGI, C.; FEDERICI, M. G.; FINSTAD, C. L.; LLOYD, K. O.; LARSON, S. M.; HOSKINS, W. J. Biodistribution and intraoperative evaluation of radiolabeled monoclonal antibody MX35 in patients with epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 51, n. 1, p. 61-66, 1993.
50. ANDERSSON, H.; CEDERKRANTZ, E.; BÄCK, T.; DIVGI, C.; ELGQVIST, J.; HIMMELMAN, J.; HORVATH, G.; JACOBSSON, L.; JENSEN, H.; LINDEGREN, S. Intraperitoneal α -particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of ^{211}At -MX35 F (ab')₂—a phase I study. **J. Nucl. Med.**, v. 50, n. 7, p. 1153-1160, 2009.
51. SHAPIRO-SHELEF, M.; CALAME, K. Regulation of plasma-cell development. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 3, p. 230-242, 2005.
52. SCHROEDER, H. W., JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-S52, 2010.
53. TONEGAWA, S. Nobel lecture in physiology or medicine--1987. Somatic generation of immune diversity. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 24, n. 4, p. 253-265, 1988.
54. DUDLEY, D. D.; CHAUDHURI, J.; BASSING, C. H.; ALT, F. W. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. **Adv. Immunol.**, v. 86, p. 43-112, 2005.
55. RHEINGOLD, S. R.; BROWN, V. I.; FANG, J.; KIM, J. M.; GRUPP, S. A. Role of the BCR complex in B cell development, activation, and leukemic transformation. **Immunol. Res.**, v. 27, n. 2-3, p. 309-329, 2003.
56. PARKER, D. C. T cell-dependent B cell activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 331-360, 1993.
57. MOND, J. J.; VOS, Q.; LEES, A.; SNAPPER, C. M. T cell independent antigens. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 349-354, 1995.
58. LANZAVECCHIA, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature**, v. 314, n. 6011, p. 537-539, 1985.
59. BEREK, C.; MILSTEIN, C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. **Immunol. Rev.**, v. 96, p. 23-41, 1987.
60. RAVETCH, J. V.; LANIER, L. L. Immune inhibitory receptors. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 84-89, 2000.

61. EDELMAN, G. M. Antibody structure and molecular immunology. **Science**, v. 180, n. 4088, p. 830-840, 1973.
62. POLONELLI, L.; PONTON, J.; ELGUEZABAL, N.; MORAGUES, M. D.; CASOLI, C.; PILOTTI, E.; RONZI, P.; DOBROFF, A. S.; RODRIGUES, E. G.; JULIANO, M. A.; MAFFEI, D. L.; MAGLIANI, W.; CONTI, S.; TRAVASSOS, L. R. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. 1-9, 2008.
63. BELLATI, F.; NAPOLETANO, C.; GASPARRI, M. L.; VISCONTI, V.; ZIZZARI, I. G.; RUSCITO, I.; CACCETTA, J.; RUGHETTI, A.; BENEDETTI-PANICI, P.; NUTI, M. Monoclonal antibodies in gynecological cancer: a critical point of view. **J. Immunol. Res.**, v. 2011, p. 1-16, 2011.
64. CASADEVALL, A. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 2, n. 3, p. 200-208, 1996.
65. SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278-287, 2012.
66. WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 317-327, 2010.
67. ASTOUL, E.; LAURENCE, A. D.; TOTTY, N.; BEER, S.; ALEXANDER, D. R.; CANTRELL, D. A. Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 9267-9275, 2003.
68. LATEEF, S. S.; GUPTA, S.; JAYATHILAKA, L. P.; KRISHNANCHETTIAR, S.; HUANG, J.-S.; LEE, B.-S. An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody production using DMF to solubilize peptides. **J. Biomol. Tech.**, v. 18, n. 3, p. 173-176, 2007.
69. FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; MASSAOKA, M. H.; POLONELLI, L.; TRAVASSOS, L. R. Anti-tumor activities of peptides corresponding to conserved complementary determining regions from different immunoglobulins. **Peptides**, v. 59, p. 14-19, 2014.
70. TYAGI, A.; KAPOOR, P.; KUMAR, R.; CHAUDHARY, K.; GAUTAM, A.; RAGHAVA, G. P. In silico models for designing and discovering novel anticancer peptides. **Sci. Rep.**, v. 3, n. 2984, p. 1-8, 2013.
71. TAM, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 85, n. 15, p. 5409-5413, 1988.
72. NIMAN, H. L.; HOUGHTEN, R. A.; WALKER, L. E.; REISFELD, R. A.; WILSON, I. A.; HOGLE, J. M.; LERNER, R. A. Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 80, n. 16, p. 4949-4953, 1983.

73. HANCOCK, D. C.; OREILLY, N. J. Synthetic peptides as antigens for antibody production. In: (Ed.). **Immunochemical Protocols**: Springer, 2005. p. 13-25.
74. CALVO-CALLE, J. M.; DE OLIVEIRA, G.; CLAVIJO, P.; MARACIC, M.; TAM, J.; LU, Y.; NARDIN, E.; NUSSENZWEIG, R.; COCHRANE, A. Immunogenicity of multiple antigen peptides containing B and non-repeat T cell epitopes of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. **J. Immunol.**, v. 150, n. 4, p. 1403-1412, 1993.
75. MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. On the semantics of immune recognition. **Res. Immunol.**, v. 147, n. 4, p. 208-214, 1996.
76. CARTER, J. M. Conjugation of peptides to carrier proteins via glutaraldehyde. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The protein Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1996. p. 679-687.
77. TAM, J. P.; CLAVIJO, P.; LU, Y. A.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R.; ZAVALA, F. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. **J. Exp. Med.**, v. 171, n. 1, p. 299-306, 1990.
78. BIER, O. G.; DIAS DA SILVA, W.; MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada**. 5^a ed. Guanabara Koogan, 2003.
79. ALBAN, S. M.; DE MOURA, J. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SÉKULA, S. B.; ALVARENGA, L. M.; MIRA, M. T.; OLORTEGUI, C. C.; MINOZZO, J. C. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2014.
80. DE SILVA, B. S.; EGODAGE, K. L.; WILSON, G. S. Purified protein derivative (PPD) as an immunogen carrier elicits high antigen specificity to haptens. **Bioconjug. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 496-501, 1999.
81. SCHAAPER, W. M.; LANKHOF, H.; PUIJK, W. C.; MELOEN, R. H. Manipulation of anti-peptide immune response by varying the coupling of the peptide with the carrier protein. **Mol. Immunol.**, v. 26, n. 1, p. 81-85, 1989.
82. BRIAND, J. P.; MULLER, S.; VAN REGENMORTEL, M. H. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. **J. Immunol. Methods**, v. 78, n. 1, p. 59-69, 1985.
83. YALOW, R. S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. **Science**, v. 200, p. 1236-1245, 1978.
84. ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.
85. TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

86. KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.
87. EAGLE, K.; LEDERMANN, J. A. Tumor markers in ovarian malignancies. **The Oncologist**, v. 2, n. 5, p. 324-329, 1997.
88. HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. **Mol. Oncol.**, v. 6, n. 2, p. 140-146, 2012.
89. JONES, H. B. On a New Substance Occurring in the Urine of a Patient with Mollities Ossium. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 138, p. 55-62, 1848.
90. KYLE, R. A.; RAJKUMAR, S. V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. **Leukemia**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2009.
91. KURIYAMA, M.; WANG, M. C.; PAPSIDERO, L. D.; KILLIAN, C. S.; SHIMANO, T.; VALENZUELA, L.; NISHIURA, T.; MURPHY, G. P.; CHU, T. M. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. **Cancer Res.**, v. 40, n. 12, p. 4658-4662, 1980.
92. THOMSON, D. M.; KRUPPEY, J.; FREEDMAN, S. O.; GOLD, P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 64, n. 1, p. 161-167, 1969.
93. KASERER, K.; SCHMAUS, J.; BETHGE, U.; MIGSCHITZ, B.; FASCHING, S.; WALCH, A.; HERBST, F.; TELEKY, B.; WRBA, F. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. **J. Pathol.**, v. 190, n. 4, p. 450-456, 2000.
94. BOURHIS, J.; LUBIN, R.; ROCHE, B.; KOSCIELNY, S.; BOSQ, J.; DUBOIS, I.; TALBOT, M.; MARANDAS, P.; SCHWAAB, G.; WIBAULT, P.; LUBOINSKI, B.; ESCHWEGE, F.; SOUSSI, T. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 88, n. 17, p. 1228-1233, 1996.
95. EASTON, D. F.; FORD, D.; BISHOP, D. T. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast cancer linkage consortium. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 56, n. 1, p. 265-271, 1995.
96. BAST JR, R.; SIEGAL, F.; RUNOWICZ, C.; KLUG, T.; ZURAWSKI JR, V.; SCHONHOLZ, D.; COHEN, C.; KNAPP, R. Elevation of serum CA 125 prior to diagnosis of an epithelial ovarian carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v. 22, n. 1, p. 115-120, 1985.
97. ROSEN, D. G.; WANG, L.; ATKINSON, J. N.; YU, Y.; LU, K. H.; DIAMANDIS, E. P.; HELLSTROM, I.; MOK, S. C.; LIU, J.; BAST, R. C., JR. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 99, n. 2, p. 267-277, 2005.
98. STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473-480, 2008.

99. MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; SANT'ANNA, O. A.; BOUTHILLIER, Y.; IBANEZ, O.; FERREIRA, V. C.; MEVEL, J. C.; REIS, M. H.; PIATTI, R. M.; STIFFEL, C.; ET AL. Genetic regulation of multispecific antibody responsiveness: improvement of "high" and "low" characters. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, n. 1, p. 41-49, 1988.
100. MOUNT, D. W. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). **CSH Protoc**, v. 2007, p. pdb top17, 2007.
101. CARVALHO, L. V.; RUIZ RDE, C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E. B.; MATOS, J. R.; TAMBOURGI, D. V.; FANTINI, M. C.; SANT'ANNA, O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, n. 50, p. 7829-7836, 2010.
102. PULLEN, G. R.; FITZGERALD, M. G.; HOSKING, C. S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J. Immunol. Methods**, v. 86, n. 1, p. 83-87, 1986.
103. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
104. MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.
105. HAMILTON, T. C.; YOUNG, R. C.; MCKOY, W. M.; GROTZINGER, K. R.; GREEN, J. A.; CHU, E. W.; WHANG-PENG, J.; ROGAN, A. M.; GREEN, W. R.; OZOLS, R. F. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. **Cancer Res.**, v. 43, n. 11, p. 5379-5389, 1983.
106. HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. B cell development pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 595-621, 2001.
107. TAKEMORI, T.; MIZUGUCHI, J.; MIYAZOE, I.; NAKANISHI, M.; SHIGEMOTO, K.; KIMOTO, H.; SHIRASAWA, T.; MARUYAMA, N.; TANIGUCHI, M. Two types of mu chain complexes are expressed during differentiation from pre-B to mature B cells. **EMBO J.**, v. 9, n. 8, p. 2493-2500, 1990.
108. POSNETT, D. N.; MCGRATH, H.; TAM, J. P. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 4, p. 1719-1725, 1988.
109. JUN, J. E.; GOODNOW, C. C. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 11, p. 1057-1064, 2003.
110. KIYAMOVA, R.; GRYSHKOVA, V.; OVCHARENKO, G.; LITUYEV, D.; MALYUCHIK, S.; USENKO, V.; KHOZHAYENKO, Y.; GURTOVYY, V.; YIN, B.; RITTER, G. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent phosphate co-transporter NaPi2b. **Hybridoma**, v. 27, n. 4, p. 277-284, 2008.

111. TUNG, C. W.; HO, S. Y. POPI: predicting immunogenicity of MHC class I binding peptides by mining informative physicochemical properties. **Bioinformatics**, v. 23, n. 8, p. 942-949, 2007.
112. HATTENHAUER, O.; TRAEBERT, M.; MURER, H.; BIBER, J. Regulation of small intestinal Na-P(i) type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 4, p. G756-762, 1999.
113. KIRCHNER, S.; MUDULI, A.; CASIROLA, D.; PRUM, K.; DOUARD, V.; FERRARIS, R. P. Luminal fructose inhibits rat intestinal sodium-phosphate cotransporter gene expression and phosphate uptake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 87, n. 4, p. 1028-1038, 2008.
114. MOSS, M. L.; LAMBERT, M. H. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. **Essays Biochem.**, v. 38, p. 141-153, 2002.
115. DUFFY, M. J.; MULLOOLY, M.; O'DONOVAN, N.; SUKOR, S.; CROWN, J.; PIERCE, A.; MCGOWAN, P. M. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? **Clin. Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2011.
116. ROY, R.; WEWER, U. M.; ZURAKOWSKI, D.; PORIES, S. E.; MOSES, M. A. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 49, p. 51323-51330, 2004.
117. The universal protein resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.**, v. 36, Database issue, p. 190-195, 2008.
118. TATE, J.; WARD, G. Interferences in immunoassay. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 105-120, 2004.

APÊNDICE - Validação de anticorpos IgY anti-peptídeos Let#1 e Let#2 produzidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anticorpos IgY

Os anticorpos IgY são as principais imunoglobulinas produzidas em galinhas (*Gallus domesticus*). Após seu rearranjo gênico, são sintetizadas continuamente, secretadas no sangue e transferidas e acumuladas na gema do ovo ¹. A IgY é produzida com o intuito de proteger a prole, fornecendo resposta humoral efetiva até a maturação do sistema imune do filhote ². O sistema imune das galinhas é constituído pela Bursa de Fabricius, medula óssea, baço, timo, glândula de Harderian, linfonodos e linfócitos teciduais e circulantes no trato digestivo. As células B produtoras de anticorpos são produzidas na Bursa de Fabricius ³.

A estrutura global da IgY é bastante semelhante a IgG de mamíferos, contendo duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). A cadeia pesada (65 kDa) é composta por uma região variável (V) e quatro regiões constantes (C). Já a cadeia leve (18 kDa) é composta por uma região variável e uma região constante. A IgY possui peso molecular em torno de 166 kDa, enquanto que a IgG é levemente menor, pesando em torno de 160 kDa. Curiosamente a cadeia leve da IgY é menor do que a de IgG, e seu peso molecular mais elevado é justificado pela presença de um domínio constante a mais que a IgG ^{1, 3}. Além disso, a IgY é menos flexível que a IgG, pois possui uma sequência mais rígida formando a região da dobradiça (Figura A.1) ³.

Figura A.1 - Comparação entre IgY de aves e IgG de mamíferos

Comparação geral das moléculas de IgY e IgG evidenciando a presença do domínio C_H4 e menor flexibilidade na região de dobradiça na imunoglobulina Y. (Adaptado de WARR; MAGOR e HIGGINS, 1995 ¹).

As vantagens em se utilizar IgY em imunodiagnóstico são variadas: devido a grande quantidade desta imunoglobulina encontrada na gema do ovo, cerca de 7 mg/mL; obtenção de anticorpos direto da gema, sem necessidade de realização de sangria do animal; menos interações cruzadas nos experimentos, visto que a IgY não ativa o sistema complemento de mamíferos, tampouco interage com o fator reumatoide e com receptores Fc, e menor custo para manutenção das galinhas produtoras de anticorpos, que, por sua vez, podem ser utilizadas em menor número do que os animais convencionais de laboratório devido a grande quantidade de anticorpos IgY sintetizados e acumulados na gema ^{4,5}.

Considerando as vantagens na utilização de anticorpos IgY em imunodiagnóstico, foram produzidos anticorpos IgY anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 (ver item 3.2 em material e métodos), para posterior análise da proteína NaPi2b potencialmente presente no soro das pacientes com diagnóstico definido de carcinoma ovariano e pacientes controle (ver item 3.11.1 em material e métodos).

2 METODOLOGIA E RESULTADOS

2.1 Produção e validação de anticorpos IgY

Os anticorpos IgY anti-peptídeos foram produzidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (UENF) e gentilmente cedidos para testes no Instituto Butantan, para tal etapa, foi solicitado ao Comitê de Ética em pesquisa envolvendo animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, o certificado de Isenção, visto que a utilização de galinhas para a produção dos anticorpos já havia sido aprovada na UENF. Os anticorpos foram encaminhados ao Laboratório de Imunoquímica em bolsas de 500 mL contendo tampão PBS acrescido de 29% de sulfato de amônio e foram mantidos a - 20°C até sua utilização.

2.2 Produção e validação de anticorpos IgY – Etapas realizadas na UENF

2.2.1 Biotério de Aves

No biotério de aves, localizado no Edifício P-4, CBB/UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, as galinhas usadas no projeto foram mantidas em gaiolas individuais com espaço suficiente para a movimentação do próprio animal, coleta de ovos, remoção das fezes e livre acesso à ração e água. As gaiolas eram dispostas em estantes para 20 gaiolas, localizadas em biotério isolado de 15m², com renovação permanente de ar, temperatura controlada (20-22 °C) e luminosidade ajustada para claro durante 15 h por dia. O acesso a esta sala foi restrito aos pesquisadores e pessoal de apoio envolvido no projeto (Figura A.2). Esta figura foi incluída com o propósito de demonstrar que as galinhas, durante a realização dos experimentos, ficam em instalações que atendem as normas internacionais recomendadas para o bem estar dos animais em experimentação. O estado sanitário das galinhas foi controlado por médico veterinário.

Figura A.2 – Galinhas imunizadas com peptídeos sintéticos

Galinhas poedeiras da raça *Rhode Island* mantidas em gaiolas individuais acondicionadas no biotério de aves (UENF) com livre acesso à ração e água.

2.2.2 *Animal produtor de anticorpos*

Galinhas poedeiras, raça *Rhode Island*, 12 semanas de idade, foram adquiridas de empresa de avicultura oficialmente registrada localizada no Estado do Espírito Santo. Antes da entrega ao “*Biotério de Aves*” da UENF, as galinhas foram vacinadas contra infecções aviárias prevalentes na região de origem. Os animais foram identificados com argolas numeradas na pata esquerda e mantidas durante todo experimento em gaiolas individuais. O projeto incluindo galinhas poedeiras como animal produtor de anticorpos, foi aprovado pelo “Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense- Darcy Ribeiro”.

2.2.3 *Esquema de Imunização*

Antes do início das imunizações, amostras de sangue e ovos foram coletadas para serem usadas como fontes de soro ou de IgY em controles negativos nas etapas posteriores. Os peptídeos conjugados com proteína carreadora D (PC-D) foram injetados nos músculos das asas (*i.m*) com intervalos de duas semanas entre as imunizações. Em cada imunização foram injetados 10 µg de peptídeo conjugado com PC-D em 1.0 mL de diluente. A primeira

imunização foi feita com os imunógenos emulsionados em adjuvante de Freund completo, e as dez seguintes com os imunógenos em solução de NaCl 0.15M. Os ovos, coletados diariamente, foram rotulados e armazenados em refrigerador a 4°C.

2.2.4 Obtenção e purificação dos anticorpos IgY

Os ovos foram coletados individualmente e identificados com dados referentes à galinha e à imunização. As gemas de cada lote foram recuperadas manualmente e transferidas para recipiente estéril contendo um volume de água estéril pH 5.5, correspondente a dez vezes o volume original de gemas. As gemas foram rompidas, o conteúdo suspenso por agitação e a suspensão deixada em repouso em refrigerador a 4 °C por 14-16 hs. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 1.0000 g por 30 min. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio, sob agitação, até atingir 29% de saturação. Uma parte desta solução foi submetida a diálise e concentração para serem tituladas por ELISA indireto, conforme descrito a seguir, e o restante mantido congelado a -20 °C na solução contendo sulfato de amônio.

Para a etapa de titulação, a solução de anticorpos com sulfato de amônio foi mantida em temperatura ambiente, com pH reajustado para 7,4 – 7,5, sob agitação por 2h, e centrifugada a 1.0000 g por 30 min. O precipitado foi dissolvido em NaCl 0.15 M e dialisado contra esta solução até completa remoção do sulfato de amônio. O conteúdo em proteínas totais foi determinado pelo método de BCA, de acordo com instruções do fabricante. A concentração final em proteínas foi ajustada para 10 mg/mL, e os anticorpos distribuídos em alíquotas de 50 mL em bolsas de plástico e congeladas a -20 °C até sua utilização.

2.2.5 Detecção e quantificação dos anticorpos IgY

Anticorpos IgY anti-peptídeos foram titulados por ELISA indireto e os antígenos reconhecidos e a integridade dos anticorpos purificados foram avaliados por *Western blotting*.

2.2.5.1 ELISA indireto

Cem microlitros de tampão carbonato de sódio, pH 9.6, contendo 1 µg de peptídeo, conjugado ou livre, como indicado para cada ensaio, foram depositados nos poços de placas de poliestireno, e incubados a 4 °C por cerca de 12 h. Em seguida, os poços foram lavados

com tampão PBS contendo 0.05% Tween 20. O bloqueio dos espaços não ocupados pelos peptídeos foi realizado por 1 h, a temperatura ambiente, com 150 µl do tampão PBS contendo 1% de gelatina. Os poços foram lavados com 300µl de PBS / 0.05% Tween 20. Cem microlitros das preparações de IgY diluídas em tampão PBS contendo 1% de gelatina, foram adicionados aos poços.

As preparações de IgY foram diluídas, a intervalos seriados, de 1:1.000 a 1:512.000. Nos poços controle, tampão PBS / 1% de gelatina ou preparações de IgY de ovos coletados antes da imunização foram usados como controle. As placas foram em seguida, incubadas a 37°C por 45 min. Após a incubação os poços foram lavados cinco vezes com tampão PBS / 0.05% Tween 20. Cem microlitros do segundo anticorpo, IgG de coelho anti-IgY marcado com peroxidase (Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, U.S.A.) ou Calbiochem Novabiochem (Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, Califórnia, USA.)) diluído 1:800 em tampão PBS / 1% de gelatina foram adicionados em cada poço e as placas incubadas a 37 °C por 45 min. Após cinco lavagens dos poços com tampão PBS / 0.05% Tween 20, 50 µl da solução de substrato (5 mL de tampão citrato acrescido de 5 mg de OPD e 5 µl de H₂O₂) foram adicionados e as placas incubadas em temperatura ambiente por 10-15 min. A reação de desenvolvimento de cor foi interrompida com adição de 50 µl de H₂SO₄ 3N e a absorbância foi lida a 492nm. Os gráficos foram construídos projetando diluições (abscissas) *versus* O.D. (ordenadas). Os títulos foram calculados em unidades ELISA, conforme descrito abaixo.

Uma unidade ELISA (U-ELISA) corresponde à menor quantidade de anticorpo que, nas condições do ensaio, resulta em D.O., 0.2, desde que as absorbâncias dos controles negativos sejam em torno 0.05. O número total de U-ELISA em 1 mL da preparação de anticorpo foi calculado considerando a diluição que corresponde à D.O. de 0.2 e o volume de 100 µL usado no teste. Os títulos obtidos no decorrer das imunizações foram crescentes, com título aproximado de 6×10^6 U-ELISA (pelo método de *endpoint*, aproximadamente título de 1:600.000) na última imunização (dados não mostrados).

2.2.5.2 SDS-PAGE e Western blotting

Peptídeos conjugados ou proteína carreadora livre (20µg/poço) foram diluídos em tampão de amostra sob condições redutoras e submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 15%. Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de PVCF (Immobilon P), tratadas com metanol a 37 °C por 15 min e bloqueadas por imersão em tampão PBS

contendo 5% de leite desnatado em temperatura ambiente por 30 min. Após lavagem, as membranas foram incubadas com preparações de IgY diluídas em tampão PBS contendo 1% de gelatina. Em seguida, as membranas foram incubadas, sob agitação por 60 min em temperatura ambiente, com IgG de coelho anti-IgY marcado com peroxidase (Santa Cruz ou Calbiochem Novabiochem), diluído 1:800 em tampão PBS. Após lavagem, as membranas foram transferidas para a solução substrato (ácido cítrico, 5.0 mg de DAB e 3 μ L de H₂O₂) e as bandas reveladas foram avaliadas. A metodologia empregada para avaliar a integridade dos anticorpos IgY purificados foi semelhante. Os anticorpos purificados foram submetidos à corrida eletroforética e após bloqueio incubados com anticorpo secundário anti-IgY. Os anticorpos apresentaram duas bandas majoritárias, cadeias L e H, reconhecidas pelo anticorpo anti IgY, evidenciando a integridade destes anticorpos após processo de purificação. Quando submetidos ao teste para reconhecimento dos antígenos sintéticos, os anticorpos reconheceram apenas os peptídeos conjugados, não reconhecendo a proteína carreadora livre e não havendo reação cruzada entre peptídeos (dados não mostrados).

2.3 Reavaliação dos anticorpos IgY – Etapa realizada no Instituto Butantan

2.3.1 Análise dos anticorpos IgY por ELISA indireto

Para avaliar os títulos dos anticorpos anti-peptídeos, inicialmente foram realizados ensaios de ELISA com metodologia padrão do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, como descrito em material e métodos no item 3.7., bem como metodologia realizada na UENF (ver item 2.2.5.1 neste apêndice). No entanto, não foi observado resultado positivo como havia ocorrido nos ensaios para validação inicial realizados na UENF, por isso, foram feitas variações nas etapas da técnica de ELISA indireto.

As variações contemplaram mudanças em todas as etapas do teste, desde alterações nas placas utilizadas (Coastar High Binding, Immulon High Binding, Nunc Marx Sorp High Binding e Greiner Bio One Medium e High Binding), diferentes lotes de peptídeos (1º ao 4º lote), bem como: alteração da quantidade de antígeno para a sensibilização da placa (1 μ g a 20 μ g/poço), tampão de sensibilização (PBS pH 7.4 ou TCB pH 9.6), número de lavagens (1 até 5 lavagens por etapa, com e sem intervalo de 5 minutos entre elas), quantidade de tampão de lavagem por poço (150 μ L a 300 μ L), diferentes concentrações de quatro tipos de bloqueio (gelatina 1% a 10%, soro fetal bovino puro ou 10%, BSA 5 a 10% e leite desnatado 5% a 10%, todos diluídos em PBS), diferentes tratamentos para purificação dos anticorpos

anti - peptídeos, bem como diferentes diluições dos anticorpos e troca de tampão (para purificação, as bolsas de anticorpos sofreram saturação com sulfato de amônio em concentrações variando de 29% a 55%, além de terem passado por testes de purificação com Polietilenoglicol 4.000 (PEG 4.000) e ácido caprílico, ambos seguidos de diálise convencional e dosagem proteica e diluições de 1:10 até 1:16.000 dos anticorpos IgY e PBS acrescido ou não de Tween 20 em diferentes concentrações de todas as soluções utilizadas para o bloqueio), anticorpos secundários anti-IgY de diferentes fabricantes e em diferentes tampões e diluições (Santa Cruz, Calbiochem e Sigma Aldrich, diluídos em tampão PBS acrescido ou não de Tween 20 com diferentes concentrações de todas as soluções utilizadas para o bloqueio, com diluições variando de 1:500 até 1:7500), e diferentes concentrações do tampão de revelação, bem como o tempo destinado para tal (o tampão para revelação, contendo tampão citrato, OPD e H_2O_2 , variou na concentração de OPD de 2 a 5 mg a cada 5 mL de tampão citrato, a quantidade de H_2O_2 30 V foi sempre constante, 5 μ L a cada 5 mL de tampão). As leituras foram feitas sempre em filtros variando de 490 a 492 nm, em leitor Biotek US, Winooski, VT ou Labsystems Multiskan Ex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, respectivamente.

Os controles negativos das placas sempre se alteravam de acordo com a metodologia, no entanto, quando era possível baixar a D.O.s dos controles para o estipulado 0,05, as D.O.s dos anticorpos também caíam. Então, embora tendo realizado diversas mudanças em todas as etapas do ELISA durante aproximadamente um ano e meio de trabalho, não foi possível reproduzir os ensaios de validação com peptídeos sintéticos realizados na UENF.

2.3.2 Verificação da integridade e reatividade de anticorpos IgY por Western blotting

Os anticorpos tiveram sua integridade avaliada por SDS-PAGE e *Western blotting*, seguindo metodologia padrão (ver itens 3.9.1.1 e 3.9.1.3 em material e métodos), utilizando 20 μ g/poço de anticorpo purificado para a corrida eletroforética sob condições redutoras, seguida de eletrotransferência para membranas de nitrocelulose com incubação com anticorpo secundário anti-IgY conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:800. Para avaliação do reconhecimento dos peptídeos pelos anticorpos IgY, os peptídeos conjugados (20 μ g/poço), foram submetidos a corrida eletroforética e *Western blotting*.

Embora aparente integridade dos anticorpos IgY observada por SDS-PAGE (Figura A.3a) e *Western blotting* (Figura A.3b), com cadeias pesadas e leves com bandas majoritárias em torno de 65 kDa e 18 kDa, respectivamente, como esperado, quando utilizados os

peptídeos sintéticos como antígenos, os anticorpos IgY não reconheceram nenhuma banda, corroborando os resultados obtidos por ELISA.

As etapas do *Western blotting* utilizando peptídeos como antígenos, também foram submetidas à variações em lavagens, bloqueio e diluição dos anticorpos, que, de maneira semelhante ao ELISA, não obteve sucesso em todas as tentativas realizadas.

Figura A.3 - Detecção e caracterização de IgY por SDS-PAGE e *Western blotting*

(A) SDS-PAGE com gel de empacotamento e gel de corrida, contendo 5% e 10% de acrilamida, respectivamente, seguido de coloração por impregnação por nitrato de prata, de anticorpos IgY anti-peptídeos Let#1 e anti-Let#2 (20 µg/poço); (B) *Western blotting* de anticorpos IgY anti-peptídeos Let#1 e anti-Let#2, revelados com anticorpo secundário anti IgY conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:800.

3 DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

A utilização de anticorpos IgY em técnicas de imunodiagnóstico se mostra promissora devido a grande quantidade de anticorpos acumulados na gema do ovo, seguida da ausência da necessidade de sangria do animal, bem como menor chances de interferências experimentais devido a distância filogenética entre aves e mamíferos.

Anticorpos IgY anti-peptídeos sintéticos Let#1 e Let#2 foram produzidos e devidamente validados na UENF como possíveis identificadores da proteína NaPi2b nativa. Posteriormente, foram encaminhados ao Instituto Butantan para reavaliação dos títulos anti-peptídeos, bem como análise de NaPi2b nativa e potencialmente presente no soro de pacientes e doadoras controle.

Como descrito anteriormente, as amostras de anticorpos IgY foram encaminhadas ao Instituto Butantan em bolsas de 500 mL contendo tampão PBS acrescido de 29% de sulfato de amônio e foram mantidas a -20 °C até sua utilização. Os ensaios de reavaliação foram realizados conforme validação inicial, no entanto, os anticorpos IgY não mostraram reconhecimento dos antígenos sintéticos, apesar de variações nas técnicas empregada na tentativa de obter melhores resultados.

Sabe-se que o pH do sulfato de amônio está em torno de 5-6, mas pode se tornar mais ácido dependendo da concentração da solução. De acordo com Shimizu et al., 1992 ⁴, a IgY resiste muito menos a condições ácidas do que a IgG de mamíferos. Nestas condições, a imunoglobulina Y muda sua conformação e perde rapidamente sua atividade. Portanto, é plausível sugerir que possivelmente tenha sido o armazenamento prolongado destes anticorpos com solução contendo sulfato de amônio, o responsável pela perda de reatividade com os peptídeos sintéticos.

Considerando estas evidências, é plausível sugerir mais conveniente manter os anticorpos IgY apenas em solução de PBS após diálise, com armazenado em freezer -20°C, além de avaliação periódica dos títulos obtidos inicialmente.

Portanto, apesar da aparente integridade dos anticorpos IgY, demonstrada por SDS-PAGE e *Western blotting*, os anticorpos não reconheceram os peptídeos sintéticos por ELISA e *Western blotting* no Instituto Butantan, não sendo possível a reprodução dos resultados obtidos na UENF.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **568/12** referente ao projeto intitulado: *"Anticorpos IgY Identificadores de Câncer Ovariano: Produção e Validação: Estudo Piloto"* sob a responsabilidade de **Angela Alice Amadeu**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

São Paulo, 14 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Vice Coordenador da CEUA-ICB/USP

REFERÊNCIAS[‡]

1. WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunol. Today**, v. 16, n. 8, p. 392-398, 1995.
2. LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **J. Exp. Med.**, v. 130, n. 6, p. 1337-1352, 1969.
3. CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody - In vitro and in vivo**. 2002. 53 p. (Ph. D. Thesis in Clinical Chemistry) - Faculty of Medicine, Uppsala University, Uppsala, 2002.
4. SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, n. 2, p. 270-274, 1992.
5. HADGE, D.; AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins. IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. **Mol. Immunol.**, v. 21, n. 8, p. 699-707, 1984.

[‡] De acordo com: