Verônica do Carmo Neves de Gouveia

Clonagem e sequenciamento de genes que expressam proteínas ósseas reconhecidas por anticorpos monoclonais produzidos a partir de células de osteossarcoma humano (MG-63)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dr^a Luciene Machado dos Reis

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gouveia, Verônica do Carmo Neves de
Clonagem e sequenciamento de genes que expressam proteínas ósseas reconhecidas
por anticorpos monoclonais produzidos a partir de células de osteossarcoma humano
(MG-63) / Verônica do Carmo Neves de Gouveia. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientadora: Luciene Machado dos Reis.

Descritores: 1.Osteosarcoma 2.Osteoblastoma 3.Osteocalcina
4.Osteonectina 5.Anticorpos monoclonais 6.Biblioteca gênica 7.Neoplasias
ósseas

USP/FM/DBD-250/14

DEDICATÓRIA

*Meu querido vô Expedito, é com seu exemplo de
otimismo que sempre quero viver.
“Cada vez melhor!!!”*

AGRADECIMENTOS

Dra Luciene Machado dos Reis, em primeiro lugar preciso agradecer a você. Mesmo assim faltarão palavras...Obrigada por me aceitar como sua orientanda! Foi um prazer grande aprender com você em todas as etapas desse trabalho, e fora também. Muito obrigada pela oportunidade, pela atenção, pela paciência e pela confiança. Obrigada por ser este exemplo de dedicação, de persistência e de otimismo. Nada foi fácil, porém chegar a uma resposta por menor que ela seja, à compreensão do que se está fazendo, a visualização e a sensação de “*deu certo!*” são os combustíveis que eu tive para chegarmos até aqui. Obrigada!!

Dra Vanda Jorgetti, muitíssimo obrigada por tudo! Por desde o meu primeiro dia de laboratório me acolher como mais um ser querendo aprender mais. No mestrado, obrigada por todo apoio, toda vibração, toda atenção! Mas fora deste trabalho, obrigada absolutamente por tu-do! A senhora abriu o caminho nas vidas de muitas pessoas, mas muitos caminhos na minha vida. Apenas obrigado é muito pouco para retribuir, mas aceite todo o meu respeito, minha admiração como mais uma pequena parte do meu “muito obrigada!”

Wagner, você é mais uma pessoa essencial que tive ao meu lado nesse trabalho. Não existe pessoa mais legal que você nesse mundo!! Obrigada por todo auxílio técnico, contudo muito obrigada pela companhia nas noites que seriam solitárias, obrigada por ter a opinião, a resposta que eu precisava, por dar aquela mãozinha... Espero que possa corresponder a esse apoio com o enorme carinho que tenho por você! Nunca vou me esquecer de todas as nossas trapalhadas no laboratório =)

Dr Renato Costa Monteiro e Dr Marc Benhamou, muito obrigada por toda a colaboração para nos ajudar na compreensão das nossas dificuldades nesse trabalho. É um prazer enorme poder ter realizado esse trabalho em conjunto

com pessoas tão experientes e que nos impulsionaram nessa jornada. Merci beaucoup!!

Dra Cláudia Regina G.C.M de Oliveira, Dr Renato José M. Natalino e Sérgio do Serviço de Patologia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP muito obrigada pela contribuição neste trabalho. Obrigada pelo incentivo e que essa ferramenta possa realmente contribuir futuramente para aprendermos cada vez mais sobre esse desafiador mundo dos tumores ósseos.

Fabiana pelo enorme apoio na imunohistoquímica, pela companhia neste período e pelos bate-papos.

Meire obrigada pelo apoio com a imensa quantidade de materiais que eu usei, sem você estaríamos perdida.

Às inesquecíveis: Ivone, Simone, Camilla, Priscilla, Tatiane, Flávia Machado, Flávia Siqueira, e Roxana que dividiram comigo inúmeros momentos alegres, tristes, estressantes, mas também dividiram opiniões, materiais, protocolos, dúvidas, relatórios do PAE, western blots, etc. A pós-graduação teria outro gosto se não fosse recheada de pessoas assim. Obrigada meninas.

Ao grupo de Osteodistrofia Renal e a toda equipe do LIM 16, que com certeza contribuíram cada um com um pedacinho para que eu pudesse chegar até aqui!

À minha querida família queria agradecer todo o apoio! À torcida da minha querida avó Dona Juraci, minha mãe Regina, meu pai Osvaldo e minha tata Débora. Obrigada por entenderem o período de dedicação que isso exige, mas é uma realização!

Tia Ruth, minha guarda-costas, obrigada por cada hora de sono que você perdeu porque eu cheguei mais tarde e muito obrigada por cada detalhe que fez totalmente a diferença nos meus incansáveis dias de correria.

Claiton, muito obrigada pelo incentivo a trilhar esse caminho. É muito proveitoso discutir, dividir, refletir com você. Muito obrigada pelo exemplo que você representa, e se hoje você está lendo este trabalho é porque você teve um importante papel nisso.

Às minhas amigas Daiana, Bianca, Karina Yumi e Karina Nunes, que sempre estão presentes (mesmo às vezes à distância), mas que me mostraram como eu sou capaz de coisas que às vezes nem eu imagino. Daiana, em especial, você é uma irmã a mais que eu tenho. Muito obrigada a todas!

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Células mesenquimais e osteoprogenitores	1
1.2. Células da linhagem osteoblástica: Características morfológicas e funcionais	3
1.3. Marcadores fenotípicos e de diferenciação das células da linhagem osteoblástica	5
1.4. Anticorpos Monoclonais	8
1.5. Anticorpos monoclonais PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9	10
1.5.1. Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais em tecido ósseo, tecido muscular, tecido cardíaco e adiposo.....	10
1.5.2. Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais em células ósseas obtidas de fragmento ósseo normal e de pacientes com doenças ósseas metabólicas.....	11
1.6. Tumores ósseos.....	12
2. OBJETIVOS	14
3. MÉTODOS.....	15
3.1. Purificação dos anticorpos monoclonais (Mabs) PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9.....	15
3.2. Avaliação da viabilidade dos Mabs.....	16
3.2.1. Cultivo de Células MG-63.....	16
3.2.2. Citometria de Fluxo.....	16
3.2.3. Western Blot (WB).....	17
3.2.4. Titulação da biblioteca de cDNA	18
3.2.5. Isolamento do cDNA codificador para os antígenos reconhecidos pelos Mabs	19
3.2.6. Titulação do bacteriófago <i>Helper ExAssist</i>	22
3.2.7. Amplificação do título do bacteriófago λ <i>Zap Express</i> com o trecho de cDNA de interesse para o protocolo de excisão <i>in vivo</i>	23
3.2.8. Excisão <i>in vivo</i> dos fagemídeos pBK-CMV, que contém os insertos de cDNA clonados, dos bacteriófagos λ <i>Zap Express</i>	24
3.2.9. Minipreparação e análise da digestão dos insertos de interesse em gel de agarose.....	25
3.2.10. Purificação do cDNA do fagemídeo pBK-CMV com os insertos de interesse.....	27
3.2.11. Sequenciamento dos insertos clonados inseridos no DNA do fagemídeo pBK-CMV.....	28
3.2.12. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados	28
3.2.13. Expressão dos Mabs em tumores ósseos	28
3.2.14. Expressão do Mab PSP85-9, da osteocalcina e da osteonectina em osteoblastomas e osteossarcomas.....	30
3.2.14.1. Avaliação semiquantitativa da imunomarcação.....	30
3.2.15. Análise estatística.....	31

4. RESULTADOS	32
4.1. Purificação dos anticorpos monoclonais (Mabs) PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9.....	32
4.2. Avaliação da viabilidade dos Mabs por citometria de fluxo	33
4.3. Avaliação da viabilidade dos Mabs em Western Blot.....	34
4.4. Titulação da biblioteca de cDNA.....	34
4.5. Isolamento do cDNA codificador para os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais PSP 42-22 e PSP 85-9.....	35
4.5.1. Triagem primária do cDNA codificador para o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal PSP 42-22.....	35
4.5.2. Triagem secundária do cDNA para o Mab PSP 42-22	36
4.5.3. Triagem terciária do cDNA para o Mab PSP 42-22.....	37
4.5.4. Triagem quaternária do cDNA para o Mab PSP 42-22	38
4.6. Triagem do cDNA codificador para o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal PSP 85-9	39
4.6.1. Triagem primária do cDNA codificador para o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal PSP 85-9	39
4.6.2. Triagem secundária do cDNA para o Mab PSP 85-9	41
4.6.3. Triagem terciária do cDNA para o Mab 85-9.....	42
4.6.4. Triagem quaternária do cDNA para o Mab 85-9	43
4.7. Titulação do bacteriófago <i>Helper ExAssist</i>	44
4.8. Amplificação do título do bacteriófago λ <i>Zap Express</i> com o trecho de cDNA de interesse na excisão in vivo.....	44
4.9. Excisão in vivo dos fagemídeos pBK-CMV, com os insertos de cDNA clonados, dos bacteriófagos λ <i>Zap Express</i> , minipreparação e análise da digestão dos insertos de interesse	45
4.10. Sequenciamento dos insertos clonados inseridos no DNA do fagemídeo pBK-CMV	47
4.10.1. Sequenciamento relativo ao PSP 42-22	47
4.10.2. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados relativo ao PSP 42-22.....	48
4.10.3. Sequenciamento relativo ao PSP 85-9 – clone 1A12-2.....	51
4.10.4. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados relativo ao PSP 85-9 – clone 1A12-2.....	52
4.10.5. Sequenciamento relativo ao PSP 85-9 – clone 1A15-3.....	55
4.10.6. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados relativo ao PSP 85-9 - clone 1A15-3.....	56
4.11. Análise histológica das biópsias	59
4.12. Análise imunohistoquímica	60
4.12.1. Expressão da proteína reconhecida pelo Mabs PSP 4-5, PSP 42-22, PSP 85-9, em tumores ósseos	60
4.12.2. Expressão da proteína reconhecida pelo Mab PSP 85-9, da osteocalcina e da osteonectina em osteoblastomas e osteossarcomas	62
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	72
7. ANEXOS	73
8. REFERÊNCIAS	92

RESUMO

Gouveia VCN. *Clonagem e sequenciamento de genes que expressam proteínas ósseas reconhecidas por anticorpos monoclonais produzidos a partir de células de osteossarcoma humano (MG-63)*. [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A partir de células de osteossarcoma humano (MG-63) que tem características de osteoblastos imaturos produzimos anticorpos monoclonais (Mabs) nomeados PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9. Esses anticorpos reconhecem antígenos de 100, 26 e 20 kDa respectivamente. Avaliamos a especificidade dos mesmos, testando suas expressões em cortes congelados de tecidos oriundos da mesma célula mesenquimal, ou seja, osso, cartilagem, músculo cardíaco e tecido adiposo. Os anticorpos marcaram o perióstio, com distintos padrões de expressão, porém o PSP 42-22 foi o mais específico marcando a camada osteogênica do perióstio. Os anticorpos marcaram também células ósseas. Diante desses resultados nosso objetivo, no presente estudo, foi identificar os antígenos reconhecidos por esses anticorpos usando clonagem e sequenciamento dos genes em biblioteca de cDNA com capacidade de expressão proteica. Outro objetivo foi testar os anticorpos, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), em tumores ósseos primários visando estabelecer os padrões de marcação e se diferenciavam os diferentes tipos de tumores. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos PSP 42-22 e PSP 85-9 foram isolados, purificados e sequenciados. Devido ao elevado peso molecular do PSP 4-5 necessitaremos de outras técnicas para isolar o clone que codifica seu antígeno. O sequenciamento do clone isolado pelo PSP 42-22, mostrou uma sequência com 99% de homologia descrita no "*Homo sapiens*" como sendo "*serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3*". A proteína SDCCAG3 foi descrita pela primeira vez em 1998 como um antígeno de câncer de cólon reconhecido por anticorpo autólogo. Vale lembrar que antígeno reconhecido pelo nosso anticorpo tem um peso molecular de aproximadamente 26 kDa, inferior ao da proteína SDCCAG3. Essa diferença poderia ocorrer devido a uma diferença no local da tradução do mRNA das células MG-63, produzindo uma proteína menor (isoforma), ou no clone isolado (3B2-3-1), poderia ocorrer uma mutação produzindo uma proteína mais curta que se expressaria na membrana celular ao contrário de uma proteína mais longa. Já o alinhamento das sequências obtidas dos clones isolados utilizando o PSP 85-9, mostrou uma sequência com 100% de concordância descrita com a porção não codante da proteína "*Homo sapiens microtubule associated protein, RP/EB family, member 1 (MAPRE1)*" portanto um falso positivo; já o clone 1A5-1-3, mostrou uma sequência de 99% de homologia com a proteína "*Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8*". Trata-se de uma proteína de membrana, com 6 isoformas diferentes que pode interagir com o receptor de serotonina. O resultado da IHQ nos tumores ósseos testados mostrou que o PSP 4-5 se expressou predominantemente no citoplasma de osteossarcoma, condrossarcoma e leiomiossarcoma e no núcleo de osteoblastoma. O anticorpo PSP 42-22 não reconheceu nenhum antígeno nos tumores avaliados. Quanto ao anticorpo PSP 85-9 nos condrossarcomas e leiomiossarcomas a expressão

foi predominante citoplasmática e nos osteossarcomas e osteoblastoma foi nuclear.

Em conclusão, identificamos os antígenos de dois dos anticorpos estudados que apresentam potencial diagnóstico diferencial em tumores ósseos primários.

Descritores: Osteossarcoma; Osteoblastoma; Osteocalcina; Osteonectina; Anticorpos monoclonais; Biblioteca gênica; Neoplasias ósseas.

SUMMARY

Gouveia VCN. *Cloning and sequencing genes that express bone proteins recognized by monoclonal antibodies produced from human osteosarcoma cells (MG63)*. [Dissertation] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

From human osteosarcoma cells (MG-63), which have characteristics of immature osteoblasts, we produced monoclonal antibodies (Mabs) named PSP 4-5, PSP 42-22 and PSP 85-9. These antibodies recognize antigens with 100, 26 and 20 kDa, respectively. We evaluated their specificity by testing their expression in frozen tissue sections from the same mesenchymal cells, that is, bone, cartilage, cardiac muscle and adipose tissue. The antibodies stained the periosteum, with distinct patterns of expression, but PSP 42-22 was the most specific, scoring the osteogenic layer of the periosteum. The antibodies also marked bone cells. With these results, our goal in this study was to identify the antigens recognized by these antibodies using cloning and sequencing of the genes in the cDNA library with capacity of protein expression. Another objective was to test the antibodies by immunohistochemistry (IHC) in primary bone tumors to establish standards for marking and whether they set apart different types of tumors. The antigens recognized by the PSP 42-22 and PSP 85-9 antibodies were isolated, purified and sequenced. Due to the high molecular weight of PSP 4-5 we will need other techniques to recognize its antigen. Sequencing of the clone isolated using the PSP 42-22 showed a sequence with 99% homology described in "*Homo sapiens*" as being "serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3". The SDCCAG3 protein was first described in 1998 as a colon cancer antigen recognized by autologous antibody. It is worth remembering that the antigen recognized by our antibody has a molecular weight of approximately 26 kDa, lower than the SDCCAG3 protein. This difference could be due to a difference in mRNA translation site of MG-63 cells producing a lower protein; or on the isolated clone (3B2-3-1) a mutation could occur producing a shorter protein that expresses in the cell membrane instead of a longer protein. The alignment of the sequences obtained from isolated clones using the PSP 85-9 showed a sequence with 100% of homology described with the non-coding protein portion "*Homo sapiens microtubule associated protein, RP/EB family, member 1 (MAPRE1), mRNA*" therefore, a false positive; 1A5-1-3 clone showed a 99% homology sequence with the protein "*Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA*". It is a membrane protein with 6 different isoforms which can interact with the serotonin receptor.

The result of IHC in bone tumors tested showed that PSP 4-5 expressed predominantly in the cytoplasm of osteosarcoma, chondrosarcoma, leiomyosarcoma and osteoblastoma in was in nucleus. The PSP 42-22 antibody did not recognize any antigen in the tumors examined. As for the PSP 85-9 antibody in chondrosarcoma and leiomyosarcoma, the expression was predominantly cytoplasmic and the osteoblastoma was nuclear in osteosarcomas.

In conclusion, we have identified the antigens of two of the antibodies studied which have potential differential diagnosis in primary bone tumors.

Keywords: Osteosarcoma; Osteoblastoma; Osteocalcin; Osteonectin; Monoclonal antibodies; Gene library; Bone neoplasms.

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo composto de matéria orgânica e inorgânica (cristais de hidroxiapatita) e células da linhagem osteoblástica (pré-osteoblastos, osteoblastos maduros, *lining cells* e osteócitos) e osteoclástica¹. O esqueleto compreende 213 ossos que protegem órgãos vitais, como o cérebro, coração e pulmão, e permite a locomoção através da inserção dos músculos esqueléticos, além de manter a integridade mecânica e participar da homeostase mineral e da regulação do metabolismo energético^{2,3}.

O tecido ósseo sofre influência de diversos hormônios e fatores locais⁴ e é renovado continuamente por um processo denominado remodelação óssea, que acontece de modo randômico ou em áreas que necessitam de reparos. Como todas as células do organismo, as células ósseas também são constantemente renovadas, existindo uma grande reserva de seus progenitores. Os osteoblastos atuam na formação e os osteoclastos na reabsorção do tecido ósseo⁵. Nos últimos anos, a origem e diferenciação dessas células, especialmente da linhagem osteoblástica, foram muito estudadas^{1,3,6,7}.

1.1. Células mesenquimais e osteoprogenitores

Friedenstein *et al.* (1966)⁸ e Owen *et al.* (1988)⁹ foram os primeiros autores a melhor caracterizar as células mesenquimais, descrevendo-as como aderentes, clonogênicas, não fagocitárias e com características fibroblásticas. Essas células foram definidas como unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-Fs), ou seja, em condições apropriadas, colônias de células distintas são formadas, sendo que cada uma é derivada de um único precursor – as CFU-Fs. Estudos demonstraram que as CFU-Fs são heterogêneas em morfologia, tamanho e potencial de diferenciação. Essas colônias também possuem uma hierarquia, onde somente algumas são células mesenquimais multipotenciais e outras têm capacidade de diferenciação mais restrita¹.

Estudos utilizando técnicas de diluição limite ou baixa densidade mostraram que somente uma parte das CFU-Fs são fosfatase alcalina positivas (CFU-ALP) e dessas uma proporção é osteogênica (CFU-O)¹⁰ enquanto outras, sob a ação de fatores transcricionais específicos, podem se diferenciar em mioblastos (*MyoD*), adipócitos (*PPAR γ 2*, *C/EBPs*), fibroblastos e condroblastos (*SOX9*)^{11,12}. As células osteogênicas localizam-se principalmente nas superfícies internas e externas dos ossos, chamados endóstio e perióstio respectivamente, e na medula óssea¹³.

Em 2006 um consenso internacional publicou as características “*in vitro*” das células mesenquimais humanas multipotentes (“*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*”). Resumidamente, essas características são:

- ✓ Aderência: característica das unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F);
- ✓ Potencial de diferenciação: deve ter potencial para diferenciação em diferentes linhagens celulares como os osteoblastos, adipócitos e condrócitos;
- ✓ Expressão de antígenos específicos: Não existe um único antígeno capaz de caracterizar as células mesenquimais. Os autores listaram vários anticorpos como, por exemplo, a expressão de antígenos CD105 (endoglina – glicoproteína de endotélio vascular reconhecida pelo anticorpo monoclonal -Mab- SH2), CD73 (ecto 5' nucleotidase – reconhecida pelo Mab SH3 e SH4) e CD90 (Thy-1) que devem estar presentes em pelo menos 95% da população celular sendo que menos de 2% poderiam expressar antígenos hematopoiéticos como CD45 (marcador pan-leucocitário), CD34 (marcador de progenitor hematopoiético e células endoteliais), CD14 ou CD11b (marcador expresso em monócitos e macrófagos), CD79 α ou CD19 (marcador de linfócitos B) e HLA classe II ¹⁴.

1.2. Células da linhagem osteoblástica: Características morfológicas e funcionais

Os pré-osteoblastos localizam-se próximos dos osteoblastos, são células alongadas, assim como seus núcleos¹⁵. Embora os pré-osteoblastos assemelhem-se histologicamente aos osteoblastos, ainda não adquiriram muitas das características da célula madura¹⁶. Alguns marcadores fenotípicos como a fosfatase alcalina estão presentes nos dois tipos de célula³. A fase de formação da remodelação óssea inicia-se com a migração dos pré-osteoblastos para os locais onde ocorreu previamente a reabsorção osteoclástica (fase reversa). Essas células irão se diferenciar em osteoblastos maduros, promovendo a deposição e mineralização da matriz osteóide¹⁷.

Os osteoblastos maduros são células mononucleares com aspecto cubóide, basófilas, com retículo endoplasmático rugoso extenso e complexo de Golgi bem desenvolvido⁴, além de possuírem grande número de mitocôndrias¹⁵. Os osteoblastos ativos são ricos em fosfatase alcalina e secretam grandes quantidades (20% do total) de colágeno tipo I e de proteínas não colágenas, como a osteocalcina¹⁸. Os osteoblastos também possuem receptores para um grande número de hormônios e fatores reguladores da remodelação óssea (por exemplo, paratormônio – PTH, vitamina D, prostaglandinas, citocinas, estrógeno e TGF- β)¹⁵. Os osteoblastos recebem “sinais sistêmicos”, sintetizam proteínas que recrutam e estimulam os osteoclastos, promovendo assim a reabsorção óssea. Uma vez que os osteoclastos não reabsorvem o tecido ósseo nos locais onde osteoblastos intactos ou células estromais estão alinhadas, a presença ou ausência dessas células determinariam o local onde a reabsorção irá ocorrer¹⁹.

Os osteócitos são células diferenciadas, não proliferativas, localizados na matriz osteóide recém-sintetizada assim como na matriz mineralizada. Derivam do osteoblasto ativo que é enclausurado na matriz durante o processo de formação óssea²⁰ e representa entre 90 e 95% de todas as células ósseas²¹. Essas células se conectam com outras células adjacentes através de projeções citoplasmáticas dentro de canais denominados canalículos¹. São consideradas pouco ativas metabolicamente e, durante a transformação dos

osteoblastos em osteócitos, os primeiros perdem cerca de 70% do volume celular²¹.

Nos últimos anos, as funções dessas células foram muito estudadas. Os osteócitos possuem propriedades mecanossensoras, ou seja, são capazes de perceber tensões mecânicas e traduzi-las, como sinais bioquímicos, para outras células. O melhor conhecimento das funções dos osteócitos fez com que fossem colocados no comando da remodelação e mineralização óssea. Na tabela 1 estão descritas as principais proteínas produzidas por essas células, entre elas a esclerostina, o ligante do receptor do ativador de fator nuclear κ B (RANKL) envolvidas na remodelação^{20,22} e o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23), um dos hormônios que atuam na homeostase do fósforo^{23,24}.

Quanto às *lining cells*, trata-se de células achatadas e alongadas com poucas organelas sugerindo que são pouco ativas. Acredita-se que são derivadas de osteoblastos que cessaram sua atividade¹⁶. Especula-se que, por estarem próximas aos osteócitos, atuem como barreira seletiva entre o osso e a medula além de participar na homeostase mineral através da regulação dos fluxos de cálcio e fósforo. Essas células, em determinadas condições, podem se diferenciar em osteoblastos ativos²⁵. Acredita-se que o paratormônio (PTH) atue nessa diferenciação^{26,27}. Nos últimos anos demonstrou-se que as *lining cells* participam da remodelação óssea, onde formam uma estrutura conhecida como "*canopy*", que sinaliza e isola a região a ser remodelada²⁸.

1.3. Marcadores fenotípicos e de diferenciação das células da linhagem osteoblástica

Na figura 1 estão descritos os estágios de diferenciação da célula mesenquimal até o osteócito, bem como os principais marcadores de cada um dos estágios (enzimas, proteínas colágenas e não colágenas), dos fatores e receptores que contribuem para o fenótipo, moléculas de adesão, e os reguladores transcricionais envolvidos. Os estágios de proliferação e diferenciação das células osteoblásticas são determinados pela expressão de moléculas, que são célula ou tecido-específicas¹⁰.

Como observado na Figura 1, a maior parte dos marcadores são detectados nos estágios mais diferenciados. Há também outras proteínas que são usadas para identificar as fases da diferenciação dessas células. Algumas estão listadas na tabela 1^{16,27, 29, 30,31, 32, 33, 34,35}.

Fatores Transcricionais

Runx2	+?	+	+	+	+	+
Osx	-	-	-	+	+	+
Enzimas						
FA	-	-	-	++	+++	-
Phex	-	-	-	-	++	+++

Matriz extracelular

Col III	-?	-	+	++	+	++	-
OPN	+?	-/+	-/+	-/+	- → +	- → +++	- → +++
BSP	-	-	++	-	- → +++	- → +++	- → +++
OCN	-	-	-	-	-	- → +++	-

Fatores e receptores

PTH1R	?	-	-	-/+	++	++	++
PTHrP	?	-/+	-/+	+	++	++	-
PDGFRα	?						
Esclerostina	-	-	-	-	-	-	+++
DMP1	-	-	-	-	-	-	+++

Figura 1. Fases sequenciais da proliferação-diferenciação da linhagem osteoblástica observados em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Nesse esquema estão descritas proteínas bem estabelecidas da linhagem osteoblástica na fase da diferenciação onde são expressas, evidenciando a diversidade da expressão desses marcadores.

(- ? + + +): expressão heterogênea nos diversos estágios de diferenciação da linhagem osteoblástica; (-): expressão não detectada; (- / + para + + +): expressão desde detectável à muito alta;

Dexa: dexametasona; *Runx2*: fator de transcrição 2 relacionado ao domínio *Runt*; *Osx*: Osterix; *FA*: Fosfatase alcalina; *Phex*: endopeptase homologa reguladora do fósforo, ligado ao X; *Col III*: Colágeno tipo III; *OPN*: Osteopontina; *BSP*: Sialoproteína óssea; *OCN*: Osteocalcina; *PTH1R*: receptor de paratormônio 1; *PTHrP*: Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide; *PDGFRα*: receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas; *DMP1*: proteína da matriz dentinária 1. (Adaptado de Aubin JE *in Principles in Bone Biology*, 2008) ¹⁰

Tabela 1. Marcadores fenotípicos da linhagem osteoblástica

Proteína (sinônimo)*	Fase de diferenciação linhagem osteoblástica	Positividade em outros tecidos	Características bioquímicas
Runx 2 (Cbfa1)	Pré-osteoblastos, osteoblastos maduros e osteócitos	Mama	Fator transcricional
Fosfatase Alcalina (BLK – ALP – bone liver-kidney isozyme); duas subunidades idênticas de 80kDa; pontes dissulfeto; tecido específica	Pré-osteoblastos, osteoblastos maduros e osteócitos	Rim e fígado	Glicoproteína (membrana celular dos osteoblastos)
Osteocalcina (bone GLA protein, BGP) ~5 kDa	osteoblastos maduros	Condrócitos, cartilagem hipertrófica, plaquetas, megacariócitos, odontoblastos e cementoblastos (dentes)	Proteína que contém γ -carboxylic acid (GLA) (10%)
Osteopontina (BSP I, SPP, SPP I, 2 ar, eta – 1 e pp69) 44 a 75 kDa	osteoprogenitor, pré-osteoblasto e osteoblasto maduro	Condrócitos, cartilagem hipertrófica, odontoblastos e cementoblastos (dentes), osteoclastos (ratos), células tubulares renais, neurônios, linfócitos T e plaquetas	Glicoproteína (RGD)
Sialoproteína óssea (BSP e BSP II) 46 a 75 kDa	pré-osteoblasto osteoblastos maduros osteócitos	Condrócitos, cartilagem hipertrófica, odontoblastos e cementoblastos (dentes), osteoclastos (humanos), plaquetas, trofoblastos (placenta), matriz mineralizada	Glicoproteína (RGD)
Osteonectina (SPARC e BM40) ~35 a 45 kDa	pré-osteoblasto osteoblastos maduros osteócitos	Tecido conectivo (fibroblastos), cultura de células endoteliais, pulmão, ovários e testículos, tecidos embrionários, matriz mineralizada	Glicoproteína fosforilada
MEPE (OF45): 525 aa, Dois sítios de N-glicosilação, um local de ligação de glicosaminoglicano-, sítio de fosforilação (PKC, tirosina-quinase e quinases dependentes de cAMP), COOH-terminal região rica em ácido serina aspartato (ASARM)	osteócito	Dentes	Fosfoglicoproteína de matrix extracelular (RGD)
PHEX: Gene de regulação do fosfato com homologias para endopeptases (HYP e XLH) 100 kDa	osteoblastos, osteócitos,	Encéfalo, pulmão, ovários, testículos, coração, paratireóides cartilagem	Protease
DMP-1 (AG1) (37 kDa N-terminal e 57kDa C-terminal)	osteoblastos, osteócitos e	Dentes, cartilagem, odontoblastos	Fosfoproteína (RGD), matriz extracelular
Esclerostina (Sost) (22 KDa)	osteócitos	Condrócitos hipertróficos em mineralização, cementócitos	Proteína reguladora da via Wnt
Colágeno Tipo I: Molécula helicoidal tripla contendo duas cadeias idênticas $\alpha 1$ e uma estrutura semelhante, mas geneticamente diferentes de cadeias $\alpha 2$	pré-osteoblasto osteoblastos maduros lining cells osteócitos	Osso, pele, tendão, ligamentos, córnea	Proteína colágena constituinte da matriz extracelular (90% do total)

*Referências: 16, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35

A linhagem osteoblástica responde a vários hormônios e citocinas que são usados como marcadores fenotípicos. Por exemplo, a ligação do PTH com seu receptor (PTHr) ativa a diferenciação dos osteoblastos *in vitro*^{27,36}. Quanto às citocinas, a prostaglandina E₂ (PGE₂), é sintetizada principalmente pelos osteoblastos menos diferenciados e atua tanto na recuperação do tecido ósseo como na sua formação^{27,37}. Citocinas como as interleucinas 6 e 11, o TNF α (fator de necrose tumoral α), o IFN γ (interferon gama), fatores de crescimento como EGF (fator de crescimento epidermal), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), IGF (Fator de crescimento ligado a insulina), TGF β (fator de crescimento transformante beta), FGFs (fatores de crescimento de fibroblastos), especialmente FGF23, relacionado à homeostase do fósforo, e as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), principalmente BMP-2 e BMP-7, podem agir como fatores parácrinos promovendo a diferenciação osteoblástica e a formação³¹. A osteoprotegerina (OPG) pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), e pode ser encontrada na forma solúvel ou expressa como receptor na superfície dos osteoblastos. A OPG controla a reabsorção óssea através do sistema OPG/RANK/RANKL, impedindo que o RANKL se ligue receptor RANK e favoreça a diferenciação dos osteoclastos¹⁹.

1.4. Anticorpos Monoclonais

A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de inúmeras doenças favoreceu o desenvolvimento de técnicas consideradas essenciais ao diagnóstico e/ou terapêutica. Dentre elas podemos citar o desenvolvimento dos Anticorpos Monoclonais (*Monoclonal antibodies* - Mabs) usados em técnicas como imunoquímicas (imunohistoquímica, imunofluorescência, citometria de fluxo, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) e também no tratamento de doenças como, por exemplo, a osteoporose.

Em 1975, Köhler & Milstein³⁸ foram pioneiros na obtenção de anticorpos monoclonais. Esses autores padronizaram a técnica que até hoje é largamente empregada em vários campos da medicina. Essa técnica baseia-se no fato que cada linfócito B produz anticorpo com uma única especificidade. Os linfócitos

não são células perenes. Durante o processamento técnico, um determinado linfócito que produz um anticorpo específico deve ser fusionado com células de mieloma para ser imortalizado. A seguir, as células fusionadas são selecionadas, podendo gerar vários clones com capacidade secretora de um anticorpo específico (monoclonal).

Na linhagem osteoblástica, poucos anticorpos monoclonais reconhecem células menos diferenciadas, sendo mais frequente a detecção de células mais diferenciadas como osteoblastos e osteócitos (figura 1). Estudos demonstraram a especificidade de alguns anticorpos para células em estágios mais precoces, contudo, os resultados são conflitantes^{39, 40, 41, 42, 43, 44, 45}. Anticorpos específicos para as células menos diferenciadas poderiam facilitar os estudos de diferenciação tanto *in vivo* como *in vitro*, bem como determinar as características dessas células em situações patológicas⁴⁶.

Muitos anticorpos monoclonais reagem com antígenos de superfície de células mesenquimais humanas. Porém, nenhum deles é linhagem ou estágio-específico. Dentre eles, os marcadores utilizados no painel para classificar as células-tronco mesenquimais do consenso do *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*, citado anteriormente, o STRO-1, que possui distribuição em diversos tecidos, (células ósseas fetais, adultas e de Osteossarcoma)^{47, 48}. O STRO-3 e o STRO-4, que reconhecem células de estroma de medula óssea^{49, 50}.

Outros anticorpos monoclonais merecem destaque por reconhecer células ósseas e seus precursores. O CD63 (conhecido anteriormente como HOP-26), que reconhece antígeno expresso pelas CFU-Fs, é usado para selecionar células osteoprogenitoras da medula⁴⁶. O OB7.3 reconhece osteoblastos maduros e osteócitos⁵¹. O RCC 455.4 também reconhece osteoblastos maduros e osteócitos⁵²; o SB-10 / CD166 ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) reconhece células mesenquimais não aderentes com capacidade multipotencial, provenientes de sangue periférico, ou células não aderentes com potencial osteoprogenitor em cultura⁵³.

Na prática clínica alguns anticorpos monoclonais são empregados no tratamento de doenças ósseas como a osteoporose e cânceres que evoluem

com perda de massa óssea, como o câncer de mama e de próstata. O Denosumab® é um anticorpo específico para o receptor do ativador de fator nuclear κ B (anti-RANKL). Através da sua ligação com o RANKL (ligante solúvel do receptor da membrana dos osteoclastos) ocorre inibição de ativação dos osteoclastos; assim, há diminuição da reabsorção e consequentemente da perda da massa óssea⁵⁴.

1.5. Anticorpos monoclonais PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9

Os Mabs PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9, que são o objeto do presente estudo, foram testados quanto a sua especificidade em tecidos de mesma origem mesenquimal de indivíduos normais (tecido ósseo, adiposo e cardíaco), em células obtidas de cultura de explante ósseo de indivíduos normais e de pacientes com doenças ósseas metabólicas (osteoporose e osteodistrofia renal), e também em fibroblastos de pele humana de indivíduos normais. Os Mabs utilizados no presente estudo foram produzidos conforme descrito no Anexo 1⁵⁵.

1.5.1. Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais em tecido ósseo, tecido muscular, tecido cardíaco e adiposo

Os resultados obtidos no estudo anterior revelaram que estes anticorpos reconhecem antígenos no tecido ósseo normal tanto em células menos diferenciadas (periósteo) como mais diferenciadas (osteócito). Porém, observamos diferenças nos padrões de expressão desses anticorpos. Todos marcaram o periósteo, porém o padrão de expressão do PSP 42-22 foi mais restrito a regiões específicas (camada osteogênica), além de se expressar nos osteoblastos e osteócitos e nos condrócitos. No músculo cardíaco, o PSP 4-5 marcou fracamente algumas células, enquanto o PSP 42-22 e o PSP 85-9 foram positivos na parede de vasos. Além disso, o PSP 85-9 também marcou outras células do tecido cardíaco. No tecido adiposo, observamos marcações positivas tanto com o PSP 4-5 quanto com o PSP 85-9; já o PSP 42-22 foi negativo⁵⁵.

1.5.2. Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais em células ósseas obtidas de fragmento ósseo normal e de pacientes com doenças ósseas metabólicas

Quanto aos testes em células ósseas obtidas de pacientes com doenças metabólicas (osteodistrofia renal e osteoporose), observamos diferentes padrões de expressão. O antígeno detectado pelo PSP 4-5 se expressa fracamente em células ósseas normais, de pacientes com osteíte fibrosa e com osteoporose e fortemente em células de pacientes com doença óssea adinâmica. Já o PSP 42-22 demonstrou fraca reatividade, por imunocitoquímica, em todas as células estudadas. O PSP 85-9 foi positivo em todas as células estudadas, com padrão semelhante nas células de indivíduos normais, de pacientes com osteíte fibrosa, doença óssea adinâmica e fracamente nas células de pacientes com osteoporose. Somente o PSP 4-5 e o PSP 85-9 marcaram fibroblastos de pele humana.

Esses resultados ainda não foram publicados, pois se faz necessária a identificação dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos, que será um dos objetivos do presente estudo, utilizando uma biblioteca de cDNA construída a partir da linhagem celular de osteossarcoma MG-63 (Anexo 2).

Poucos estudos avaliam os Mabs no diagnóstico de tumores ósseos. Desse modo, Mabs produzidos a partir de osteossarcoma poderiam contribuir na compreensão da patologia desses tumores. O diagnóstico histológico de tumores ósseos baseia-se nas características histológicas e na análise, por imunohistoquímica, da expressão de proteínas, como por exemplo, a osteocalcina, osteonectina, fator de crescimento vascular (VEGF) e de metaloproteinases^{56,57,58}.

Antes de abordar o tema propriamente dito, optamos por descrever as características clínicas e histológicas dos principais tipos de tumores ósseos.

1.6. Tumores ósseos

Osteossarcoma

O osteossarcoma (ou sarcoma osteogênico) é o tumor mesenquimal maligno mais frequente. Acomete predominantemente adolescentes e adultos jovens⁵⁹ especialmente as metáfises dos ossos longos. O osteossarcoma possui diversos subtipos histológicos cujo diagnóstico preciso permite avaliar a resposta aos tratamentos quimioterápicos⁶⁰. As células são de tamanhos e formatos variados, com núcleos hipercromáticos e distintas figuras de mitose⁶¹. A imunohistoquímica revela diferenças de padrão de expressão de marcadores ósseos clássicos como osteocalcina e osteonectina. Os dados de literatura são limitados a poucos estudos. A osteocalcina é mais empregada e a osteonectina parece ser menos específica⁵⁶.

Osteoblastoma

O osteoblastoma é um tumor benigno que raramente maligniza. A expressão da proteína p53 é vista como um índice de transformação maligna⁶². Cerca de 50% dos casos acomete vértebras, mas também é encontrado no ilíaco, nas costelas e nos ossos das mãos e dos pés⁶³. Histologicamente apresenta deposição de matriz osteóide e trabéculas ósseas recobertas por osteoblastos. O estroma é composto por tecido conjuntivo frouxo vascularizado⁶¹.

Condrossarcoma

O termo condrossarcoma descreve um grupo de tumores com características, padrões e comportamento diversos. Esses tumores formam cartilagem sem matriz osteóide e é o segundo tumor ósseo primário maligno. Possui subtipos e pode ser classificado como convencional, de células claras, mixóide (matriz mucóide), mesenquimal e desdiferenciado. Suas características histológicas correlacionam-se com a gravidade da doença, onde tumores de

baixa malignidade se assemelham à cartilagem normal. Observa-se aumento da celularidade, núcleos grandes, células binucleadas e multinucleadas, pleomorfismo nuclear com hipercromasia e invasão de osso cortical ou medular^{61, 64}.

Leiomiossarcoma de tecido ósseo

O leiomiossarcoma é um tumor de tecido germinativo mesenquimal de tecidos moles, com diferenciação muscular lisa e que corresponde a 1 em cada 10 casos de sarcomas. Acomete locais como retroperitônio, útero, pele e tecidos moles, e sua ocorrência como sítio primário no tecido ósseo é rara⁶⁵. O diagnóstico é facilitado pelo uso de marcadores de tecido muscular, principalmente desmina e actina^{66,67}, h-caldesmona⁶⁸ e calponina. Na histologia encontramos feixes de células fusiformes, com pleomorfismo nuclear, núcleos alongados com cantos arredondados, em formato de “charuto”⁶⁹.

Da mesma forma que testamos os Mabs PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9 em tecido ósseo de pacientes com doenças ósseas metabólicas, pretendemos nesse estudo também testá-los em tumores ósseos, uma vez que há carência de marcadores específicos no diagnóstico de tumores.

Os tumores descritos anteriormente foram selecionados por compor o grupo de tumores ósseos de maior frequência na população. Os tumores ósseos primários correspondem a 2% de todos os tumores clínicos e sarcomas ósseos, e a 0,6% dos tumores malignos, dos quais o osteossarcoma corresponde a 20%⁷⁰. Estes tumores são importantes também por produzirem diferentes tipos de matriz, uma vez que há diversos subtipos e variantes a serem caracterizados, o que implica em uma maior complexidade diagnóstica^{62,63}.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Isolar cDNAs codificadores de proteínas reconhecidas (antígenos) pelos anticorpos monoclonais, PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9 e sequenciamento do DNA, visando identificar o antígeno reconhecido pelos mesmos.

Objetivos específicos

- Triagem da biblioteca de cDNA com capacidade de expressão proteica, utilizando os anticorpos monoclonais, quando possível;
- Sequenciamento do DNA do fagemídeo com inserto clonado e análise da sequência obtida;
- Avaliar a expressão dos anticorpos pela técnica de imunohistoquímica em diferentes tipos de tumores ósseos.

3. MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 194/11.

3.1. Purificação dos anticorpos monoclonais (Mabs) PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9

Inicialmente purificamos os Mabs PSP 4-5, 42-22 e PSP 85-9 a partir de ascites congeladas a -20°C, visando obter novas alíquotas desses anticorpos e dar início a esse estudo propriamente dito. A descrição dos métodos para obtenção dos Mabs encontra-se no Anexo 1, pois foi objeto de outro estudo⁵⁵.

Para a purificação das alíquotas seguimos as instruções do fabricante do kit de purificação *Montage PROSEP-G Media* (Millipore, Billerica, EUA), cujo princípio é de cromatografia por afinidade. Resumidamente, removemos os lipídeos com sulfato de dextran 10% e cloreto de cálcio e acrescentamos no sobrenadante o tampão de ligação (1,5M glicina/NaOH, 3M NaCl, pH 9,0). Usamos para centrifugação um tubo específico com uma coluna de purificação com proteína G covalentemente imobilizada. Essa coluna retém os anticorpos da classe IgG através de sua região *Fc*. Em seguida, adicionamos o tampão de eluição (0,2M glicina/HCl pH 2,5) que desprende os anticorpos ligados à coluna, e que foram imediatamente neutralizados com tampão de neutralização (1M Tris/HCl, pH 9,0). Para dialisar os anticorpos e ajustar sua concentração final, usamos tubos específicos (Amicom Ultra – Millipore, Billerica, EUA).

O cálculo da concentração foi obtido pela leitura da densidade ótica a 280 nm (DO_{280}) em Espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific - Waltham, EUA) empregando-se a fórmula:

Imunoglobulina G (IgG) mg/ml = $DO_{280} \times \text{diluição (quando houver)} \times 0,72$ ⁷¹

As amostras também foram analisadas em gel SDS – PAGE a 12%, em condições não reduzidas e reduzidas (quebra das pontes dissulfeto pela ação do 2-mercaptoetanol), para visualizar as cadeias leves e pesadas das IgGs.

Em seguida, obtivemos lisatos proteicos de células MG-63, que foram desnaturados com duodecil sulfato de sódio (SDS) para confirmar se os Mabs reconheciam seus respectivos antígenos.

3.2. Avaliação da viabilidade dos Mabs

3.2.1. Cultivo de Células MG-63

Células MG-63 (ATCC, Manassas, EUA) foram cultivadas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco BRL, Grand Island, EUA) suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos (50 UI de Penicilina, 50 µl/ml de Estreptomicina e 2,5 µl/ml de Anfotericina B). Após confluência, as células foram dissociadas com *Tryple Express*TM (Gibco BRL, Grand Island, EUA) e testadas contra os Mabs na citometria de fluxo. Parte das células foram lisadas e usadas na técnica de *Western Blot* (WB).

3.2.2. Citometria de Fluxo

As células MG-63 foram contadas em câmaras de Neubauer (ou hemocitômetro) e colocadas na proporção de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por tubo. Esses tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4°C com tampão de lavagem gelado (tampão fosfato salina - PBS, 5% soro fetal bovino e 0,1% azida sódica) e neles, acrescentamos 10 mg/ml IgG humana (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para bloqueio inespecífico. Essa etapa foi de 15 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com os Mabs na diluição de 50 µg/ml por 30 minutos, a 4°C. Usamos como controle negativo o anticorpo monoclonal anti IgG1 de camundongo (MAB002, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Anticorpo de cabra anti imunoglobulina de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC (Southern Biotech, Birmingham, EUA) na

concentração 50 µg/mL foi usado como anticorpo secundário, incubado 30 minutos à 4°C. Para a fixação empregamos 1% paraformaldeído em PBS. Realizamos a leitura no citômetro FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) onde as células em suspensão de cada amostra são aspiradas e analisadas uma a uma através de lasers e detectores posicionados no aparelho, e que ao dispersar o laser ou ao excitar os fluorocromos ligados aos anticorpos geram dados que foram analisados com o programa CellQuest® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA).

3.2.3. Western Blot (WB)

Lisatos proteicos de células MG-63 foram usados para avaliar, por WB, a capacidade dos Mabs detectar seus respectivos antígenos.

Empregamos tampão de lise RIPA - *Radio-Immunoprecipitation Assay* (Millipore, Billerica, EUA), 1 ml para cada 10^7 células, acrescido de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) na proporção de 1µl do coquetel para cada 10^6 células. As células foram incubadas com tampão de lise por 30 minutos a 4°C e centrifugadas por 15 minutos, a 14000 x g. O lisato foi armazenado em freezer a -80°C, com tampão de amostra Laemmli⁷² 5 vezes concentrado, na proporção 1:1. A concentração proteica foi determinada com o kit *Pierce® 660nm Protein Assay* (Thermo Scientific, Waltham, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As proteínas do lisato foram separadas, segundo seu o peso molecular, em gel de SDS-PAGE (eletroforese de gel de poliacrilamida) a 10%. Após migração, as proteínas do gel foram transferidas por corrente elétrica para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, EUA) ou difluoreto de polivinilideno - PVDF (Millipore, Billerica, EUA). Essas membranas foram bloqueadas em Tampão Tris Salina e Tween 20 (20mM de Tris HCl pH 7,5, 150mM de NaCl, 0,05% de Tween 20 - TTST), contendo 4% de albumina bovina sérica (*Bovine serum albumin* – BSA, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida foram incubadas com os Mabs na concentração de 1 µg/ml diluídos em TTST com 0,5% BSA por mais 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante (ou ON - *overnight*, a 4°C). Na etapa seguinte, as membranas foram

novamente incubadas, por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação constante, com anticorpo secundário produzido em cabra anti camundongo, conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP - Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) na diluição 1:80.000 em TBST com 0,5% BSA. Os antígenos foram detectados pela revelação com substrato quimioluminescente - *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific, Waltham, EUA), com captura de imagem no fotodocumentador Alliance 2.7 (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK) e análise com o software UVIBAND (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK). Em cada teste empregamos o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein WesternC Standards* (BIO-RAD – Hercules, EUA).

3.2.4. Titulação da biblioteca de cDNA

Alíquotas armazenadas da biblioteca de cDNA foram tituladas para obter bacteriófagos viáveis e assim iniciar a triagem do cDNA.

Para tanto uma cepa de *Escherichia coli* (E. coli) XL1-Blue MRF' foi semeada em placas de 100 mm x 20 mm (Corning Inc., Nova Iorque, EUA) com meio Luria-Bertani – LB (BD Difco, Franklin Lakes, EUA) com 2% de Agar (BD Difco, Franklin Lakes, EUA), acrescido de tetraciclina 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) – Anexo 3 – incubada em estufa bacteriológica ON a 37°C.

Uma colônia dessas bactérias, foi colhida e semeada em meio LB suplementado com 0,2% Maltose (BD Difco, Franklin Lakes, EUA), 10 mM de MgSO₄ (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), mantida a 30°C sob agitação constante (200 rpm), ON. A fase exponencial de crescimento foi obtida pela leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro de luz visível a 600 nm (valor esperado entre 0,5 e 1,0). Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 500 x g durante 15 minutos, e dispersas em 10mM MgSO₄ ajustando-se a DO 600 das bactérias para 0,5.

Infectamos as bactérias com bacteriófagos (λ Zap Express) da biblioteca de cDNA (Anexo 2) em meio SM (Anexo 3) em três concentrações: 10³ (1:1000), 10⁴ (1:10.000) e 10⁵ (1:100.000). Adicionamos 1 µl de fagos para

cada 200 µl de bactérias que foram então incubados por 15 minutos a 37°C. Em seguida, adicionamos em cada tubo 15 µl de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo – IPTG (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) 0,5 M (preparado com água destilada), 50 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-d-galactopiranosídeo - X-Gal (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) a 250 mg/ml (preparado com dimetilformamida) e 3 ml de meio NZCYM (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) *Top Agar* (Anexo 3). Na etapa seguinte, a mistura foi colocada cuidadosamente em placa de 100 mm com meio NZCYM 1,5% ágar (Anexo 3) previamente preparada, incubada a 37°C em estufa bacteriológica, *ON*.

Contamos os halos translúcidos formados a partir da lise das bactérias infectadas pelos bacteriófagos λ Zap Express (Anexo 4).

Para a determinação do título em pfu/ml, utilizamos a fórmula:

$$[N^{\circ} \text{ de halos translúcidos (pfu)} \times \text{fator de diluição/ volume de bacteriófago adicionado (}\mu\text{l)}] \times 1000 \mu\text{L/ml} = \text{pfu/ml},$$

onde pfu (*plaque forming unit*) são as unidades formadoras de halos translúcidos.

3.2.5. Isolamento do cDNA codificador para os antígenos reconhecidos pelos Mabs

Os anticorpos que reconheceram os antígenos por *Western Blot* foram usados para triar a banca de expressão de cDNA, construída a partir de mRNA de MG-63 (Anexo 2). Para isolar os bacteriófagos com os trechos de interesse foram seguidas 3 etapas:

1ª Etapa - Amplificação do cDNA infectando bactérias com bacteriófagos λ Zap Express: uma nova colônia de bactérias *E. coli* XL1-Blue MRF', foi colocada em meio LB suplementado com 0,2% Maltose (BD Difco, Franklin Lakes, EUA), 10 mM de MgSO₄ (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) a 30°C sob agitação constante (200 rpm), *ON*. A fase exponencial de crescimento foi obtida pela leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro de luz visível a 600 nm

(valor esperado entre 0,5 e 1,0). Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 500 x g durante 15 minutos, e dispersas em 10mM MgSO₄ ajustando-se a DO₆₀₀ das bactérias para 0,5. Nas triagens primárias foram usadas placas de cultura 245 mm x 245 mm (Corning Inc., Nova Iorque, EUA) e nas triagens subsequentes, placas de Petri 100 mm x 20 mm (Corning Inc., Nova Iorque, EUA). Tanto nas triagens primárias como nas subsequentes, as placas foram preparadas com meio base, imediatamente antes da distribuição das bactérias infectadas com os bacteriófagos. Foi usado meio NZCYM, 1,5% de ágar. A infecção das bactérias pelos bacteriófagos Zap Express foi obtida com o título de aproximadamente 150.000 pfu/ml para as triagens primárias. Assim, 1,8 ml de bactérias resuspensas em 10mM MgSO₄ (DO₆₀₀= 0,5) com 10 µl de bacteriófagos da biblioteca, diluídos em meio SM, foram incubadas por 15 min, a 37° C. A seguir, foi acrescentado 20 ml de meio NZCYM, 1% de ágar (Anexo 3) e a mistura foi distribuída imediatamente nas placas 245 mm x 245 mm. Nas triagens subsequentes, os clones provenientes de halos positivos (descrito posteriormente) foram diluídos de acordo com a necessidade da etapa de triagem (1:1000, 1:500 ou 1:100). Para as triagens subsequentes (secundária, terciária e quaternária) a infecção foi feita utilizando-se 200 µl das bactérias e 10 µl dos bacteriófagos triados. Em seguida, essa mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C após o que, acrescentamos 1,8 ml de meio NZCYM, 1% de ágar distribuído imediatamente sobre as placas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C, até o aparecimento dos halos translúcidos (de 4 a 8 horas) (Anexo 6);

2ª Etapa - Indução da síntese de proteínas por isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG): após o aparecimento dos halos translúcidos, as placas foram recobertas com membranas de nitrocelulose, previamente embebidas em solução de 10mM de IPTG (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) secas à temperatura ambiente. As membranas foram colocadas cuidadosamente sobre as placas e sua posição, devidamente orientada. O conjunto foi incubado *ON* a 37°C em estufa bacteriológica para a indução da síntese das proteínas (Anexo 6);

3ª Etapa - Detecção das proteínas representadas nos halos positivos *por western blot* empregando-se os anticorpos monoclonais: nesta etapa as membranas foram cuidadosamente removidas das placas (que foram guardadas a 4°C para posterior coleta dos halos/clones positivos), lavadas 6 vezes por 30 minutos cada vez com Tampão Tris Salina e Tween 20 (TTST) acrescido de 0,1% de azida sódica – NaN_3 (Serva, Heidelberg, Alemanha) e secas por 2 horas em temperatura ambiente sobre papel Whatmann (GE Healthcare, Chalfont St Giles UK). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em TTST acrescido de 0,1% de azida sódica e 4% de BSA, por 1 hora, a temperatura ambiente, com agitação constante. A seguir foram incubadas com os Mabs na concentração de 1µg/ml, a 4°C *ON*, diluídos em TTST com 0,02% de NaN_3 e 0,5% de BSA. As membranas foram novamente lavadas com TTST por 5 vezes, durante 20 minutos cada vez, sob agitação constante, e incubadas com anticorpo anti camundongo, conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP - Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) na diluição 1:80.000 ou anticorpo anti camundongo conjugado com fosfatase alcalina - AP (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) na diluição 1:5.000, por 1 hora, a temperatura ambiente sob agitação. Para a detecção do anticorpo conjugado com HRP, foi utilizado o substrato quimioluminescente *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific, Waltham, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Nas triagens primárias foi usado o filme radiográfico CL-XPosure Film (Thermo Scientific, Waltham, EUA) revelado com solução reveladora e fixadora para filmes Raio-X (Kodak, Manaus, BR). Nas triagens subsequentes, foi empregado o fotodocumentador Alliance 2.7 (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK) e o software UVIBAND (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK) para detecção dos antígenos nas membranas. Para detecção do anticorpo conjugado com AP foi utilizado o substrato azul de nitro-tetrazólio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato dissódico (BCIP) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), nas concentrações de 0,33 mg/ml e 0,165 mg/ml, respectivamente, diluídas em 100mM de Tris pH 9,5, 100mM de NaCl e 5mM de MgCl_2 (solução reveladora). Após lavagens com TTST, por 5 vezes, durante 20 minutos cada vez, as membranas foram incubadas em solução reveladora por, no mínimo, 10 minutos (usualmente são visíveis em 30 minutos). Em seguida, foram lavadas

em Tampão Tris Salina (TTS) e a reação interrompida com tampão 20mM de Tris, pH 2,9 e 1mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Quando halos positivos foram visualizados em qualquer uma das etapas de detecção descritos anteriormente, as membranas foram pareadas com as placas previamente guardadas a 4°C. Os pontos concordantes considerados positivos foram coletados com o auxílio de uma ponteira estéril e estocados em meio SM com 5% de Clorofórmio, a 4°C por, ao menos, 24 horas antes do próximo uso. O clorofórmio destrói as bactérias e os fagos ficam em suspensão no sobrenadante e assim são utilizados nas triagens seguintes, promovendo a infecção de novas colônias de *E. coli* XL1-Blue MFR'.

Uma vez clonado o cDNA codificador para os antígenos reconhecidos pelos Mabs foi feita a excisão *in vivo* do fagemídeo pBK-CMV com o inserto de cDNA do bacteriófago λ Zap Express, a análise do inserto de cDNA e a purificação do DNA do fagemídeo com o inserto, para posterior sequenciamento desse DNA.

3.2.6. Titulação do bacteriófago *Helper ExAssist*

O bacteriófago *Helper ExAssist* (projetado para auxiliar na excisão do fagemídeo com o inserto de cDNA) foi titulado para avaliar sua estabilidade antes da excisão *in vivo*. Essa etapa se assemelha à titulação da biblioteca de cDNA. Assim, uma colônia de *E. coli* XL1-Blue MRF' foi inoculada em meio LB suplementado com 0,2% de Maltose e 10 mM de MgSO_4 . Após proliferação as bactérias, foram centrifugadas, por 15 minutos a 500 x g, ressuspensas em 10mM de MgSO_4 como descrito anteriormente, exceto pela densidade ótica que para essa etapa deve ser igual a 1,0 ($\text{DO}_{600} = 1,0$). Para a infecção foram usados os bacteriófagos *Helper ExAssist* (estocados em freezer -80°C), diluídos em meio SM nas concentrações: 10^3 (1:1000), 10^4 (1:10.000) e 10^5 (1:100.000). Para infectar as bactérias foi adicionado 1 μl de bacteriófagos para cada 200 μl de bactérias em 10 mM de MgSO_4 , $\text{DO}_{600} = 1,0$. Bacteriófagos e bactérias foram, então, incubados por 15 minutos a 37°C. Em seguida, foi acrescido em cada tubo 3 ml de meio NZCYM Top Agar, sendo a mistura final

colocada em placas NZCYM 1,5% ágar, previamente preparadas. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica, *ON*. Foram contados os halos translúcidos formados pela lise das bactérias infectadas pelos bacteriófagos e usado o mesmo cálculo já descrito na titulação da biblioteca de cDNA.

3.2.7. Amplificação do título do bacteriófago λ Zap Express com o trecho de cDNA de interesse para o protocolo de excisão *in vivo*

Antes de iniciar o protocolo de excisão *in vivo*, foi avaliada a titulação mínima de clones isolados na triagem quaternária com o cDNA de interesse. Se a mesma fosse inferior a 1×10^5 pfu/ml, seria feita uma amplificação desses clones.

Para tanto, uma colônia de bactérias foi colocada em meio LB suplementado com 0,2% de maltose e 10 mM de MgSO_4 , mantida a 30°C sob agitação constante (200 rpm), *ON*. Quando o crescimento das bactérias atingiu DO_{600} entre 0,5 e 1,0, as bactérias foram centrifugadas a 500 x g, durante 15 minutos e resuspensas em 10 mM de MgSO_4 , mantendo-se a DO_{600} em 1,0. Para a amplificação, 100 μl do fago clonado (estocado a 4°C numa mistura de Meio SM com 5% de clorofórmio) foi adicionado a 100 μl de bactérias em 10 mM de MgSO_4 , 100 μl de 10mM MgCl_2 /10mM CaCl_2 . Essa mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C. Em seguida, foi transferida para um tubo estéril com 50 ml de meio NZCYM e incubada durante 8 horas, a 37°C e agitação a 300 rpm. Ao final da incubação, foi acrescido 1,2 ml de clorofórmio, seguido de nova etapa de incubação por 15 minutos, a 37°C e agitação a 300 rpm. Após essa etapa, as amostras foram colocadas em outro tubo, centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos, a 4°C, e os clones amplificados transferidos para um novo tubo estéril, acrescido de algumas gotas de clorofórmio e estocados a 4°C. O material foi então titulado, utilizando-se o mesmo protocolo de titulação e cálculo empregado na titulação da banca de cDNA.

3.2.8. Excisão *in vivo* dos fagemídeos pBK-CMV, que contém os insertos de cDNA clonados, dos bacteriófagos λ Zap Express

Após a titulação do bacteriófago *Helper ExAssit*, foi iniciado o protocolo de excisão *in vivo*. O princípio do método está descrito no Anexo 7. Bactérias *E. coli* XL1-Blue MRF' e *E. coli* XL0LR foram semeadas em placas com meio LB 2% ágar suplementado com tetraciclina 50 μ g/ml e incubadas ON em estufa a 37°C.

No dia seguinte, colônias das duas bactérias foram colocadas em frascos separados, contendo 50 ml de meio LB suplementado com 10 mM MgSO_4 e 0,2% de maltose e incubadas a 30°C, sob agitação a 300 rpm, ON.

Após essa etapa foi feita a leitura da densidade ótica das duas culturas em espectrofotômetro de luz visível a 600 nm (DO_{600}), cujo valor deve ser igual a 1,0. As culturas foram então centrifugadas a 1000 x g, por 10 minutos e resuspensas em cerca de 25 ml de 10 mM de MgSO_4 (as concentrações das culturas foram ajustadas a $\text{DO}_{600} = 1,0$, $\sim 8 \times 10^8$ células/ml).

Em um tubo de polipropileno de 14 ml estéril (cod. 352059 - BD Falcon, Franklin Lakes, EUA) foram adicionados 200 μ l das bactérias XL1-Blue MRF' em 10 mM de MgSO_4 ($\text{DO}_{600} = 1,0$), 250 μ l da solução do estoque de bacteriófagos clonados da biblioteca (com título maior que 400 pfu/ μ l), durante a triagem quaternária (ou que foram amplificados como descrito anteriormente), e 1 μ l da solução de bacteriófago *Helper ExAssist* previamente titulado. Os tubos foram incubados a 37°C, por 15 minutos. Em seguida, foi acrescentado 3 ml de meio LB suplementado com 10 mM de MgSO_4 e 0,2% de maltose. Essa mistura foi novamente incubada por 3 horas, a 37°C com agitação constante (300 rpm) e em seguida os tubos foram aquecidos a 70°C, por 20 minutos. Durante o período de incubação, duas placas para cada clone excisado foram preparadas com meio LB 2% Agar e 50 μ g/ml de canamicina (Sigma, St Louis, EUA). Ao término da incubação tubos com os clones excisados foram centrifugados a 1000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante contendo os fagemídeos pBK-CMV excisados foi transferido para outro tubo estéril e estocado a 4°C. Duas amostras de cada clone excisado foram usadas para a infecção desses fagemídeos nas bactérias *E. coli* XL0LR. Na primeira amostra

foram adicionados 200 µl de bactérias XLRL, diluídas em 10 mM de MgSO_4 , com 100 µl de sobrenadante de fagemídeos. Na segunda amostra, 200 µl de bactérias XLRL com 10 µl de sobrenadante de fagemídeos. Seguiu-se um período de incubação a 37°C por 15 minutos, após o qual adicionamos em cada tubo 300 µl de meio NZCYM e foi feita nova incubação a 37°C por 45 minutos.

Em seguida, as bactérias XLRL, agora infectadas com os fagemídeos pBK-CMV, contendo os insertos clonados, foram semeadas nas placas LB 2% ágar com canamicina, previamente preparadas e incubadas *ON* a 37°C em estufa bacteriológica. Para a amplificação da bactéria XLRL infectada com o fagemídeo, uma colônia foi colhida e inoculada em 3 ml de meio LB, suplementado com 0,2% Maltose e 10 mM de MgSO_4 , e incubada a 37°C, sob agitação a 300 rpm, *ON*.

3.2.9. Minipreparação e análise da digestão dos insertos de interesse em gel de agarose

Para estimar o tamanho do inserto de cDNA dos clones isolados e avaliar sua qualidade, empregamos o protocolo de Minipreparação seguido da análise da digestão dos insertos em gel de agarose 0,7%. Para tanto, 1 ml de cada uma das culturas de bactérias XLRL infectadas com o fagemídeo de interesse foi colocada em tubos de microcentrífuga de 1.5 ml centrifugados por 10 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante e as células foram ressuspensos em 200µl da solução STETL - 8% Sacarose, 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de EDTA, 0,5% de Triton X-100 e 0,5 mg/ml de Lisoenzima (Thermo Scientific - Waltham, EUA). Essa mistura foi homogeneizada e incubada em água fervente durante 1 minuto, centrifugada, durante 10 minutos, temperatura ambiente a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o precipitado bacteriano foi removido com auxílio de um palito de dente estéril. Ao sobrenadante contendo os fagemídeos, acrescentamos igual volume (cerca de 200 µl) de isopropanol resfriado a -20°C.

A mistura foi incubada a -20°C por 30 minutos e centrifugada por 15 minutos, a 4°C , $14000 \times g$. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de DNA do fagemídeo com o inserto de interesse, foi lavado delicadamente com $200\mu\text{l}$ de etanol 80% resfriado a -20°C . O precipitado foi então centrifugado por 15 minutos, a 4°C , a $14000 \times g$. O precipitado de DNA do fagemídeo com o inserto foi então seco a temperatura ambiente com os tubos abertos por, cerca de, 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso com $15\mu\text{l}$ de água tratada com $200\mu\text{g/ml}$ RNase A (Invitrogen, Grand Island, EUA). A análise das amostras de DNA do fagemídeo com os insertos foi realizada após digestão com $10\text{ U}/\mu\text{l}$ de Xho I (Invitrogen, Grand Island, EUA) e $15\text{ U}/\mu\text{l}$ de EcoRI (Invitrogen, Grand Island, EUA), conforme as combinações descritas na tabela 2. Para cada amostra de DNA de fagemídeo com o inserto obtida no protocolo de minipreparação, foram preparadas quatro combinações de meio reativo.

Tabela 2. Meios reativos para a digestão dos sítios de restrição no DNA fagemídeo pBK-CMV com o inserto de interesse

	A	B	C	D
10 x buffer H	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
Xho I (10 U/μl)	0	2,5 μl	0	2,5 μl
EcoRI (15 U/μl)	0	0	0,6 μl	0,6 μl
água deionizada	35 μl	32,5 μl	34,4 μl	31,9 μl
Total	40 μl	40 μl	40 μl	40 μl

Para cada amostra testada utilizamos 8 μl de cada meio reativo com 2 μl de cada amostra obtida na minipreparação. A digestão do DNA do fagemídeo com o inserto foi de 3 horas a 37°C (em estufa).

Os produtos da digestão do DNA do fagemídeo com o inserto foi separado em gel de 0,7 % de agarose. Para preparação do gel, a agarose foi dissolvida em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) em microondas. Após o resfriamento (50°C), acrescentamos 5 μl de brometo de etídio (EtBr) para cada 50 ml de gel. Em seguida, o gel Agarose 0,7% foi colocado em cuba de eletroforese horizontal Sub Cell GT, 15 x 25 cm ou 10 x 15 cm (Bio-Rad,

Hercules, EUA). Após a polimerização do gel o mesmo foi recoberto com o tampão de TAE. Foram aplicados 10 µl de cada amostra por orifício do gel, onde 8 µl eram da amostra digerida combinados com 2 µl de *Blue Juice Gel loading Buffer* (Invitrogen, Grand Island, EUA). O marcador usado foi a mistura de 10 µl do *1Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen, Grand Island, EUA) combinado com 2,5 µl do *BlueJuice Gel loading Buffer*. A separação das amostras do gel foi feita por aproximadamente 2 hs a 90 V. Após a separação, o gel foi analisado sob luz ultravioleta – UV no fotodocumentador Alliance 2.7 (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK) e o software UVIBAND (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK).

3.2.10. Purificação do cDNA do fagemídeo pBK-CMV com os insertos de interesse

Uma vez avaliada a qualidade da excisão *in vivo* e confirmada a presença dos insertos após a digestão do DNA do fagemídeo pBK-CMV com as enzimas de restrição, iniciamos o protocolo de purificação do DNA do fagemídeo usando o kit *QIAfilter Plasmid midi protocol* (Qiagen, Valencia, EUA). Usamos uma colônia de bactérias XL0LR infectadas com fagemídeos excisados em meio LB suplementado com 10 mM MgSO_4 , 0,2% Maltose e 50 µg/ml de tetraciclina. Essa cultura foi incubada por 8hs, a 300 rpm, 37°C. Após o término da incubação, as culturas foram diluídas 1:500 e 1:1000 em meio LB suplementado com 10 mM MgSO_4 , 0,2% Maltose e 50 µg/ml de tetraciclina e novamente incubadas a 37°C, 300 rpm, ON. Ao término dessa etapa as culturas foram tratadas seguindo o protocolo do kit. Uma vez finalizado o protocolo de purificação do DNA do fagemídeo pBK-CMV com os insertos, a pureza e a quantificação do material obtido foram avaliadas. Para tanto, foi feita a leitura das densidades óticas a 260 nm (DO_{260}) e a 280 nm (DO_{280}), em Espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

3.2.11. Sequenciamento dos insertos clonados inseridos no DNA do fagemídeo pBK-CMV

Os insertos clonados inseridos no DNA do fagemídeo pBK-CMV foram encaminhados para a empresa Beckman Coulter Genomics (Grenoble, França).

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o método de eletroforese de capilaridade (Sanger)⁷³ no sequenciador *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser* (Life Technologies, Carlsbad, EUA), usando-se kit *Big-dye® Terminator v3.1* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). As reações foram preparadas de acordo com instruções do fabricante. Foi utilizado como *Primer* o M13-20 nas direções direta e inversa de leitura (*primers forward* e *reverse*).

3.2.12. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados

As sequências dos *primers* T3 e T7 foram enviadas nos formatos “.doc” e “.pdf”. O *primer* T7 é a sequência inversa/complementar da sequência do inserto. Desse modo, foi obtida a sequência inversa a partir do *primer* T7, utilizando-se recurso de bioinformática disponível gratuitamente no site do Instituto Pasteur (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::revseq>). Já a sequência obtida do *primer* T3 estava no sentido direto de leitura. As duas sequências foram então, sobrepostas e onde houve o alinhamento das bases, pesquisamos a homologia no *software* de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

3.2.13. Expressão dos Mabs em tumores ósseos

A expressão dos Mabs foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica no tecido ósseo de pacientes em seguimento no Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-FMUSP). Esses pacientes eram portadores de tumores ósseos e foram submetidos à biópsia para diagnóstico da doença. O material foi analisado e

gentilmente cedido pelo Serviço de Patologia do IOT. Estudamos biópsias de 36 pacientes cujos diagnósticos foram: osteossarcoma, osteoblastoma, condrossarcoma e leiomiossarcoma do tecido ósseo.

Inicialmente removemos a parafina, ou seja, as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 30 minutos seguida da imersão em xilol durante 9 minutos, 3 vezes. Em seguida, foram desidratadas em álcool absoluto 100% por 5 minutos (2 vezes), álcool 96%, por 3 minutos (2 vezes) e reidratadas em água destilada por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram colocadas em solução salina tris-tamponada –TBS (0,5 M de Tris HCl (Sigma, Saint Louis, EUA), pH=7,6 acrescida de 0,15M de cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), na proporção de 1:10. A recuperação do sítio antigênico foi feita por aquecimento em forno de micro-ondas. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (10mM de ácido cítrico mono hidratado, ajustando pH=6,0 com NaOH).

Após exposição antigênica usamos o método de imunoperoxidase com o kit LSAB – *Labeled Streptavidin-Biotin Method* (Dako, Carpinteria, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução a 3% de Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂ (Merck, Hohenbrunn, Alemanha) em álcool metílico por 30 minutos. Em seguida fizemos o bloqueio da avidina e da biotina endógenas durante 15 minutos cada um, utilizando o kit de bloqueio Avidina/Biotina (Vector *Laboratories Inc*, Burlingame, EUA). Após esta etapa realizamos outro bloqueio inespecífico por 30 minutos com *Protein Block* (Dako, Carpinteria, EUA). A concentração foi de 50 µg/mL para todos os anticorpos testados.

Na montagem das lâminas usamos glicergel (Merck, Hohenbrunn, Alemanha). Para o controle negativo o anticorpo primário foi omitido.

3.2.14. Expressão do Mab PSP85-9, da osteocalcina e da osteonectina em osteoblastomas e osteossarcomas

A expressão do anticorpo PSP 85-9 e dos anticorpos anti-osteocalcina e anti-onectina foram avaliadas pela técnica de imunohistoquímica unicamente no tecido ósseo de pacientes com osteoblastomas e osteossarcoma que são os principais tumores ósseos primários, sendo os osteoblastoma tumores na maior parte dos casos benignos e os osteossarcomas malignos. A opção de comparar nosso anticorpo com anticorpos anti-osteocalcina e anti-onectina se deu pois são os marcadores mais testados nesses tipos de tumores.

A concentração do Mab PSP 85-9 foi de 50 µg/mL. Para a osteocalcina usamos o anticorpo anti-osteocalcina (GeneTex, Irvine, EUA) 5 µg/ml e para a onectina o anticorpo anti-onectina (GeneTex, Irvine, EUA) 5 µg/ml. A incubação com esses anticorpos foi ON a 4°C em câmara úmida. Nas etapas de lavagem, usamos Tris-HCL e Tween (*Wash Buffer* - Carpinteria, EUA). O substrato cromogênico empregado para detecção das marcações foi o 3-Amino - 9 Ethyl – Carbazol (AEC) (Sigma-Aldrich – St Louis, EUA) e a contra coloração obtida com Hematoxilina de Mayer. Na montagem das lâminas usamos glicergel (Merck, Hohenbrunn, Alemanha). Para o controle negativo o anticorpo primário foi omitido.

3.2.14.1. Avaliação semiquantitativa da imunomarcção

Os cortes histológicos foram examinados por microscopia óptica comum nos aumentos de 40X e 100X para detectar os locais de positividade, seguido de aumentos maiores 200X e 400X para avaliar a imunomarcção. A positividade dos três anticorpos foi expressa como a percentagem média (%) de células positivas e a pela intensidade de marcação em pelo menos três campos diferentes. Consideramos positiva a coloração acastanhada no citoplasma e núcleo das células ósseas, bem como na matriz óssea. A análise foi semiquantitativa e usamos um sistema de escore ponderado de 12 pontos descrito a seguir:

1. Em primeiro lugar, a percentagem de células positivas em cada área foi avaliada com um escore de 5 pontos: 0 para <5%, 1 para 5-25%, 2 para >25-50%, 3 para >50 - 75%, e 4 para mais de 75%⁷⁴.
2. Em segundo lugar, a intensidade da marcação das marcações positivas foi avaliada com um escore de 4 pontos: 0 para negativa, 1 para fraco, 2 para médio e 3 para a coloração intensa^{75,76,77}.
3. Por último, o escore ponderado para cada área foi calculado multiplicando-se o escore atribuído à percentagem de células positivas pelo escore atribuído à intensidade de marcação. Os resultados foram pontuados como negativo (0-1), fraco (2-3), moderado (4-6) e forte (8-12)^{74,78}.

3.2.15. *Análise estatística*

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa Prism v.4 (Graphpad Inc., La Jolla, EUA). O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar as relações da expressão da proteína marcada pelo anticorpo PSP 85-9, da osteocalcina e da osteonectina em osteoblastomas e osteossarcomas. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação dos anticorpos monoclonais (Mabs) PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9

Na Tabela 3 está descrito o resultado da purificação dos anticorpos a partir das ascites congeladas.

Tabela 3. Concentração dos Mabs PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9 após purificação

Anticorpos purificados	Concentração
PSP 4-5	1,50 mg/ml
PSP 42-22	1,82 mg/ml
PSP 85-9	1,79 mg/ml

As figuras 2A e 2B demonstram o grau de recuperação das imunoglobulinas separadas no gel SDS-PAGE onde e as cadeias leves (~25 KDa) e pesadas (~55 KDa) características de IgGs foram observadas após quebra das pontes dissulfeto pelo 2-mercaptoetanol (figura 2B). Nas figuras 2A e 2B estão indicados os anticorpos: PSP 4-5, PSP 42-22, PSP 85-9 respectivamente.

Figura 2. Gel SDS-PAGE 12% das imunoglobulinas purificadas submetidas a condições não-redutoras (A) e redutora (uso de 2-mercaptoetanol) (B); PM - peso molecular.

4.2. Avaliação da viabilidade dos Mabs por citometria de fluxo

Na Tabela 4 estão descritos os resultados, expressos em média de intensidade de fluorescência nas células analisadas. Cada amostra continha 10.000 células. Nessa tabela também descrevemos os resultados obtidos de um experimento onde os Mabs foram purificados de uma amostra de ascite que ficou congelada por longo período (Mabs antigos). Podemos observar que os resultados são semelhantes mostrando a estabilidade dos anticorpos.

Tabela 4. Marcações das células MG-63 pelos Mabs realizadas por citometria de fluxo

Mabs novos (recém purificados)	Intensidade média de fluorescência (IMF)
MG-63 vs controle isotípico IgG1	4,80
MG-63 vs PSP 4-5 (1,50 mg/ml)	138,32
MG-63 vs PSP 42-22 (1,82 mg/ml)	398,64
MG-63 vs PSP 85-9 (1,79 mg/ml)	555,23
Mabs antigos	
MG-63 vs controle isotípico IgG1	5,45
MG-63 vs PSP 4-5 (2,16 mg/ml)	136,74
MG-63 vs PSP 42-22 (2,19 mg/ml)	355,46
MG-63 vs PSP 85-9 (2,90 mg/ml)	492,12

Esses resultados demonstram uma boa reatividade dos anticorpos contra os antígenos das células MG-63, confirmando que podiam ser usados para a triagem da biblioteca de cDNA. O PSP 85-9 apresentou maior avidéz pelo seu antígeno que os demais anticorpos.

4.3. Avaliação da viabilidade dos Mabs em *Western Blot*

A Figura 3 demonstra que empregando-se essa técnica foi possível visualizar o peso molecular dos antígenos reconhecidos pelo PSP 42-22, que é aproximadamente 26 kDa e pelo PSP 85-9, com cerca de 20 kDa.

Figura 3. *Western Blot* dos anticorpos monoclonais PSP 42-22 (A) e PSP 85-9 (B), testados em lisato total de células MG-63 após solubilização em RIPA

Esses resultados novamente confirmaram que era possível continuar a triagem da biblioteca de cDNA para identificação dos antígenos reconhecidos pelos nossos Mabs. No entanto, o PSP 4-5 não foi detectado por esse método. Esse anticorpo necessitará, provavelmente, de outra estratégia para a identificação de seu antígeno.

4.4. Titulação da biblioteca de cDNA

Ao construirmos a biblioteca de cDNA de células MG-63, o título era de $1,23 \times 10^{11}$ pfu/ml. Após três meses a 4°C o título diminuiu, o que nos levou a congelá-la a -80°C. Entre a construção da biblioteca e o presente estudo se

passaram 10 anos. Portanto era imperativo confirmar a viabilidade da biblioteca, o que foi feito em três diluições e os resultados estão descritos na tabela 5. Os valores de aproximadamente 10^8 pfu/ml observados na titulação foram considerados adequados permitindo a continuação da triagem

Tabela 5. Resultados das diferentes titulações da biblioteca de cDNA de células MG-63

	10^3 (1:1000)	10^4 (1:10000)	10^5 (1:100000)
(nº) halos translúcidos	(80) 8×10^7 pfu/ml	(5) 5×10^7 pfu/ml	(1) 10×10^7
(nº) halos azuis	(11) $1,1 \times 10^7$ pfu/ml	(1) 1×10^7	(0)
Média	$7,66 \times 10^7$ (halos translúcidos) – $0,7 \times 10^7$ (halos azuis) = $6,96 \times 10^7$ pfu/ml		

4.5. Isolamento do cDNA codificador para os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais PSP 42-22 e PSP 85-9

4.5.1. Triagem primária do cDNA codificador para o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal PSP 42-22

Para o isolamento do clone reconhecido pelo PSP 42-22 inicialmente foram preparadas placas de cultura, em triplicata, nas quais foram semeadas bactérias XL1-Blue MRF' infectadas com 180.000 pfu/ml por placa. Usamos dois sistemas de detecção quimioluminescente e NBT/BCIP. Os resultados estão descritos na tabela 6. Nas placas triadas utilizando-se o sistema quimioluminescente e NBT/BCIP, dos 180.000 pfu/ml (180.000 pfu/ml por placa), inúmeros halos translúcidos foram observados, contudo somente seis clones positivos foram detectados e colhidos (1A-1; 1B-1; 2B-1; 3B-1, 3B-2 e 3B-3). Já nas placas triadas utilizando-se a fosfatase alcalina, 5 clones foram detectados e colhidos (1B-1, 2B-1, 3B-1, 3B-2 e 3B-3).

Tabela 6. Triagem primária da biblioteca de cDNA para o Mab PSP 42-22

	Identificação das placas	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados	Clones positivos coletados
Quimioluminescente	1A	(vários) / 1 +	1A-1
	2A	(vários) / Negativo	-
	3A	(vários) / Negativo	-
NBT/BCIP	1B	(vários) / 1 +	1B-1
	2B	(vários) / 1 +	2B-1
	3B	(vários) / 3 +	3B-1, 3B-2 e 3B-3

4.5.2. Triagem secundária do cDNA para o Mab PSP 42-22

A triagem secundária foi realizada a partir dos clones positivos colhidos na triagem primária. Após os experimentos testando-se esses clones, somente o 3B-2 e 3B-3 (testados na diluição 1:1000) mantiveram a positividade. Na tabela 7 estão descritos os resultados observados, onde inúmeros clones foram positivos, porém 16 clones foram colhidos (3B2-1 a 3B2-6; e 3B3-1 a 3B3-10). As figuras 4 e 5 exemplificam os resultados observados nessa triagem.

Tabela 7. Triagem secundária da biblioteca de cDNA utilizando o Mab PSP 42-22

	Identificação dos clones	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados	Clones positivos coletados
Quimioluminescente	3B-1	(vários) / Negativo	-
	3B-2	(vários) / vários +	3B2-1 à 3B2-6
	3B-3	(vários) / vários +	3B3-1 à 3B3-10

Figura 4. Positividade em triagem secundária do clone 3B-2

Figura 5. Positividade em triagem secundária do clone 3B-3

4.5.3. Triagem terciária do cDNA para o Mab PSP 42-22

A triagem terciária foi realizada em todos os clones selecionados na triagem secundária. Realizamos vários testes, variando a diluição e o método de detecção, e os clones 3B2-1, 3B2-2 e 3B2-3, testados na diluição 1:1000, foram os que mantiveram a positividade. Na tabela 8 estão descritos os resultados desse experimento, onde inúmeros clones foram positivos, porém 8 deles foram colhidos (3B21-1 e 3B2-1-2; 3B2-2-1, 3B2-2-2 e 3B2-2-3; 3B2-3-1, 3B2-3-2 e 3B2-3-3). As figuras 6 e 7 exemplificam esses resultados.

Tabela 8. Triagem terciária da biblioteca de cDNA para o Mab PSP 42-22

	Identificação dos clones	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados	Clones positivos coletados
Quimioluminescente	3B2-1	(6) / 2+	3B2-1-1 e 3B2-1-2
	3B2-2	(4) / 4+	3B2-2-1, 3B2-2-2 e 3B2-2-3
	3B2-3	(2) / 3+	3B2-3-1, 3B2-3-2 e 3B2-3-3

Figura 6. Positividade em triagem terciária do clone 3B2-2

Figura 7. Positividade em triagem terciária do clone 3B2-3

4.5.4. Triagem quaternária do cDNA para o Mab PSP 42-22

Nessa etapa testamos todos os clones positivos colhidos na triagem terciária. Após vários testes, nos quais variamos especialmente a diluição, os clones 3B2-2-2 (figura 8) e 3B2-3-1 (figura 9) foram escolhidos para o protocolo de excisão *in vivo*. A escolha se baseou no fato de estarem bem isolados e com intensa marcação.

Tabela 9. Triagem quaternária da biblioteca de cDNA utilizando o Mab PSP 42-22

	Identificação dos clones	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados
Quimioluminescente	3B2-1-1	(16) / Negativo
	3B2-1-2	(12) / 12+
	3B2-2-1	(8) / 8+
	3B2-2-2	(19) / 19+
	3B2-2-3	(12) / Negativo
	3B2-3-1	(3) / 3+
	3B2-3-2	(14) / 14+

Figura 8. Positividade em triagem quaternária do clone 3B2-2-2

Figura 9. Positividade em triagem quaternária do clone 3B2-3-1

4.6. Triagem do cDNA codificador para o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal PSP 85-9

4.6.1. Triagem primária do cDNA codificador para o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal PSP 85-9

Para o isolamento do clone reconhecido pelo Mab PSP 85-9 inicialmente preparamos placas de cultura, em triplicata, nas quais foram semeadas bactérias XL1-Blue MRF' infectadas com 150.000 pfu/ml por placa. Nesse experimento o sistema de detecção escolhido foi o quimioluminescente (anticorpos secundários conjugados com HRP - *horseradish peroxidase*). Os resultados dessa primeira triagem estão descritos na tabela 10. Neste experimento, dos 450.000 pfu/ml, observamos vários halos translúcidos foram observados dos quais escolhemos 5 clones positivos (clone 1A-1, 1A-2, 1A-3, 1A-4 e 1A-5). A figura 10 exemplifica esse resultado.

Tabela 10. Triagem primária da biblioteca de cDNA utilizando o Mab PSP 85-9

	Identificação das placas	(Nº de halos translúcidos)/ clones positivos detectados	Clones positivos coletados
Quimioluminescente	1A	(vários) / 5 +	1A-1, 1A-2, 1A-3, 1A-4 e 1A-5
	2A	(vários) / Negativo	-
	3A	(vários) / Negativo	-

Figura 10. Positividade observada em filme radiográfico na triagem primária do cDNA com o Mab PSP 85-9

4.6.2. Triagem secundária do cDNA para o Mab PSP 85-9

A triagem secundária foi realizada a partir dos clones positivos obtidos na triagem primária. Após a realização dos experimentos testando os cinco clones, somente os 1A-1, 1A-2 e 1A-5, testados na diluição 1:1000, mantiveram a positividade. Na tabela 11 estão descritos os resultados desse experimento, onde inúmeros halos translúcidos foram observados, porém cinco clones foram colhidos (1A1-1, 1A1-2 e 1A1-3; 1A2-1; e 1A5-1). As figuras 11 e 12 exemplificam esses resultados.

Tabela 11. Triagem secundária da biblioteca de cDNA utilizando o Mab PSP 85-9

	Identificação dos clones	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados	Clones positivos coletados
Quimioluminescente	1A-1	(vários) / 3+	1A1-1, 1A1-2 e 1A1-3
	1A-2	(vários) / 1+	1A2-1
	1A-3	(vários) / negativo	-
	1A-4	(vários) / negativo	-
	1A-5	(vários) / 1+	1A5-1

Figura 11. Positividade em triagem secundária do clone 1A-2

Figura 12. Positividade em triagem secundária do clone 1A-5

4.6.3. Triagem terciária do cDNA para o Mab 85-9

A triagem terciária foi novamente realizada em todos os clones selecionados na triagem secundária. Após inúmeros testes, variando-se a diluição, os clones 1A1-2 e 1A5-1, testados na diluição 1:1000, foram os que mantiveram a positividade. Na tabela 12 estão descritos os resultados observados nesse experimento, onde inúmeros halos translúcidos foram obtidos, porém 7 clones foram colhidos (1A12-1 e 1A12-2; 1A51-1, 1A51-2, 1A51-3, 1A51-4 e 1A51-5). As figuras 13 e 14 exemplificam os resultados observados nessa triagem.

Tabela 12. Triagem terciária da biblioteca de cDNA utilizando o Mab PSP 85-9

	Identificação dos clones	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados	Clones positivos coletados
Quimioluminescente	1A1-1	(vários) / negativo	-
	1A1-2	(2) / 2+	1A12-1 e 1A12-2
	1A1-3	(5) / negativo	-
	1A2-1	(31) / negativo	-
	1A5-1	(vários) / todos +	1A51-1, 1A51-2, 1A51-3, 1A51-4 e 1A51-5

Figura 13. Positividade em triagem terciária do clone 1A1-2

Figura 14. Positividade em triagem terciária do clone 1A5-1

4.6.4. Triagem quaternária do cDNA para o Mab 85-9

A etapa de triagem quaternária foi realizada em todos os clones positivos colhidos na triagem terciária. Após inúmeros testes, variando-se a principalmente a diluição, os clones 1A1-2-2 (figura 15) e 1A5-1-3 (figura 16) foram escolhidos para o protocolo de excisão *in vivo*. A escolha se baseou no fato de estarem bem isolados, pela intensa marcação e por serem clones independentes (provenientes de clones diferentes obtidos na triagem secundária). Na tabela 13 estão descritos os resultados observados nesse experimento, onde descrevemos os clones escolhidos.

Tabela 13. Triagem quaternária da biblioteca de cDNA utilizando o Mab PSP 85-9

	Identificação dos clones	(Nº de halos translúcidos) / clones positivos detectados
Quimioluminescente	1A1-2-1	(4) / 4+
	1A1-2-2	(5) / 5+
	1A5-1-1	(5) / 5+
	1A5-1-2	(11) / 11+
	1A5-1-3	(22) / 22+
	1A5-1-4	(11) / 11+
	1A5-1-5	(11) / 11+

Figura 15. Positividade em triagem quaternária do clone 1A1-2-2

Figura 16. Positividade em triagem quaternária do clone 1A5-1-3

4.7. Titulação do bacteriófago *Helper ExAssist*

Previamente à excisão *in vivo* verificamos o título do bacteriófago *Helper ExAssist* em ao menos três diluições, pois o nível aceito é de aproximadamente 10^{10} pfu/ml. Esses resultados estão descritos na Tabela 17 e foram considerados adequados.

Tabela 17. Resultados da titulação do bacteriófago *Helper ExAssist*

	10^3 (1:1000)	10^4 (1:10000)	10^5 (1:100000)
1ª titulação	Impossível contar	(1084) $10,84 \times 10^9$ pfu/ml ou $10,84 \times 10^6$ pfu/ μ l	(134) $13,4 \times 10^9$ pfu/ml ou $13,4 \times 10^6$ pfu/ μ l
2ª titulação	Impossível contar	(1000) $1,0 \times 10^{10}$ pfu/ml ou 10×10^6 pfu/ μ l	(201) $20,1 \times 10^9$ pfu/ml ou $20,1 \times 10^6$ pfu/ μ l

4.8. Amplificação do título do bacteriófago λ Zap Express com o trecho de cDNA de interesse na excisão *in vivo*

Na triagem quaternária isolamos os clones com o trecho de cDNA de interesse para PSP 42-22 (3B2-2-2 e 3B2-3-1) e PSP 85-9 (1A1-2-2 e 1A5-1-3). Na excisão *in vivo* avaliamos a titulação dos clones isolados. Como o cDNA para PSP 42-22 não atingiu a concentração obrigatória, ou seja, maior do que 1×10^5 pfu/ml, os clones foram amplificados. Na tabela 18 estão descritos os resultados dessa amplificação.

Tabela 18. Resultados observados na titulação dos clones com cDNA que expressam o antígeno para o Mab PSP 42-22

Clone amplificado	10^4 (1:10000)	10^6 (1:100000)	10^9 (1:1000000000)
3B2-2-2	(1 halo translúcido) $1,0 \times 10^7$ pfu/ml ou $1,0 \times 10^4$ pfu/ μ l	nenhum halo translúcido	nenhum halo translúcido
3B2-3-1	(84 halos translúcidos) $8,4 \times 10^8$ pfu/ml ou $8,4 \times 10^4$ pfu/ μ l	nenhum halo translúcido	nenhum halo translúcido

A titulação dos clones com cDNA para o PSP 85-9 foi suficiente e portanto realizamos a excisão *in vivo* sem necessidade de amplificação (obtivemos 1A1-2-2 com $\sim 1,0 \times 10^5$ pfu/ml e 1A5-1-3 com $2,2 \times 10^5$ pfu/ml).

4.9. Excisão *in vivo* dos fagemídeos pBK-CMV, com os insertos de cDNA clonados, dos bacteriófagos λ Zap Express, Minipreparação e análise da digestão dos insertos de interesse

A figura 17 demonstra o gel do produto de digestão do cDNA do fagemídeo obtidos do clone 3B2-3-1 através da triagem do PSP 42-22 e a figura 18 demonstra o cDNA obtidos dos clones 1A12-2 e 1A51-3 através da triagem do PSP 85-9. O tamanho do inserto do clone 3B2-3-1 é de aproximadamente 1401 bp, contudo o inserto não está visível no gel. O tamanho do inserto do clone 1A1-2-2 é de aproximadamente 950 bp e do inserto do clone 1A5-1-3 é de 750 bp.

Após a confirmação do peso molecular do fagemídeo e dos insertos todos os clones foram submetidos à purificação usando o kit *QIAfilter Plasmid midi protocol*.

Figura 17. Gel de agarose – Análise de digestão do inserto 3B2-3-1 reconhecido pelo Mab PSP 42-22. As amostras estão dispostas na seguinte ordem: Situação A: amostra sem digestão; B: digestão através da enzima Xho I; C: digestão através da enzima EcoRI; D: digestão através das enzimas Xho I e EcoRI; Amostras: 1: utilizado 10µl de sobrenadante de fagemídeos; 2: utilizado 100µl de sobrenadante de fagemídeos. Teste realizado em duplicata.

Figura 18. Gel de agarose – Análise de digestão dos insertos 1A12-2 e 1A51-3 reconhecidos pelo Mab PSP 85-9. As amostras estão dispostas na seguinte ordem: Situação A: amostra sem digestão; B: digestão através da enzima Xho I; C: digestão através da enzima EcoRI; D: digestão através das enzimas Xho I e EcoRI; Amostras: 1: utilizado 10µl de sobrenadante de fagemídeos obtidos do clone 1A12-2; 2: utilizado 100µl de sobrenadante de fagemídeos obtidos do clone 1A12-2; 3: utilizado 10µl de sobrenadante de fagemídeos obtidos do clone 1A51-3; 4: utilizado 100µl de sobrenadante de fagemídeos obtidos do clone 1A51-3.

Os resultados da purificação do DNA do fagemídeo pBK-CMV com os insertos estão descritos na tabela 19. A quantidade de DNA obtido foi elevada e o grau de pureza (razão DO_{260}/DO_{280}) considerado adequado.

Tabela 19. Resultados observados da purificação do DNA do fagemídeo pBK-CMV com os insertos de interesse

Clone	Concentração do DNA (ng/µl)	DO_{260}/DO_{280}
3B2-3-1 (PSP 42-22)	1532,3	1,92
1A1-2-2 (PSP 85-9)	3633,7	1,90
1A5-1-3 (PSP 85-9)	3891,9	1,91

Após a análise desses resultados, os DNA do fagemídeo pBK-CMV, com o inserto de cada clone isolado, foram enviados para o sequenciamento.

4.10. Sequenciamento dos insertos clonados inseridos no DNA do fagemídeo pBK-CMV

4.10.1. Sequenciamento relativo ao PSP 42-22

Através do sequenciamento foi obtida a sequência de nucleotídeos descrita a seguir:

T3

CTGGCAGGTCGACACTAGTGGATCCAAAGAATTCGGCACGAGGAGAGTCTCTGGGAGACA
GGCACCTGCGGACGCTGCAGATAAGTTACGACGCACTGAAAGATGAAAATTCTAAGCTGA
GAAGAAAGCTGAATGAGGTTGAGAGCTTCTCTGAAGCTCAAACAGAAATGGTGAGGACGC
TTGAGCGGAAGTTAGAAGCAAAAATGATCAAGGAGGAAAGCGACTACCACGACCTGGAGT
CGGTGGTTGAGCAGGTGGAGCAGAACCTGGAGCTGATGACCAAACGGGCTGTAAAGGCA
GAAAACCACGTCGTGAAACTAAAACAGGAAATCAGTTTGCTCCAGGCGCAGGTCTCCAAC
TCCAGCGAGAGAATGAAGCCCTGCGGTGCGGCCAGGGCGCCAGCCTGACCGTGGTGAAG
CAGAACGCCGACGTGGCCCTGCAGAACCTCCGGGTGGTCATGAACAGTGACAGGCTTC
CATCAAGCAACTGGTTTCCGGAGCTGAGACACTGAATCTTGTTGCCGAAATCCTTAAATCT
ATAGACAGAATTTCTGAAGTTAAAGACGAGGAGGAAGACTCTTGAGGACCCCTGGGTGTTT
TCAGCATGAAGCTCCGTGTATACCCTGAGGTCACCACCGCTCGATCTAAATGTGCAGTTGT
GTCCTTAAATATGCAGTCTTCACCCAGAGTAAAGTGTTGATCGCAAGAGTCCAGTGTCGTG
CCCTCAGCCAGTTCTTGCCACCAACAATGGGAGCAGCCCTGGCCGAGTTGTCTCTGGT
TTCTATGCAGCCCTTCTTGCGAAATTCCTGCGATCTTATAGATTCTAATGAGCTCTTGAA
GACATTGTCATAAAAGCCAGTGATTTTAAGAAAAGAGTGGTTCTGGAATCAGTGTTTTCCA
GTCCCATCCCAGAACATCAGTTGTAAGATAAGTACAATTGGTTGTCTTGATTTTATAAGTA
GAACAAACATAAATGTGCCTCTGAGATGGCCACCCCGGCGAGGACCTGTGCCTTCCGC
CGATGCTCAGGGCTCCCTCTGGCTCCCGGCTCACTCTTGTTGGCCCCAGGGTGGTCCCT
GCAGTCATGGCCTGAGTGCAGGGGCCACCGCGTGGCTGCTGCTGCTCCTCCGGAC
CACGGGGACCAAGGTCCACGTTCCGTGCTGTGAAGCTGTCCAgatgtgctccttggctgggggttctgg
ggacgtttcaagtgcatttgacaatgcaggtaaaattcaggaattcaagtatgtcccgggtctgcaggggccaggttgcct

Sentido T7

tttGATTTACCCGGGTGGAATCGATGGGCCCCGCGGCCGCTCTAGAAGTACTCTCGAGTTTT
TTTTTTTTTTTTTTCGGTGAACCTACAGAATTTATTAATAAGAAAGCTATCAATTGGAACAG
GAGGAAAAAAAGTTTTAAAAAAATCTATAGGAAAATAGTCAAAAAAGCATTTAGTGCTCG
TCGCCGTCCCTCTGAGGGGGGCGCTCAGAAAGGCAACTGGGACCTGACAGACCCGGGCA
CATACTTGAAATTCCTGAATTCTAACCTGCATTGTACAAAATGCCACTTGAAACGTCCACCA
GAACCCCCAGCCAAAGAGGACACATCTGGACAGCTTCACAGCACGGAACGTGTGACCTTGG
TCCCCGTGGGTCCCGGAGGAGGACAGCAGCAGCACGCGGTGGCCCTGCGCACTCAG
GCCATGACTGCAGGGACCACTGAGGACCAAGAGTGACCCGGGAGCCAGAGGGA
GCCCTGAGCATCGGCGGAAGGCACAGGTCCCTGCCCGGGGTGGCCATCTCAGAGGCACA
TTTAGTGTTTGTCTACTTATGAAATCAAGGACAACCAATTGTACTTATCTTACAACCTGATGT
TCTGGGATGGGACTGGAAAACACTGATTCCAGAACCACTCTTTTTCTTAAATCACTGGCTT
TTATGACAATGTCTTCCAAGAGCTCATTAGAATCTATAAGATCGCAGGAATTCGCCAAGAA
GGGCTGCATAGAAACCACAGAGACAACCTCGGCCAGGGCTGCTCCCATTTGGTGGCCAA
GAACTGGCTGAGGGCACGACACTGGACTCTTGCGATCAACACTTTACTCTGGGTGAAGAC
TGCATATTTAAGGACACAACCTGCACATTTAGATCGAGCGGTGGTGACCTCAGGGTATACAC
GGAGCTTCATGCTGAGAACACCCAGGGTCTCAAGAGTCTTCCTCCTCGTCTTAACTTC
AGAAATCTGTCTATAGATTTAAGGATTTTCGGCAACAAGATTCAGTGTCTCAGCTCCGGAAA
CCAGTTGCTTGATGGAAGCCTGTGCACTGTTTCATGACCACCCGGAAGTTCTGCAGGGCCA
CGTCGGCGTTCTGCTTCACCACGGTCAGGCTGGGGCCTGGCCGCACCCGcagggttcattctctgc
tggaattggaactgcgcctggagcaactgatttctgttaatttcccagcgggttctgcctttacagccgttgggcatcagct
ccaggttctgtccacctgtggaacccgaactccaggtcgggggaagccct

Sentido T7 inverso

```

agggcttccccgacctggagttcgggggtcaccaggtggacagaaacctggagctgatgcccacgggctgtaaaggcagaaac
cccgtcgggaaaattaaacaggaaatcagttgctccaggcgagtttccaattccagcgagagaatgaaccctgCGGTGCGG
CCAGGCCCCAGCCTGACCGTGGTGAAGCAGAACGCCGACGTGGCCCTGCAGAACTTCCG
GGTGGTCATGAACAGTGCACAGGCTTCCATCAAGCAACTGGTTTCCGGAGCTGAGACACT
GAATCTTGTTGCCGAAATCCTTAAATCTATAGACAGAATTTCTGAAGTTAAAGACGAGGAGG
AAGACTCTTGAGGACCCCTGGGTGTTCTCAGCATGAAGCTCCGTGTATACCCTGAGGTCA
CCACCGCTCGATCTAAATGTGCAGTTGTGTCTTAAATATGCAGTCTTCACCCAGAGTAAA
GTGTTGATCGCAAGAGTCCAGTGTCTGTCCTTAAATATGCAGTCTTCACCCAGAGTAAA
GCAGCCCTGGCCGAGTTGTCTCTGTGGTTTCTATGCAGCCCTTCTTGGCGAAATTCCTGCG
ATCTTATAGATTCTAATGAGCTCTTGAAGACATTGTCATAAAAGCCAGTGATTTTAAGAAA
AAGAGTGTTTCTGGAATCAGTGTTTTCCAGTCCCATCCCAGAACATCAGTTGTAAGATAAG
TACAATTGGTTGTCTTGATTTTATAAGTAGAACAAACACTAAATGTGCCTCTGAGATGGCC
ACCCCGGGCAGGGACCTGTGCCTTCCGCCGATGCTCAGGGCTCCCTCTGGCTCCCGGGT
CACTCTTGTTGGCCCCAGTGGGTGGTCCCTGCAGTCATGGCCTGAGTGCGCAGGGGCCAC
CGCGTGGCTGCTGCTGTCTCCTCCGGGACCCACGGGGACCAAGGTCACACGTTCCGTG
CTGTGAAGCTGTCCAGATGTGCCTCTTTGGCTGGGGGTTCTGGTGGACGTTTCAAGTGGC
ATTTTGTACAATGCAGGTTAGAATTCAGGAATTTCAAGTATGTGCCCGGGTCTGTGAGGTC
CCAGTTGCCTTTCTGACGGCCCCCCTCAGAGGGACGGCGACGAGCACTAAATGCTTTTTT
GACTATTTTCTATAGATTTTTTTTAAACTTTTTTTTCTCCTGTTCCAATTGATAGCTTTCT
TATTTAATAAATTCTGTAGTTCACCGCAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGTACTTCTAG
AGCGGCCGCGGGCCCATCGATTCCACCCGGGTGAAATcaaa

```

4.10.2. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados relativo ao PSP 42-22

Através do alinhamento da sequência obtivemos 14 sequências descritas no *Homo sapiens* que apresentaram identidade entre 95 e 99%, estas estão descritas na figura 20 gerada pelo programa BlastN 2.2.29+ em 15/05/2014.

Dentre as sequências encontradas, a que possui o resultado de maior concordância, ou seja 99% de identidade, está descrita pela *National Center for Biotechnology Information* como: "*Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3, mRNA*" código de referência NM_001039708.1 (conteúdo disponível no anexo 8). O alinhamento detalhado está exibido na figura 21.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3, mRNA	2606	2606	93%	0.0	99%	NM_001039708.1
Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 1, mRNA	2606	2606	93%	0.0	99%	NM_001039707.1
Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 2, mRNA	2606	2606	93%	0.0	99%	NM_006643.3
PREDICTED: Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant X2, mRNA	2586	2586	92%	0.0	99%	XM_005266051.1
PREDICTED: Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant X1, mRNA	2410	2410	92%	0.0	98%	XM_005266050.1
Genomic sequences[show first]						
Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly HuRef	2076	2076	92%	0.0	93%	AC_000133.1
Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1	2071	2071	92%	0.0	93%	NC_018912.2
Homo sapiens chromosome 1, GRCh38 Primary Assembly	2071	2071	92%	0.0	93%	NC_000001.11
Homo sapiens chromosome 9, alternate assembly HuRef	1786	2617	92%	0.0	99%	AC_000141.1
Homo sapiens chromosome 9, alternate assembly CHM1_1.1	1775	2606	92%	0.0	99%	NC_018920.2
Homo sapiens chromosome 9, GRCh38 Primary Assembly	1775	2606	92%	0.0	99%	NC_000009.12
Homo sapiens chromosome 18, alternate assembly HuRef	1327	1327	54%	0.0	95%	AC_000150.1
Homo sapiens chromosome 18, alternate assembly CHM1_1.1	1321	1321	54%	0.0	95%	NC_018929.2
Homo sapiens chromosome 18, GRCh38 Primary Assembly	1315	1315	54%	0.0	95%	NC_000018.10

Figura 20. Listagem das seqüências identificadas após alinhamento, pelo programa BlastN, para o inserto do clone 3B2-3-1 relativo ao Mab PSP 42-22

Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3, mRNA

Sequence ID: ref|NM_001039708.1| Length: 2171 Number of Matches: 1

Range 1: 752 to 2171

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
2606 bits(1411)	0.0()	1417/1420(99%)	0/1420(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 42	GGAGAGTCTCTGGGAGACAGGCACCTGCGGACGCTGCAGATAAGTTACGACGCACTGAAA	101			
Sbjct 752	GGAGAGTCTCTGGGAGACAGGCACCTGCGGACGCTGCAGATAAGTTACGACGCACTGAAA	811			
Query 102	GATGAAAATCTTAAGCTGAGAAGAAAGCTGAATGAGGTTTCTCTGAAGCTCAA	161			
Sbjct 812	GATGAAAATCTTAAGCTGAGAAGAAAGCTGAATGAGGTTTCTCTGAAGCTCAA	871			
Query 162	ACAGAAATGGTGAGGACGCTTGAGCGGAAGTTAGAAGCAAAATGATCAAGGAGGAAAGC	221			
Sbjct 872	ACAGAAATGGTGAGGACGCTTGAGCGGAAGTTAGAAGCAAAATGATCAAGGAGGAAAGC	931			
Query 222	GACTACCACGACCTGGAGTCGGTGGTTTTCAGCAGGTGGAGCAGAACCTGGAGCTGATGACC	281			
Sbjct 932	GACTACCACGACCTGGAGTCGGTGGTTTTCAGCAGGTGGAGCAGAACCTGGAGCTGATGACC	991			
Query 282	AAACGGGCTGTAAAGGCAGAAAACACGTCGTGAACTAAACAGGAAATCAGTTTGCTC	341			
Sbjct 992	AAACGGGCTGTAAAGGCAGAAAACACGTCGTGAACTAAACAGGAAATCAGTTTGCTC	1051			
Query 342	CAGGCGCAGGTCTCCAACTTCCAGCGAGAGAATGAAGCCCTGCGGTGCGGCCAGGGCGCC	401			
Sbjct 1052	CAGGCGCAGGTCTCCAACTTCCAGCGAGAGAATGAAGCCCTGCGGTGCGGCCAGGGGTGCC	1111			
Query 402	AGCCTGACCGTGGTGAAGCAGAACGCCGACGTGGCCCTGCAGAACCTCCGGGTGGTCATG	461			
Sbjct 1112	AGCCTGACCGTGGTGAAGCAGAACGCCGACGTGGCCCTGCAGAACCTCCGGGTGGTCATG	1171			
Query 462	AACAGTGACAGGCTTCCATCAAGCAACTGGTTTCCGGAGCTGAGACACTGAATCTTGTT	521			
Sbjct 1172	AACAGTGACAGGCTTCCATCAAGCAACTGGTTTCCGGAGCTGAGACACTGAATCTTGTT	1231			
Query 522	GCCGAAATCCTTAAATCTATAGACAGAATTTCTGAAGTTAAAGACGAGGAGGAAGACTCT	581			
Sbjct 1232	GCCGAAATCCTTAAATCTATAGACAGAATTTCTGAAGTTAAAGACGAGGAGGAAGACTCT	1291			
Query 582	TGAGGACCCCTGGGTGTTCTCAGCATGAAGCTCCGTGTATACCTGAGGTACCCACCGCT	641			
Sbjct 1292	TGAGGACCCCTGGGTGTTCTCAGCATGAAGCTCCGTGTATACCTGAGGTACCCACCGCT	1351			
Query 642	CGATCTAAATGTGAGTGTGTCTTAAATATGCAGTCTTCACCCAGAGTAAAGTGTGA	701			
Sbjct 1352	CGATCTAAATGTGAGTGTGTCTTAAATATGCAGTCTTCACCCAGAGTAAAGTGTGA	1411			
Query 702	TCGCAAGAGTCCAGTGTGTCGTCCTCAGCCAGTCTTGGCCACCACAATGGGAGCAGCCC	761			
Sbjct 1412	TCGCAAGAGTCCAGTGTGTCGTCCTCAGCCAGTCTTGGCCACCACAATGGGAGCAGCCC	1471			
Query 762	TGGCCGAGTGTCTCTGTGGTTTCTATGCAGCCCTTCTTGGCGAAATTCCTGCGATCTTA	821			
Sbjct 1472	TGGCCGAGTGTCTCTGTGGTTTCTATGCAGCCCTTCTTGGCGAAATTCCTGCGATCTTA	1531			
Query 822	TAGATTCTAATGAGCTCTTGAAGACATTGTGATATAAAGCCAGTGATTTTAAAGAAAAGA	881			
Sbjct 1532	TAGATTCTAATGAGCTCTTGAAGACATTGTGATATAAAGCCAGTGATTTTAAAGAAAAGA	1591			
Query 882	GTGGTTCTGGAATCAGTGTCTTCCAGTCCCATCCAGAACATCAGTTGTAAGATAAGTAC	941			
Sbjct 1592	GTGGTTCTGGAATCAGTGTCTTCCAGTCCCATCCAGAACATCAGTTGTAAGATAAGTAC	1651			
Query 942	AATTGGTTGTCTTGATTTTCAAGTAGAACAAACACTAAATGTGCCTCTGAGATGGCCA	1001			
Sbjct 1652	AATTGGTTGTCTTGATTTTCAAGTAGAACAAACACTAAATGTGCCTCTGAGATGGCCA	1711			
Query 1002	CCCCGGGCAGGGACCTGTGCTTCCGCGATGCTCAGGGCTCCCTCTGGCTCCCGGGTCA	1061			
Sbjct 1712	CCCCGGGCAGGGACCTGTGCTTCCGCGATGCTCAGGGCTCCCTCTGGCTCCCGGGTCA	1771			
Query 1062	CTCTTGTGGCCCCAGTGGGTGGTCCCTGCAGTCATGGCCTGAGTGCGCAGGGGCCACCGC	1121			
Sbjct 1772	CTCTTGTGGCCCCAGTGGGTGGTCCCTGCAGTCATGGCCTGAGTGCGCAGGGGCCACCGC	1831			
Query 1122	GTGGCTGTGCTGTCTCTCCCTCCGGGACCCACGGGGACCAAGGTCACACGTTCCGTGCTGT	1181			
Sbjct 1832	GTGGCTGTGCTGTCTCTCCCTCCGGGACCCACGGGGACCAAGGTCACACGTTCCGTGCTGT	1891			
Query 1182	GAAGCTGTCCAGATGTGCTCTTTGGCTGGGGGTTCTGGTGGACGTTTCAAGTGGCATT	1241			
Sbjct 1892	GAAGCTGTCCAGATGTGCTCTTTGGCTGGGGGTTCTGGTGGACGTTTCAAGTGGCATT	1951			
Query 1242	TGTACAATGCAGGTTAGAATTCAGGAATTTCAAGTATGTGCCCGGGTCTGTGAGGTCCCA	1301			
Sbjct 1952	TGTACAATGCAGGTTAGAATTCAGGAATTTCAAGTATGTGCCCGGGTCTGTGAGGTCCCA	2011			
Query 1302	GTGCTCTTTCTGACGGCCCCCTCAGAGGGACGGCGACGAGCACTAAATGCTTTTTTgac	1361			
Sbjct 2012	GTGCTCTTTCTGACGGCCCCCTCAGAGGGACGGCGATGAGCACTAAATGCTTTTTTgac	2071			
Query 1362	tattttctatagatttttttttaaaacttttttttCCTCCTGTTCGAATTGATAGCTTTC	1421			
Sbjct 2072	TATTTTCCTATAGATTTTTTTTAAACTTTTTTCTCCTGTTCGAATTGATAGCTTTC	2131			
Query 1422	TTATTTAATAAATCTGTAGTTCACCGCAaaaaaaaaaaaaa	1461			
Sbjct 2132	TTATTTAATAAATCTGTAGTTCACCGCAAAAAAAAAAAAAA	2171			

Figura 21. Alinhamento da sequência com maior identidade para o inserto do clone 3B2-3-1 relativo ao Mab PSP 42-22

4.10.3. Sequenciamento relativo ao PSP 85-9 – clone 1A12-2

O clone 1A12-2 selecionado na triagem forneceu as sequências de nucleotídeos descritas a seguir:

Clone 1A12-2

Sentido T3

gGAGACTGCACGTCGACACTAGTGGATCCAAAGAATTCGGCACGAGGGTTTTTAAATCTAA
CAACTACTTTTGGGGACTTGCCACATCTCTGGGATTTGAATGGGGATTGTATCCCATTTTA
CTGTCTTTTAGGTTTACATTTACCACGTTTCTCTCTGCTCCCCTTGCCCACTGGGGACT
CCTCTTTGGCTCCTTGAAGTTTGCTGCTTAGAGTTGGAAGTGCAGCAGGCAGGTGATCATG
CTGCAAGTTCTTTCTGGACCTCTGGCAAAGGGAGTGGTCAGTGAAGGCCATCGTTACCTTG
GGATCTGCCAGGCTGGGGTGTTCGGTATCTGCTGTTACAGCTCTCCACTGTAATCCGA
ATACTTTGCCAGTGCACATAATCTCTTTGGAGATAAAATTCATTAGTGTGTTACTAAATGTTAA
TTTTCTTTTGGCGAAAATACAGTACCGTGTCTGAATTAATTATTAATATTTAAAATACTTCATT
CCTTAACCTCTCCCTCATTGCTTTGCCACAGCCTATTCAGTTCCTTTGTTGGCAGGATTC
TGCAAAATGTGTCTCACCCTACTGAGATTGTTTCAGCCCCTGATGTATTTGATTGATTG
TTTCTGGTGGTAGCTTGTCTGAAATGTGTGTAGAAAGCAAGTATTTATGATAAAATGTT
GTGTAGTGCATGCTCTGTGTGGAATTCAGAGGAAAACCCAGATTCAGTGATTAACAATGCC
AAAAATGCAAGTAAGTACCATTTGTTCAAATGACAGTGGTGCTATTTCTCTTTGTGGCCT
TTTAGACTTTTGTGGCCTAAAATTCCATTTTATTGGGAACCCATTTTCCACCTGGTCTTTCT
TGACAGGGTTTTTTTCTACTTTAAACAGTTTCTAAATAAAATTCTGTATTTCAAGAGTAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGTACTTCTAGAGCGGCCGCGGGCCCATCGATTT
TCCACCCGGGTGGGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACA
ATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAA
TCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAAAACCAAAGgccccgaccgatcgccct
tccaacagttgccagcctgaatggcgaatggaaatccaaatttaaagggaaggggtaaaacaacggatccaaatggttg
ggaatttaaaatccaagtccaaggccatttcagg

Sentido T7

catgGTACCCACCCGGGTGGAAATCGATGGGCCCGCGGCCGCTCTAGAAGTACTCTCGAGT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTCTTGAAATACAGAATTTTATTTAAAATACTGTTTAAAGT
AAAAAAAAAACCTGTCAAGAAAGACCAGGTGGAAAATGGGTTCCCAATAAAATGGAATTTTA
GGGCAACAAAAGTCTAAAAGGCCACAAAAGAGAAATAGCACCCTGTCAATTTGAACAATGG
CTAGTTACTTGCATTTTTTGGCATTGTTAATCACTGAATCTGGGTTTTCTCTGAATTCACA
CAGAGCATGCACTACACAACATTTTTATCATAAAATACTTGCTTTCTACACACATTTTCAAGGAC
AAGCTACCACCAGAAACAAATCAATACAAATACATCAGGGGCTGAACAATCTCAGTAGTGG
GTGAGACACATTTTGCAGAATCCTGCCAAACAAAGGAACTGAATAGGCTGTGGGCAAAGCA
AATGAGGGAGAGTTAAGGAATGAAGTATTTTAAATATTAATAATTAATTCAGACACGGTACT
GTATTTTCCGCAAAGAAATTAACATTTAGTAACACACTAATGAATTTTATCTCCAAAGAGA
TTAGTGCATGGCAAAGTATTCGGATTACAGTGGAGAGCTGTGAACAGCAGATACCGAAAA
CACCCAGCCTGGCAGATCCCAAGGTAACGATGGCCTTCACTGACCACTCCCTTTGCCAG
AGGTCCAGAAAGAACTTGCAGCATGATCACCTGCCTGCTGCACTTCCAACCTCTAAGCAGCA
AACTTCAAGGAGCCAAAGAGGAGTCCCCAGTGGGCAAGGGGAGCAGAGAAGAGAAACGT
GGTAAATGTAAACCTAAAAGACAGTAAAATGGGATACAATCCCCATTCAAATCCCAGAGAT
GTGGGCAAGTCCCCAAAAGTAGTTGTTAGATTAAAAAACCCCTCGTGCCGAATTCCTTTGGAT
CCACTAGTGTGCGAGCTGCAGGCGCGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTA
ATTTGAGCTTGGCGTAATCAAGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
AATTCACACAATATACGAGCCGGAAGTATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGT
gagctaactcacagtaattgcggttagcggtactgacggttactaaaccagctctgcttaataagacctccaccgtaccgctacc
ggccatttgcgtcaatggggccgaattttacaaatttttga

Sentido T7 reverso

tccaaaaattgtaaaaattccggccccattgacgcaaatggccggtaggcggtacggtgggaggtcttattaagcagagctgggttag
tgaaccgtcagatccgctagccgcaattactgtgagttagctcACTCATTAGGCACCCCCAGGCTTTACACTTTA
TACTTCCGGCTCGTATATTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
CTATGACCTTGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG
CTCGCGCGCCTGCAGGTGACACTAGTGGATCCAAAGAATTCGGCACGAGGGTTTTTTAA
TCTAACAACTACTTTTTGGGGACTTGCCACATCTCTGGGATTTGAATGGGGATTGTATCCC
ATTTTACTGTCTTTTAGGTTTACATTTACCACGTTTTCTTCTCTGCTCCCCCTTGCCCACTGG
GGACTCCTCTTTGGCTCCTTGAAGTTTGCTGCTTAGAGTTGGAAGTGCAGCAGGCAGGTG
ATCATGCTGCAAGTTCTTTCTGGACCTCTGGCAAAGGGAGTGGTCAGTGAAGGCCATCGTT
ACCTTGGGATCTGCCAGGCTGGGGTGTTCGGTATCTGCTGTTACAGCTCTCCACTGTA
ATCCGAATACTTTGCCAGTGCATAATCTCTTTGGAGATAAAATTCATTAGTGTGTTACTAAA
TGTTAATTTTCTTTTGCAGAAAATACAGTACCGTGTCTGAATTAATTATTAATTTAAAATAC
TTCATTCTTAACCTCTCCCTCATTTGCTTTGCCACAGCCTATTCAGTTCCTTTGTTTGGCA
GGATTCTGCAAAATGTGTCTCACCCACTACTGAGATTGTTACAGCCCTGATGTATTTGTATT
GATTTGTTTCTGGTGGTAGCTTGTCTGAAATGTGTGTAGAAAGCAAGTATTTTATGATAAA
AATGTTGTGTAGTGCATGCTCTGTGTGGAATTCAGAGGAAAACCCAGATTCAGTGATTAAC
AATGCCAAAAAATGCAAGTAACTAGCCATTGTTCAAATGACAGTGGTGTCTATTTCTCTTTG
TGGCCTTTTAGACTTTTGTGCCCCTAAAATTCCATTTTATTGGGAACCCATTTTCCACCTGGT
CTTTCTTGACAGGGTTTTTTTTTACTTTAAACAGTTTTTAAATAAAATTCTGTATTTCAAGAGT
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGTACTTCTAGAGCGGCCGCGGGCCCATC
GATTTCCACCCGGGTGGGTACcatg

4.10.4. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados relativo ao PSP 85-9 – clone 1A12-2

Através do alinhamento da sequência obtivemos 14 sequências descritas no *Homo sapiens* que apresentaram identidade entre 85 e 100%, descritas na figura 22 gerada pelo programa BlastN 2.2.29+ em 19/06/2014.

Dentre as sequências encontradas, a que possui o resultado de maior concordância é descrita pela *National Center for Biotechnology Information* como: "*Homo sapiens microtubuleassociated protein, RP/EB family, member 1 (MAPRE1), mRNA*" código de referência NM_012325.2 (conteúdo disponível no anexo X). O alinhamento detalhado está exibido na figura 23.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
Homo sapiens microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1 (MAPRE1), mRNA	1655	1655	56%	0.0	100%	NM_012325.2
Genomic sequences[show first]						
Homo sapiens chromosome 20, alternate assembly CHM1_1.1	1624	1624	55%	0.0	100%	NC_018931.2
Homo sapiens chromosome 20, alternate assembly HuRef	1624	1624	55%	0.0	100%	AC_000152.1
Homo sapiens chromosome 20, GRCh38 Primary Assembly	1624	1624	55%	0.0	100%	NC_000020.11
Homo sapiens chromosome 4, alternate assembly CHM1_1.1	1399	1399	56%	0.0	95%	NC_018915.2
Homo sapiens chromosome 4, alternate assembly HuRef	1399	1399	56%	0.0	95%	AC_000136.1
Homo sapiens chromosome 4, GRCh38 Primary Assembly	1399	1399	56%	0.0	95%	NC_000004.12
Homo sapiens chromosome 2, alternate assembly CHM1_1.1	776	776	48%	0.0	85%	NC_018913.2
Homo sapiens chromosome 2, alternate assembly HuRef	776	776	48%	0.0	85%	AC_000134.1
Homo sapiens chromosome 2, GRCh38 Primary Assembly	776	776	48%	0.0	85%	NC_000002.12
Homo sapiens chromosome 8, alternate assembly HuRef	638	1270	54%	1e-179	92%	AC_000140.1
Homo sapiens chromosome 8, GRCh38 Primary Assembly	638	1265	54%	1e-179	92%	NC_000008.11
Homo sapiens chromosome 8, alternate assembly CHM1_1.1	632	1265	54%	5e-178	96%	NC_018919.2
Homo sapiens chromosome X, alternate assembly HuRef	58.4	58.4	2%	4e-05	97%	AC_000155.1

Figura 22. Listagem das seqüências geradas após alinhamento, pelo programa BlastN, para o inserto do clone 1A12-2 relativo ao Mab PSP 85-9

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1655 bits(896)	0.0()	896/896(100%)	0/896(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 338		GT TTT TTA ATCTAACA AACTACTTTTGGGGACTTGCCACATCTCTGGGATTTGAATGGGG			397
Sbjct 1745		GT TTT TTA ATCTAACA AACTACTTTTGGGGACTTGCCACATCTCTGGGATTTGAATGGGG			1804
Query 398		ATTGTATCCCATTTTACTGTCTTTTAGGTTTACATTACCACGTTTCTCTCTCTGCTCC			457
Sbjct 1805		ATTGTATCCCATTTTACTGTCTTTTAGGTTTACATTACCACGTTTCTCTCTCTGCTCC			1864
Query 458		CCTTGCCCACTGGGGACTCCTCTTTGGCTCCTTGAAGTTTGTCTGCTTAGAGTTGGAAAGTG			517
Sbjct 1865		CCTTGCCCACTGGGGACTCCTCTTTGGCTCCTTGAAGTTTGTCTGCTTAGAGTTGGAAAGTG			1924
Query 518		CAGCAGGCAGGTGATCATGCTGCAAGTTCTTTCTGGACCTCTGGCAAAGGGAGTGGTCAG			577
Sbjct 1925		CAGCAGGCAGGTGATCATGCTGCAAGTTCTTTCTGGACCTCTGGCAAAGGGAGTGGTCAG			1984
Query 578		TGAAGGCCATCGTTACCTTGGGATCTGCCAGGCTGGGGTGTTCGGTATCTGCTGTTCA			637
Sbjct 1985		TGAAGGCCATCGTTACCTTGGGATCTGCCAGGCTGGGGTGTTCGGTATCTGCTGTTCA			2044
Query 638		CAGCTCTCCACTGTAATCCGAATACTTTGCCAGTGCCTAATCTCTTTGGAGATAAAATT			697
Sbjct 2045		CAGCTCTCCACTGTAATCCGAATACTTTGCCAGTGCCTAATCTCTTTGGAGATAAAATT			2104
Query 698		CATTAGTGTGTTACTAAATGTTAATTTTCTTTTGCAGAAAATACAGTACCGTGTCTGAAT			757
Sbjct 2105		CATTAGTGTGTTACTAAATGTTAATTTTCTTTTGCAGAAAATACAGTACCGTGTCTGAAT			2164
Query 758		TAATTATTAATATTTAAAATACTTCATTCCTTAACCTCTCCCTCATTGCTTTGCCACAG			817
Sbjct 2165		TAATTATTAATATTTAAAATACTTCATTCCTTAACCTCTCCCTCATTGCTTTGCCACAG			2224
Query 818		CCTATTCAAGTTCCTTTGTTTGGCAGGATTCTGCAAAATGTGTCTCACCCTACTGAGAT			877
Sbjct 2225		CCTATTCAAGTTCCTTTGTTTGGCAGGATTCTGCAAAATGTGTCTCACCCTACTGAGAT			2284
Query 878		TGTTCAAGCCCTGATGTATTTGTATTGATTGTTTCTGGTGGTAGCTTGCTCTGAAATGT			937
Sbjct 2285		TGTTCAAGCCCTGATGTATTTGTATTGATTGTTTCTGGTGGTAGCTTGCTCTGAAATGT			2344
Query 938		GTGTAGAAAGCAAGTATTTTATGATAAAAAATGTTGTGTAGTGCATGCTCTGTGTGGAATT			997
Sbjct 2345		GTGTAGAAAGCAAGTATTTTATGATAAAAAATGTTGTGTAGTGCATGCTCTGTGTGGAATT			2404
Query 998		CAGAGGAAAACCCAGATTCAAGTGATTAACAATGCCAAAAATGCAAGTAACTAGCCATTG			1057
Sbjct 2405		CAGAGGAAAACCCAGATTCAAGTGATTAACAATGCCAAAAATGCAAGTAACTAGCCATTG			2464
Query 1058		TTCAAATGACAGTGGTGCTATTTCTCTTTTGTGGCCTTTTAGACTTTTGTGGCCCTAAAA			1117
Sbjct 2465		TTCAAATGACAGTGGTGCTATTTCTCTTTTGTGGCCTTTTAGACTTTTGTGGCCCTAAAA			2524
Query 1118		TTCCATTTTATTGGGAACCCATTTTCCACCTGGTCTTTCTTGACAGGGTTTTTTCTACT			1177
Sbjct 2525		TTCCATTTTATTGGGAACCCATTTTCCACCTGGTCTTTCTTGACAGGGTTTTTTCTACT			2584
Query 1178		TTAAACAGTTTCTAAATAAAATTctgtatttcaagagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa			1233
Sbjct 2585		TTAAACAGTTTCTAAATAAAATTCTGTATTTCAGAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA			2640

Figura 23. Alinhamento da sequência com maior identidade para o inserto do clone 1A12-2 relativo ao Mab PSP 85-9

4.10.5. Sequenciamento relativo ao PSP 85-9 – clone 1A15-3

Clone 1A51-3

Sentido T3

agcGAGACTGCAGGTCGACACTAGTGGATCCAAAGAATTCGGCACGAGGCGTCAATGCCC
CGGACCTCTACATTCCAGCAATGGCTTTTCATCACCTACGTTTTGGTGGCTGGTCTTGCCT
GGGGACCCAGGATAGGTTCTCCCCAGACCTCCTGGGGCTGCAAGCGAGCTCAGCCCTGG
CCTGGCTGACCTGGAGGTGCTGGCCATCCTGCTCAGCCTCTATCTGGTCACTGTCAACA
CCGACCTCACCACCATCGACCTGGTGGCCTTCTTGGGCTACAAATATGTCGGGATGATTG
GCGGGGTCTCATGGGCCTGCTCTTCGGGAAGATTGGCTACTACCTGGTGTGGGCTGGT
GCTGCGTGGCCATCTTTGTGTTTCATGATCCGGACGCTGCGGCTGAAGATCTTGGCAGACG
CAGCAGCTGAGGGGGTCCCGGTGCGTGGGGCCCGGAACCAGCTGCGCATGTACCTGACC
ATGGCGGTGGCGGCGCGCAGCCTATGCTCATGTACTGGCTCACCTTCCACCTGGTGCG
GTGAGCGCGCCCGCTGAACCTCCCGCTGCTGCTGCTGCTGGGGGCCACTGTGGCCG
CCGAACCTCATCTCCTGCCTGCAGGCCCAAGGTCCACCCTGTCTGGCCACAGGCACCGCC
TCCATCCCATGTCCCGCCAGCCCCGCCCAACCCAAGGTGCTGAGAGATCTCCAGCTG
CACAGGCCACCGCCCCAGGGCGTGGCCGCTGTTACAGAAACAATAAACCTGATGGGCAT
GGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGTACTTCTAGAGCGGCCGCGGGCCCATCGATT
TCCACCCGGGTGGGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACA
ATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAA
TCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAGATCCAATTTTTAAGTGTAT
AATGGGTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGGGTATTTTAGATTCAcagtcccaaggctcatttcaggc
ccctcagtcctcacagctgttcacatcataatcagccataccacatttgaaggtttacttgcttaaaaaacctcccaacctcccc
ctgaacctgaaacataaaatgaatggaattggtggtggaactgtttattggccctt

Sentido T7

ttagCTTCTGGTACCACCCGGGTGGAAATCGATGGGCCCCGCGGCCGCTCTAGAAGTACTCT
CGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATGCCCATCAGGGTTTATTGTTTCTGTAACAGCGGCCA
CGCCCTGGGGCGGTGGCCTGTGCAGCTGGAGATCTCTCAGCACCTTGGGTTGGGGGCGG
GGCTGGGCGGGACATGGGATGGAGGCGGTGCCTGTGGCCAGACAGGGTGGACCTTGGG
GCCTGCAGGCAGGAGATGAGTTCGGCGGCCACAGTGGCCCCCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCGGGAGGTTACGCGGGCGCGCTACCGCACCAAGGTGGAAGGTGAGCCAGTACATGAGC
ATAGGCTGCGCCGCCGCCACCGCCATGGTCAGGTACATGCGCAGCTGGTTCGGGGCCCC
ACGCACCGGGACCCCCCTCAGCTGCTGCGTCTGCCAAGATCTTCAGCCGCAGCGTCCGGA
TCATGAACACAAAGATGGCCACGCAGCACCAGCCCAGCACCAGGTAGTAGCCAATCTTCC
CGAAGAGCAGGCCCATGAGGACCCCGCCAATCATCCCGACATATTTGTAGCCCAAGAAGG
CCACCAGGTGATGGTGGTGAGGTGCGTGTGACAGTGACCAGATAGAGGCTGAGCAGG
ATGGCCAGCACCTCCAGGGTCAGCCAGGCCAGGGCTGAGCTCGTTGCAGCCCCAGGAG
GTCTGGGGAGAACCTATCCTGGGTCCCCAGCGCAAGACCAGCCACCAAAACGTAGGTGAT
GAAAGCCATTGCTGGAATGTAGAGGTCCGGGGCATTGACGCCTCGTGCCGAATTCTTTGG
ATCCACTAGTGTGACCTGCAGGCGCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTT
AATTTTCAGGCTTGGCGTAATCAAGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCACACAATATACGAGCCGGAAGTATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACAGTAATTGCGGCTAGCGGATCTGACGGTTCACTAAACCAGCTCTGCTTA
TATAGACCTCCCACCGTAACGCCTACCGCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAATTGTTACG
ACatttggaaagtcccggtgatttgggtgccaacaaactccattgacgtcaatggggtggaacttggaatccccgtgagtcaaa
ccgctatccacgcccattgatgtactgccaacacccgatcccatgggtatagcgatgactaataaccttaaat

Sentido T7 reverso

```
atttaaggtatttagtcacgctatacccatgggatgacggttttggcagtacatcaatgggctggatagcggtttgactcacggggatttcc
aagtttccacccattgacgtcaatgggagtttgttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatGTCGTAACAATTCCGC
CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTTTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGG
TTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCCGCAATTACTGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCAC
CCCAGGCTTTACACTTTATACTTCCGGCTCGTATATTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAA
TTTCACACAGGAAACAGCTATGACCTTGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAAAG
GGAACAAAAGCTGGAGCTCGCGCGCCTGCAGGTGACACTAGTGGATCCAAAGAATTCCG
CACGAGGCGTCAATGCCCCGGACCTCTACATTCCAGCAATGGCTTTTCATCACCTACGTTT
TGGTGGCTGGTCTTGCGCTGGGGACCCAGGATAGGTTCTCCCCAGACCTCCTGGGGCTG
CAAGCGAGCTCAGCCCTGGCCTGGCTGACCCTGGAGGTGCTGGCCATCCTGCTCAGCCT
CTATCTGGTCACTGTCAACACCGACCTCACCACCATCGACCTGGTGGCCTTCTTGGGCTAC
AAATATGTCGGGATGATTGGCGGGGTCTCATGGGCCTGCTCTTCGGGAAGATTGGCTAC
TACCTGGTGCTGGGCTGGTGCTGCGTGGCCATCTTTGTGTTTCATGATCCGGACGCTGCGG
CTGAAGATCTTGGCAGACGCAGCAGCTGAGGGGGTCCCGGTGCGTGGGGCCCCGGAACCA
GCTGCGCATGTACCTGACCATGGCGGTGGCGGCGGCGCAGCCTATGCTCATGTACTGGC
TCACCTTCCACCTGGTGCGGTGAGCGCGCCCGCTGAACCTCCCGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGGGGGGCCACTGTGGCCGCCGAATCATCTCCTGCCTGCAGGCCCAAGGTCCACCCT
GTCTGGCCACAGGCACCGCCTCCATCCCATGTCCCGCCCAGCCCCGCCCAACCCAAG
GTGCTGAGAGATCTCCAGCTGCACAGGCCACCGCCCCAGGGCGTGGCCGCTGTTACAGA
ACAATAAACCCCTGATGGGCATGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGAGTACTTCTAGA
GCGGCCGCGGGCCCATCGATTTCCACCCGGGTGGTACCAGAAAGctaa
```

4.10.6. Análise das sequências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados relativo ao PSP 85-9 - clone 1A15-3

Através do alinhamento da sequência obtivemos 13 sequências descritas no *Homo sapiens* que apresentaram identidade entre 99 e 100%, que estão descritas na figura 24 gerada pelo programa BlastN 2.2.29+ em 19/06/2014.

Dentre as sequências encontradas, a que possui o resultado de maior concordância é descrita pela *National Center for Biotechnology Information* como: "*Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA*" código de referência NM_001145462.1 (conteúdo disponível no anexo 9). O alinhamento detalhado está exibido na figura 25.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
PREDICTED: Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant X2, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	XM_005259385.1
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	NM_001145462.1
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 6, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	NM_001145461.1
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 2, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	NM_033557.3
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 3, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	NM_001039671.2
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 4, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	NM_001039673.2
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 5, mRNA	1345	1345	42%	0.0	99%	NM_001039672.2
Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 7, mRNA	730	1348	42%	0.0	100%	NM_001145463.1
PREDICTED: Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant X1, mRNA	617	617	19%	2e-173	99%	XM_005259384.2
Genomic sequences[show first]						
Homo sapiens chromosome 19, alternate assembly CHM1_1.1	730	1368	42%	0.0	100%	NC_018930.2
Homo sapiens chromosome 19, alternate assembly HuRef	730	1368	42%	0.0	100%	AC_000151.1
Homo sapiens chromosome 19, GRCh38 Primary Assembly	730	1368	42%	0.0	100%	NC_000019.10
Homo sapiens chromosome X, alternate assembly HuRef	58.4	58.4	1%	4e-05	97%	AC_000155.1

Figura 24. Listagem das seqüências geradas após alinhamento, pelo programa BlastN, para o inserto do clone 1A15-3 relativo ao Mab PSP 85-9

Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA
 Sequence ID: ref|NM_001145462.1| Length: 2764 Number of Matches: 1
 Range 1: 454 to 1184

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1345 bits(728)	0.0()	730/731(99%)	0/731(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 488	CGTCAATGCCCCGGACCTCTACATTCCAGCAATGGCTTTTCATCACCTACGTTTGGTGGC	547			
Sbjct 454	CGTCAATGCCCCGGACCTCTACATTCCAGCAATGGCTTTTCATCACCTACGTTTGGTGGC	513			
Query 548	TGGTCTTGCGCTGGGGACCCAGGATAGGTTCTCCCCAGACCTCCTGGGGCTGCAAGCGAG	607			
Sbjct 514	TGGTCTTGCGCTGGGGACCCAGGATAGGTTCTCCCCAGACCTCCTGGGGCTGCAAGCGAG	573			
Query 608	CTCAGCCCTGGCCTGGCTGACCTGGAGGTGCTGGCCATCCTGCTCAGCCTCTATCTGGT	667			
Sbjct 574	CTCAGCCCTGGCCTGGCTGACCTGGAGGTGCTGGCCATCCTGCTCAGCCTCTATCTGGT	633			
Query 668	CACTGTCAACACCGACCTCACCACCATCGACCTGGTGGCCTTCTTGGGCTACAAATATGT	727			
Sbjct 634	CACTGTCAACACCGACCTCACCACCATCGACCTGGTGGCCTTCTTGGGCTACAAATATGT	693			
Query 728	CGGGATGATTGGCGGGGTCTCATGGGCCTGCTCTTCGGGAAGATTGGCTACTACCTGGT	787			
Sbjct 694	CGGGATGATTGGCGGGGTCTCATGGGCCTGCTCTTCGGGAAGATTGGCTACTACCTGGT	753			
Query 788	GCTGGGCTGGTGTGCGTGGCCATCTTTGTGTTTCATGATCCGGACGCTGCGGCTGAAGAT	847			
Sbjct 754	GCTGGGCTGGTGTGCGTGGCCATCTTTGTGTTTCATGATCCGGACGCTGCGGCTGAAGAT	813			
Query 848	CTTGGCAGACGCAGCAGCTGAGGGGGTCCCGGTGCGTGGGGCCCGGAACCAGCTGCGCAT	907			
Sbjct 814	CTTGGCAGACGCAGCAGCTGAGGGGGTCCCGGTGCGTGGGGCCCGGAACCAGCTGCGCAT	873			
Query 908	GTACCTGACCATGGCGGTGGCGGGCGGCGCAGCCTATGCTCATGTACTGGCTCACCTTCCA	967			
Sbjct 874	GTACCTGACCATGGCGGTGGCGGGCGGCGCAGCCTATGCTCATGTACTGGCTCACCTTCCA	933			
Query 968	CCTGGTGCGGTGAGCGCGCCCGCTGAACCTCCCgetgetgetgetgetgetgGGGGCCAC	1027			
Sbjct 934	CCTGGTGCGGTGAGCGCGCCCGCTGAACCTCCCCTGCTGCTGCTGCTGGGGGCCAC	993			
Query 1028	TGTGGCCGCCGAACCTCATCTCTGCTGCGAGGCCCAAGGTCCACCTGTCTGGCCACAG	1087			
Sbjct 994	TGTGGCCGCCGAACCTCATCTCTGCTGCGAGGCCCAAGGTCCACCTGTCTGGCCACAG	1053			
Query 1088	GCACCGCCTCCATCCCATGTCCCGCCAGCCCCGCCCCCAACCCAAGGTGCTGAGAGATC	1147			
Sbjct 1054	GCACCGCCTCCATCCCATGTCCCGCCAGCCCCGCCCCCAACCCAAGGTGCTGAGAGATC	1113			
Query 1148	TCCAGCTGCACAGGCCACCGCCCCAGGGCGTGGCCGCTGTTACAGAAACAATAAACCTG	1207			
Sbjct 1114	TCCAGCTGCACAGGCCACCGCCCCAGGGCGTGGCCGCTGTTACAGAAACAATAAACCTG	1173			
Query 1208	ATGGGCATGGC	1218			
Sbjct 1174	ATGGGCATGGC	1184			

Figura 25. Alinhamento da sequência com maior identidade para o inserto do clone 1A15-3 relativo ao Mab PSP 85-9

4.11. Análise histológica das biópsias

Analizamos biópsias ósseas de 36 pacientes com tumores ósseos. Os diagnósticos anatomopatológicos seguiram as normas propostas pela Classificação de Tumores Malignos da Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (TNM FNCLCC).

A distribuição dos tipos de tumores revelou que 39% dos pacientes tinham osteossarcoma, 36% osteblastomas, 14% condrossarcomas e 11% leiomiiossarcomas.

A idade dos pacientes com osteossarcomas variou de 7 a 37 anos com média de 18 anos atingindo predominantemente indivíduos do sexo masculino (81%). Quanto aos pacientes com diagnóstico de osteoblastoma a idade variou de 13 a 54 anos e a distribuição por sexo foi mais homogênea com 58% dos pacientes do sexo masculino. A idade dos pacientes com diagnóstico de condrossarcoma variou de 26 a 54 anos e os pacientes com esse diagnóstico eram predominantemente do sexo masculino (80%). Já os pacientes com diagnóstico de leiomiiossarcoma tinham idade entre 44 e 78 anos e neles também observamos predomínio do sexo masculino (75%).

A Figura 26 demonstra o tipo histológico e o padrão de marcação dos Mabs nas células tumorais dos casos estudados. As características histológicas observadas no osteossarcoma são células tumorais de tamanhos variáveis e nucléolos proeminentes em núcleos hipercromáticos entre a matriz osteóide (Figuras 26A, 26B e 26C). Já no osteoblastoma podemos observar as células dispostas entre trabéculas ósseas e o tecido conjuntivo frouxo (Figuras 26D, 26E e 26F). O condrossarcoma representado na figura foi classificado como mixóide, onde a matriz é composta por muco (Figura 26G, 26H, 26I). Há grande variação de tamanho das células, com núcleos grandes e muitos nucléolos. Também observamos a presença de células binucleadas e grupamentos celulares semelhantes à condrócitos (Figura 26I). O leiomiiossarcoma apresenta pleiomorfismo nuclear, com formato em charuto (26J), com células grandes e binucleadas (Figuras 26K e 26L).

4.12. Análise imunohistoquímica

4.12.1. Expressão da proteína reconhecida pelo Mabs PSP 4-5, PSP 42-22, PSP 85-9, em tumores ósseos

O PSP 4-5 reconheceu seu respectivo antígeno em todos os tipos de tumores. Nos casos de osteossarcoma e condrossarcoma a expressão foi predominantemente citoplasmática, no entanto em um caso de cada um dos tumores a marcação foi nuclear. No leiomiossarcoma o padrão de marcação foi exclusivamente citoplasmático, já nos osteoblastomas foi nuclear, porém em dois casos o citoplasma também marcou (Figura 26B, 26E, 26H e 26K).

O anticorpo PSP 42-22 não reconheceu nenhum antígeno nos tumores avaliados.

Quanto ao anticorpo PSP 85-9, o mesmo reconhece antígeno no núcleo dos osteossarcomas e osteoblastomas, porém em dois casos de osteossarcoma o citoplasma também marcou com esse anticorpo. Tanto no condrossarcoma como no leiomiossarcoma a expressão do PSP 85-9 foi predominante no citoplasma das células (Figuras 26C, 26F, 26I e 26L).

Figura 26. Características histológicas dos tumores ósseos e expressão dos Mabs nos diferentes tipos de tumores. **A.** Osteossarcoma, subtipo condroblástico - coloração de hematoxilina-eosina - HE (1000x); **B.** Expressão do PSP 4-5 no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma subtipo condroblástico (1000x); **C.** Expressão do PSP 85-9 em núcleo de células neoplásicas de osteossarcoma de alto grau (1000x); **D.** Osteoblastoma - coloração pelo HE presença de trabéculas ósseas e de células com características osteoblásticas (1000x); **E.** Expressão do PSP 4-5 em núcleos de células com características osteoblásticas próximas à trabécula e na medula óssea de osteoblastoma (1000x); **F.** Expressão do PSP 85-9 no núcleo de células com características de osteoblastos e na medula óssea de osteoblastoma (1000x); **G.** Condrossarcoma de alto grau, coloração pelo HE, apresentando matriz mixóide (400x); **H.** Expressão do PSP 4-5 em citoplasma de células neoplásicas de condrossarcoma de alto grau (1000x); **I.** Expressão do PSP 85-9 em citoplasma de células com características de condrócitos em condrossarcoma de alto grau (400x); **J.** Leiomiossarcoma de alto grau, coloração pelo HE com núcleos em formato de charuto - em destaque (400x); **K.** Expressão do PSP 4-5 em citoplasma de células neoplásicas de Leiomiossarcoma (400x); **L.** Expressão do PSP 85-9 em citoplasma de células neoplásicas de leiomiossarcoma (400x)

4.12.2. Expressão da proteína reconhecida pelo Mab PSP 85-9, da osteocalcina e da osteonectina em osteblastomas e osteossarcomas

Os resultados das análises semiquantitativas da expressão da proteína reconhecida pelo Mab PSP 85-9, pela osteocalcina e osteonectina em osteblastomas e osteossarcomas estão descritos nas Tabelas 20 a 24.

A proteína reconhecida pelo Mab PSP 85-9 se expressa predominantemente no núcleo das células, tanto nos osteossarcomas (Figura 27B) como nos osteblastomas (Figura 27F) e o escore ponderado mostrou uma expressão significativamente maior nos osteblastomas ($p=0,047$). A marcação foi negativa na matriz osteóide de ambos os tumores.

Quanto à osteocalcina, sua expressão foi celular e também na matriz osteóide, porém na maior parte dos casos de osteossarcomas sua expressão foi negativa (Figura 27C), enquanto que nos osteblastomas a expressão foi positiva nas células em 31% dos casos e na matriz em 32% (Figura 27G). A análise do escore ponderado não mostrou diferença significativa entre os dois tumores.

Em relação à osteonectina, foi observada expressão predominantemente celular, especialmente no citoplasma, mas com expressão notável na matriz osteóide, porém de forma semelhante entre os osteossarcomas (Figura 27D), e os osteblastomas (Figura 27H).

Osteossarcoma

Osteblastoma

Figura 27. Características histológicas dos tumores ósseos e expressão de PSP 85-9, Osteocalcina e Osteonectina em osteossarcoma e osteblastoma. **A.** Osteossarcoma, subtipo condroblástico - coloração de hematoxilina-eosina - HE (400x); **B.** Expressão do PSP 85-9 no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma subtipo condroblástico (400x); **C.** Expressão de osteocalcina em osteossarcoma: negativa (400x); **D.** Expressão de osteonectina no citoplasma de células neoplásicas de osteossarcoma subtipo condroblástico **E.** Osteblastoma - coloração pelo HE presença de trabéculas ósseas e de células com características osteoblásticas (400x); **F.** Expressão do PSP 85-9 em núcleos de células com características osteoblásticas (400x); **G.** Expressão de osteocalcina demonstrada em matriz (400x); **H.** Expressão de osteonectina no citoplasma de células com características osteoblásticas (400x).

Tabela 20. Expressão da proteína reconhecida pelo Mab PSP 85-9 em osteossarcomas e em osteoblastomas (marcação celular)

	Osteossarcoma		Osteoblastoma	
	n=13		n=13	
% de células positivas				
0 (0-5%)	6/13	47%	1/13	8%
1 (5-25%)	4/13	30%	5/13	39%
2 (25-50%)	—	—	1/13	8%
3 (50-75%)	1/13	8%	2/13	15%
4 (>75%)	2/13	15%	4/13	30%
Intensidade de marcação				
0 (negativa)	6/13	47%	1/13	8%
1 (fraca)	3/13	22,5%	2/13	15%
2 (moderada)	3/13	22,5%	6/13	47%
3 (forte)	1/13	8%	4/13	30%
Escore ponderado				
0-1 (negativo)	9/13	69%	3/13	23%
2-3 (fraco)	1/13	8%	3/13	23%
4-6 (moderado)	1/13	8%	3/13	23%
8-12 (forte)	2/13	15%	4/13	31%

Tabela 21. Expressão da osteocalcina em osteossarcomas e em osteoblastomas (marcação celular)

	Osteossarcoma		Osteoblastoma	
	n=13		n=13	
% de células positivas				
0 (0-5%)	12/13	92%	8/13	62%
1 (5-25%)	1/13	8%	4/13	30%
2 (25-50%)	—	—	1/13	8%
3 (50-75%)	—	—	—	—
4 (>75%)	—	—	—	—
Intensidade de marcação				
0 (negativa)	12/13	92%	8/13	62%
1 (fraca)	1/13	8%	1/13	8%
2 (moderada)	—	—	2/13	15%
3 (forte)	—	—	2/13	15%
Escore ponderado				
0-1 (negativo)	13/13	100%	9/13	69%
2-3 (fraco)	—	—	3/13	23%
4-6 (moderado)	—	—	1/13	8%
8-12 (forte)	—	—	—	—

Tabela 22. Expressão da osteocalcina em osteossarcomas e em osteoblastomas (marcação na matriz osteóide)

	Osteossarcoma		Osteoblastoma	
	n=13		n=13	
% de área marcada				
0 (0-5%)	11/13	84%	6/13	46%
1 (5-25%)	1/13	8%	4/13	31%
2 (25-50%)	—	—	3/13	23%
3 (50-75%)	1/13	8%	—	—
4 (>75%)	—	—	—	—
Intensidade de marcação				
0 (negativa)	11/13	84%	6/13	46%
1 (fraca)	1/13	8%	4/13	31%
2 (moderada)	1/13	8%	2/13	15%
3 (forte)	—	—	1/13	8%
Escore ponderado				
0-1 (negativo)	11/13	84%	9/13	68%
2-3 (fraco)	2/13	16%	2/13	16%
4-6 (moderado)	—	—	2/13	16%
8-12 (forte)	—	—	—	—

Tabela 23. Expressão da osteonectina em osteossarcomas e em osteoblastomas (marcação celular)

	Osteossarcoma		Osteoblastoma	
	n=13		n=13	
% de células positivas				
0 (0-5%)	2/13	15%	—	—
1 (5-25%)	—	—	1/13	8%
2 (25-50%)	4/13	31%	3/13	23%
3 (50-75%)	3/13	23%	4/13	31%
4 (>75%)	4/13	31%	5/13	38%
Intensidade de marcação				
0 (negativa)	2/13	15%	—	—
1 (fraca)	—	—	—	—
2 (moderada)	6/13	47%	4/13	31%
3 (forte)	5/13	38%	9/13	69%
Escore ponderado				
0-1 (negativo)	2/13	15%	—	—
2-3 (fraco)	—	—	1/13	8%
4-6 (moderado)	6/13	47%	5/13	38%
8-12 (forte)	5/13	38%	7/13	54%

Tabela 24. Expressão da osteonectina em osteossarcomas e em osteoblastomas (marcação na matriz osteóide)

	Osteossarcoma		Osteoblastoma	
	n=13		n=13	
% de de área marcada				
0 (0-5%)	4/13	31%	—	—
1 (5-25%)	5/13	38%	4/13	31%
2 (25-50%)	3/13	23%	9/13	69%
3 (50-75%)	1/13	8%	—	—
4 (>75%)	—	—	—	—
Intensidade de marcação				
0 (negativa)	4/13	30%	—	—
1 (fraca)	—	—	4/13	31%
2 (moderada)	8/13	62%	7/13	53%
3 (forte)	1/13	8%	2/13	16%
Escore ponderado				
0-1 (negativo)	4/13	31%	1/13	8%
2-3 (fraco)	5/13	38%	6/13	46%
4-6 (moderado)	4/13	31%	6/13	46%
8-12 (forte)	—	—	—	—

5. DISCUSSÃO

Esse estudo respondeu um dos seus principais objetivos, que foi isolar os cDNAs de uma biblioteca capaz de codificar os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais (Mabs), PSP 42-22 e PSP 85-9. Quanto ao anticorpo PSP 4-5, sua identificação será concluída posteriormente, pois necessita de outras técnicas ainda em desenvolvimento no nosso laboratório. Esse antígeno apresenta um peso molecular de aproximadamente 100 kDa (detectado por imunoprecipitação) muito superior ao dos outros antígenos o que dificultou sua identificação. Uma das técnicas que pretendemos empregar são as sondas de oligonucleotídeos ou sondas radiomarcadas⁷⁹.

Para a construção da biblioteca usamos mRNA isolado de células MG-63, o que foi feito há mais de dez anos. O presente estudo mostrou que em boas condições de armazenamento, a biblioteca se manteve estável. A mesma poderá ser utilizada para identificação de outros antígenos no futuro, uma vez que além dos anticorpos que estudamos ainda temos outros potencialmente interessantes (Anexo 2). Além da biblioteca os nossos anticorpos também se mantiveram estáveis demonstrando que são de boa qualidade.

As células MG-63 obtidas de osteossarcoma humano pertencem a uma linhagem bem estabelecida, apresentando características de osteoblastos imaturos⁸⁰. A linhagem osteoblástica tem sido muito estudada nos últimos anos e marcadores das diferentes etapas são muito úteis para compreender a formação óssea e, em última análise, a remodelação. Já demonstramos que nossos anticorpos marcam regiões e células distintas do tecido ósseo como, por exemplo, o PSP 42-22 que se expressa predominantemente no periósteo (camada osteogênica) e o PSP 85-9, que marca osteócitos⁵⁵. Uma vez finalizada a identificação, pretendemos usá-los na compreensão da diferenciação celular nos mecanismos envolvidos nas diferentes doenças ósseas metabólicas, além de ampliar os testes para diagnóstico de tumores ósseos.

O peso molecular dos antígenos reconhecidos por estes anticorpos demonstra que são proteínas de baixo peso molecular (PSP 42-22, ~26 kDa e o 85-9, ~20 kDa), o que facilitou a identificação dos antígenos, ao contrário do PSP 4-5.

Os anticorpos monoclonais são ferramentas muito importantes e empregadas em pesquisa, diagnóstico e em terapias onde são usados, por exemplo, intactos ou conjugados com átomos radioativos, com toxinas, entre outras possibilidades. Sua capacidade seletiva é uma de suas vantagens, o que torna o desenvolvimento do mesmo uma das principais ferramentas estudadas nas últimas décadas. No entanto, a triagem de uma biblioteca de cDNA pode levar ao isolamento de clones irrelevantes como, por exemplo, o clone 1A1-2-2 do PSP 85-9. Esse clone, após o sequenciamento mostrou uma identidade molecular com 100% de homologia com uma região não codante da proteína MAPRE-1, ou seja, trata-se de um falso positivo.

Durante o isolamento do clone reconhecido pelo PSP 42-22, a triagem apresentou algumas dificuldades, obrigando a aumentar o título na triagem primária da biblioteca.

A sequência de nucleotídeos obtida pelo PSP 42-22 (3B2-3-1) apresentou uma identidade elevada (99% de homologia) com a sequência "*Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3, mRNA*". A proteína SDCCAG3 foi descrita pela primeira vez em 1998 como um antígeno de câncer de cólon reconhecido por anticorpo autólogo⁸¹. Atualmente o estudo desta proteína como marcador de câncer ainda está em desenvolvimento, devido a sua associação com citocinese e agressividade tumoral⁸². Vale lembrar que o antígeno reconhecido pelo nosso anticorpo tem um peso molecular de aproximadamente 26 kDa, inferior ao dessa proteína que é de 43 kDa. Essa diferença poderia se dar por várias razões, ou seja: no mRNA das células MG-63 há um local de início da tradução diferente produzindo uma proteína menor; ou antes da sequência do nosso clone isolado (3B2-3-1), ocorreria um "splicing" produzindo uma proteína mais curta que se expressaria na membrana celular, ao contrário de uma proteína mais longa. Vale lembrar que os imunógenos utilizados para produzir os

anticorpos monoclonais eram constituídos predominantemente por proteínas de membrana das células MG-63.

Para os clones 1A12-2 e 1A51-3, isolados do Mab PSP 85-9, obtivemos em ambos alinhamentos com 100% de identidade com as sequências de nucleotídeos dos genes "*Homo sapiens microtubule associated protein, RP/EB family, member 1 (MAPRE1), mRNA*" e "*Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA*", cujo peso molecular varia de 31 a 34 kDa e possui seis isoformas distintas. O antígeno do clone 1A12-2 já foi estudado e também se associa a câncer de colo⁸³.

Como já relatamos, a sequência do clone 1A12-2 corresponde a um trecho não codante. Como a construção da biblioteca de cDNA é feita através do RNA mensageiro, regiões não codantes não são esperadas. Contudo, isto pode acontecer por mutação de trechos de RNA durante a produção da biblioteca.

Já a sequência do clone 1A51-3, corresponde a um gene tradutor de uma isoforma Yif1B da proteína original Yif1p. Essa proteína foi descrita no *Saccharomyces cerevisiae* como uma proteína ortóloga (com descendência de um ancestral comum) de membrana e de transporte no complexo de Golgi⁸⁴. Em humanos, a atividade da forma original e da isoforma B interage com o receptor de serotonina em células neuronais e está sendo estudada no tratamento da depressão^{85,86}. Vale lembrar que no tecido ósseo a serotonina tem um efeito bimodal, ou seja, a sintetizada no cérebro tem efeito anabólico enquanto a sintetizada no duodeno inibe a atividade osteoblástica, diminuindo a formação óssea⁸⁷.

Uma vez que o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais foi realizado com a célula de osteossarcoma da linhagem MG-63, diversos constituintes celulares possibilitaram a formação dos anticorpos. Esta metodologia de triagem é a melhor técnica disponível, pois podemos rastrear, através da biblioteca de cDNA, a maior parte do conteúdo genético da célula a fim de localizar os nucleotídeos que traduzem a proteína que estimulou a produção do anticorpo. A sensibilidade desta técnica é boa, pois o requisito do anticorpo de apresentar a capacidade de detectar o clone correspondente à

proteína reconhecida em todas as etapas de triagem, faz com que possíveis falsos positivos sejam excluídos.

Previamente a excisão *in vivo*, verificamos o título do bacteriófago *Helper ExAssist* para assegurar sua aplicação nesta técnica. Os resultados mostraram que as titulações dos mesmos eram estáveis. A excisão *in vivo* foi realizada e sua análise feita através do gel da minipreparação, onde é possível avaliar a qualidade dos trechos clivados pelas enzimas de restrição. A excisão do inserto de cDNA do clone isolado pelo PSP 42-22 (3B2-3-1) demonstrou que a clivagem ocorreu corretamente e permitiu que o tamanho do inserto fosse estimado. A excisão *in vivo* dos clones isolados pelo Mab PSP 85-9 (1A12-2 e 1A51-3) também possibilitou uma análise adequada dos mesmos, bem como estimar o tamanho dos insertos. Esta etapa foi importante, pois através dos clones isolados, antes da realização da purificação do cDNA propriamente dita, podemos validar as etapas de co-infecção da *E. coli* XL1 blue MFR' com os dois bacteriófagos (*λ Zap Express* e *Helper ExAssist*) gerando o fagemídeo pBK-CMV, que posteriormente infectaram a bactéria XL0LR para a amplificação. A importância das amostras serem puras e de boa qualidade é oferecer confiabilidade ao sequenciamento.

Decidimos ressaltar esses aspectos da metodologia que empregamos para mostrar que a partir da biblioteca de cDNA construída com o genoma da MG-63, insertos selecionados de modo isolado, respeitaram os critérios técnicos e o bom padrão de qualidade. O DNA obtido correspondente a cada clone isolado foi sequenciado. No entanto, a sequência de nucleotídeos identificada para os dois anticorpos não foi completa. Dessa forma, precisamos aplicar outras técnicas para obter a sequência completa dos nossos antígenos e verificar se correspondem as proteínas anteriormente mencionadas.

Quanto aos testes de imunohistoquímica em tumores ósseos, o PSP 4-5 detectou uma proteína predominantemente citoplasmática em osteossarcomas e condrossarcomas, porém seu respectivo antígeno não foi identificado, dificultando a compreensão de seu papel nesses tumores. O anticorpo PSP 42-22, embora potencialmente interessante, não reconheceu nenhum antígeno nos tumores, provavelmente por terem sido fixados em formalina e incluídos

em parafina. Testes imunohistoquímicos realizados anteriormente com esse anticorpo, em diversos tipos de tecidos congelados, mostraram marcações específicas em células menos diferenciadas (camada osteogênica do periósteo do tecido ósseo)⁵⁵.

Nesse estudo analisamos uma amostra de tumores ósseos primários bastante representativa, sendo os osteossarcomas e os osteoblastomas os mais prevalentes. Tumores malignos primários são raros. Dentre eles os osteossarcomas são os mais frequentes e representam menos de 0,2% dos cânceres diagnosticados nos Estados Unidos. No nosso meio são diagnosticados cerca de 2700 casos novos por ano⁸⁸. O diagnóstico dos osteossarcomas se baseia em achados radiológicos correlacionados ao diagnóstico anatomopatológico. Histologicamente são compostos por células pleiomórficas que produzem matriz extracelular óssea, cartilaginosa ou fibrosa. Um dos pré-requisitos para o diagnóstico é a observação direta de produção de "woven bone" pelas células tumorais⁸⁹.

Até o presente momento não existe um marcador específico capaz de marcar por imunohistoquímica a matriz celular e as células principalmente nos osteossarcomas especialmente devido ao grande grupo de subtipos histológicos⁹⁰.

Alguns trabalhos descrevem a osteocalcina como um bom marcador, mas a osteonectina não tem atendido os requisitos necessários, o mesmo pode se dizer do VEGF, porém os resultados são conflitantes^{56,57}. A osteopontina e a S100A4 (*small calcium-binding protein*) também têm sido estudados especialmente para avaliar associação com invasão e metástases⁹¹. O Indutor de matriz metaloproteinase extracelular (EMMPRIM, ou CD147) apresentou resultados bons em osteossarcoma⁵⁸.

Nossos resultados são interessantes, pois o PSP 85-9 mostrou certa especificidade para os osteoblastomas quando comparado a osteocalcina e a osteonectina o que poderia ser usado no diagnóstico diferencial desses tumores. No entanto outros estudos deverão ser realizados visando especialmente estudar nosso anticorpo nos subtipos de osteossarcoma.

6. CONCLUSÕES

1. A obtenção de clones, usando a banca de cDNA com capacidade de expressão, foi possível somente para os anticorpos PSP 42-22 e PSP 85-9.
2. O antígeno reconhecido pelo PSP 4-5 (100 kDa), será identificado utilizando-se outra estratégia, pois com os métodos que utilizamos não foi possível.
3. A sequência de nucleotídeos obtidas do cDNA isolado pelo PSP 42-22 (26 kDa), apesar de não ser completa, possui homologia com a proteína "*Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3)*".
4. A sequência de nucleotídeos obtidas do cDNA isolado pelos Mab PSP 85-9 (20 kDa), apesar de não ser completa, possui homologia com a proteína "*Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B)*".
5. Mais testes serão necessários para confirmar se os antígenos isolados são isoformas das proteínas das quais possuem homologia.
6. Os resultados dos testes realizados com os Mabs na imunohistoquímica dos tumores ósseos mostraram que o PSP 85-9 foi o mais interessante, quando combinado com osteocalcina e a osteonectina, pois foi possível detectar certa especificidade do antígeno em núcleo de osteoblastomas.

7. ANEXOS

Anexo 1. Produção dos anticorpos monoclonais PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9

O presente estudo é a continuação de um trabalho no qual desenvolvemos anticorpos monoclonais que reconheciam proteínas de células óssea. Para tanto, desenvolvemos, uma colaboração com a equipe UMR 1149 INSERM – Université Paris Diderot – ERL CNRS 8252 (Faculte de Medicine Xavier Bichat, Paris). Os anticorpos monoclonais foram obtidos a partir de células de osteossarcoma humano da linhagem MG-63, que apresentam características de osteoblastos imaturos.

A linhagem MG-63 (ATCC, *Rockville*, EUA) foi obtida de um paciente de 14 anos de idade do sexo masculino com osteossarcoma⁸⁰. Essa linhagem possui características de células menos diferenciadas, expressa receptores para TGF β tipo I e II, colágeno X, e não expressa fosfatase alcalina.

Para obtenção dos anticorpos utilizamos camundongos Balb/C, que foram imunizados 7 vezes com células da linhagem MG-63, com intervalo de 3 dias entre as aplicações. Os linfócitos obtidos dos gânglios poplíteos e inguinais dos animais foram separados e fusionados com a linhagem de mieloma de camundongo Ag8653⁹², que não expressam imunoglobulinas de cadeias leve ou pesada. Para fusão, empregamos o método clássico, utilizando PEG 4000 e seleção através de hipoxantina aminopterina timidina – HAT⁹² em presença de macrófagos peritoneais. Sobrenadantes da cultura dos hibridomas foram coletados e os clones originais congelados para posterior seleção. Na figura 2 estão resumidas as etapas para seleção dos anticorpos monoclonais obtidos a partir das células MG-63.

1ª etapa: primeira seleção, realizada por marcação indireta por citometria de fluxo, contra células MG-63. Selecionados 63 clones positivos.

2ª etapa: nova citometria com as mesmas células, para confirmação das reatividades. Selecionamos 46 clones devido à sua forte reatividade nas células MG-63.

3ª etapa: Selecionamos 19 clones pela reatividade em osteoblastos normais. São eles: PSP 1, PSP 4, PSP 5, PSP 9, PSP 11, PSP 24, PSP 29, PSP 38, PSP 39, PSP 40, PSP 42, PSP 52, PSP 65, PSP 72, PSP 77, PSP 78, PSP 82, PSP 85 e PSP 96. Para decidir qual clone seria sub-clonado duas novas triagens foram realizadas

4ª etapa: imunoprecipitação de proteínas de superfície celular radiomarcadas (^{125}I).

5ª etapa: eliminação de anticorpos multireativos (osteoblastos e leucócitos), por citometria indireta, com células do sangue periférico de doadores normais.

Após essas etapas, alguns dos hibridomas que secretavam anticorpos com capacidade imunoprecipitante e específicos de osteoblastos foram sub-clonados. A figura 28 demonstra as etapas descritas.

Figura 28. Etapas das várias análises realizadas nos clones obtidos após a fusão celular.

Os anticorpos denominados PSP 4, PSP 42 e PSP 85 foram escolhidos e sub-clonados (PSP 4-5, PSP 42-22 e PSP 85-9) e reconhecem antígenos de 100, 26 e 20 kDa respectivamente. A nomenclatura PSP foi dada pela colaboração entre os grupos (Paris - São Paulo).

Anexo 2. Construção da banca de cDNA

Para dar continuidade ao processo de identificação dos antígenos reconhecidos por esses anticorpos construímos uma biblioteca de cDNA a partir de células MG-63. Essa biblioteca tem capacidade de expressão proteica e para construí-la utilizamos o kit de síntese de cDNA Zap Express® (Stratagene), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a partir do mRNA de células MG-63 obtivemos cópias de cDNA que codificarão uma determinada proteína. Essas cópias foram inseridas e ligadas, de forma orientada, no genoma do vetor (fago lambda Zap) sob controle de um promotor induzível (β galactosidase). Após a ligação desses insertos com o vetor, o fago lambda, agora recombinante, foi submetido a um processo chamado de empacotamento. Em seguida foram usados para infectar a bactéria *Escherichia coli* XL1-Blue MRF para um ciclo de amplificação e, assim, a obtenção de uma banca estável. Após várias etapas de triagem, os insertos positivos e amplificados poderão ser utilizados para a excisão *in vivo* na forma de fagemídeo pBK-CMV com o inserto e submetidos então, ao sequenciamento. Esse vetor permite que os insertos de cDNA se expressem em eucariotas e procariotas.

Anexo 3. Preparo dos meios de cultivo

A seguir estão descritas detalhadamente a composição dos meios de cultura usados nas diversas etapas do isolamento do cDNA codificador para os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais.

Meio Luria-Bertani 2% Agar

- 25g/L de meio Difco LB Broth, Miller (Becton, Dickison and Company, Franklin Lakes, EUA)
- 2% Bacto Agar (Becton, Dickison and Company, Franklin Lakes, EUA)
- Água destilada
- Autoclavar por 15 minutos à 120°C
- Resfriar à 48°C e acrescentar 250µl tetraciclina (estoque 10 mg/ml) para 50ml
- Distribuir 25 ml da solução por placa

Meio Luria-Bertani (LB Broth)

- 25g/L de meio Difco LB Broth, Miller (Becton, Dickison and Company, Franklin Lakes, EUA)
- Água destilada
- Autoclavar por 15 minutos à 120°C
- Acrescentar Maltose [0,2%]
- MgSO₄ [10mM]
- Tetraciclina [50µg/ml]

Tampão SM 0,02% gelatina

- 1,16 g NaCl
- 1,62 ml MgSO₄ (1M)
- 10 ml TrisHCl (1M) pH 7,5
- 1 ml gelatina 2%
- q.s.p 200 ml água destilada
- Filtrar poro 0,22µ

Meio NZCYM, 1,5% ágar

- 22 g/L de meio NZCYM Broth (Sigma-Aldrich, *St Louis*, EUA)
- 1,5% Bacto Agar (Becton, Dickison and Company, Franklin Lakes, EUA)
- Água destilada
- Autoclavar por 15 minutos, 120°C
- Distribuir 25 ml da solução por placa

Meio NZCYM, 1% Agar

- 22 g/L de meio NZCYM Broth (Sigma-Aldrich, *St Louis*, EUA)
- 1% Bacto Agar (Becton, Dickison and Company, Franklin Lakes, EUA)
- Água destilada
- Autoclavar por 15 minutos, 120°C

Meio NZCYM Top Agar

- 22 g/L de meio NZCYM Broth (Sigma-Aldrich, *St Louis*, EUA)
- 0,7% agarose (Invitrogen, *Grand Island*, EUA)
- Água destilada
- Autoclavar por 15 minutos, 120°C

Anexo 4. Titulação da biblioteca de cDNA de MG-63

Na titulação da biblioteca de cDNA infectamos bactérias *E. coli* XL1 Blue MRF' com bacteriófagos λ Zap Express. Nas placas de cultivo a infecção se traduz pela formação de halos de lise devido destruição das bactérias pelos bacteriófagos. Após a lise os bacteriófagos re-infectam novas bactérias.

As bactérias lisadas que abrigavam bacteriófagos sem os insertos de cDNA formam halos azuis, pois possuem no seu genoma uma β -galactosidase (lacZ^+) enzima que cliva o X-Gal acrescentado ao meio de cultivo, formando um halo azul. Já aquelas que abrigavam bacteriófagos com os insertos de cDNA ao serem lisadas produzem halos translúcidos(lacZ^-) pois ao acrescentarmos IPTG ao meio ocorre somente síntese proteica. Vide esquema no anexo 5.

Anexo 5. Infecção das bactérias pelos bacteriófagos λ Zap Express

A figura 29 ilustra a infecção das bactérias *E. coli* XL1 Blue MRF' pelos bacteriófagos Zap Express.

Fase de adsorção: Os bacteriófagos infectando as bactérias.

Os bacteriófagos se multiplicam fazendo com que ocorra a lise das bactérias

Após a lise os bacteriófagos liberados irão infectar outras bactérias.

Observam-se na placa os halos translúcidos resultantes da lise das bactérias.

Figura 29. Esquema que descreve as etapas da infecção das bactérias pelos bacteriófagos

Anexo 6. Isolamento de clones positivos da triagem primária da banca de cDNA usando os anticorpos PSP 42-22 e PSP 85-9

Os bacteriófagos λ Zap Express usam o maquinário celular das bactérias, se multiplicam rapidamente, levando à lise das mesmas e infectando outras. Pequenos locais de lise se formaram nas placas de cultivo e cada um corresponde a um clone de bacteriófagos. Cada clone possui uma sequência de cDNA da biblioteca específica diferente do clone vizinho. Os locais de lise são reconhecidos como halos translúcidos. O restante da placa é opaco, indicando que as bactérias proliferaram, mas não foram infectadas pelos bacteriófagos (Figura 29). O isolamento de um clone que produz uma proteína reconhecida por um de nossos anticorpos foi obtido depois de vários ciclos de triagem, até sua purificação e amplificação (Figura 30).

A indução da síntese de proteínas se dá pelo isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo - IPTG presente na membrana de nitrocelulose, que induz a síntese de proteínas, pois bloqueia o repressor do promotor da β -galactosidase (o lacI^q). Esse repressor situa-se sobre o epissoma da *E. coli* XL1-Blue MRF', enquanto o promotor da β -galactosidase (e o inserto de cDNA sob seu controle) encontra-se no DNA do bacteriófago. As bactérias sintetizam os mRNA e suas proteínas correspondentes são depositadas a partir do inserto do cDNA situado no DNA do bacteriófago. Essas proteínas aderem à membrana de nitrocelulose, podendo ser detectadas pela técnica semelhante ao de *western blot*.

De acordo com a imunodeteção de halos positivos através das membranas, os clones serão coletados e partir destes, novas colônias de *E. coli* XL1 Blue MRF' serão infectadas. Durante as diferentes triagens os clones serão selecionados isolados e amplificados uma vez que um único clone se replicará em cada placa separadamente.

Figura 30. Princípio da amplificação do cDNA isolado

Anexo 7. Excisão *in vivo* dos fagemídeos pBK-CMV

Após as triagens, isolamento e amplificação do clone de interesse, inicia-se o processo de excisão *in vivo* para obter o inserto de cDNA recombinado com o genoma do bacteriófago.

O vetor Zap *Express* é projetado para permitir uma excisão do inserto clonado na forma do fagemídeo pBK-CMV (Figura 31).

Figura 31. Mapa do vetor pBK-CMV.

Bactérias *E. coli* XL1-Blue MRF' são infectadas simultaneamente com o bacteriófago de um único clone positivo (λ Zap Express) e com o bacteriófago *Helper* ExAssist. As proteínas produzidas por esse último reconhecem a região f1 (origem de replicação) no genoma do bacteriófago λ Zap Express. Essa região pode ser dividida em duas partes que se sobrepõem (Figura 32): o sítio iniciador (I) e o finalizador (T) para síntese de DNA. No interior da bactéria as proteínas produzidas pelo bacteriófago *helper*, reconhecem o sítio iniciador de síntese de DNA (I), cortando uma das suas duas fitas. Uma nova síntese de DNA tem início e duplica o DNA existente no vetor. A síntese de uma nova fita simples de DNA continua até um determinado ponto do sítio finalizador (T).

Essa fita, então, formará um círculo como um plasmídeo de fita simples (fagemídeo pBK-CMV). Ele contém a região f1 (origem de replicação) e todas as sequências necessárias para o empacotamento nos bacteriófagos filamentosos ExAssist *helper* (Figura 33).

Figura 32. Mapa linear do vetor Zap Express. I, sítio iniciador e T, sítio finalizador

Figura 33. Representação da dupla infecção da *E. coli* pelos bacteriófagos ExAssist *helper* e λ Zap Express

As bactérias e os bacteriófagos λ Zap Express são lisados por aquecimento a 70°C. O aquecimento não afeta o bacteriófago filamentoso ExAssist *helper* que contém o fagemídeo recém formado e circularizado. A

seguir, a outra cepa de *E. coli* (*Escherichia coli* XL0LR não suprimida) será infectada com os bacteriófagos ExAssist helper que contém os fagemídeos pBK-CMV e semeadas em meio seletivo (agar LB- canamicina) para formar colônias. Nessa cepa somente os fagemídeos excisados poderão amplificar-se na bactéria (Figura 34).

Figura 34. Representação da infecção da *E. coli* XL0LR pelo bacteriófago ExAssist helper com o cDNA excisado

Anexo 8. Dados *NCBI* - sequência de nucleotídeos correspondente ao alinhamento do inserto obtido pelo clone 3B2-3-1 (PSP 42-22)

Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001039708.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NM_001039708 2171 bp mRNA linear PRI 20-FEB-2014
 DEFINITION Homo sapiens serologically defined colon cancer antigen 3 (SDCCAG3), transcript variant 3, mRNA.
 ACCESSION NM_001039708
 VERSION NM_001039708.1 GI:89353282
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2171)
 AUTHORS Hagemann N, Ackermann N, Christmann J, Brier S, Yu F and Erdmann KS.
 TITLE The serologically defined colon cancer antigen-3 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTPN13 and is involved in the regulation of cytokinesis
 JOURNAL Oncogene 32 (39), 4602-4613 (2013)
 PUBMED [23108400](#)
 REMARK GeneRIF: The novel endosomal protein SDCCAG3 forms a complex with PTPN13 & interacts with GIT1. Interaction of SDCCAG3 with PTPN13 is mediated by the PTPN13 FERM domain & the SDCCAG3 N-terminus. SDCCAG3 expression levels are elevated in colon cancers.
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2171)
 AUTHORS Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Buning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsten TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JT, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H, Silverberg MS, Annesse V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC and Cho JH.
 CONSRMT International IBD Genetics Consortium (IIBDGC)
 TITLE Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease
 JOURNAL Nature 491 (7422), 119-124 (2012)
 PUBMED [23128233](#)
 REFERENCE 3 (bases 1 to 2171)
 AUTHORS Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagace C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Colombel JF, Denson LA, De Vos M, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RS, Floyd JA, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot JP, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panes J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhart AH, Targan SR, van den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra HJ, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsten TH, Kupcinskis L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JT, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamailard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annesse V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S,

Weersma RK and Rioux JD.
 TITLE Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk
 loci, increasing the number of confirmed associations to 47
 JOURNAL Nat. Genet. 43 (3), 246-252 (2011)
 PUBMED [21297633](#)
 REMARK Erratum:[Nat Genet. 2011 Sep;43(9):919]
 REFERENCE 4 (bases 1 to 2171)
 AUTHORS Neznanov N, Neznanova L, Angres B and Gudkov AV.
 TITLE Serologically defined colon cancer antigen 3 is necessary for the
 presentation of TNF receptor 1 on cell surface
 JOURNAL DNA Cell Biol. 24 (12), 777-785 (2005)
 PUBMED [16332174](#)
 REMARK GeneRIF: SDCCAG3 is important for protein trafficking and
 presentation of TNFR1 on the cell surface.
 REFERENCE 5 (bases 1 to 2171)
 AUTHORS Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD,
 Tureci O, Sahin U, Pfreundschuh M and Old LJ.
 TITLE Characterization of human colon cancer antigens recognized by
 autologous antibodies
 JOURNAL Int. J. Cancer 76 (5), 652-658 (1998)
 PUBMED [9610721](#)
 COMMENT VALIDATED [REFSEQ](#): This record has undergone validation or
 preliminary review. The reference sequence was derived from
[BM549484.1](#), [AL592301.14](#), [AF039688.1](#) and [AA742964.1](#).

Transcript Variant: This variant (3) lacks two alternate in-frame
 exons in the 5' end compared to variant 1. The resulting isoform
 (3) has the same N- and C-termini but is shorter compared to
 isoform 1.

##Evidence-Data-START##

RNAseq introns : single sample supports all introns ERS025093
 [ECO:0000348]

##Evidence-Data-END##

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-9	BM549484.1	1-9	
	10-275	AL592301.14	53952-54217	c
	276-388	AL592301.14	51450-51562	c
	389-805	AL592301.14	50769-51185	c
	806-879	AL592301.14	49529-49602	c
	880-991	AL592301.14	48715-48826	c
	992-1054	AL592301.14	48255-48317	c
	1055-1194	AL592301.14	47679-47818	c
	1195-2131	AL592301.14	45575-46511	c
	2132-2157	AF039688.1	1420-1445	
	2158-2171	AA742964.1	1-14	c

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..2171
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[9606](#)"
 /chromosome="9"
 /map="9q34.3"
 gene 1..2171
 /gene="SDCCAG3"
 /gene_synonym="NY-CO-3"
 /note="serologically defined colon cancer antigen 3"
 /db_xref="GeneID:[10807](#)"
 /db_xref="HGNC:[10667](#)"
 exon 1..275
 /gene="SDCCAG3"
 /gene_synonym="NY-CO-3"
 /inference="alignment:Splign,1.39.8"
 CDS 206..1294
 /gene="SDCCAG3"
 /gene_synonym="NY-CO-3"
 /note="isoform 3 is encoded by transcript variant 3;
 antigen NY-CO-3"
 /codon_start=1
 /product="serologically defined colon cancer antigen 3
 isoform 3"
 /protein_id="NP_001034797.1"
 /db_xref="GI:89353283"
 /db_xref="CCDS:[CCDS43903.1](#)"
 /db_xref="GeneID:[10807](#)"
 /db_xref="HGNC:[10667](#)"
 /translation="MSGYQRRPGATPLSRARSLAIPDDDRFEDLEEANPFSFREFLKT
 KNLGLSKEDPASRIYAKEARHSIGLDHNSPPSQGGYGLYQQPFEDFTGAGDLLD
 EEEDEDTGWSGAYLPSAIEQTHPERVPAGTSPCSTYLSFFSTPSELAPESLPSWALS
 DTDSPVSPASGSPSADFVHGESLGDRLRLTLQISYDALKDENSCLRRLNEVQSF
 SEAQTEVMVTLERKLEAKMIKEESDYHDLESVVQQVEQNLELMTKRAVKAENHVVKLK
 QETISLLQAQVSNFQRENEALRCGGASLTVVKQNADVALQNLRVVMNSAQASIKQLVS
 GAETLNLVAELKSIDRISEVVKDEEDS"
 exon 276..388

```

        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon      389..805
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon      806..879
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon      880..991
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon      992..1054
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon      1055..1194
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
exon      1195..2160
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /inference="alignment:Splign:1.39.8"
STS      1930..2071
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /standard_name="STS-H69662"
        /db_xref="UniSTS:56775"
polyA signal 2138..2143
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
polyA site 2160
        /gene="SDCCAG3"
        /gene_synonym="NY-CO-3"
        /experiment="experimental evidence, no additional details
        recorded"

```

ORIGIN

```

1  gacggcccaa  ggcgttcagg  cacgcgcttt  cgggtgctcg  agcgggaagca  gcggcgagag
61  gctcggaggg  gcggggggcg  ccgagcggcg  ggcgacgggg  gcggggcgacg  gggggggggcg
121 acgcggggcg  cggcagggcg  ggagccgggg  ccatggagcc  gccgctgccg  ggctaggcag
181 gtcgtgcccc  gccgggcccg  cggcgatgtc  gggctaccag  cgccgccccg  gcgcccccc
241 gctgtcccca  gcccgagacc  tcgccattcc  cgacgatgac  agatttgaag  atctggaaga
301 ggcaaatcca  ttctctttta  gagagtcttc  gaagaccaag  aaactcggcc  tctcgaaaga
361 ggatccggcc  agcagaattt  atgcaaagga  agcctcgagg  cattccctgg  gacttgacca
421 caactcccca  cctcccaaaa  ccggcgggta  tggcctggag  tatcagcagc  catttttcga
481 ggatccgaca  ggggctgtgt  acctcctgga  tgaggaggag  gatgaggaca  ccgatgggag
541 tggggcctac  ctgccgtccg  ccacgagaca  gactcaccgc  gagagggtcc  ctgccggcac
601 gtcgccctgc  agcacatacc  ttctcttttt  ctccaccgcc  tcggagctgg  caggggctga
661 gtctctgccc  tcgtgggcgt  tgagtgcac  tgattctcgc  gtgtctccgg  cctctccggc
721 agggagtctt  agcgcagact  ttgcgggtca  tggagagtct  ctgggagaca  ggcacctgcg
781 gacgctgcag  ataagttacg  acgcactgaa  agatgaaaat  tctaagctga  gaagaaagct
841 gaatgaggtt  cagagcttct  ctgaagctca  aacagaaatg  gtgaggacgc  ttgagcggaa
901 gttagaagca  aaaatgatca  aggaggaaag  cgactaccac  gacctggagt  cgggtgttca
961 gcaggtggag  cagaacctgg  agctgatgac  caaacgggct  gtaaaggcag  aaaaccacgt
1021 cgtgaaacta  aaacaggaaa  tcagtttgct  ccaggcgcag  gtctccaact  tccagcgaga
1081 gaatgaagcc  ctgcgggtgc  gccagggtgc  cagcctgacc  gtggtgaagc  agaacgccga
1141 cgtggccctg  cagaacctcc  ggggtgtcat  gaacagtcca  caggcttcca  tcaagcaact
1201 ggtttccgga  gctgagacac  tgaatcttgt  tgccgaaatc  cttaaatcta  tagacagaat
1261 ttctgaagtt  aaagacgagg  aggaagactc  ttgaggaccc  ctgggtgttc  tcagcatgaa
1321 gtcctgtgta  taccctgagg  tcaccaccgc  tcgatctaaa  tgtgcagttg  tgccttaaa
1381 tatgcagtct  tcaccagag  taaagtgttg  atcgcaagag  tccagtgtcg  tgccctcagc
1441 cagttcttgg  ccaccacaat  gggagcagcc  ctggccgagt  tgtctctgtg  gtttctatgc
1501 agcccttctt  ggcgaatttc  ctgcgatctt  atagattcta  atgagctctt  ggaagacatt
1561 gtcataaaaag  ccagtgtttt  taagaaaaag  agtggttctg  gaatcaatgt  ttccagctcc
1621 catcccgaaa  catcagttgt  aagataagta  caattggttg  tccttgattt  cataagtaga
1681 acaaacacta  aatgtgcctc  tgatagtgcc  accccgggca  gggacctgtg  ccttccgcgg
1741 atgtctcagg  ctccctctgg  ctcccggttc  actcttgtgg  cccagtgagg  tggctccctgc
1801 agtcatggcc  tgagtgcgca  ggggccaccg  cgtggtctgt  gctgtcctcc  tccgggaccc
1861 acgggggaca  aggtcacacg  ttccgtgctg  tgaagtgtgc  cagatgtgcc  tctttggctg
1921 ggggttctgg  tggacgtttc  aagtggcatt  ttgtacaatg  caggttagaa  ttcaggaatt
1981 tcaagtatgt  gcccggtctt  gtcagggtcc  agttgccttt  ctacagggccc  cctcagagg
2041 gacggcgatg  agcactaaat  gcttttttga  ctattttcct  atagattttt  tttaaaactt
2101 ttttttctc  ctgttccaat  tgatagcttt  cttatttaat  aaattctgta  gttcaccgca
2161 aaaaaaaaaa  a

```

//

Anexo 9. Dados NCBI - sequência de nucleotídeos correspondente ao alinhamento do inserto obtido pelo clone 1A5-3-1 (PSP 85-9)

Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001145462.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

LOCUS NM_001145462 2764 bp mRNA linear PRI 02-FEB-2014
 DEFINITION Homo sapiens Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B), transcript variant 8, mRNA.
 ACCESSION NM_001145462
 VERSION NM_001145462.1 GI:224451037
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2764)
 AUTHORS Lamesch P, Li N, Milstein S, Fan C, Hao T, Szabo G, Hu Z, Venkatesan K, Bethel G, Martin P, Rogers J, Lawlor S, McLaren S, Driscoll A, Borick H, Cusick ME, Vandenhaute J, Dunham I, Hill DE and Vidal M.
 TITLE hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes
 JOURNAL Genomics 89 (3), 307-315 (2007)
 PUBMED 17207965
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2764)
 AUTHORS Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huse DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravits S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salsberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferrieria S, Garg M, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houch J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkuch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karalak B, Kejariwal A, Mi H, Lazarova B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Bonkendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A and Zhu X.
 TITLE The sequence of the human genome
 JOURNAL Science 291 (5507), 1304-1351 (2001)
 PUBMED 11819955
 REMARK Erratum:[Science 2001 Jun 8;292(5523):1838]
 COMMENT VALIDATED REFSEQ: This record has undergone validation or preliminary review. The reference sequence was derived from [BM703847.1](#), [CF127836.1](#), [BC091477.1](#), [AC011479.7](#) and [AK027130.1](#).
 Transcript Variant: This variant (8) represents use of an alternate

promoter and 5' exon and uses a downstream start codon, compared to variant 5. The resulting isoform (2) has a shorter N-terminus, compared to isoform 5. Both variants 2 and 8 encode the same isoform.

Sequence Note: This RefSeq record was created from transcript and genomic sequence data to make the sequence consistent with the reference genome assembly. The genomic coordinates used for the transcript record were based on transcript alignments.

##Evidence-Data-START##

Transcript exon combination :: CF127536.1 [ECO:0000382]
RNAseq introns :: single sample supports all introns
ERS025081, ERS025083 [ECO:0000348]

##Evidence-Data-END##

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-6	BM703847.1	1-6	
	7-177	CF127536.1	1-171	
	178-1177	BC091477.1	200-1199	
	1178-1277	AC011479.7	14258-14357	
	1278-2764	AK027130.1	1-1487	

FEATURES

Location/Qualifiers
<p>source</p> <p>1..2764</p> <p>/organism="Homo sapiens"</p> <p>/mol_type="mRNA"</p> <p>/db_xref="taxon:9606"</p> <p>/chromosome="19"</p> <p>/map="19q13.2"</p>
<p>gene</p> <p>1..2764</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/note="Yipl interacting factor homolog B (S. cerevisiae)"</p> <p>/db_xref="GeneID:90522"</p> <p>/db_xref="HGNC:30511"</p>
<p>exon</p> <p>1..59</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/inference="alignment:Splice:1.39.8"</p>
<p>misc_feature</p> <p>56..58</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/note="upstream in-frame stop codon"</p>
<p>exon</p> <p>60..298</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/inference="alignment:Splice:1.39.8"</p>
<p>CDS</p> <p>95..946</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/note="isoform 2 is encoded by transcript variant 8; protein YIF1B; Yipl-interacting factor homolog B"</p> <p>/codon_start=1</p> <p>/product="protein YIF1B isoform 2"</p> <p>/protein_id="NP_001138934.1"</p> <p>/db_xref="GI:224451038"</p> <p>/db_xref="CCDS:CCDS12512.1"</p> <p>/db_xref="GeneID:90522"</p> <p>/db_xref="HGNC:30511"</p> <p>/translation="MADPHQLFDDTSSAQSRGYGAQAPGGLSYPAASPTPHAAFLAD FVSNMAMAYGSSLAAGKELVDKNIDRFIPITKLNKYFAVDTMVGRKLGLLFFPYLN QDWEVQYQDTPVAPRFDVNPADLYIFAMAFITVVLVAGLALGTQDRFSFDLLGLQAS SALAWLTLEVLAILLSLYLVNTDITIDLVAFGLGYVGMIGGVLMGLLFGKIGYV LVLGWCVAIFVFMIRTLRLKILADAAEGVPVRGARNQLRMVLTMAVAAQPMVMYV LTFHIVR"</p>
<p>exon</p> <p>299..403</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/inference="alignment:Splice:1.39.8"</p>
<p>exon</p> <p>404..482</p> <p>/gene="YIF1B"</p> <p>/gene_synonym="FinGERS"</p> <p>/inference="alignment:Splice:1.39.8"</p>


```

exon      483..540
          /gene="YIF1B"
          /gene_synonym="FinGER8"
          /inference="alignment:Splice:1.39.8"

exon      541..696
          /gene="YIF1B"
          /gene_synonym="FinGER8"
          /inference="alignment:Splice:1.39.8"

exon      697..790
          /gene="YIF1B"
          /gene_synonym="FinGER8"
          /inference="alignment:Splice:1.39.8"

exon      791..2738
          /gene="YIF1B"
          /gene_synonym="FinGER8"
          /inference="alignment:Splice:1.39.8"

STS      804..928
          /gene="YIF1B"
          /gene_synonym="FinGER8"
          /standard_name="RH94089"
          /db_xref="UniSTS:89777"

ORIGIN
1  tcgggttgccg aggtcactgc aggtcagagg tcacgagatc aaggatctgg aaccttgagc
61  ctcgaaagcgg aggatccctg tgtcccagcc gggcatggcc gacccccacc agcttttcga
121  tgacacaagt tcagcccaga gccgggggcta tgggggccag cgggacacct gtggcctgag
181  ttatccttca gccctctcca cgcctccatgc agccttctct gctgacccgg tgtccaacat
241  ggccatggcc tatgggagca gcctggccgc gcaggggcaag gagctgggtg ataagaacat
301  cgaccgcttc atccccatca ccaagctcaa gtattacttt gctgtggaca ccattgtatgt
361  gggcagaaag ctgggctctg tgttctctcc ctacctacac caggactggg aagtgcagta
421  ccaacaggac accccggtgg cccccgctt tgacgtcaat gccccggacc tctacattcc
481  agcaatggct ttcacacact acgttttggg ggctgggtct gcgctgggga cccaggatag
541  gttctcccca gacctctctg ggctgcaagc gagctcagcc ctggcctggc tgacctggga
601  ggtgctggcc atcctgctca gcctctatct ggtcactgtc aacaccgacc tcaccacact
661  cgacctgggt gccctctctg gctacaaata tgtcgggatg attggcgggg tctctcatggg
721  cctgctcttc gggaaagatt gctactacct ggtgctgggc tgggtgctgc tagccatctt
781  tbtgttctat atccggagcg tgcggctgaa gatcttgcca gacgcagcag ctgagggggg
841  ccggtgtcgt gggggccgga accagctgcg catgtacctg accatggcgg tggcgccggc
901  gcagcctatg ctcatgtact ggctcacttc ccacctgggt cgggtgagcg gcccgctgaa
961  cctcccgctg ctgctgctgc tgcctgggggc cactgtggcc gccgaactca tctcctgcct
1021  gcaggccccc aggtccaccc tgtctggcca caggcaccgc ctccatccca tgtcccgccc
1081  agcccccccc ccaacccaaag gtgctgagag atctccagct gcacaggcca ccgccccagg
1141  gcgtggccgc tgttacagaa acaataaacc ctgatgggca tggcgtggac agcctctctt
1201  tggcctctcg cagcaatggg cggggccagc gctgggcagg gggcaggagg ctggggagcg
1261  gccagagtag gcaccacgct gaccagtcgc agaagcgaga gaggaagggt taatgagccc
1321  tgtccagggg ccttcagatg ggagcctctt tcttcttggc ctctctcttc ttgccccctt
1381  ccttctcttc cactttgggc ttcttggcct tgcgggggat gctctctgtc tgcctggagg
1441  cagcagcgtg ggaactgtgg gccaggggca gggatgggag agaagagatg gttctgggct
1501  ggaagcgaga cagggggacc actccccgca cctccccgcg cagccccagt gcggggagcg
1561  ctctctgggg tgcagggcac gtgcttgggg acgctggcga gagcccccta ccttcacatc
1621  cgtgtccgaa tcgctggagc tgcctgtgga gtcgggaagag ctgtgtgtgc cttgtgtgat
1681  ggaagtgctg cagttagggc gcgcccccta cccagcccc tgaaagtgtg ggccaaaggg
1741  aggaacctgg ggtcaggggc aacccccagc ttcccccccc tccgcagccg tggatgaggg
1801  gacttaacct ggtaccggga cctgccccct cctccgaccc gccctgaaat ttgtggggag
1861  tgagcttggt atctcccccg tggccccccc ccacaccggg ctctctggag gtgggctcca
1921  gggctgttga gagaagttgg gtggttgggt caggcagctt ctgggcttga gtccggcccc
1981  ctgcacctcc agtccacact cccagggagc tcacctgtct ccaggtcgaa ctccatggcg
2041  gtaagagaaag ttgggtccta aggcacaagg cgcctggggc ctgcagagga gcggagcagg
2101  gggagggagc ctgagacctg cccgttggag gaatgctgag acgccccacc caacctctgt
2161  cctggtctct agccttgact cattgccccg caccaccagc gatttctctt ctgagaagtg
2221  ggggagatgg acaggtgact gcttccgcca gccttgggtg ctccagggag gccgactgag
2281  gggggtctct tggatggcat tggggagctc acaggttttc ccaaaaagct cagatgctcg
2341  ttcttgaaag gggaggtgct gccccgctt tcttgcgtac cgcgacaata cagcttcttc
2401  cgcggcgctt taacacgcag ggcgctgctg ccaggggctg cccgtgttct aactcgctcc
2461  cacagccccc ccggtctggt gagcagcgtc tgagggggtg ggggcataga cttggagcca
2521  gcctgctgca ctatagccca gctgtgtcac ttagcagcaa ggtgacctca ccaagttgt
2581  tttaacctct tgcctcagtt tctctatctg taaataacag ctacccatgg gattgatgtg
2641  aaagtcagag gagttaatct cctagaatgg tgtctggcat gaagtactga taatgtgttg
2701  gtttttttaa aataaaaagg taggtgtttt aggcagtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2761  aaaa

```

//

8. REFERÊNCIAS

1. Aubin JE, Lian JB, Stein GS. Bone formation : Maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. *In: Favus, JM (ed.). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6 ed.* Washington: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2006. p. 20-9.
2. Dempster DW. Anatomy and Functions of the Adult Skeleton. *In: Favus, JM (ed.). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6 ed.* Washington: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2006. p.7-11.
3. Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* 2012; 481: 314-20.
4. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 ;3 :S131-9.
5. Aubin JE, Turksen K, Heersche, JNM. Osteoblast cell lineage. *In: Noda, M. (ed.). Cellular and molecular biology of bone.* San Diego: Academic Press, Inc., 1993.1-45.
6. Bonewald LF. Osteocytes. *In: Rosen CJ(ed). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 7 ed.* Washington: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2008. p. 22-7.
7. Krause C, Gorter DJJ, Karperien M, Dijke P. Signal transduction cascades controlling osteoblast differentiation. *In: Rosen CJ (ed). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 7 ed.* Washington: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2008. p.10-6.

8. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3): 381-90.
9. Owen, M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*, 1988; 10: 63-76.
10. Aubin JE. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of Bone Biology*. 3 ed. San Diego: Elsevier; 2008. v. 1, p.85-101
11. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci*. 2008; 13: 898-903.
12. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Comunicação celular. In: *Biologia Molecular da Célula*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 2004 cap.15, p.831-906.
13. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008; cap. 8, p. 135-52.
14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Cortenbach-Slaper I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for refining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4): 315-7.
15. Puzas JE. Osteoblast cell biology – lineage and functions. In: Favus, JM (ed.). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 3.ed. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1996.p. 11-6
16. Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press, 1996. p. 51-67.
17. Mundy GR. Bone Remodeling. In: Favus, JM (ed.). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 4.ed. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p.30-8.
18. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodeling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012 ; 45(12): 863-73.

19. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling : Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19: 445-51.
20. Neve A, Conrado A, Cantatore FP. Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions. *Acta Physiol (Oxf).* 2012; 204(3): 317-30.
21. Bonewald LF. Osteocytes. *In: Rosen, CJ (ed.). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 8.ed. Ames: Woley-Blackwell Publishers, 2013. p.34-41.
22. Atkins GJ, Findlay, MD. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int.* 2012; 23(8): 2067-79.
23. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(6): F1170-82.
24. Oliveira RB, Moysés RM. FGF-23: state of the art. *J Bras Nefrol.* 2010; 32(3):323-31.
25. Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res.* 2014; 355(1): 23-33.
26. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinol.* 1995; 136: 3632-8.
27. Hughes FJ, Aubin JE. Culture of cells of the osteoblast lineage. *In: Arnett TR and Henderson B (eds). Methods in bone biology.* London: Chapman & Hall, 1998. p.1-49.
28. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014 8; 1-10.

29. Quarles LD. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: E1-9.
30. Guo R, Liu S, Spurney RF, Quarles LD. Analysis of recombinant Phex: an endopeptidase in search of a substrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(4): E837-47.
31. Rider CC, Mulloy B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.* 2010; 429:1-12.
32. Petersen DN, Tkalcevic GT, Mansolf AL, Rivera-Gonzalez R, Brown TA. Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J Biol Chem.* 2000; 275 (46): 36172-80.
33. Lu Y, Qin C, Xie Y, Bonewald LF, Feng JQ. Studies of the DMP1 57-kDa functional domain both in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs.* 2009; 189(1-4):175-85.
34. Ferrari N, McDonald L, Morris JS, Cameron ER, Blyth K. RUNX2 in mammary gland development and breast cancer. *J Cell Physiol.* 2013; 228(6):1137-42
35. Sclerostin serum levels correlate positively with bone mineral density and microarchitecture in haemodialysis patients. Cejka D, Jäger-Lansky A, Kieweg H, Weber M, Bieglmayer C, Haider DG, et al. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27(1):226-30.
36. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000; 21(4): 393-411.
37. Li M, Thompson DD, Paralkar VM. Prostaglandin E₂ receptors in bone formation. *Int Orthop.* 2007; 31: 767-72.
38. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256 (5517): 495-7.

39. Bruder SP, Caplan AI. First bone formation and the dissection of an osteogenic lineage in the embryonic chick tibia is revealed by monoclonal antibodies against osteoblasts. *Bone*. 1989; 10: 359-75.
40. Nakano T, Kimoto S, Tanikawa K, Kim KT, Higaki M, Kawase T, et al. Identification of osteoblast-specific monoclonal antibodies. *Calc Tissue Int*. 1989; 44: 220-7.
41. Bruder SP, Caplan AI. A monoclonal antibody against the surface of osteoblasts recognizes alkaline phosphatase isoenzymes in bone, liver, kidney, and intestine. *Bone*. 1990; 11: 133-9.
42. Turksen K, Brargava U, Moe HK, Aubin JE. Isolation of monoclonal antibodies recognizing rat bone associated molecules *in vitro* and *in vivo*. *J Histochem Cytochem*. 1992; 40(9): 1339-52.
43. Yamaguchi A, Kahn AJ. Monoclonal antibodies that recognize antigens in human osteosarcoma cells and normal fetal osteoblasts. *Bone Miner*. 1993; 22: 165-76.
44. Walsh S, Dodds RA, James IE, Bradbeer JN, Gowen M. Monoclonal antibodies with selective reactivity against osteoblast and osteocytes in human bone. *J Bone Miner Res* 1994; 9(11): 1687-96.
45. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*. 1997; 21(3): 225-35.
46. Joyner CJ, Bennett A, Triffitt JT. Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies. *Bone*. 1997; 21(1): 1-6.
47. Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, Porretta C, Ruiz B, Pochampally RR, Iwakuma T. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metatasis and drug resistance. *Cancer Res*. 2010; 70(11): 4602-12.
48. Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, Lin CS. Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(10): 1747-52.

49. Gronthos S, Fitter S, Diamond P, Simmons PJ, Itescu S, Zannettino AC. A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16(6): 953-63.
50. Gronthos S, McCarty R, Mrozik K, Fitter S, Paton S, Menicanin D, et al. Heat shock protein-90 beta is expressed at the surface of multipotential mesenchymal precursor cells: Generation of a novel monoclonal antibody, STRO-4, with specificity for mesenchymal precursor cells from human and ovine tissues. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(9): 1253-62.
51. Nijweide PJ, Mulder RJ. Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. *Histochemistry*, 1986; 84(4-6): 342-7.
52. Turksen K, Bhargava U, Moe HK, Aubin JE. Isolation of monoclonal antibodies recognizing rat bone associated molecules in vitro and in vivo. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40(9): 1339-52.
53. Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res*, 2003; 313 (3): 281-90.
54. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(5): 401-19.
55. dos Reis LM. *Produção de anticorpos monoclonais e sua aplicação na identificação de marcadores de células da linhagem osteoblástica* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2003.
56. Fanburg JC, Rosenberg AE, Weaver DL, Leslie KO, Mann KG, Taatjes DJ, Tracy RP. Osteocalcin and Osteonectin Immunoreactivity in the Diagnosis of Osteosarcoma. *J Clin Pathol.* 1997; 108: 464-73.

57. Qu JT, Wang M, He HL, Tang Y, Ye XJ. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012; 138: 819-25.
58. Lu Q, Lv G, Kim A, Ha JM, Kim S. Expression and clinical significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147, in human osteosarcoma. *Oncol Lett*. 2012; 5 (1): 201-7.
59. Hock JM, Lau CC. Osteogenic Osteosarcoma. In: Rosen CJ(ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 7 ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research publishers; 2008. p. 382-5.
60. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma Anatomic and Histologic Variants. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125: 555-81.
61. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Sistema Musculoesquelético. In: *Robbins Patologia Básica*. 8 ed. Elsevier, cap. 21, p. 875-914, 2008.
62. Oliveira CR, Mendonça BB, Camargo OP, Pinto EM, Nascimento SA, Latorre Mdo R, Zerbini MC. Classical Osteblastoma, Atypical Osteblastoma, and Osteosarcoma. A Comparative Study Based on Clinical, Histological, and Biological Parameters. *Clinics*. 2007; 62 (2): 167-74
63. Garcia Filho RJ. Tumores produtores de Tecido Ósseo. In: *Tumores Ósseos*. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 5, p.125, 2008.
64. Mavrogenis AF, Gambarotti M, Angelini A, Palmerini E, Staals EL, Ruggieri P, Papagelopoulos PJ. Chondrosarcomas Revisited. *Orthopedics*. 2012; 35 (3): e379-90.
65. Rekhi B, Kaur A, Puri A, Desai S, Jambhekar NA. Primary leiomyosarcoma of bone - a clinicopathologic study of 8 uncommon cases with immunohistochemical analysis and clinical outcomes. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(3):147-56.

66. Wirbel RJ, Verelst S, Hanselmann R, Remberger K, Kubale R, Mutschler WE. Primary leiomyosarcoma of bone: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular biologic aspects. *Ann Surg Oncol*. 1998; 5(7):635-41.
67. Antonescu CR, Erlandson RA, Huvos AG. Primary leiomyosarcoma of bone: a clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of 33 patients and a literature review. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21(11):1281-94.
68. Watanabe K, Tajino T, Sekiguchi M, Suzuki T. h-Caldesmon as a specific marker for smooth muscle tumors. Comparison with other smooth muscle markers in bone tumors. *Am J Clin Pathol*. 2000; 113(5):663-8.
69. Wile AG, Evans HL, Romsdahl MM. Leiomyosarcoma of Soft Tissue: A Clinicopathologic Study. *Cancer*. 1981; 48: 1022-32.
70. Alimena LJM, Garcia Filho RJ, de Toledo SRC, Alves MTS, Petrilli AS, de Luca Junior G, et al. Protocolo de um banco de tecidos neoplásicos. *Rev Bras Ortop*. 2008; 43(3): 53-8
71. Johnstone A, Thorpe R. *Immunochemistry in practice*. Oxford: Blackwell Scientific; 1988.
72. Laemmli UK. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-85.
73. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Biochemistry*. 1977; 74 (12): 5463-67.
74. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol*. 2000; 156 (2): 409-17.
75. Linderöth J, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Kvaloy S, Torlakovic E. Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res*. 2003; 9 (2): 722-8.

76. Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shamma MA, Whiteman KR, et al. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 104 (12): 3688-96.
77. Hartel PH, Jackson J, Ducatman BS, Zhang P. CD99 immunoreactivity in atypical fibroxanthoma and pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: a useful diagnostic marker. *J Cutan Pathol*. 2006; 33(2): 24-8.
78. Hussein MR, Al-Badaiwy ZH, Guirguis MN. Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. *J Cutan Pathol*. 2004; 31(10): 643-51.
79. Sambrook J, Russel DW. Screening expression libraries. In: Sambrook J (ed.). *Molecular Cloning*. 3 ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. p. 14.1-14.53.
80. Billau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, De Somer P. Human Interferon: Mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977; 12(1): 11-5.
81. Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD et al. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer*. 1998; 76(5): 652-8.
82. Hagemann N, Ackermann N, Christmann J, Brier S, Yu F, Erdmann KS. The serologically defined colon cancer antigen-3 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTPN13 and is involved in the regulation of cytokinesis. *Oncogene*. 2013; 32(39): 4602-13.
83. Stypula-Cyrus Y, Mutyal NN, Dela Cruz M, Kunte DP, Radosevich AJ, Wali R et al. End-binding protein 1 (EB1) up-regulation is an early event in colorectal carcinogenesis. *FEBS Lett*. 2014. 588(5):829-35.
84. Matern H, Yang X, Andrulis E, Sternglanz R, Trepte HH, Gallwitz D. A novel Golgi membrane protein is part of a GTPase-binding protein complex involved in vesicle targeting. *EMBO J*. 2000; 19(17):4485-92.

85. Carrel D, Masson J, Al Awabdh S, Capra CB, Lenkei Z, Hamon M. Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J Neurosci*. 2008; 28(32):8063-73.
86. Al Awabdh S, Miserey-Lenkei S, Bouceba T, Masson J, Kano F, Marinach-Patrice C. A new vesicular scaffolding complex mediates the G-protein-coupled 5-HT_{1A} receptor targeting to neuronal dendrites. *J Neurosci*. 2012; 32(41):14227-41.
87. Zofkova I1, Matucha P. New insights into the physiology of bone regulation: the role of neuro-hormones. *Physiol Res*. 2014 Apr 3. [Epub ahead of print].
88. Câncer Ósseo. Sociedade Brasileira de Cancerologia [Internet]. 2014 [citado junho 2014]. Disponível em: http://www.sbcancer.org.br/home2/site/index.php?option=com_content&view=article&id=117:cancer-osseo&catid=29&Itemid=123.
89. Green JT, Mills AM. Osteogenic tumors of bone. *Semin Diagn Pathol*. 2014; 31(1):21-9
90. El-Badawi ZH1, Muhammad EM, Noaman HH. Role of immunohistochemical cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and osteocalcin in differentiating between osteoblastomas and osteosarcomas. *Malays J Pathol*. 2012; 34(1):15-23.
91. Berge G, Pettersen S, Grotterod I, Bettum IJ, Boye K, Maelandsmo GM. Osteopontin – an important downstream effector of S100A4-mediated invasion and metastasis. *Int J Cancer*. 2010; 129: 780-90.
92. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, et al. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol*. 1979; 123:1548-50.