UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α -dístroglicana, por *Phage Display*

Thais Canassa De Leo

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α -dístroglicana, por *Phage Display*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Thais Canassa De Leo

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 23/01/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Canassa De Leo, Thais

Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α -distroglicana, por *Phage Display*. Ribeirão Preto, 2017.

89p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Dias Baruffi, Marcelo.

1. *Phage Display*. 2. Mucinas. 3. Fragmentos de anticorpos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Thais Canassa De Leo

Título do trabalho: Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α -dístroglicana, por *Phage Display*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

meus pais, Rosane e Gilberto,

meus avós, tios, padrinhos e primos,

meu namorado, Otávio,

e aos meus irmãos nascidos em outros lares.

Vocês são luz e fonte de amor na vida.

E uma vida não seria suficiente para retribuir os esforços e amor incondicional.

Gratidão.

Agradecimientos

Ao professor Dr. Marcelo Dias Baruffi,

Pela oportunidade de desenvolver e confiar a mim o desenvolvimento deste trabalho. Pela orientação acadêmica, mas também pela orientação de desenvolvimento pessoal. Por ser o maior exemplo de amor à ciência que me inspira seguir carreira acadêmica. Obrigada por tudo.

Aos professores Drs. Andrea Maranhão e Marcelo Brígido,

Por me receberem de braços abertos em seu laboratório, estabelecerem uma colaboração tão amistosa que só gera bons frutos, pelos diversos ensinamentos e orientações durante minha estadia em Brasília. É ótimo trabalhar com vocês!

À Dra. Vanessa Leiria Campo,

Pela colaboração estabelecida neste trabalho, ensinamentos compartilhados e amizade.

Aos amigos do laboratório de glicoimunologia da FCFRP-USP,

Lílian Cataldi, Rubens Eduardo, Anna Karoline Aguiar, Thaís Plépis, Talícia Santos, Fábio Kubata e Martin Amstalden que fizeram da rotina de trabalho momentos tão agradáveis e de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. É um prazer trabalhar com vocês! Não posso deixar de agradecer àqueles que hoje percorrem outros caminhos, mas fizeram parte da construção do nosso grupo: Thalita Riul, Flávia Porto, João Francisco, Daniel Cerri e Elder Latorraca.

Aos amigos laboratório de imunologia molecular da Universidade de Brasília,

Manuela Maragno, Fernanda Borges, Ronny Petterson, Laura Miazato, Ana Paula Costa, Isabel Souza, Ruan Riasco, Thompson Tomatieli, Jhennifer Lana, Natalia Gladistone e Bianca Alencar pela receptividade e companhias tão agradáveis durante minha estadia em Brasília. Agradeço especialmente ao Rafael Burtet e ao Nestor Leyton pelos ensinamentos e disponibilidade em me auxiliar durante experimentos. Muito obrigada a todos.

Ao laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP,

Professora Dra. Maria Cristina Nonato, Joane Rustiguel, Felipe Calil, Mariana Ajalla, Iara Cardoso, Marília Cirqueira e Victor Rangel pelo auxílio na realização dos experimentos. Obrigada pela amizade e convívio!

Ao laboratório de Bioinformática da Universidade de Brasília,

Dr. Waldeyr Mendes Silva pelo auxílio na utilização da plataforma ATTILA. Obrigada pela disponibilidade e ensinamentos.

Ao serviço de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,

e aos funcionários do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia, por todos os serviços prestados e disponibilidade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,

Por me acolher desde 2012 no início de minha iniciação científica, pelos excelentes profissionais e pelo suporte por todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

Pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Epígrafe

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

CANASSA DE-LEO, T. **Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α -distroglicana, por Phage Display** 2017. 87f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Adenocarcinomas e distroglicanopatias são doenças graves que estão associadas a quadros de hipoglicosilação de mucinas tumorais, como a MUC1 (*transmembrane glycoprotein Mucin 1*) e de mucinas de α -distroglicana (α -DG). Um dos mais importantes desafios associados à terapia anti-câncer refere-se ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que permitam o direcionamento da ação de drogas anti-tumorais para a célula cancerosa com o objetivo de evitar o acometimento de células saudáveis. Nessa linha, é crucial a construção de sistemas de liberação de medicamentos sítio específicos por meio de marcadores tumorais. Quanto ao diagnóstico das distroglicanopatias, atualmente este se baseia principalmente na observação de manifestações clínicas, biópsias musculares e medidas enzimáticas, sendo que os anticorpos monoclonais disponíveis no mercado não são específicos para a condição do músculo distrófico. Dessa forma, mucinas tumorais e mucinas de α -DG modificadas tem sido consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e/ou terapêuticas aplicáveis a estas doenças. Para este trabalho, foram sintetizados, em fase sólida, glicopeptídeos miméticos de MUC1 e α -DG hipoglicosilados, os quais foram utilizados como ferramenta de busca por novos anticorpos recombinantes. Estes antígenos foram imobilizados em uma placa e sobre eles foi aplicada uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (Fabs) humanos recombinantes para o desenvolvimento do processo de seleção pela tecnologia de *Phage Display*. Após quatro *rounds* consecutivos de seleção, os genes codificadores dos Fabs da biblioteca não selecionada e selecionada foram sequenciados e analisados *in silico* na plataforma ATTILA. Esta análise permitiu rastrear o enriquecimento dos domínios VH e VL durante a seleção, além de possibilitar a escolha de inúmeros clones para produção. Para este trabalho, quatro fragmentos de anticorpos scFvs recombinantes inéditos para a mucina tumoral MUC1 e α -DG hipoglicosilados foram desenhados e clonados em vetor de expressão pET29(a) contendo um marcador de identificação (peptídeo FLAG) e outro de purificação (cauda de histidina). A expressão de um scFv recombinante anti-MUC1 foi realizada em *E. coli* BL21-DE3 pela adição de 0,5mM de IPTG com indução a 20°C por 16 horas. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel, seguida de gel filtração, sendo estas etapas monitoradas por SDS-PAGE. A identificação imunoquímica da proteína recombinante foi confirmada por *Western Blot*, utilizando o anticorpo *anti*-FLAG. Entende-se que este trabalho, por meio da produção de novas ferramentas biotecnológicas, poderá cooperar para o desenvolvimento de novas formas abordagens diagnósticas e/ou terapêuticas para tumores e distroglicanopatias.

Palavras-chave: *Phage Display*, anticorpos recombinantes scFv, MUC1, mucinas de α -DG

ABSTRACT

CANASSA DE-LEO, T. **Selection, partial characterization, and production of human recombinant antibodies anti-mimetic glycopeptides of tumoral mucins and α -dystroglycan by Phage Display**. 2017. 87f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Adenocarcinomas and dystroglycanopathies are serious diseases associated with hypoglycosylation of tumoral mucins, such as MUC1 (transmembrane glycoprotein Mucin 1) and α -dystroglycan mucins (α -DG). One of the most important challenges associated with anti-cancer therapy is the development of therapeutic strategies that allow the targeting of anti-tumor drugs to the cancer cell in order to avoid the involvement of healthy cells. In this regard, the construction of site-specific drug delivery systems by tumor markers is crucial. The diagnosis of dystroglycanopathies are currently based on the observation of clinical manifestations, muscle biopsies and enzymatic measures, and the available monoclonal antibodies are not specific for the dystrophic muscle condition. Thus, tumoral mucins and modified α -DG mucins have been considered potential targets for the development of new diagnostic and/or therapeutic strategies applicable to these diseases. For this work, glycoproteins MUC1 and α -DG hypoglycosylated mimetics were synthesized by solid phase reaction, and were used as a search tool for new recombinant antibodies. These antigens were immobilized in a plate and a library of recombinant human antibody (Fabs) fragments was applied thereon for the development of the screening process by Phage Display technology. After four consecutive rounds of selection, the Fabs coding genes from the unselected and selected library were sequenced and analyzed *in silico* on ATTILA platform. This analysis allowed us to track the enrichment of the VH and VL domains during selection process, and also presented several option of clones to choose for production. For this work, four novel fragments of recombinant scFvs antibodies specific for tumoral mucin MUC1 and α -DG hypoglycosylated were designed and cloned into pET29 (a) expression vector containing an identification marker (FLAG peptide) and a purification tag (histidine tail). Expression of a recombinant anti-MUC1 scFv was performed on *E. coli* BL21-DE3 by the addition of 0.5 mM of IPTG with induction at 20°C for 16 hours. Purification was performed by affinity chromatography on nickel resin, followed by gel filtration, these steps being monitored by SDS-PAGE. Immunochemical identification of the recombinant protein was confirmed by Western Blot, using the anti-FLAG antibody. It is understood that this work, through the production of new biotechnological tools, could cooperate for the development of new forms of diagnostic and/or therapeutic approaches for tumors and dystroglycanopathies.

Keywords: Phage Display, scFV recombinant antibodies, MUC1, α -DG mucins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema sintético das vias de O-glicosilação na MUC1.	4
Figura 2 - Representação esquemática da MUC1 na superfície celular.	4
Figura 3 - Representação esquemática da α -distroglicana.	8
Figura 4 - Representação esquemática do processo de recombinação e expressão dos genes das cadeias pesadas e leves das Igs.	12
Figura 5 - Representação esquemática de um domínio de Ig com destaque para as regiões CDR e sua variabilidade.	13
Figura 6 - Representação esquemática de uma molécula de imunoglobulina.	14
Figura 7 - Representação esquemática de diferentes possíveis formas de produção de anticorpos.	16
Figura 8 - Representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago M13. ..	19
Figura 9 - Representação esquemática de um bacteriófago M13 recombinante.	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μF: microfarad

μg: micrograma

μL: microlitro

ATTILA: Ferramenta Automatizada para Análise de Imunoglobulina (*AutomaTed Tool For Immunoglobulin Analysis*)

BCR: Receptor de célula B (*B cell receptor*)

BSA: Albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*)

cDNA: DNA complementar (*complementary DNA*)

CDR: Região determinante de complementariedade (*complementarity determining region*)

CH: Domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina (*constant heavy*)

CL: Domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina (*constant light*)

CMD: Distrofias musculares congênitas (*congenital muscular dystrophy*)

c-myc: fosfoproteína nuclear que desempenha papel na progressão do ciclo celular.

DG: Distroglicana (*dystroglycana*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados do inglês (*deoxynucleotide triphosphate*)

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético do inglês (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico do inglês (*epidermal growth factor receptor*)

ER: Receptor de estrógeno (*estrogen receptor*)

Fab: Fragmento de ligação ao antígeno (*fragment antigen binding*)

Fc: Fragmento cristalizável (*fragment crystallizable*)

FCMD: Distrofia muscular congênita de Fukuyama (*Fukuyama congenital muscular dystrophy*)

FKRP: Proteína relacionada a fukutina (*fukutin-related protein*)

GalNAc: N-acetil galactosamina

GlcNAc: N-acetil glicosamina

HAMA: Anticorpo humano contra anticorpo murino (*human anti-mouse antibody*)

HCl: ácido clorídrico

HER2: Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HIF-1 α : Fator indutor de hipóxia 1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*)

Ig: Imunoglobulina

IMAC: Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (*immobilized metal affinity chromatography*)

IPTG: Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo

kb: kilobase

KCl: cloreto de potássio

kDa: kilodalton

kV: quilovolts

L: litro

LB: Luria Bertani (meio de cultivo)

M: molar

mA: miliampere

Man: manose

mAU: Unidade de absorbância (*mili-absorbance unit*)

MCF-7: Fundação do câncer de Michigan (*Michigan Cancer Foundation-7*)

MDC1D: Distrofia muscular congênita tipo 1D (*Congenital muscular dystrophy type 1D*)

MgCl₂: cloreto de magnésio

MgSO₄: sulfato de magnésio

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro (*messenger RNA*)

mTOR: Alvo mamífero de rapamicina (*mammalian target of rapamycin*)

MUC1: mucina tumoral 1

MW: Peso molecular (*molecular weight*)

NaCl: cloreto de sódio

NeuAc: ácido neuramínico

NGS: Sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*)

nm: nanômetro

O.D._{600nm}: Densidade ótica em comprimento de onda 600nm (*optical density*)

°C: graus Celsius

p53: gene supressor tumoral mutado em aproximadamente metade dos cânceres humanos.

pb: pares de base

PCR: Reação de polímerase em cadeia (*polymerase chain reaction*)

PEG: Polietileno glicol (*polyethylene glycol*)

pfu: Unidades formadoras de colônia (*plaque forming units*)

PKM2: Piruvato quinase 2 (*pyruvate kinase 2*)

POMGnT1: O-manosil-N-acetilglicosaminiltransferase (*Protein O-Linked Mannose N-Acetylglucosaminyltransferase 1*)

POMT1: O-manosil transferase 1 (*Protein O-Mannosyltransferase 1*)

POMT2: O-manosil transferase 2 (*Protein O-Mannosyltransferase 2*)

PS: Sinal de empacotamento (*packaging signal*)

RNA: Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RPM: rotações por minuto

SB: Super Broth (meio de cultivo)

scFv: Cadeia simples de fragmento variável (*single chain fragment variable*)

SDS: Dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SOC: Super Optimal Broth (meio de cultivo)

ssDNA: DNA cadeia simples (*single-strand DNA*)

TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA

TBS: Tampão Tris-salino

TBS-T: TBS-Tween

TNF: Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

V: volt

VH: Domínio de cadeia pesada variável de imunoglobulina (*variable heavy*)

VhH: fragmento de anticorpo de cadeia simples obtido de camelídeos

VL: do inglês, *variable light* (domínio de cadeia leve variável de imunoglobulina)

V-NAR: Novo receptor de antígeno variável (Imunoglobulina de tubarão)

Ω: ohm

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código	Códon (DNA)
Isoleucina	I	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valina	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanina	F	TTT, TTC
Metionina	M	ATG
Cisteína	C	TGT, TGC
Alanina	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicina	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolina	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Treonina	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Serina	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirosina	Y	TAT, TAC
Triptofano	W	TGG
Glutamina	Q	CAA, CAG
Asparagina	N	AAT, AAC
Histidina	H	CAT, CAC
Ácido glutâmico	E	GAA, GAG
Ácido aspártico	D	GAT, GAC
Lisina	K	AAA, AAG
Arginina	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE AMINOÁCIDOS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Adenocarcinomas e mucinas tumorais	2
1.1.1. Terapias	5
1.2. Distroglicanopatias e mucinas	6
1.2.1. Diagnóstico e terapêutica associados às distroglicanopatias.....	9
1.3. Imunoglobulinas.....	10
1.4. A produção de fragmentos de anticorpos na pesquisa e prática clínica	14
1.5. <i>Phage Display</i> e bibliotecas de moléculas apresentadas em bacteriófagos.....	18
2. OBJETIVOS	22
3. CONCLUSÃO.....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adenocarcinomas e mucinas tumorais

O termo câncer faz referência a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que, diferentemente daquelas infecciosas e degenerativas, decorrem da formação de um tecido constituído por células autônomas com características distintas daquelas que a antecederam. Atualmente é a segunda maior causa de morte no mundo, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. Além de fatores genéticos, causas externas como radiações ionizantes, alimentos, drogas, medicamentos, toxinas, poluentes e hábitos danosos como tabagismo e etilismo, são os maiores contribuintes para o desenvolvimento de câncer na população mundial. A exposição aos fatores de risco aumenta a cada dia tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, sendo que os tipos mais recorrentes na população brasileira e mundial são: próstata, mama feminina, cólon de útero, intestino e pulmão (CANCER RESEARCH UK, 2012; INCA, 2016; JUNIOR; BATOCCHIO; LESSA, 2014).

As mucinas são um grupo heterogêneo de glicoproteínas de elevado peso molecular expressas na superfície de células epiteliais ou secretadas. Elas estão associadas a proteção do lúmen de muitos tecidos glandulares contra infecção por patógenos microbianos. Estas moléculas podem ser encontradas em células dos olhos, glândulas mamárias, pulmão, trato gastrointestinal e tratos genitourinário, desempenhando, também, funções de propriedades adesivas, transdução de sinais intracelulares, retenção de muco e funcionamento celular (LINDEN et al., 2008; NELSON; COX, 2011; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015). Assim como o ciclo celular da célula tumoral apresenta-se desregulado, os mecanismos biossintéticos das mucinas tumorais também o são, de forma que o processo de glicosilação nestas células seja comprometido. Desta forma, células tumorais são caracterizadas por glicolipídeos e glicoproteínas considerados antígenos próprios alterados (ALBERTS et al., 2010; ANDRIANIFAHANANA; MONIAUX; BATRA, 2006; HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; HOSSAIN; WALL, 2016). Dentre as classes de mucinas tumorais, a mucina epitelial 1 (MUC1) é a mais estudada, estando documentada em diferentes tipos de tumores epiteliais tais como mama, pulmão, pâncreas, rim, ovário, cólon e próstata, também chamados de adenocarcinomas (HOSSAIN; WALL, 2016; KUFE, 2009; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). A MUC1 encontra-se expressa em quase todas as células epiteliais glandulares. Ela foi

detectada pela primeira vez em 1982, no leite humano, como uma proteína de elevado peso molecular rica em resíduos de serina, treonina, prolina e muitas cadeias de carboidratos O-ligados. Esta molécula encontra-se super expressa em células malignamente transformadas e com padrão de glicosilação alterado. Assim, novos padrões moleculares, não existentes na célula sadia, passam a ser expressos no tumor de forma a gerar novos epítomos com potencial antigênico na célula tumoral. Estudos envolvendo a MUC1 se desenvolvem no sentido de unir pesquisadores de áreas diversas como a glicobiologia, imunologia e oncologia (SHIMIZU; YAMAUCHI, 1982; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999).

A MUC1 é uma glicoproteína transmembrana cujo domínio extracelular é composto por aproximadamente 20 aminoácidos em *tandem repeat*, em números que variam devido ao caráter polimórfico do gene codificador. Esta região é rica em resíduos de serina, treonina e prolina, apresentando diversos potenciais sítios para O-glicosilação (KUFE et al., 1984; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). Já as porções transmembrana e citoplasmática apresentam um alto grau de conservação de suas sequências codificadoras em comparação com genes homólogos de outras espécies, sugerindo o desempenho de um papel importante na transdução de sinal e outras interações (RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015; SPICER et al., 1991).

As glicanas alteradas que compõe a MUC1 são denominadas Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (TACAs), sendo elas α GalNAc (Tn), Neu5Ac α 2-6 α GalNAc (STn) e β Gal1-3 α GalNAc (TF) (BEATTY; FINN, 2013; HOSSAIN; WALL, 2016). A reação de glicosilação da MUC1 ocorre ao longo do complexo de Golgi por enzimas da família *N*-acetilgalactosaminiltransferases, conforme exemplificado no esquema da figura 01 (LLOYD et al., 1996). Após completamente sintetizada, esta glicoproteína fica exposta na região apical da célula, voltada para o lúmen. Entretanto, na célula tumoral cujo ciclo celular apresenta-se desregulado, a síntese das cadeias de O-glicanas ocorre de forma truncada e terminadas por sialiação (Figura 01 e figura 02). Além disso, ocorre a perda da polarização celular, de forma que a MUC1 fique disposta, e superexpressa, por toda superfície celular (ALBERTS et al., 2010; KUFE et al., 1984; LLOYD et al., 1996; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999).

Figura 1 - Esquema sintético das vias de O-glicosilação na MUC1.

Em células não-tumorais, ocorre a adição de *N*-acetilgalactosamina e *N*-acetil-glicosamina pela ação de acetiltransferases. Já em células tumorais, ocorre a adição de ácido siálico (SA) a partir da estrutura core 1 ou diretamente na *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) ligada à proteína. Retirado e adaptado de Taylor-Papadimitriou et al., 1999 e Lloyd et al., 1996.

Figura 2 - Representação esquemática da MUC1 na superfície celular.

A figura ilustra as diferenças entre a MUC1 hiperglicosilada expressa na superfície de células saudáveis e a MUC1 hipoglicosilada expressa em células tumorais. Retirado e adaptado de Hossain; Wall (2016).

Muitos dados da literatura relatam que a MUC1, principalmente suas porções transmembrana e citoplasmática, estão envolvidas em funções e interações importantes relacionadas à sinalização celular. Conforme já mencionado, a célula malignamente transformada perde sua polarização e esta mucina, antes localizada somente na porção apical, passa a ser distribuída por toda membrana, podendo interagir com tirosina-quinases de outras porções celulares (MEHLA; SINGH, 2014; SINGH; HOLLINGSWORTH, 2006). De forma direta e indireta, a MUC1 interfere no ciclo de vida da célula tumoral, favorecendo sua progressão. Ela está envolvida em processos de regulação de metabolismo da glicose no tumor ao atuar como moduladora dos fatores p53, c-myc e mTOR; regulação e estabilidade da atividade transcricional do fator de transcrição HIF-1 α , relacionado a sobrevivência do tumor em ambientes hostis e desenvolvimento de quimioresistência; participação na regulação da atividade enzimática da PKM2, uma enzima crítica da via glicolítica; e atua, também, na regulação do fluxo de carbono na via da glicólise aeróbica e sobrevivência da célula tumoral em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, favorecendo assim, a inibição do processo apoptótico (MEHLA; SINGH, 2014).

Os diversos envolvimento e funções metabólicas da MUC1 no contexto da progressão tumoral implica na utilização desta mucina como um importante alvo terapêutico no tratamento e/ou diagnóstico do câncer.

1.1.1. Terapias

Devido ao elevado grau de expressão e glicosilação alterada, a MUC1 é considerada um importante alvo para a imunoterapia de adenocarcinomas. Nesse sentido, muitas estratégias já foram, e tem sido, trabalhadas: vacinação com sequência de peptídeos, tratamentos com anticorpos monoclonais e monoclonais conjugados (RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015). A MUC1, considerada um importante marcador tumoral de relevância clínica, foi a primeira molécula antigênica marcadora de superfície a ser utilizada em tratamentos com viés imune (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). Na década de 80 foi desenvolvido o anticorpo monoclonal HMFG1 contra MUC1 obtida em solução no leite humano.

Alguns anos depois este anticorpo foi conjugado a compostos radioativos, como yttrium-90 e outras formas derivadas, e utilizado no tratamento de pacientes com câncer de ovário (BURCHELL et al., 1987; HIRD et al., 1993; MARAVEYAS et al., 1994; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015). Rapidamente os anticorpos monoclonais se tornaram ferramentas importantes na prática clínica. Porém, quando administrados em humanos, eram observadas reações imunopatológicas indesejadas, como HAMA (*human anti-mouse antibody*), devido a epítomos característicos de imunoglobulinas murinas. A engenharia genética possibilitou a manipulação gênica para o desenvolvimento dos anticorpos humanizados, ou seja, anticorpos cujas porções murinas antigênicas eram substituídas por sequências humanas. Entretanto, em alguns casos foi observada a perda de reatividade da molécula pelo seu antígeno (OLIMPIERI; MARCATILI; TRAMONTANO, 2015). O monoclonal HMFG1 foi utilizado no desenvolvimento da forma humanizada AS1402, a qual passou por fase I de teste clínico em pacientes com câncer de mama avançado, mas não apresentou resultados objetivos satisfatórios, apesar da atividade *in vitro* e tolerância dos pacientes (PEGGRAM et al., 2009). Gulec e colaboradores (2011) utilizaram o anticorpo monoclonal humanizado hPAM4 (Clivatuzumab Tetraxetan) no tratamento de pacientes com câncer pancreático e observaram resultados positivos. Os autores ainda afirmam que a especificidade da molécula pode ser ainda explorada no sentido de ser utilizada como veículo de entrega de drogas (GOLD et al., 2007; GULEC et al., 2014; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015).

1.2. Distroglicanopatias e mucinas

Distroglicanopatias correspondem a um grupo de distrofias musculares congênitas (CMD) caracterizadas por anormalidades no processo de glicosilação de proteínas envolvidas no ancoramento muscular, nas quais o portador apresenta sintomas desde seu nascimento (MOORE; HEWITT, 2009). Estas doenças apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, dentre elas, desabilidades intelectuais, problemas oculares e neurais, com quadros de piora ou melhora durante os primeiros anos de vida, mas que ao se associarem a deformidades na coluna e contraturas, reduzem consideravelmente a qualidade e expectativa de vida (SPARKS

et al., 1993). Devido à falta de um registo mundial, o número de indivíduos acometidos pelas distroglicanopatias é impreciso, mas sabe-se que a distribuição global é heterogênea, com prevalência na população caucasiana (BOUCHET-SÉRAPHIN; VUILLAUMIER-BARROT; SETA, 2015).

A distroglicana (DG) é uma glicoproteína composta por duas subunidades, α e β , que fazem parte do complexo distrofina glicoproteína e atuam em conjunto no ancoramento de proteínas musculares intracelulares (distrofina) à laminina da matrix extracelular, sendo essencial para a manutenção da estabilidade estrutural e funcional da fibra muscular. Apesar de sua função já ser claramente desvendada, estudos sobre a bioquímica e variações químicas desta molécula, revelam a importância das modificações pós traducionais para o correto desempenho de sua função estrutural no músculo (BARRESI; CAMPBELL, 2006; BROWN et al., 1999; MOORE; HEWITT, 2009; SCIANDRA et al., 2015).

O gene DAG1 codifica a distroglicana precursora, a qual é clivada por modificações pós traducionais em subunidades α e β . A porção β é transmembrana e possui aproximadamente 43 kDa, sendo sua extremidade C-terminal, citoplasmática, rica em resíduos de prolina. Já a α -DG é ancorada e exposta ao meio extracelular, apresentando uma massa molecular aparente que varia de 120 a 160 kDa dependendo do tecido em que é expressa (cérebro e músculo esquelético) (BRANCACCIO et al., 1995, 1997; MUNTONI; BROCKINGTON; BROWN, 2004). Esta subunidade apresenta um peptídeo conector, rico em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr), altamente O-glicosilado entre as extremidades globulares C e N-terminal (Figura 03).

Figura 3 - Representação esquemática da α-distroglicana.

A figura ilustra a disposição da α-DG na membrana celular. A subunidade β fica inserida na membrana, apresentando uma porção citoplasmática responsável por se ligar à distrofina. A subunidade α apresenta duas cabeças globulares conectadas por um segmento peptídico amplamente O-glicosilado, representando uma região semelhante à mucinas. Esta porção glicosilada liga-se à laminina, ancorando proteínas musculares à matriz extracelular. Retirado e adaptado de Merry; Astrautsova, (2008)

Os padrões de O-glicosilação no domínio mucina-like da α-DG é conservado entre todos os mamíferos (TOLEDO et al., 2012), sendo este processo realizado por diferentes enzimas do tipo glicosil-transferases. Chiba e colaboradores (1997) identificaram pela primeira vez a estrutura de O-manose, Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα-O-Ser/Thr, que compõe o domínio de hiperglicosilação da α-DG. Mutações genéticas nos genes codificadores das enzimas que editam este domínio polissacarídico associam-se a alterações nos padrões de glicosilação da α-DG, sendo estes genes *POMT1* (OMIM 607423), *POMT2* (OMIM 607439), *POMGnT1* (OMIM 606822), *fukutin* (OMIM 607440), *FKRP* (OMIM 606596) e *LARGE* (OMIM 603590) (BOUCHET-SÉRAPHIN; VUILLAUMIER-BARROT; SETA, 2015; ENDO, 2015; MOORE; HEWITT, 2009; MUNTONI et al., 2007). Dessa forma, as mutações, não no gene codificador da α-DG, mas sim nas enzimas responsáveis pela glicosilação, levam a um quadro de hipoglicosilação da porção mucina-like da α-DG. Esta é a principal razão da ocorrência de anormalidades musculares nas distroglicanopatias.

O impacto da correta O-glicosilação pôde ser evidenciado por meio de modificações químicas da α -DG hiperglicosilada por ácido periódico e ácido trifluorometanosulfônico, resultando na perda de adesão à laminina (ENDO, 2015; MARTIN, 2003; SMALHEISER, 1993).

Camundongos *Large* são um modelo de distroglicanopatias caracterizados por deficiência na produção da glicosil-transferase LARGE. Barresi e colaboradores (2004) trabalharam superexpressando a LARGE humana nestes animais e observaram que a ligação da α -DG à laminina foi reconstituída, inclusive em pacientes com deficiência em outras glicosil-transferases. Entre outras distroglicanopatias podem ser citadas a distrofia de Fukuyama (FCMD), sendo a segunda mais prevalente no Japão, a síndrome de Walker-Warburg, a doença *muscle-eye-brain* e a distrofia muscular tipo 1D (MDC1D), acometida pela LARGE humana – todas caracterizadas por anormalidades nas enzimas de O-glicosilação da α -DG (MUNTONI et al., 2004; SPARKS et al., 1993).

1.2.1. Diagnóstico e terapêutica associados às distroglicanopatias

As distroglicanopatias apresentam dezenas de quadros clínicos diferentes e com diferentes graus de comprometimento das atividades motoras do indivíduo, sendo quase impossível associar um gene a um único fenótipo. Devido a essa miscelânea de manifestações, torna-se um desafio diagnosticar quais mutações estão envolvidas em cada quadro. Com o advento do sequenciamento de nova geração, foi possível sequenciar genomas inteiros de indivíduos e famílias e, então, descobrir novos genes associados às distroglicanopatias. O diagnóstico desta desordem baseia-se principalmente na observação de manifestações clínicas, medidas da atividade enzimática de enzimas como a POMGnT1 a partir de biópsias musculares e métodos de imuno-histoquímica, e também testes genéticos (BÖNNEMANN et al., 2014; MUNTONI et al., 2007; SPARKS et al., 1993). As formas de terapia são determinadas de acordo a condição física apresentada pelo indivíduo ou mesmo o tipo de mutação que ele carrega. Nos primeiros anos de vida, indica-se a fisioterapia e tratamentos ortopédicos (BÖNNEMANN et al., 2014; SPARKS et al., 1993).

Os anticorpos monoclonais IIH6 e VIA4-1 presentes no mercado são capazes de reconhecer a forma hiperglicosilada padrão da α -DG, porém, não se sabe exatamente quais epítomos eles reconhecem. Assim, em ensaios de imunohistoquímica e *Western Blot* o quadro de hipoglicosilação característico das distroglicanopatias pode ser detectado pela perda de imunoreatividade observada em relação à condição saudável da α -DG (MOORE; HEWITT, 2009; MUNTONI et al., 2007; VOGLMEIR et al., 2011). Anticorpos recombinantes capazes de reconhecer a condição hipoglicosilada da α -DG representam maior acurácia e especificidade no diagnóstico de distroglicanopatias.

1.3. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são glicoproteínas expressas na superfície de células B ou secretadas, que atuam na neutralização e eliminação de antígenos não próprios. A ativação dos linfócitos B para secreção de anticorpos pode ocorrer a partir de diferentes vias, sendo elas dependentes do auxílio de linfócitos T auxiliares (*helper*) ou não. Antígenos microbianos multivalentes, como polissacarídeos e lipídeos, ligam-se aos receptores BCR dos linfócitos B, induzindo diretamente a produção de anticorpos. Já a secreção de anticorpos dependente de T requer a captura de antígenos proteicos microbianos pelo linfócito B, e apresentação deste às células T auxiliares, que por sua vez levam a ativação de B. A eliminação e neutralização de patógenos depende de diversos mecanismos efetores e anticorpos de diferentes isotipos. Entretanto anticorpos produzidos de maneira T dependente se ligam com maior avidéz aos seus antígenos proteicos, sendo os mediadores mais eficazes da resposta humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A capacidade dos linfócitos B de produzirem diferentes classes – ou isotipos – de imunoglobulinas proporciona uma plasticidade imensa na resposta imune humoral, pois cada classe associa-se a diferentes funções efetoras contra diversos agentes infecciosos: antígenos polissacarídicos estimulam principalmente anticorpos IgM; a resposta contra vírus, bactérias e antígenos proteicos envolve a produção de IgG; a eliminação de parasitas helmintos está associada a produção de IgE, enquanto que a defesa de mucosas ocorre pela produção de IgA. A mudança de isotipo é

desencadeada em resposta a sinais bioquímicos gerados a partir da ligação da molécula CD40 ao seu ligante presente na superfície das células B e a liberação de diferentes citocinas. Mas a variabilidade e especificidade das imunoglobulinas produzidas pelo sistema imunológico vai muito além da diversidade de isótipos, de forma que existam bilhões de anticorpos circulantes no nosso organismo. A capacidade de cada indivíduo gerar esse repertório diverso vem de um processo muito engenhoso, selecionado pela evolução biológica, capaz criar milhares de anticorpos diferentes a partir de um número limitado de genes. Isso só é possível devido à combinação aleatória de três diferentes *loci* gênicos que codificam para a região variável das imunoglobulinas. Os *loci* gênicos de variabilidade (V), diversidade (D) e junção (J), reorganizam-se num processo denominado recombinação V(D)J, codificam para as cadeias pesadas e as cadeias leve κ e λ (vale ressaltar que as cadeias κ e λ não possuem o segmento D em sua composição) das Ig. Existem aproximadamente 100 genes funcionais de variabilidade no locus da cadeia pesada humana, 35 genes no locus na cadeia κ e 30 genes para cadeia λ , sendo que estes números variam entre as espécies. Os segmentos gênicos de cada locus estão separados por espaçadores de até 2000 quilobases. À jusante dos genes V, encontram-se os segmentos de diversidade e junção, cujo número, semelhantemente a V, varia em diferentes *loci* das Igs. Os genes J tem em média 40 pares de base, estão separados por sequências não codificadoras e encontram-se estreitamente ligados às sequências codificadoras da região constante. Dessa forma, o rearranjo de V, D e J formam um único éxon que codifica para a região variável da Ig (Figura 04). Além deste mecanismo, a variabilidade do repertório de imunoglobulinas é dada pela adição e deleção aleatória de bases nitrogenadas, por ação de endonucleases, nas junções entre os segmentos VDJ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; MARANHÃO et al., 2015; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Figura 4 - Representação esquemática do processo de recombinação e expressão dos genes das cadeias pesadas e leves dos Ig.

A figura ilustra a sequência resumida dos processos de recombinação dos segmentos V, D e J para expressão de Ig. C representa a região codificadora da porção constante de Ig. Retirado e modificado de Maranhão et al., 2015.

Os anticorpos de todas as classes apresentam características estruturais semelhantes tanto nas regiões variáveis de ligação ao antígeno quanto nas regiões constantes que desempenham funções efetoras. Estas moléculas, basicamente, apresentam uma estrutura central simétrica composta por duas cadeias idênticas de maior peso molecular (cadeias pesadas) e duas cadeias idênticas de menor peso molecular (cadeias leves). As cadeias leve e pesada são constituídas por unidades homólogas de domínios globulares repetidos, denominados domínio Ig, formados por duas camadas de folha β , cada uma com três a cinco fitas de cadeias polipeptídicas antiparalelas. Pontes dissulfeto unem as camadas de folha β , enquanto curtas alças unem as sequências antiparalelas (Figura 5a). No sítio de ligação ao antígeno, três destas alças são extremamente importantes no que tange o nível de variabilidade para reconhecimento antigênico, formando a região determinante de complementariedade CDR (Figura 5b). Com o avanço das técnicas de sequenciamento, foi possível sequenciar as regiões codificadoras das cadeias leve e pesada e, portanto, as CDRs e as regiões que as intercalam, denominadas *frameworks*. A determinação das CDRs pode ser dada pela definição de Kabat ou Chotia, que levam em consideração a

variabilidade de resíduos em cada posição dos domínios variáveis ou a estrutura secundária, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; CRUSE; LEWIS, 2010; MARANHÃO et al., 2015; NELSON; COX, 2011).

Figura 5 - Representação esquemática de um domínio de Ig com destaque para as regiões CDR e sua variabilidade.

a) Estrutura de um domínio Ig, ilustrando as duas camadas de folha β ligadas por pontes dissulfeto, com as fitas antiparalelas associadas por alças curtas; b) Gráfico Wu-Kabat ilustrando as regiões de hipervariabilidade de imunoglobulinas, com destaque para as CDRs 1, 2 e 3. Retirado e adaptado de Abbas; Lichtman; Pillai, 2012.

Tanto cadeia leve quanto cadeia pesada, na extremidade aminoterminal, fazem parte da região variável de reconhecimento ao antígeno, enquanto que a porção carboxi-terminal de ambas possuem domínios constantes. A porção responsável por reconhecer o antígeno, composta por cadeia leve e pesada, é denominada região Fab. A parte das cadeias pesadas que ultrapassam os limites da cadeia leve, formam a região Fc, o qual pode ser removido do restante da molécula de anticorpo por digestão enzimática com papaína (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; ALBERTS et al., 2014; NELSON; COX, 2011). A figura 06 a seguir ilustra uma estrutura de imunoglobulina IgG.

Figura 6 - Representação esquemática de uma molécula de imunoglobulina.

O sítio de ligação ao antígeno é formado pela justaposição das porções VL e VH. O Fab é formado por VH, VL, CL e CH1 (constante 1 da cadeia pesada). Já o Fc é formado pelos domínios globulares CH2 e CH3 da cadeia pesada. Retirado e adaptado de Alberts et al., 2014.

1.4. A produção de fragmentos de anticorpos na pesquisa e prática clínica

Anticorpos e produtos relacionados foram a classe de agentes terapêuticos de maior crescimento nos anos 2000. Muitos já foram aprovados e são comercializados para o tratamento de doenças como câncer e doenças inflamatórias. Anticorpos como rituximab (Rituxan/ Mabthera; Genentech/Roche/Biogen Idec), infliximab (Remicade; Centocor/Merck), trastuzumab (Herceptin; Genentech/ Roche) e cetuximab (Erbix; ImClone Systems), desenvolvidos a partir dos antígenos CD20, fator de necrose tumoral (TNF), receptor para fator de crescimento epitelial humano 2 (HER2) e fator de crescimento epitelial (EGFR), respectivamente, são grandes sucessos “clássicos” já estabelecidos no mercado. Com o avanço da engenharia genética e da capacidade de modificação dos anticorpos, estas moléculas puderam ser desmontadas em fragmentos menores capazes de reter as características de ligação a um antígeno específico (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005). Os *designers* de anticorpos acreditam que a natureza modular das imunoglobulinas pode ser explorada no sentido de customizá-las para as mais diferentes aplicações. Características como

tempo de meia vida, distribuição, valência, afinidade, avides, penetração tecidual e outras bioatividades podem ser modificadas por técnicas de engenharia genética, controlando tanto eficácia quanto segurança do uso da molécula (NELSON, 2010).

A terapia baseada no uso de anticorpos depende da habilidade desta molécula alcançar seu alvo em quantidades adequadas. Devido aos coeficientes de permeabilidade vascular, transporte e pressão intersticial do tumor (comparado aos outros tecidos), anticorpos inteiros, com peso molecular de aproximadamente 150kDa, penetram tumores sólidos muito lentamente, de maneira heterogênea, apresentando altos níveis no soro e certos níveis de toxicidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; HOLLIGER; HUDSON, 2005; JAIN, 1990; JAIN; BAXTER, 1988). A fragmentação dos anticorpos em moléculas menores permite eles acessem tecidos que anticorpos inteiros não conseguiriam e ainda preservam a capacidade de ligação ao antígeno (BECK et al., 2010; JAIN, 1990). Vale notar que, a porção Fc é extremamente importante no que tange o elevado tempo de meia-vida do anticorpo no soro. Entretanto, em diversas aplicações, esta porção não é necessária e até mesmo indesejada, devido a possibilidade de liberação de citocinas e geração de efeitos tóxicos indesejados (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

A facilidade de manipulação pela engenharia genética extrapolou a produção dos anticorpos sob as mais diversas formas. Os chamados fragmentos de anticorpos são compostos pelos domínios VH e/ou VL que retém a capacidade de ligação ao antígeno que a IgG parental possuía. Como vantagem, apresentam uma melhor farmacocinética na penetração nos tecidos e podem ser utilizados desde simples ferramentas de pesquisa, até o diagnóstico e tratamento de doenças (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005; NELSON, 2010). Com a diminuição dos anticorpos em unidades menores, foi possível construir vastas bibliotecas de fragmentos de anticorpos para seleções *in vitro* frente a um antígeno de interesse, o que atrai o interesse de muitos grupos de pesquisa e da indústria biotecnológica, em comparação com a tecnologia do hibridoma (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Na utilização da tecnologia de *Phage Display* para a seleção de anticorpos específicos para um antígeno, propriedades como expressão, solubilidade e estabilidade são selecionadas concomitantemente à afinidade pelo antígeno alvo. Domínios leve κ (Vk) e domínios VH selecionadas por *Phage Display* apresentam boa estabilidade termodinâmica e solubilidade (JESPERS et al., 2004). Os fragmentos de anticorpos

podem ser trabalhados sob diversas formas, sendo Fabs e scFvs os mais conhecidos. Os Fabs são basicamente a representação da região variável de uma imunoglobulina, compostos por um domínio VL, um domínio VH, um CL e um CH1. Já os scFvs são fragmentos de anticorpos caracterizados por possuírem apenas um domínio pesado e um domínio leve unidos por um peptídeo flexível, a fim de mimetizar a região variável, de um anticorpo inteiro, de reconhecimento ao antígeno. Além disso, muitos grupos de pesquisa atualmente trabalham com moléculas chamadas VhH e V-NAR, produzidas, respetivamente, por camelídeos e tubarões e caracterizadas por serem compostas por cadeias semelhantes a IgGs humanas de domínios *V-like* associados a uma porção constante (Figura 07) (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005; MARANHÃO et al., 2015).

Figura 7 - Representação esquemática de diferentes possíveis formas de produção de anticorpos.

A primeira ilustração esquematiza uma imunoglobulina do tipo IgG humana, com porção constante Fc e porção variável Fab. A segunda ilustração representa uma unidade Fab composta pelos domínios variáveis VH e VL e constantes CH1 e CL. A terceira figura ilustra uma unidade de cadeia simples scFv composta apenas pelos domínios variáveis VH e VL. As figuras 4 e 5 ilustram imunoglobulinas não clássicas produzidas por tubarões e camelídeos; as regiões variáveis dessas Igs são produzidas na forma de pequenos fragmentos de anticorpos chamados V-NAR e VhH. Retirado e adaptado de Holliger; Hudson, 2005.

O custo e rendimento de produção de anticorpos inteiros e de fragmentos de anticorpos apresentam diferenças significativas. Pequenos anticorpos são passíveis de serem produzidos em plataformas mais baratas, mas rápidas e de maior

rendimento de produção, como *E. coli*, uma vez que não carecem de modificações pós traducionais. Entretanto, fragmentos de anticorpos, no geral, podem ter baixo tempo de meia vida no organismo devido à ausência do Fc e rápido *clearance*. A ligação covalente destas moléculas a polietilenoglicol (PEG), uma estratégia conhecida como PEGlação, e a conjugação a proteínas como albumina, são estratégias aprovadas pelo FDA capazes de melhorar a farmacodinâmica, farmacocinética e perfil imunológico da molécula, aumentando seu efeito terapêutico (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005; HOLT et al., 2008; MISHRA; NAYAK; DEY, 2016).

Assim como os monoclonais foram conjugados a diversos tipos de moléculas, os fragmentos de anticorpos tem o mesmo potencial para conjugação a enzimas, drogas, toxinas e outros, para utilização como ferramenta de pesquisa, diagnóstico e tratamento (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Mehrling (2015) esclarece a importância da utilização destas novas moléculas no tratamento do câncer, por exemplo, como uma revolução na quimioterapia. Ao longo do histórico da busca pela cura do câncer, o elevado uso de quimioterápicos citotóxicos foi responsável pelo surgimento de reações adversas na maior parte dos pacientes. Diante deste cenário, o autor defende que quimioterapia clássica está ao poucos sendo substituída por métodos inovadores que direcionam a droga diretamente ao seu alvo, eliminando as células cancerosas, mas mantendo as saudáveis intactas – sendo um destes métodos a utilização de anticorpos antígeno-tumor-específicos. Um exemplo é a conjugação do quimioterápico auristatina, de elevada citotoxicidade, ao anticorpo brentuximab vedotin (BV), que tem como alvo proteínas CD30. Este trabalho apresentou resultados promissores no tratamento de pacientes com linfoma de Hodgkin's, com 85% de redução do tumor em 97% dos pacientes (GARNOCK-JONES, 2013). Tais fragmentos de anticorpos tem um elevado potencial neste tipo de tratamento direcionado, podendo endereçar a droga a célula tumoral e ainda evitar a possibilidade de liberação de citocinas e efeitos tóxicos devido a presença da porção constante Fc.

Os estudos e análises sobre a eficácia clínica dos novos formatos de fragmentos de anticorpos, com diferentes propriedades farmacológicas, e sua possibilidade de produção em diferentes plataformas (de maior rendimento e mais baratas), alavancam o surgimento de novas bioterapias e diagnóstico direcionados, e com possível maior acessibilidade devido à redução do custo de produção.

1.5. *Phage Display* e bibliotecas de moléculas apresentadas em bacteriófagos

O reconhecimento molecular e a identificação de pares ligantes são a base biológica para o estudo e obtenção de novos fármacos utilizada por muitos grupos de pesquisa. A técnica de *Phage Display*, estabelecida na década de 80 por George Smith, tem feito grandes contribuições nesse campo, pois foi desenvolvida sustentando-se em aspectos que contribuem para caracterizações importantes no reconhecimento molecular. A etimologia das palavras resume o princípio desta técnica: *Phage*, do inglês, é um vírus bacteriófago que apresenta (do inglês, *Display*), algo em sua superfície. Desta maneira, existe uma relação direta entre fenótipo e genótipo, na qual a molécula expressa na superfície do capsídeo encontra-se diretamente associada a sua sequência codificadora carregada pelo vírus. Outro aspecto importante é a possibilidade de clonagem de vastas bibliotecas de DNA em vírus bacteriófagos, de forma que cada partícula recombinante represente um clone da biblioteca e possa ser recuperada da ligação ao seu alvo e amplificada biologicamente. Bibliotecas de peptídeos, anticorpos e diversas moléculas de interesse podem ser trabalhadas na técnica de *Phage Display* (BARBAS et al., 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004).

Bacteriófagos filamentosos constituem um grande grupo caracterizado pela presença de um DNA circular cadeia simples (ssDNA) e capacidade de infectar bactérias gram-negativas. A classe Ff (f1, fd e M13) infecta bactérias *E. coli* pelo *pillus* sexual e se replica de forma não lítica. Seu ssDNA encontra-se abrigado em um capsídeo em forma de cilindro constituído pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX (Figura 08) (BARBAS et al., 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004; MAGALHÃES et al., 2015).

Figura 8 - Representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago M13.

A figura ilustra uma representação geral do processo de infecção pela interação da pIII com o *pillus* sexual de uma *E. coli*. O DNA simples fita é convertido em dupla fita (dsDNA), pelo mecanismo de círculo rolante, para então codificar as proteínas estruturais do fago e a proteína pV, a qual impede a formação de dsDNA em algumas cópias de ssDNA. A formação do complexo PS (sinal de empacotamento) é um sinal para *assembling* da partícula viral no espaço periplasmático intermembranar e, então, sua extrusão (BARBAS et al., 2001; SIDHU, 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004).

A estrutura e forma de replicação dos bacteriófagos Ff, somados aos avanços das técnicas de clonagem na biologia molecular, permitiram com que estes microorganismos se tornassem uma ferramenta ideal de pesquisa. A construção de bibliotecas combinatórias de peptídeos, fragmentos de anticorpos ou quaisquer outras moléculas de interesse, se baseia na utilização de vetores do tipo fagomídeo. Estes vetores possuem todas as características básicas de um vetor de expressão padrão, tais como gene marcador de seleção, origem de replicação bacteriana, promotor e um sítio de clonagem. Entretanto, sua peculiaridade se dá pela presença de uma segunda origem de replicação, sendo esta viral, e um gene codificador da proteína pIII do capsídeo, em linha com o sítio de clonagem. No sítio de clonagem pode ser inserida a sequência do peptídeo ou do fragmento de anticorpo de interesse, num processo de construção de bibliotecas, o qual será, então, expresso em fusão com o gene pIII. A presença da origem de replicação viral garante que este DNA seja replicado e passado

às partículas virais filhas recombinantes, as quais expressarão em fusão à pIII de sua superfície o peptídeo de interesse – além de carregar o fagomídeo com o gene codificador deste peptídeo (BARBAS et al., 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002; CLARCKSON; LOWMAN, 2004; GOULART et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2015).

Figura 9 - Representação esquemática de um bacteriófago M13 recombinante.

A figura ilustra uma representação geral de um bacteriófago utilizado na técnica de *Phage Display*, carregando um fagomídeo com genes codificadores da pIII e do fragmento de anticorpo, além da expressão destas moléculas fusionadas em sua superfície externa. Retirado e adaptado de <<https://www.bio-rad-antibodies.com/hucal-antibody-technology.html>>

Porém, uma vez que o fagomídeo não possui todos os genes necessários para a montagem de uma nova partícula viral, quando esta metodologia é utilizada, torna-se necessária a adição de fagos auxiliares (fago *helper*) que contenham, então, estes genes requeridos. É importante destacar que fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação que dificultam o empacotamento do seu próprio material, favorecendo, então, a formação de novas partículas virais com o DNA do fagomídeo (BARBAS et al., 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

As proteínas expressas no capsídeo em fusão à pIII correspondem a um único clone de um peptídeo – ou quaisquer outros tipos de proteínas – proveniente de uma biblioteca de interesse. Portanto, uma vez que cada bacteriófago carrega um fagomídeo, contendo a sequência codificadora de um clone de uma vasta biblioteca e expressa esta sequência em seu capsídeo em fusão à pIII, uma biblioteca de *Phage Display* é um conjunto de bilhões de fagos, no qual cada partícula corresponde um clone. Com a biblioteca de fagos recombinantes em mãos, é possível desafiá-la múltiplas vezes frente a um antígeno imobilizado, num processo denominado *panning*,

e selecionar ligantes específicos com base em sua afinidade. Os clones que se ligam com maior afinidade ao antígeno alvo podem ser recuperados e amplificados biologicamente por infecção e seguir para consecutivas etapas de seleção (BARBAS et al., 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004).

Quando se trata da utilização de bibliotecas combinatórias de anticorpos para obtenção de anticorpos específicos para alvos terapêuticos, a tecnologia de *Phage Display* ultrapassa barreiras e limitações dos processos de imunização e utilização de animais que são realizados no processo de produção de anticorpos monoclonais pela técnica do hibridoma. Os fragmentos de anticorpos são totalmente humanos, dispensando etapas de humanização e construção de anticorpos quiméricos. A obtenção da sequência gênica, que codifica para as regiões variáveis das imunoglobulinas, após as etapas de seleção, expande as possibilidades de produção em larga escala em plataformas variadas. Os anticorpos podem ser produzidos sob diferentes formas, como scFv, Fab, *minibodies* ou mesmo anticorpos inteiros (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002; FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013; GOULART et al., 2015).

A prática de *Phage Display* se tornou uma tecnologia promissora e inovadora no campo da identificação de novas moléculas, com o diferencial de se poder modificar e manipular o gene codificador da molécula de interesse. Um trabalho de obtenção de pares ligantes, seleção de anticorpos, entre outros, realizado pela natureza ao longo de milhões de anos, pode ser, pelo *Phage Display*, conduzido *in vitro* em poucos dias (BARBAS et al., 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002). Além disso, o advento do sequenciamento de nova geração (NGS) trouxe grandes contribuições para a técnica de *Phage Display*, pois se tornou possível sequenciar estas bibliotecas e obter um número ilimitado de clones selecionados e combinações, os quais não eram possíveis de se analisar pelos antigos métodos de sequenciamento.

2. OBJETIVOS

Obtenção e caracterização de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-MUC1 e anti- α -DG hipoglicosilados, os quais podem apresentar potencial na elaboração de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para distrofias musculares e câncer.

3. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou por meio de um processo eficiente de seleção de fagos recombinantes que foi possível (I) selecionar, (II) caracterizar por sequenciamento de nova geração, (III) escolher, expressar de forma solúvel e purificar um novo fragmento de anticorpo humano recombinante anti MUC1. Além disso, o uso da sequenciamento de nova geração e de novas plataformas de análise para processos de seleção, como a ATTILA, contribuíram grandemente para melhorar a análise de clones selecionados e expandir as opções de anticorpos recombinantes para produzir. Por fim, as novas ferramentas biotecnológicas obtidas com o desenvolvimento deste trabalho, poderão cooperar para a elaboração de novas abordagens diagnósticas e/ou terapêuticas para tumores e distroglicanopatias.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALBERTS, B. et al. **Essential cell biology**. 4. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC., 2014.

ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1765, n. 2, p. 189–222, 2006.

BARBAS, C. F. et al. **Phage Display: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

BARRESI, R. et al. LARGE can functionally bypass α -dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. 696–703, 2004.

BARRESI, R.; CAMPBELL, K. P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 2, p. 199–207, 2006.

BEATTY, P. L.; FINN, O. J. Preventing cancer by targeting abnormally expressed self-antigens: MUC1 vaccines for prevention of epithelial adenocarcinomas. **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 1284, n. The Renaissance of Cancer Immunotherapy, p. 52–56, 2013.

BECK, A. et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 345–352, 2010.

BOUCHET-SÉRAPHIN, C.; VUILLAUMIER-BARROT, S.; SETA, N. Dystroglycanopathies: About Numerous Genes Involved in Glycosylation of One Single Glycoprotein. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 2, n. 1, p. 27–38, 2015.

BRANCACCIO, A. et al. Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle α -dystroglycan. **FEBS Letters**, v. 368, n. 1, p. 139–142, 1995.

BRANCACCIO, A. et al. The N-terminal region of alpha-dystroglycan is an autonomous globular domain. **European Journal of Biochemistry**, v. 246, p. 166–172, 1997.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 26, 2002.

BROWN, S. C. et al. Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle α -dystroglycan-laminin interaction. **Journal of cell science**, v. 112, p. 209–216, 1999.

BURCHELL, J. et al. Development and Characterization of Breast Cancer Reactive Monoclonal Antibodies Directed to the Core Protein of the Human Milk Mucin. **Cancer Research**, n. 17, p. 5476–5482, 1987.

CANCER RESEARCH UK. **Worldwide cancer statistics**. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Four>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

CHIBA, A. et al. Structures of Sialylated O-Linked Oligosaccharides of Bovine Peripheral Nerve α -Dystroglycan. **The journal of biological chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2156–2162, 1997.

CLACKSON, T.; LOWMAN, H. B. **Phage Display**. New York: Oxford University Press, 2004.

CRUSE, J. M.; LEWIS, R. T. **Atlas of Immunology**. 3rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

ENDO, T. Glycobiology of α -dystroglycan and muscular dystrophy. **Journal of Biochemistry**, v. 157, n. 1, p. 1–12, 2015.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Front Immunol**, v. 4, p. 217, 2013.

GARNOCK-JONES, K. P. Brentuximab vedotin: A review of its use in patients with hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma following previous treatment failure. **Drugs**, v. 73, n. 4, p. 371–381, 2013.

GOLD, D. V. et al. PAM4-reactive MUC1 is a biomarker for early pancreatic adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7380–7387, 2007.

GOULART, L. R. et al. Phage Display: fundamentos e aplicações. In: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Blucher, 2015.

GULEC, S. A. et al. Treatment of Advanced Pancreatic Carcinoma with 90 Y-Clivatuzumab Tetraxetan: A Phase I Single-Dose Escalation Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 244, p. 1–16, 2014.

HIRD, V. et al. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal

antibody. **Br J Cancer**, v. 68, n. 2, p. 403–406, 1993.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.

HOLLINGSWORTH, M. A.; SWANSON, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 45–60, 2004.

HOLT, L. J. et al. Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 21, n. 5, p. 283–288, 2008.

HOSSAIN, M. K.; WALL, K. A. Immunological Evaluation of Recent MUC1 Glycopeptide Cancer Vaccines. **Vaccines**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2016.

INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp>. Acesso em: 6 abr. 2017.

JAIN, R. K. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. **Cancer Research**, v. 50, n. 3 SUPPL., 1990.

JAIN, R. K.; BAXTER, L. T. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: Significance of elevated interstitial pressure. **Cancer Research**, v. 48, n. 18, p. 7022–7032, 1988.

JESPER, L. et al. Crystal structure of HEL4, a soluble, refoldable human VH single domain with a germ-line scaffold. **Journal of Molecular Biology**, v. 337, n. 4, p. 893–903, 2004.

JUNIOR, H. J. F.; BATOCCHIO, G.; LESSA, M. DO S. N. Dissecando e desmistificando o câncer. In: BIFULCO, V. A.; JUNIOR, H. J. F. (Eds.). **Câncer - Uma visão multiprofissional**. 2. ed. Barueri: Editora Manole LTDA, 2014.

KUFE, D. et al. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. **Hybridoma**, v. 3, n. 3, p. 223–32, 1984.

KUFE, D. W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 12, p. 874–85, 2009.

LINDEN, S. K. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 3, p. 183–197, 2008.

LLOYD, K. O. et al. Comparison of O-Linked Carbohydrate Chains in MUC-1 Mucin

from Normal Breast Epithelial Cell Lines and Breast Carcinoma Cell Lines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33325–33334, 1996.

MAGALHÃES, L. DA S. et al. Phage Display: Aspectos básicos e perspectivas atuais. In: RESENDE, R. R. (Ed.). . **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Blucher, 2015.

MARANHÃO, A. Q. et al. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES DE ANTICORPOS: MÉTODOS E APLICAÇÕES. In: RESENDE, R. R. (Ed.). . **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Blucher, 2015.

MARAVEYAS, A. et al. Pharmacokinetics and Toxicity of an Yttrium-90-CITC-DTPA-HMFG 1 Radioimmunoconjugate for Intraperitoneal Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer. **Cancer (Supplement)**, v. 73, n. 3, p. 1067–1075, 1994.

MARTIN, P. T. Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. **Glycobiology**, v. 13, n. 8, p. 55R–66R, 2003.

MEHLA, K.; SINGH, P. K. MUC1: A Novel Metabolic Master Regulator. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 42, n. 1, p. 115–125, 2014.

MEHRLING, T. Chemotherapy is getting “ smarter ”. **Future Oncology**, v. 11, p. 549–552, 2015.

MERRY, C. L. R.; ASTRUTSOVA, S. A. Glycans in evolution and development. Workshop on Glycoscience and Development. **EMBO reports**, v. 9, n. 7, p. 617–622, 2008.

MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 337–348, 2016.

MOORE, C. J.; HEWITT, J. E. Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. **Glycoconj J**, v. 26, n. 3, p. 349–357, 2009.

MUNTONI, F. et al. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. **Current Opinion in neurology**, 2004.

MUNTONI, F. et al. Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. **Acta Myologica**, p. 129–135, 2007.

MUNTONI, F.; BROCKINGTON, M.; BROWN, S. C. Glycosylation eases muscular dystrophy. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. 676–677, 2004.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 Ed. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2010.

NELSON, A. L. Antibody fragments: hope and hype. **Landes Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 77–83, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011.

OLIMPIERI, P. P.; MARCATILI, P.; TRAMONTANO, A. Tabhu: Tools for antibody humanization. **Bioinformatics**, v. 31, n. 3, p. 434–435, 2015.

PEGGRAM, M. D. et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. R73, 2009.

PEREIRA, F. V et al. FTY720 induces apoptosis in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, limits metastatic development in vivo, and modulates the immune system. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 68, n. 7, p. 1018–27, 2013.

RIVALLAND, G.; LOVELAND, B.; MITCHELL, P. Update on Mucin-1 immunotherapy in cancer: a clinical perspective. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 15, n. 12, p. 1773–1787, 2015.

SCIANDRA, F. et al. Genetic Engineering of Dystroglycan in Animal Models of Muscular Dystrophy. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 635792, 2015.

SHIMIZU, M.; YAMAUCHI, K. Isolation and Characterization of Mucin-Like Glycoprotein in Human Milk Fat Globule Membrane. **The Journal of Biochemistry**, v. 91, n. 2, p. 515–524, 1982.

SINGH, P. K.; HOLLINGSWORTH, M. A. Cell surface-associated mucins in signal transduction. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 467–476, 2006.

SMALHEISER, N. R. Cranin Interacts Specifically With the Sulfatide-Binding Domain of Laminin. **Journal of Neuroscience Research**, 1993.

SPARKS, S. E. et al. **Congenital Muscular Dystrophy Overview**. [s.l: s.n.].

SPICER, A. P. et al. Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential o-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 23, p. 15099–15109,

1991.

TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. et al. MUC1 and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1, n. 1, p. 98–103., 1999.

TOLEDO, A. G. et al. O -Mannose and O – N -acetyl galactosamine glycosylation of mammalian α -dystroglycan is conserved in a region-specific manner. **Glycobiology**, v. 22, n. 11, p. 1413–1423, 2012.