

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação de anticorpo anti-DLC1 e imunolocalização em tumor de
mama**

Simone Ramos Deconte

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho – 2007

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação de anticorpo anti-DLC1 e imunolocalização em tumor de
mama**

Simone Ramos Deconte

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Julho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação de anticorpo anti-DLC1 e imunolocalização em tumor de mama

Simone Ramos Deconte

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola - INGEB

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em ____/____/____.

Profa. Dra. Vera Lúcia Brites

Uberlândia - MG

Julho - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação de anticorpo anti-DLC1 e imunolocalização em tumor de mama

Simone Ramos Deconte

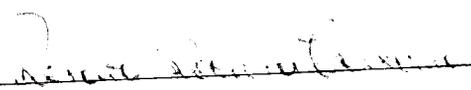
Aprovado pela banca examinadora em 10/07/07 Nota: 7,0



Prof. Dr. Foued Salmen Espindola



Ms. Luciana Karen Calábria



Ms. Renata Roland Teixeira

Uberlândia, 10 de Julho de 2007.

Dedicatória

À Deus, que com Sua sabedoria, me guiou por caminhos tão bons.

Aos meus pais, Rubens e Neuza, exemplos a serem seguidos. Obrigada pelo incentivo, amor, carinho, conversas e compreensão. Se não fosse por vocês, nunca teria chegado até aqui. Amo muito vocês.

À minha irmã Mônica, sempre com seu jeito próprio de resolver as coisas. Obrigada pelas palavras de força e amizade.

Ao meu namorado Márcio, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pelo apoio, amor, ajuda e por compreender todos os momentos em que estive ausente.

Aos meus padrinhos, Agnes e Raul, que foram fundamentais para o começo de minha caminhada. Obrigada por tudo, mesmo que longe, a presença e o amor de vocês estão marcados em meu coração.

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela convivência, incentivo, aprendizado científico e por acreditar em mim. Obrigada por tudo.

À Profa. Dra. Enilza M. Espreafico, da USP-Ribeirão Preto, que gentilmente nos cedeu seu laboratório para padronização de kits e forneceu uma amostra do kit NOVO LINK para realização da imunohistoquímica. Agradeço ainda à técnica Silmara por todo seu apoio e dedicação, e à Vani, que sempre nos ajudou com seu laboratório, materiais e amizade.

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pela disponibilidade do laboratório e ao “Vicentin” que sempre se mostrou disponível nos momentos de necessidade.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela disponibilidade do laboratório e pela oportunidade de estágio (onde tudo começou...). Obrigada por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Adriano Mota Loyola, pelo fornecimento dos blocos de tumor e contribuição nas discussões sobre as patologias dos casos.

À Minhas amigas e amigos de laboratório... Ana Clara, Anna Flávia, Bruna, Claudia, Elberth, Fabiana, Fernanda, Jean, Leandro, Leonardo, Let, Lorena, Lu, Lyvia, Neire, Renata, Renato, Rogério, Vilma e Tati. Obrigada pelas dicas, convivência e amizade. Amo muito vocês.

As minhas grandes amigas, Anna Flávia e Lorena, que me ajudaram sempre que precisei. Além de uma co-orientadora, ganhei duas grandes amigas, que sei que posso contar em todos os momentos. Obrigada por tudo que vocês fizeram por mim.

À minha amiga Andréa, que tornou mais fácil meu começo neste laboratório, sempre me auxiliando e tirando dúvidas. Obrigada Dea.

Aos meus novos amigos, Deborah e Marcus Vinícius, que gentilmente cortaram os blocos de tumores a fim de que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica por tornar possível a realização deste trabalho.

RESUMO:

Cadeia leve de dineína 1 (DLC1) é uma proteína regulatória multifuncional, não associada somente com os motores de miosina V e de dineína, mas relacionada com a apoptose celular, sendo sua superexpressão e fosforilação demonstrada como causadora do crescimento de células tumorais mamárias. O objetivo deste trabalho foi obter anti-DLC1 a partir de coelhos imunizados e aplicar este anticorpo em imunohistoquímica, para um possível controle do desenvolvimento e/ou regressão de tumores de mama. Foi realizado um ciclo de imunização com DLC1-GST em 2 coelhos, em seguida os soros imunes passaram por uma cromatografia em coluna de afinidade para a purificação do anticorpo que foi então utilizado na imunolocalização desta proteína em tumores de ducto de glândula mamária. Foi detectada por western-blotting, a presença de anti-DLC1 no soro dos coelhos e a purificação deste anticorpo também ficou comprovada pelo mesmo método. A imunohistoquímica dos tumores de mama evidenciou a imunolocalização da DLC 1 nas células tumorais localizadas próximas aos ductos da glândula, o que sugere este método como controle qualitativo destas células neste tipo de tumor.

PALAVRAS CHAVE: DLC1, tumor, mama, imunohistoquímica, anticorpo.

ABSTRACT:

Dynein light chain1 (DLC1) is a multifunctional regulatory protein, not only associated with myosin V and dynein motors, but also related with cellular apoptotic. Overexpression and phosphorylation of DLC1 have been shown to promote the growth of breast cancer cells. The aim of this data was to obtain anti-DLC1 from 2 immunized rabbits and to apply this antibody on immunohistochemistry for a possible control of development and/or regression of breast tumors. Two rabbits were immunized with DLC1-GST pure and after, the serum of the animals were passed on a chromatography colun of afinity to purify the antibody anti-DLC1, which was used in the imunolocalization of this protein in duct gland breast tumors. It was detected by western-blotting the presence of anti-DLC1 in the serum of 2 rabbits and the purification of this antibody was proved for the same method. The immunohistochemistry of breast tumors showed a higher localization of DLC1 in tumoral cells placed in the proximities of the gland ducts, which suggest this method as a control of qualification of this kind of cell in this kind of tumor.

KEY WORDS: DLC 1, tumors, breast, immunohistochemistry, antibody.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
DLC	Cadeia Leve de Dineína
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
kDa	Quilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Salina fosfato tamponada
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLM	Proteína Ligante de Maltose
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBS-T	Tampão salina-tris com tween
TRIS	Tris (hidroxi-metil) amino metano

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	10
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1 Imunização de coelhos com DLC-GST.....	11
3.2 Purificação do anticorpo anti-DLC1 por cromatografia de afinidade.....	14
3.3 Imunolocalização de DLC1 em tumor de mama.....	14
3.3.1 Parafinização dos tecidos e montagem das lâminas.....	14
3.3.2 Imunohistoquímica.....	15
4. Resultados e Discussão.....	17
4.1 Produção do anticorpo anti-DLC1.....	21
4.2 Purificação do anticorpo anti-DLC1.....	22
4.3 Imunodeteccção de DLC1 em tumores de ductos de glândula mamária.....	22
5. Conclusão.....	26
6. Referências Bibliográficas.....	27

1) INTRODUÇÃO

A migração de neurônios, células da glia e a formação de cones de crescimento no sistema nervoso dos animais são devido a eficientes mecanismos de motilidade celular. Tais mecanismos são mediados por recém caracterizadas mecanoenzimas associadas ao citoesqueleto formado por microtúbulos e actina. Estas moléculas motoras geram, através da energia liberada pela hidrólise de ATP, força mecânica e mobilidade através do citoesqueleto (HARRINGTON & RODGERS, 1984).

O termo motor molecular é usado para definir as mecanoenzimas que convertem energia química em energia mecânica. Os principais motores moleculares são as cinesinas, dineínas e miosinas, estas, que trabalham ao longo de filamentos de actina e, por isso, obtêm a energia química através da hidrólise do ATP; essa energia é convertida em energia mecânica necessária para os movimentos ao longo dos trilhos do citoesqueleto. A utilização dessa conversão de energia dentro da célula é um fenômeno de extrema importância, pois possibilita a realização de importantes processos, como: deslocamento de cromossomos, movimento celular, motilidade de vesículas e organelas, motilidade flagelar, citocinese, expansão neurítica, formação de cone de crescimento, tráfico de membranas e sinais de transmissão (CHENEY & MOOSEKER, 1992; LANGFORD, 1995; HASSON & MOOSEKER, 1996; HIROKAWA, 1998; MERMALL *et al.*, 1998; GOODE *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2000; GONÇALVES, 2000).

Existem em nosso organismo diferentes tipos de células que formam diferentes tecidos. Mas todas elas se encontram em constante movimento interno (exocitose, endocitose, transporte de organelas, e outros). Nos diversos tipos de células, os microtúbulos e a malha de filamentos de actina agem simultaneamente durante uma ampla variedade de processos, incluindo o transporte de vesículas e organelas. Historicamente, filamentos de actina e microtúbulos têm sido considerados constituintes à parte do citoesqueleto com funções distintas, contudo grande número de observações mostrou que os dois sistemas de filamentos agem juntos e simultaneamente durante uma variedade de processos celulares. Estudos farmacológicos mostraram que o rompimento de um dos sistemas tem profundos efeitos na organização do outro sistema de filamentos. Estudos em microscopia eletrônica mostraram pontes de ligação entre filamentos de actina e microtúbulos *in vitro*. Estas observações indicam que microtúbulos e citoesqueleto de

actina estão ligados tanto fisicamente quanto funcionalmente (GOODE *et al.*, 2000; GONÇALVES, 2000).

Os elementos do citoesqueleto desempenham papel mecânico de suporte; estabelece, modifica e mantém a forma das células; além de ser responsável por movimentos celulares como contração, formação de pseudópodes e deslocamentos intracelulares de organelas, cromossomos, vesículas e grânulos diversos (VALLEE & FALCHUK, 1993; MERMALL *et al.*, 1998; CALÁBRIA, 2004).

O citoesqueleto compõe-se de três classes principais de fibras: microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Associadas a esses filamentos, encontramos um conjunto de proteínas acessórias chamadas de proteínas motoras capazes de hidrolisar ATP (adenosina trifosfato) e acoplar a energia química dessa hidrólise à produção de força e movimento, necessários a vários elementos celulares (EVANS *et al.*, 1997; CALÁBRIA, 2004).

Existem três principais proteínas motoras pertencentes à família das ATPases (adenosinas trifosfatases) que participam do transporte intracelular de organelas, interagindo com microfilamentos de actina e microtúbulos. As cinesinas, dineínas e miosinas, que se diferem funcionalmente pela direção do movimento que realizam ao longo dos microtúbulos do axônio e quanto à associação ao tipo de fibra do citoesqueleto, sendo que a kinesina participa de transportes do corpo celular para o axônio; a dineína, do axônio para o corpo celular; e a miosina nos filamentos de actina (CHENEY *et al.*, 1993; CALÁBRIA, 2004).

As descobertas dos micromotores, cinesina e dineína citosólica, associadas à microtúbulos do cérebro ajudam a esclarecer o transporte axonal de vesículas e organelas. Os mecanismos de interação cinesina e dineína com microtúbulos e de miosina com actina estão sendo em grande parte elucidados por sistemas de motilidade *in vitro* que podem ser ensaiados por observação direta ao microscópio óptico, por estudos de proteólise limitada, por técnicas de biologia molecular e por reconhecimento por anticorpos monoclonais (ESPINDOLA, 1991).

A análise filogenética da superfamília das dineínas revelou três subfamílias agrupadas de acordo com suas características moleculares relacionadas (GIBBONS, 1995).

As dineínas caracterizam-se como complexos motores moleculares, multiprotéicos (GIBBONS, 1995) associados a microtúbulos, constituídos por duas cadeias pesadas, duas cadeias intermediárias e uma família de cadeias leves (Figura 1) (GILL *et al.*, 1994) e que regula

o remodelamento citoplasmático, movimento de cromossomos, junção e posicionamento de fusos mitóticos e migração nuclear (VAISBERG *et al.*, 1993; HOLZBAUR & VALLE, 1994).

As subfamílias das dineínas são: o braço externo e braço interno do axonema, que cooperam na produção de oscilações dos cílios e batimentos dos flagelos; e a subfamília da dineína citoplasmática que está presente em todas as células, envolvida em uma variedade de processos de motilidade intracelular, incluindo o transporte axonal retrógrado, a mitose e a meiose, a manutenção do complexo de Golgi e o tráfego centrípeto de vesículas membranosas (endossomos e lisossomos) e outras partículas intracelulares (HOLZBAUR & VALLE, 1994).

Esta proteína foi primeiramente identificada como um componente integral da dineína axonemal, braço externo, da alga *Clamydomonas* onde está associada com a cadeia intermediária na base da partícula solúvel, tendo sido denominada de cadeia leve de dineína, de acordo com sua massa molecular relativa de 8.000 daltons, em gel SDS-PAGE (PIPERNO & LUCK, 1979, PFISTER *et al.*, 1982). Análise eletroforética demonstrou que a fração de cadeias leves de dineína axonemal de *Clamydomonas* consiste de peptídeos de Mr 8.000; 11.000; 14.000; 16.000 e 19.000 daltons.

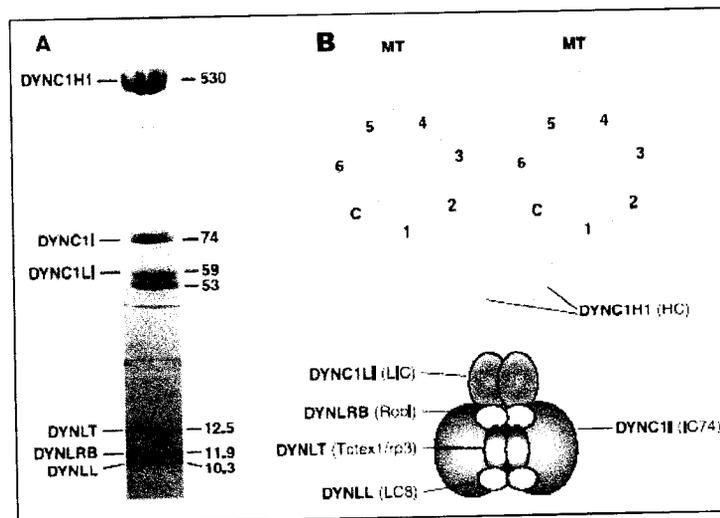


Figura 1: Complexo citoplasmático da dineína de mamífero: **A:** polipeptídeos do complexo purificados de cérebro de ratos por imunoafinidade. A massa molecular relativa é indicada em kDa ao lado direito do gel e os nomes das famílias indicados do lado esquerdo. **B:** Modelo estrutural para a associação das subunidades do complexo. O centro do complexo é composto por 2 cadeias pesadas (DYNC1H1 – HC); 2 cadeias intermediárias (DYNC1I / IC74 e DYNC1LI) se ligam à região N-terminal das cadeias pesadas e dímeros de 3 famílias de cadeias leves: DYNLT (Tctex 1), DYNLRB e DYNLL (LC8) se ligam aos dímeros das cadeias intermediárias (*Fonte:* PFISTER *et al.*, 2006).

A clonagem molecular revelou que as cadeias leves de 8.000 e 11.000 são relacionadas entre si (43% de identidade na seqüência de aminoácidos) e fazem parte de uma família de proteínas altamente conservada entre mamíferos, nematódeos e plantas (KING & PATEL-KING, 1995). A cadeia leve de 8 kDa (Mr 8.000 e massa molecular predita= 10.3 kDa) é altamente conservada, compartilhando identidade de seqüência de aminoácidos, entre as diferentes espécies de *Clamydomonas*, sendo maior que 90% (KING *et al.*, 1996).

Atualmente, pesquisa em banco de genes mostra que esta cadeia leve constitui uma grande família de proteínas ubiqüamente expressa em diversos membros em muitas espécies. Pesquisa no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o *BLAST* contra o Genoma Humano, revelou a existência de pelo menos 12 regiões cromossômicas, cobrindo cada qual a identidade em seqüência de nucleotídeos maior que 80% (PATUSSI, 2002). Dois membros dessa família de proteínas vêm sendo estudados em mamíferos, os quais foram denominados de DLC1 e DLC2, conforme a ordem em que foram seqüenciados e caracterizados (PATUSSI, 2002).

A DLC foi identificada em outros diversos organismos como: *S. Cerevisae*, *Drosophila* (DICK *et al.*, 1996a); *Schistosoma mansoni* (HOFFMANN & STRAND, 1996) e humanos, nos quais é compartilhada por inúmeros complexos protéicos e enzimáticos, e possui diversas funções biológicas (FAN *et al.*, 2002).

A DLC, como uma cadeia do complexo da dineína, está relacionada com diversas funções, incluindo controle do ciclo celular e manutenção da polaridade (FAN *et al.*, 2002), além de funcionar como um regulador da apoptose por sequestro da proteína pró apoptótica Bim dos microtúbulos (PUTHALAKATH *et al.*, 1999).

Além disso, estudos mostram que a perda parcial ou total da DLC na espécie *Aspergillus nidulans* inibe a migração nuclear (BECKWITH *et al.*, 1998) e acarreta defeitos morfogênicos, incluindo deficiência no desenvolvimento de asas e pêlos, e morte celular durante a embriogênese em espécies de *Drosophila* (DICK *et al.*, 1996a).

No *Aspergillus nidulans*, o homólogo da DLC é codificado pelo locus *NudG*. Mutações temperatura-sensíveis levam a múltiplos defeitos mediados pela dineína, incluindo a inibição da migração nuclear devido a uma falha na localização da dineína citoplasmática na ponta do micélio, redução na eficiência da esporulação e crescimento lento (BECKWITH *et al.* 1998).

Em organismos unicelulares, mutações que levam à ausência da DLC não afetam a viabilidade, e em *Saccharomyces cerevisiae* nenhum fenótipo tem sido observado (DICK *et al.* 1996b).

Em *Drosophila*, a DLC, a qual é referida na literatura como DLC1 de *Drosophila*, sendo na realidade mais relacionada com a DLC 2 humanas (86/89 aminoácidos idênticos) do que a DLC1 humana (83/89 aminoácidos idênticos), tem sido encontrada interagindo com a proteína *swallow*, que apresenta colocalização com o RNA bicóide durante a oogênese e pode atuar como um adaptador para capacitar a dineína no transporte do RNA ao longo dos microtúbulos (SCHNORRER *et al.*, 2000).

King e Patel-King (1995) caracterizaram inicialmente a DLC associada a dineína flagelar em *Clamydomonas*, porém uma seqüência homóloga foi encontrada em dineína citoplasmática de cérebro de mamífero (KING *et al.*, 1996), onde participa de funções como transporte axonal retrógrado, movimento de endossomos e lisossomos, migração nuclear, organização subcelular do aparato de Golgi (XIANG *et al.*, 1994), além de se relacionar ao processo de anáfase (SAUNDERS *et al.*, 1995). Acredita-se que a DLC possa também estar associada a outros componentes citosólicos que não cosedimentam com microtúbulos (KING *et al.*, 1996). Além disso, estudos estruturais mostram que esta cadeia leve se liga a vários peptídeos alvos de diferentes proteínas (FAN & AMOS, 2001).

A cadeia Leve de Dineína 1 (DLC1) é um dos tipos de DLC encontradas no citoplasma e desempenha a função de chaperona em combinação com a cadeia intermediária IC74 do complexo motor de dineína (MAKOKHA *et al.*, 2002). A figura 2 ilustra, segundo Vadlamudi e colaboradores (2004) alguns fatores de interação com a DLC1, relacionados à apoptose celular.

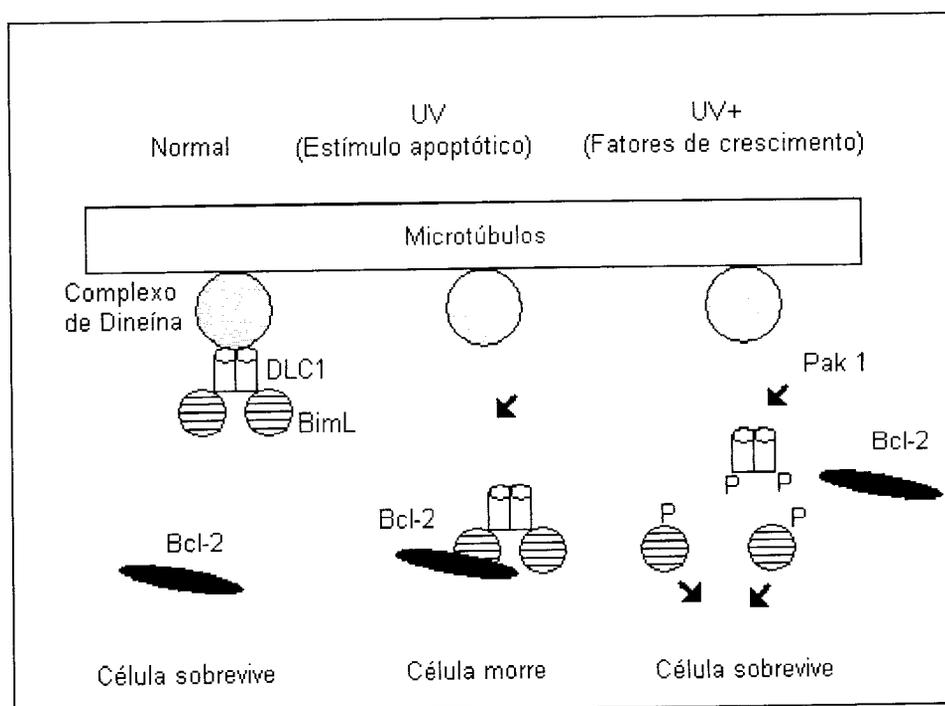


Figura 2: Modelo de regulação de DLC1 por Pak1 e funções da BimL. Sob condições fisiológicas, DLC1 seqüestra BimL para os microtúbulos. Sob condições de apoptose, os dímeros de DLC1-BimL são liberados e interagem com Bcl-2. Fatores de sobrevivência ativam Pak1, o qual fosforila os dímeros DLC1-BimL e , depois, previne a interação entre BimL e Bcl-2 (Fonte: VADLAMUDI, *et al.*, 2004).

A morte celular pode se dar de duas formas: a necrose e a apoptose (WYLLIE *et al.*, 1980). A necrose é a morte celular induzida por trauma e, portanto há uma resposta inflamatória. As características das células em necrose são: intumescimento celular e da mitocôndria, aumento da permeabilidade da membrana plasmática e ruptura da mesma, desintegração das organelas e dos componentes nucleares. A necrose é associada a danos graves como a hipóxia aguda e deficiência abrupta de nutrientes (KROEMER *et al.*, 1998).

A apoptose ou morte celular programada pode ser ativada por diversos estímulos, tais como agentes fisiológicos na embriogênese e no sistema imune. Em condições fisiológicas, apoptose é um processo controlado, envolvida na homeostase do tecido. Mas quando ocorre após algum dano celular, pode representar um mecanismo de destruição seletiva das células danificadas, cuja sobrevivência poderia prejudicar o organismo como um todo (WYLLIE *et al.*, 1980). É provável que todas as células do corpo humano possuam a capacidade intrínseca de sofrer apoptose. Isto sugere que todas as estruturas e processos requeridos em pelo menos uma via de apoptose estão

presentes na célula e provavelmente sejam necessários à sua sobrevivência (KROEMER *et al.*, 1998).

A célula, ao sofrer apoptose, apresenta alterações morfológicas e bioquímicas distintas daquela em necrose. A célula em apoptose é caracterizada pelo encolhimento celular, condensação e fragmentação da cromatina. A célula apoptótica se fragmenta formando os corpos apoptóticos. O vazamento do citocromo c da mitocôndria para o citosol é uma das primeiras características bioquímicas que precede as alterações no núcleo da célula em apoptose. Estas propriedades diferem significativamente das características de necrose ou morte celular acidental (BORTNER *et al.*, 1995).

Existem evidências de que a apoptose é uma resposta à omissão, isto é, de que a sinalização ativa contínua por fatores tróficos teciduais específicos, citocinas, hormônios, fatores de contato entre células (moléculas de adesão e integrinas) que pode ser necessária para a sobrevivência e a viabilidade da célula, sendo o mecanismo de autodestruição automaticamente deflagrado, a não ser que haja inibição ativa e contínua por esses fatores anti-apoptóticos. Esses aspectos são relevantes para propensão dos tumores a invadir e sofrer metástases (THOMPSON, 1998).

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação ou propagação descontrolada de células no corpo e de formas anormais das próprias células corporais. Trata-se de uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (LODISH *et al.*, 2000). Os termos “câncer”, “neoplasia maligna” e “tumor maligno” são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos pelas suas propriedades de diferenciação, poder de invasão e capacidade de metastasiar-se, isto é, disseminar-se para outras regiões do corpo (LODISH *et al.*, 2000).

As células cancerosas apresentam, em graus variáveis, quatro características que distinguem das células normais: proliferação descontrolada, desdiferenciação e perda da função; poder de invasão e metástases (LACERDA, 2003). Essas células frequentemente possuem alterações na via da morte celular programada (apoptose). Essas células demonstram relações alteradas entre os membros anti-apoptóticos da família da Bcl2 e os membros pró-apoptóticos, pertencente às famílias Bax (*Bax, Bak, Bok*) e “BH3-only” (*Bim, Bad, Bmf, Bid, Puma, Noxa, Bik, MAPI*, entre outras), que desviam o equilíbrio em prol da sobrevivência e, desse modo, agem conferindo resistência às terapias. Ambos os tipos de proteínas pró-apoptóticas são requeridas para iniciar a apoptose (LETAI *et al.*, 2002; MOORE *et al.* 2007).

Em tumores de mama, a fosforilação da DLC1 pela Pak1 (Kinase 1 ativada pelo p21, que remodela o citoesqueleto, menos relacionada aos fatores de crescimento e sinalização de estrógeno) mostrou promover a sobrevivência e o crescimento positivo de receptores de estrógeno nas células (VADLAMUDI *et al.*, 2004).

Nessas células, os efeitos biológicos do estrógeno são resultantes da sua ligação estrutural e funcional com receptores de estrógeno (ERs) (ER α e ER β). O ER α é o principal ER do epitélio mamário humano e regula a expressão gênica. Para exercer as funções de transativação, o ER transloca-se para o núcleo e liga-se a uma seqüência palíndromica (HERYNK & FUGUA, 2004). Além da ligação com o estrógeno, a função do ER é modificada por coativadores e complexos de remodelagem cromatínicos (KUMAR *et al.*, 2004).

O mecanismo molecular de transporte do ER até o núcleo ainda permanece desconhecido. Foi proposto que a DLC1 influencia na fisiologia celular, dependente e independente da função motora, porque a maior parte da DLC1 não está ligada aos microtúbulos e interage com outros tipos de proteínas celulares (BENASHKI *et al.*, 1997). Apesar do amplo conhecimento da participação da DLC1 no transporte retrógrado e na migração nuclear (BECKWITH *et al.*, 1998; PAZOUR *et al.*, 1998), o seu papel na ação do ER permanece desconhecido.

Segundo o Ministério da Saúde, a análise da mortalidade estimou que em 2002, o câncer de mama foi a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres, seguido pelo câncer de pulmão, cólon e reto, do colo do útero e estômago.

O câncer de mama localmente avançado, em regiões economicamente desenvolvidas é de aproximadamente 5%, enquanto nos países em desenvolvimento correspondem 30% a 50% dos casos diagnosticados, incluindo o carcinoma inflamatório, que representa 1% a 3% de todos os cânceres de mama (HORTOBAGYI *et al.*, 1996; JARDINES *et al.*, 2000).

Tendo em vista que o câncer de mama é muito comum entre as mulheres e a sua relação com a superexpressão de DLC1 já fora publicada, a produção e a purificação de anticorpo contra DLC1 e a sua respectiva utilização em imunohistoquímica, seria uma possível maneira de acompanhar a eficácia de tratamentos, bem como as diferentes fases do desenvolvimento de tumores mamários através da análise dos diferentes níveis de expressão de DLC1.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo Geral

Obter anti-DLC1 a partir de coelhos imunizados e utilizar este anticorpo em imunohistoquímica, para um possível controle do desenvolvimento e/ou regressão de tumor de mama e da eficácia de tratamentos alternativos, tendo em vista que esta é uma proteína superexpressa nesse tipo de câncer.

2.2) Objetivo Específico

- Produzir anti-DLC1 em coelhos a partir de ciclos de imunização;
- Obter frações puras do anticorpo produzido em coelhos, através de cromatografia por afinidade;
- Testar o anticorpo na imunodeteção e localização da DLC1 em tumor de mama.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Imunização dos coelhos com DLC1-GST

Até a década de 70, o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado. Sua seqüência de nucleotídeos de enorme tamanho e monotonia química era geralmente analisada por meios indiretos como a seqüência de proteínas e análise genética. A partir da década de 70 novas tecnologias foram desenvolvidas permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado de clonagem gênica. Na verdade, muitas destas técnicas são provenientes da Microbiologia, Bioquímica, Imunologia e Genética Microbiana e permitiram que a análise do DNA ganhasse um novo enfoque. O DNA tornou-se então, a molécula mais fácil de ser analisada, sendo possível isolar regiões específicas, obtê-las em grande quantidade e determinar a sua seqüência numa velocidade de milhares de nucleotídeos por dia (BLAU *et al.*, 2006).

A Tecnologia do DNA recombinante, como se convencionou denominar este conjunto de técnicas tem uma ampla aplicação. Ela pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da seqüência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades. Sua aplicação comercial ou biotecnológica parece ter um potencial inesgotável. Como conseqüência do desenvolvimento desta tecnologia é atualmente possível realizar investigação de paternidade e o diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas através da análise de DNA (BLAU *et al.*, 2006).

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes: primeiro o fragmento do DNA de interesse chamado de *inserto* é ligado a uma outra molécula de DNA chamada de *vetor* para formar o que se chama de *DNA recombinante*. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de *transformação*. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de *transformante* ou *célula transformada*. Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão

celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante (BLAU *et al.*, 2006).

As proteínas de fusão são utilizadas em clonagem molecular por serem geralmente mais estáveis que a correspondente proteína de eucarioto produzida em bactérias e, portanto, podem ser obtidas em grande quantidade. Com isso, a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma abordagem essencial para a produção de anticorpos e purificação desses por afinidade, a fim de se realizar estudos funcionais/estruturais da proteína expressa (BUGG *et al.*, 1994).

De maneira ideal, para a construção do fragmento de DNA de interesse pode-se utilizar um vetor que apresente a glutathione-S-transferase de *Schistosoma japonicum* (26 kDa) como proteína de fusão, permitindo a purificação em coluna de agarose-glutathione (pGEX).

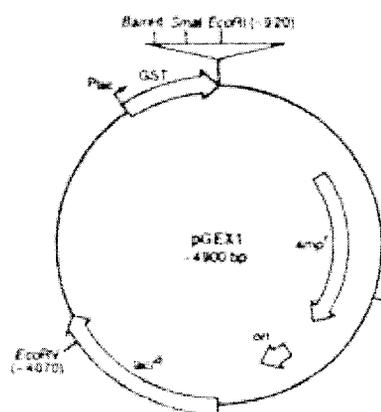


Figura 3: Estrutura do vetor Pges que expressa a proteína de interesse em fusão com a glutathione transferase (GST).
(Fonte: VILELA, *et al.*, 2006).

A proteína DLC1 em fusão com GST, produzida a partir de clones de bactérias pIH902 (GST), foi aplicada em dois coelhos, segundo o ciclo de imunização descrito a seguir.

A primeira imunização foi feita com dose completa de 250 ug de proteína de fusão (DLC1 – GST), diluída em 400 uL de adjuvante de Freund. O primeiro reforço foi feito 15 dias após a primeira dose, com uma injeção de 150 ug de proteína diluída em 250 uL de adjuvante, e o segundo reforço foi realizado 7 dias depois do primeiro reforço, também com uma dose incompleta de 150 ug de proteína diluída em 250 uL de adjuvante.

No segundo reforço foram coletadas amostras de aproximadamente 2 mL de sangue da orelha de cada animal, para a realização de western-blotting, visando a detecção da presença ou não do anticorpo anti-DLC1 no soro dos animais.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 2500 xg por 10 minutos a 4°C. Os soros foram separados e armazenados a -20°C em solução de 0.2 mM de azida sódica.

Os soros foram submetidos a SDS-PAGE 5 a 22%, de 10 uL de DLC-GST. A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100 mM Tris, 7.8 mM EDTA, 770 mM glicina, SDS 3% pH 8.3) e corrente constante de 45 mA.

As amostras separadas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm em corrente constante de 200 mA por 2 horas, utilizando-se tampão eletroblot (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina e metanol 40%). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0.5% (Ponceau 0.2% em ácido tricloroacético 3%) por quinze minutos para visualização da proteína e descorada com água destilada.

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS-T) overnight a 8°C. Em seguida, esta foi lavada em TBS-T, por 3 vezes de 5 minutos e incubada com o soro dos animais, diluído 20 vezes em TBS-T. Essa incubação foi feita por 4 horas à temperatura ambiente e sob agitação. A membrana foi lavada em TBS-T, por 3 vezes de 5 minutos e incubada com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase Amersham®, diluído 3.000 vezes em TBS-T, por 3 horas. A reatividade do anticorpo foi detectada pelo sistema DAB sob agitação e em câmara escura. A reação foi interrompida com água.

3.2) Purificação do anticorpo anti-DLC por cromatografia de afinidade

Após certificação da presença do anticorpo de interesse nos soros dos animais, os mesmos foram diluídos em 1 volume de TBS e centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram juntados e o volume único foi incubado com a resina Q-Sepharose-DLC-PLM pré-equilibrada com TBS [1x], *overnight*, em câmara fria sob agitação em *shaker* orbital.

Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com TBS [1x], sendo a primeira com volume igual ao da coluna; a segunda com volume de 10 vezes o da coluna com TBS acrescido de 0.5M de NaCl e a terceira com TBS no volume de 20 vezes o da coluna de TBS.

Seguindo as lavagens, foi feita a eluição com uma solução contendo 200 mM de glicina, 150 mM de NaCl, pH 2.5, 10 vezes o volume da coluna. As frações foram coletadas em tubos contendo 300 uL de 1M Tris pH 8.8, sendo completado o volume de 1.5 mL para cada tubo. Foi determinada a absorvância de todas as frações a 280 nm e as amostras que apresentaram maior leitura, tiveram sua concentração protéica calculada e foram testadas por western-blotting para a determinação daquele que continha o anticorpo de interesse.

Em seguida, o anti-DLC1 purificado e na concentração final de 0,9ug/uL foi aliquoteado em frações menores e congelado a -20°C.

3.3) Imunolocalização de DLC1 em tumor de mama

3.3.1) Parafinização dos tecidos e montagem das lâminas

Os tecidos tumorais retirados cirurgicamente de 4 pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, foram colocados em pequenos frascos individuais contendo solução de formol 10%. Os tecidos permaneceram nesta solução por 48 horas, em seguida, foram estocados em álcool etílico absoluto durante 2 ou 3 dias, passando por uma troca. Decorrido esse período, passaram-se pelo procedimento de inclusão em parafina: sendo colocados por 3 horas em xilol com uma troca, 4 horas em xilol acrescido de parafina (1:1). Todo esse processo ocorreu em estufa a 58° C. O próximo passo consistiu em colocar os tecidos em parafina pura, onde

permaneceram por 12 horas em estufa a 58°C. A parafina foi trocada e os tecidos permaneceram por 2 horas na segunda parafina, também mantida em estufa a 58° C. Este último banho em parafina serviu como meio para emblocar os tecidos. Após o período de 2 horas foi retirado o frasco da estufa e observou-se se o tecido estava centralizado no bloco.

Decorrido dois dias desse emblocamento, foram realizados cortes de 3 µm em micrótomo manual. No preparo das lâminas, estas foram tratadas previamente com solução de gelatina: 5 g de gelatina em folha, 0.5 g de bicromato de potássio e 1L de água destilada. As lâminas foram imersas nessa solução por alguns minutos, e em seguida secas em estufa a 30° C por pelo menos 24 horas antes do uso.

Após a realização dos cortes dos tecidos emblocados, as secções foram postas nas lâminas e secas em estufa a 30° C, durante 24 horas.

3.3.2) Imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinizados por 20 minutos em estufa a 80°C e seguindo o procedimento de dois banhos consecutivos de xilol de 15 minutos cada, seguiu-se a hidratação com um banho em álcool 50% e xilol 50% de 3 minutos, um banho em álcool etílico 100% de 3 minutos, álcool etílico 95% de 3 minutos, álcool etílico 90% de 3 minutos, álcool etílico 85% de 3 minutos, álcool etílico 70% de 3 minutos, álcool etílico 50% de 3 minutos, dois banhos consecutivos em água destilada de 30 segundos cada e um banho em água deionizada de 30 segundos.

Os tecidos foram submetidos à recuperação antigênica por 30 minutos em *panela à vapor*, sendo as lâminas mergulhadas em um coplin contendo tampão Citrato (4mM) pH 6,0 acrescido de 0,05% de Tween 20 pré-aquecido a 96°C.

Em seguida, as lâminas passaram por um resfriamento natural por 30 minutos, e foram lavadas em TBS [1x] por 15 minutos (3x de 5 minutos). Foi realizado um bloqueio com a solução NOVO LINK® Peroxidase Block por 20 minutos à temperatura ambiente, em câmara escura.

As lâminas foram lavadas em água destilada e, em seguida, com TBS [1x] por 15 minutos (3x de 5 minutos). Em seguida, fez-se um bloqueio de proteínas com a solução NOVO LINK® Protein Block por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e, em seguida, com TBS [1x] por 15 minutos (3x de 5 minutos).

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-DLC1 na concentração de 0.045ug/uL previamente purificado, à temperatura ambiente por 2 horas. As lâminas foram lavadas em água destilada e, em seguida, lavadas com TBS [1x] por 15 minutos (3x de 5 minutos). Em seguida, ocorreu uma incubação com NOVO LINK[®] Post Primary Block por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida com TBS [1x] por 15 minutos (3x de 5 minutos). Posteriormente, fez-se a incubação com solução NOVO LINK[®] Polymer por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida com TBS [1X] por 15 minutos (3x de 5 minutos).

Finalmente, realizou-se a revelação com o sistema DAB Chromogen associado à DAB Substrate - NOVO LINK[®] por aproximadamente 5 minutos. As lâminas foram mergulhadas em água para a parada da reação. Para contracorar o tecido, as lâminas foram submetidas a um banho com Hematoxilina Harris, por um período de 30 segundos. Logo em seguida, estas foram lavadas em água corrente por aproximadamente 5 minutos. As lâminas passaram pelo processo de desidratação, que consistiu em banhos de 3 minutos em álcool etílico 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%, seguidos de um banho de 5 minutos em uma solução álcool: xilol (1:1) e 3 banhos de 5 minutos em xilol. Após a desidratação as lâminas foram montadas com a utilização de Entellan para a colagem das lamínulas. Os cortes foram analisados em microscópio óptico.

O mesmo procedimento foi realizado em cortes de cerebelo para controle negativo.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenvolvido com o propósito de obter anti-DLC1 a partir de coelhos imunizados e, através da metodologia de imunohistoquímica, obter um possível controle do desenvolvimento de tumores de ducto de mama e da eficácia de tratamentos alternativos.

O perfil da resposta imune em pacientes com câncer pode fornecer informações valiosas de proteínas celulares que podem induzir a resposta imune. A regressão tumoral é um processo que parece ser o resultado da interação do sistema imune com células tumorais. Então, em alguns pacientes, o sistema imune parece ser ativado contra células tumorais. Respostas imunes contra algumas proteínas celulares têm sido descritas em pacientes com câncer (HANSEN *et al.*, 2001; FRESCHI, 2006).

Os anticorpos têm sido uma importante ferramenta laboratorial por suas diversas aplicações, no qual destacamos *Western blotting*, imunohistoquímica, imunocitoquímica, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), imunoprecipitação, dentre outros (HARLOW, 1988; PEIXOTO, 2006).

Os anticorpos são classificados de acordo com a quantidade de epítopos que conseguem reconhecer o antígeno, podendo ser classificados como policlonal e monoclonal. Os policlonais são conhecidos por se ligarem a vários epítopos de um mesmo antígeno, ao contrário dos monoclonais que, têm especificidade elevada e se ligam a um único epítipo (AUSUBEL *et al.*, 2001). Por esta razão existe uma escolha preferencial dos anticorpos policlonais para detecção de proteínas desnaturadas entre outros variantes. Porém, existem desvantagens. Os anticorpos policlonais, por reconhecerem vários epítopos do antígeno, podem originar reações cruzadas com outros antígenos não específicos e formar *background* indesejável. Para reduzir estes problemas purifica-se a IgG de interesse por imunoafinidade a partir do antígeno imobilizado (MARSHAK, 1996).

O epítipo é uma característica estrutural de uma molécula na qual a região variável da imunoglobulina se liga. As seqüências curtas de aminoácidos, as cadeias laterais de hidratos de carbono ou mesmo o local de fosforilação de um peptídeo podem servir como um epítipo (AUSUBEL, 2001). As proteínas contêm diferentes epítopos, e quando uma proteína é injetada em um animal, existe a produção de diferentes epítopos (AUSUBEL, 2001).

Dessa forma, os anticorpos representam uma intrigante classe de proteínas, por sua inerente capacidade de reconhecer um excesso de epítomos com alta afinidade e especificidade, e também pela sua estabilidade e possibilidade de se montarem (KRETZSCHMAR & VON RUDEN, 2002; PEIXOTO, 2006).

Trabalho de imunohistoquímica desenvolvido por Martins e colaboradores (2000) utilizando cerebelo humano incluído em parafina demonstrou que os tecidos que não são coletados recentemente e incluídos em parafina têm os sítios antigênicos recuperados quando submetidos ao *retrieval* (recuperação antigênica).

A recuperação antigênica é um procedimento de rotina em tecidos que foram submetidos à fixação em formalina, pois este tipo de fixador promove ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes em uma proteína, bloqueando o acesso de anticorpos aos epítomos alvo, mascarando o antígeno (MONTEIRO, 2003; CALÁBRIA, 2004).

Os receptores hormonais também apresentam características de fator preditivo à resposta terapêutica, exibindo associação com o curso clínico dos carcinomas da mama. A positividade para receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) é um excelente marcador de diferenciação dos carcinomas mamários. Outro importante fator preditivo é a expressão do gene *c-erbB-2*, cuja amplificação ocorre em um terço dos carcinomas mamários e está associado ao alto grau histológico, e à redução da sobrevida. (SLAMON *et al.*, 1987; GUSTERSON *et al.*, 1992; GASPARINI *et al.*, 1993; DUFFY, 2005)

O crescimento tumoral está relacionado a um balanço resultante do somatório entre proliferação e morte celular. A medida combinada de morte celular e proliferação é uma importante arma na predição mais realista do comportamento tumoral. O mecanismo geneticamente controlado de morte celular é chamado de apoptose, que é fundamental para a eliminação de células danificadas. Estudos recentes demonstram a relevância da morte celular programada na homeostase tecidual, na organogênese e na patogenia dos tumores (STORY & KODYM, 1998; HASHIMOTO, 1996; FOTEDAR *et al.*, 1996; VILLUNGER & STRASSER, 1998).

A apoptose depende de processos bioquimicamente regulados contingenciados por eventos de estimulação do meio ambiente tecidual. Do ponto de vista morfológico, podemos observar, a partir da clivagem do DNA pelas endonucleases, alterações como picnose, fragmentação nuclear

e proteólise do citoesqueleto. Os detalhes da regulação da apoptose por oncogenes e genes supressores ainda não são totalmente entendidos, embora saiba-se da participação do gene *p53* (KERR *et al.*, 1972; KERR *et al.*, 1994; ALBERTS *et al.*, 1997).

No câncer de mama, muito embora o número de células apoptóticas cresçam com o tamanho tumoral, a apoptose é pouco detectada em tumores com receptor de estrógeno positivo (NISHIMURA *et al.*, 1999). Além disso, o Índice Apoptótico (I.A.) está associado com a atividade mitótica, alto grau histológico, tumores pouco diferenciados e com superexpressão do gene *p53* (DE JONG *et al.*, 2000). Observa-se portanto, uma associação direta entre o número de células apoptóticas e comportamento biológico agressivo.

O estudo clínico do carcinoma mamário ainda é bastante imprevisível, refletindo processos relacionados à progressão de tumor, taxa de crescimento e heterogeneidade tumoral. Algumas mulheres morrem de doença metastática dentro de um ano, outras, várias décadas depois do diagnóstico. Em face da grande variabilidade de comportamento clínico, da incidência crescente, e da alta taxa de mortalidade dessa doença tornou-se necessário identificar fatores que, ao diagnóstico, possam prever o comportamento biológico destes tumores (SUNDERLAND & McGUIRE, 1990).

Morfologicamente, as células tumorais também variam segundo o grau histológico, apresentando graus de pleomorfismo, anisocariose, hiper cromasia nuclear, presença de nucléolos, figuras mitóticas e corpos apoptóticos. Observa-se ainda que, na maioria dos tumores avaliados, áreas de necrose, calcificação e infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variável. (FARIAS *et al.*, 2005).

Na última década, ficou evidente que a apoptose tem um papel determinante na carcinogênese, no crescimento tumoral e na agressividade do câncer de mama. A taxa de crescimento tumoral é resultado não apenas dos níveis de proliferação, mas também de morte celular (DE JONG *et al.*, 2000).

Tumores bem diferenciados invariavelmente estão associados à positividade para o *bcl-2*, e ao receptor de estrógeno, ao baixo índice apoptótico e à negatividade para o *p53* (DE JONG *et al.*, 2000; LIPPONEN *et al.*, 1994; VAKKALA *et al.*, 1999; GONZALEZ *et al.*, 2000). Paradoxalmente o *bcl-2*, segundo Sierra e colaboradores (1996), prolonga a sobrevivência celular, sem conferir vantagens proliferativas. Num contexto adverso, as células que expressam *bcl-2*,

portanto com potencial de resistência à apoptose poderiam ter a supressão da morte celular programada, adquirir mutações e culminar com a progressão tumoral.

A participação da DLC1 no transporte e expressão de receptores de estrógeno segundo Vadlamudi e colaboradores (2004), desvia esta proteína da sua função de se ligar ao *bcl-2* e promover a apoptose, portanto, em tumores de mama positivos para receptores de estrógeno, a alteração na função da DLC1 pode ser considerada um dos fatores anti-apoptóticos e promotores da proliferação desordenada de células, típica da formação de tumores.

Segundo Wu e colaboradores (2000), a redução da apoptose pode favorecer o crescimento tumoral e a permanência de células geneticamente aberrantes, favorecendo a progressão tumoral.

A indução do processo de apoptose é de grande importância no entendimento da carcinogênese mamária. Níveis crescentes de apoptose estão associados à progressão histológica do carcinoma ductal infiltrante da mama, sendo evidenciado altos índices de morte celular programada em tumores pouco diferenciados, portanto mais agressivos. Tal fato pode ser explicado como uma tentativa da resposta imune celular em induzir a apoptose em células tumorais com a finalidade de supressão tumoral. Estes aspectos implicam ainda em possíveis estratégias terapêuticas com finalidade de induzir apoptose nesses tumores.

Através do método de imunohistoquímica, evidenciamos a presença de DLC1 em todas as lâminas avaliadas. Uma nítida marcação foi observada nas células tumorais, evidenciando maior marcação ao redor dos ductos (Figura 7).

A identificação de fatores associados à resposta a quimioterapia poderiam auxiliar na seleção de pacientes com maior probabilidade de alcançarem resposta objetiva e na definição de melhores estratégias terapêuticas, evitando-se exposição desnecessária à toxicidade. A resposta completa foi identificada como fator prognóstico favorável em relação à evolução clínica das pacientes portadoras de neoplasia mamária localmente avançada (HORTOBAGYI *et al.*, 1995).

Assim, a identificação de marcadores para avaliar a resposta ao tratamento primário, permitirá a seleção de esquemas quimioterápicos mais efetivo (CLARCK, 2000; WOLF & DAVIDSON, 2000).

4.1) Produção do anticorpo anti-DLC1

Após a realização do western-blotting, foi possível concluir que os 2 coelhos produziram anticorpos anti-DLC1, conforme ilustra a figura 4. A figura 3 mostra o gel da eletroforese de DLC-GST utilizada para a realização do western-blotting.

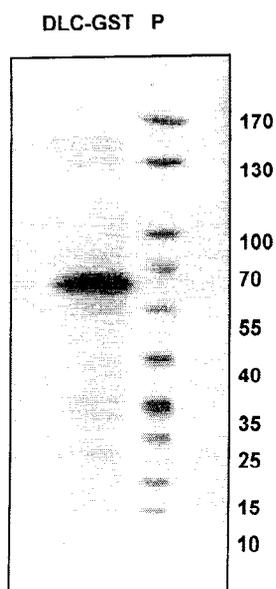


Figura 4: Gel de eletroforese da DLC – GST e padrão de massa molecular relativa em kDa (P).

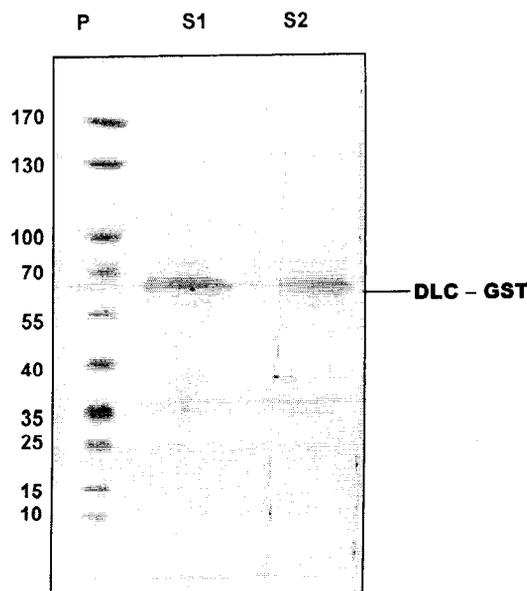


Figura 5: Imunoreconhecimento de DLC1-GST. P - padrão de massa molecular relativa em kDa; S1 e S2 - imunodeteção de DLC1-GST em membrana de nitrocelulose testando o soro dos coelhos 1 (S1) e 2 (S2).

A banda que aparece na figura 4 corresponde à DLC1 em fusão com a GST, submetida a SDS-PAGE e transferida para a membrana de nitrocelulose, interagindo com o anti-DLC1 presente no soro dos coelhos 1 e 2.

A identificação de peptídeos encontrados pelo teste de western-blotting foi efetuada por cálculo de peso molecular aparente. Dependendo das variáveis envolvidas no sistema, não se deve excluir a possibilidade de uma mesma proteína ser expressa por valores em kDa, muito próximos em diferentes trabalhos (GERSHONI, 1988).

O teste Western-blotting combina a resolução minuciosa da eletroforese em gel de poliacrilamida com a alta sensibilidade de detectar anticorpos (LORRALDE *et al.*, 1989).

Portanto pôde-se certificar que, se houve marcação é porque havia no soro dos coelhos o anticorpo de interesse. Ou seja, após o ciclo de imunização os coelhos apresentam anti-DLC1 em seu sistema imunológico. Na ocorrência de novos reforços, estes animais produzirão constantemente este anticorpo, que poderá ser constantemente purificado.

4.2) Purificação do anticorpo anti- DLC1

Realizada a cromatografia de afinidade, as alíquotas de soro que apresentaram maiores picos de absorvância foram unidas e novamente testadas pela técnica de western-blotting. Conforme ilustra a figura 6, houve marcação da banda de DLC em fusão com GST, comprovando que o conteúdo da amostra era realmente o anticorpo de interesse.

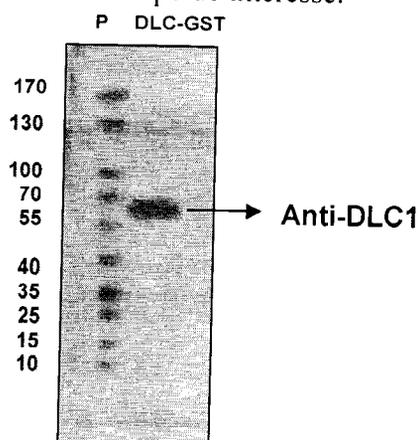


Figura 6: Interação entre DLC-GST e anti-DLC1 purificado. P-padron de massa molecular relativa em kDa; DLC-GST- pool das alíquotas da resina Q-Sepharose-DLC-PLM que apresentaram maiores leituras de absorvância.

4.3) Imunodeteção de DLC1 em tumores de ductos de glândula mamária

A aplicação e/ou utilização do anti-DLC1 produzido e purificado abrange várias técnicas, dentre elas western-blotting e imunohistoquímica para testes de detecção e imunolocalização em vários tipos de tecidos, em especial tumores de ductos de glândulas mamárias, que são tecidos, que segundo Herynk & Fugua (2004), expressam em grande quantidade a proteína DLC1.

Em relação à imunohistoquímica realizada no tumor de ducto de glândula mamária, obteve-se com marcação positiva em castanho, como já citado por Herynk & Fuqua (2004) e como ilustra a figura 7 mostrada por Sohn e colaboradores (2006).

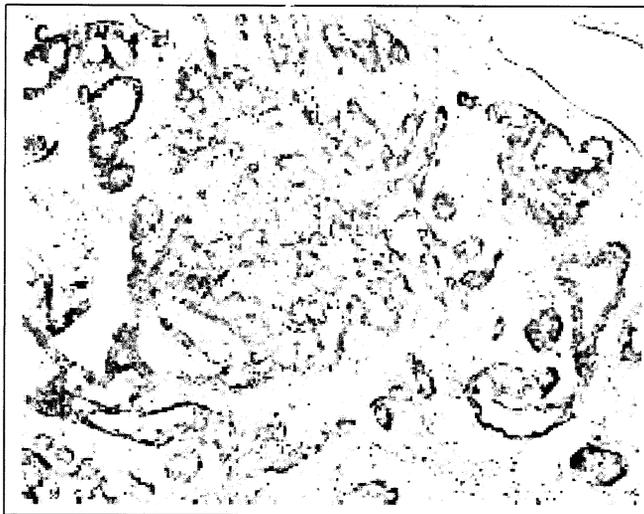


Figura 7: Imunohistoquímica de hiperplasia de mama, com marcação de survivina em torno dos ductos (Aumento de 40x) (Fonte: SOHN *et al.*, 2006).

A marcação observada, junto à bibliografia levantada, nos permite colocar o anticorpo anti-DLC1 como sendo um marcador tumoral, visto que as áreas de maior concentração do anticorpo correspondem às áreas de ducto de glândula mamária invadida por células tumorais (Figura 8).

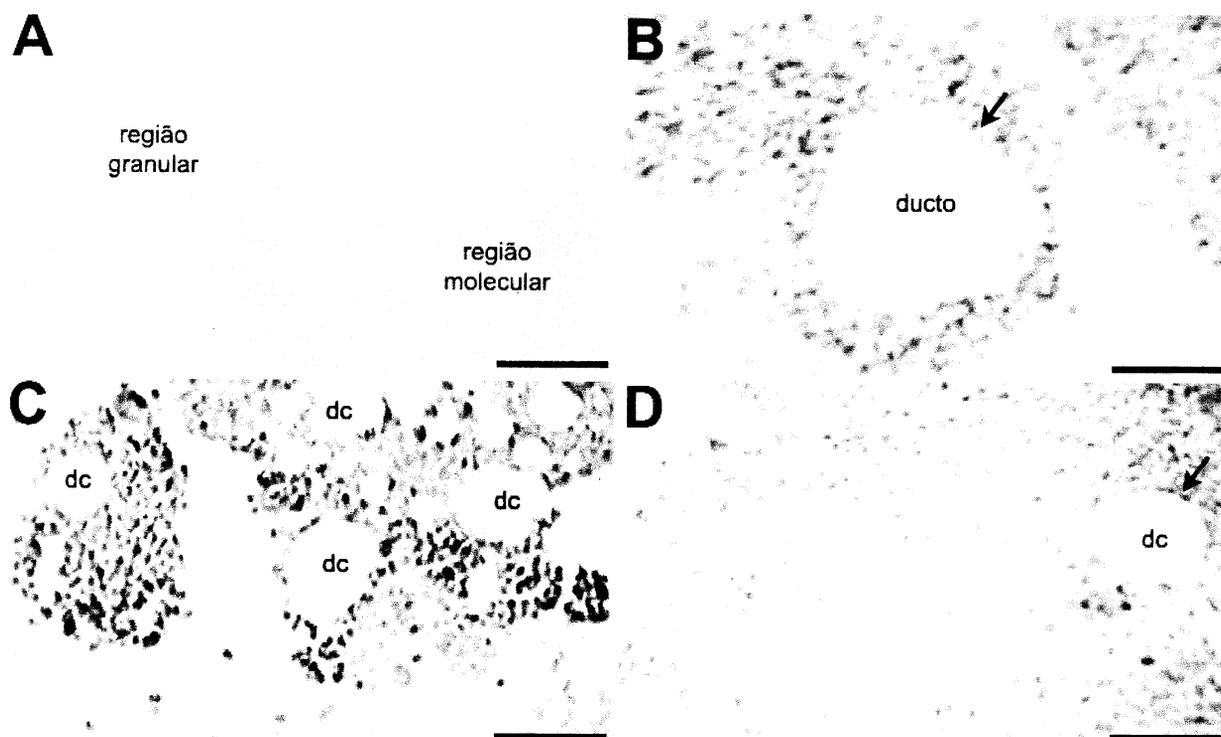


Figura 8) A: Imunohistoquímica de corte de cerebelo (região granular com maior marcação em azul e região molecular com menor marcação), com ausência de marcação para DLC - controle negativo das reações de imunohistoquímica. **B:** Imunohistoquímica de um ducto de glândula mamária, com superexpressão de DLC 1 nas células tumorais que o circundam (seta) (Barra= 9 μ m). **C:** Imunohistoquímica de ducto de glândula mamária. Observa-se um conjunto de ductos tumorais marcados com DLC1 (Barra= 22 μ m). **D:** Imunohistoquímica de ducto de glândula mamária. Figura C com aumento de 100x. Observa-se a intensa marcação de DLC1 nas células que circundam o ducto.

O carcinoma mamário ductal foi considerado o de maior prevalência em câncer de mama (SOHN, D, M. *et al.*). Segundo Vadlamudi, *et al.*, 2004, de cada 15 tecidos de mama testados por imunohistoquímica para imunolocalização de DLC 1, 14 apresentam superexpressão desta proteína na área tumoral. O mesmo autor cita que a desregulação pela DLC 1 dos fatores apoptóticos pode ser considerado um evento comum na progressão do câncer e estas moléculas podem estar envolvidas no desenvolvimento e/ou manutenção da malignidade fenotípica em tumores.

O presente trabalho condiz com as citações propostas por outros autores, evidenciando a utilização da imunolocalização de DLC1 em tumores de mama, como uma técnica para acompanhamento do grau de evolução desses tumores, uma vez que somente células tumorais apresentam expressão mais elevada e ainda, um possível controle para a eficácia de tratamentos alternativos.

5) CONCLUSÃO

Conclui-se que a produção de anticorpos a partir de coelhos como descrito por outros autores, comprovou ser uma técnica eficiente, visto que com apenas um ciclo de imunização foi possível produzir anti-DLCI.

A purificação do anticorpo realizada pela técnica de cromatografia de afinidade, como já sugerido na literatura, também foi eficaz, pois esta pode ser facilmente realizada a cada fim de ciclo de imunização.

Após produção e purificação, o anti-DLCI testado em tumor de glândula mamária comprovou ser um eficaz marcador de células tumorais. Sendo assim, este pode ser utilizado no diagnóstico de câncer de mama como controle de crescimento do tumor e na comprovação da eficiência ou não do tratamento.

Tendo em vista que o processo de purificação deste anticorpo é relativamente simples, conclui-se que a implantação deste método na rotina de trabalho é bastante viável e propicia uma produção e purificação em grande escala.

Assim, sugere-se que novos ensaios de imunohistoquímica sejam realizados a fim de padronizar esta técnica e assim, aplicá-la em outros anticorpos.

6)REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAYD, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON , J.D. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R.E., KINGSTON, D.D., MOORE, J.D., SEIDMAN, J.A., SMITH, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, New York, 2001.

BECKWITH, S.M., ROGHI, C.H., LIU, B., MORRIS, R. N. The '8-kD' cytoplasmic Dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Cell Biology**. v. 143, p. 1239-1247, 1998.

BENASHSKI, S.E., HARRISON, A., PATEL-KING, R.S., KING, S.M., Dimerization of highly conserve light chain shared by dynein and myosin V. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 20929-20935, 1997.

BLAU, L., MENEGON, R.F., CHUNG, M.C. Prodrug activation by enzyme, a promising strategy for chemotherapy. **Química Nova**. v. 29, p. 1307-1317, 2006.

BORTNER, C.D., OLDENBURG, N.B.E., CIDLOWSKI, J.A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology**. v. 5, p. 21-26, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

BUGG, C.E., CARSON, W., MONTGOMERY, J.A. Drugs by Design. **Scientific American** v. 269, p. 60-66, 1994.

CALÁBRIA, L.K. Análises Bioquímica e Morfológica do cérebro da abelha *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) com enfoque na Miosina-V. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2004.

CHENEY, R.E., MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 4, p. 27-35, 1992.

CHENEY, R.E., O'SHEA, M.K., HEUSER, J.E., COELHO, M.V., WOLENSKI, J.S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity, **Cell**. v. 75, p. 13-23, 1993.

CLARCK, G.M. Prognostic and predictive factors. **Diseases of the Breast**. v. 2, p. 489-514, 2000.

DE JONG, J.S., VAN DIEST, P.J., BAAK, J.P. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**. v. 82, p. 368-373, 2000.

DICK, T., RAY, K., SALZ, H.K., CHIA, W. Cytoplasmic dynein (*ddlc1*) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Biology**. v. 16, p. 1966-1977, 1996a.

DICK, T., SURANA, U., CHIA, W. Molecular and genetic characterization of SLC1, a putative *Saccharomyces Cerevisiae* homolog of the metazoan cytoplasmic dynein light chain 1. **Molecular & General Genetics**. v. 251, p. 38-43, 1996b.

DUFFY, J. Predictive markers in breast and other cancers: a review. **Clinical Chemistry**. v. 51, p. 492-503, 2005.

ESPINDOLA, F.S. Purificação Parcial e Caracterização de uma Proteína Ligante de Calmodulina Associada a Actomiosina de Cérebro. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 1991.

EVANS, L.L., HAMMER, J., BRIDGMAN, P.C. Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from *dilute-lethal* neurons. **Journal of Cell Science**. v. 110, p. 439-449, 1997.

FAN, J., AMOS, L.A. Antibodies to cytoplasmic dynein heavy chain map the surface and inhibit motility. **Journal of Molecular Biology**. v. 307, p.1317-1327, 2001.

FAN, J.S., ZHANG, Q., TOCHIO, H., ZHANG, M. Backbone dynamics of the 8 kDa dynein light chain dimer reveals molecular basis of the protein's functional diversity. **Journal of Biomolecular NMR**. v. 23, p. 103-114, 2002.

FARIAS, R.E., SOUZA, A.R., AARESTRUP, F.M. Assesment of apoptosis in breast cancer: association with histological grade and prognostic factors. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, p. 209-218, 2005.

FOTEDAR, R., DIEDERICH, L., FOTEDAR, A. Apoptosis and the cell cycle. **Progress in Cell Cycle Research**. v. 2, p. 147-163, 1996.

FRESCHI, A.P. Desenvolvimento de aplicações tecnológicas da metodologia de *Phage Display* no diagnóstico do câncer de próstata. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2006.

GASPARINI, G., POZZA, F., HARRIS, A.L. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 85, p. 1206-1219, 1993.

GERSHONI, J.M. Protein blotting: a manual. **Methods of Biochemistry Analysis**. v. 33, p. 1-58, 1988.

GIBBONS, I.R. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. **Cell Motility and the Cytoskeleton**. v. 32, p. 146-144, 1995.

- GONÇALVES, S.M.C. Estudo Histológico e Imunohistoquímico do cérebro da abelha *Apis mellifera* (Himenoptera, Apidae). Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2000.
- GONZALEZ, C.R., GALERA, R.M.R., VASQUEZ, R.F., RIOS, M.J.J., FERNANDEZ, S.J.M., RAMOS, M.M. Apoptosis in breast cancer. **Pathology, Research and Practice**. v. 196, p. 167-174, 2000.
- GOODE, L.B., DRUBIN, D.G., BARNES, G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 12, p. 63-71, 2000.
- HANSEN, M.H., OSTENSTAD, B., SIOUD, M. Antigen-specific IgG antibodies in stage IV long-time survival breast cancer patients. **Molecular Medicine**. v. 7, p. 230-239, 2001.
- HARLOW, E.L.D. Monoclonal Antibodies. Chapter 6: Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor/New York. ISBN 0-87969-314-2, 1988.
- HARRINGTON, W.F., ROGERS, M.E. Myosins. **Annual Review of Biochemistry**. v. 53, p. 35-73, 1984.
- HASHIMOTO, Y. A brief overview of apoptosis. **Human Cell**. v. 9, P. 194-196, 1996.
- HASSON, T., MOOSEKER, M.S. Vertebrate unconventional myosins. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 2816441-2816434, 1996.
- HERYNK, M. H., FUQUA, S.A. Estrogen receptor mutations in human disease. **Endocrine Reviews**. v. 25, p. 869–898, 2004.
- HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**. v. 279, p. 519–526, 1998.

- HOFFMANN, K.F., STRAND, M. Molecular identification of a *Schistosoma mansoni* tegumental protein with similarity to cytoplasmic dynein light chains. **Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 26117-26123, 1996.
- HOLZBAUR, E.L.F., VALLE, R.B. Dyneins: molecular structure and cellular function. **Annual Review of Cell Biology**. v. 19, p. 339-72, 1994.
- HORTOBAGYI, G.N., BUZDAR, A.U., STROM, E.A., AMES, F.C. Primary chemotherapy for early and advanced breast cancer. **Cancer Letters**. v. 90, p. 103-109, 1995.
- HORTOBAGYI, G.N., SINGLETARY, E., McNESSE, M. Treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer. **Disease of the Breast**. v. 93, p. 585-599, 1996.
- LETAI, A., BASSIK, M.C., WALENSKY, L.D., SORCINELLI, M.D., WEILER, S., KORSMEYER, S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. **Cancer Cell**. v. 2, p. 183-192, 2002.
- JARDINES, L., HAFFTY, B.G., ROYCE, M., JAIYESIMI, I. Advanced Disease: Stages III and IV breast cancer. **Breast Cancer**. cap. 11, 2000.
- KEER, J.F.R., WILLIE, A.H., CURRIE, A.P. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 26, p. 239-257, 1972.
- KEER, J.F.R., WINTERFORD, C.M., HARMON, B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**. v. 73, P. 2013-2026, 1994.
- KING, S. M., PATEL-KING, R. S. The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *Chlamydomonas* flagella have cytoplasmic homologues. **Journal of Biological Chemistry** v. 270, p. 11445- 11452, 1995.

KING, S. M.; BARBARESE, E.; DILLMAN, J. F. III.; PATEL-KING, R. S.; CARSON, J. H.; PFISTER, K. K. Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. **Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 19358-19366, 1996.

KRETZSCHMAR, T., VON RUDEN, T. Antibody discovery: phage display. **Current opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 598-602, 2002.

KROEMER, G., DALLAPORTA, B., RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**. v. 60, p. 619-642, 1998.

KUMAR, R., WANG, R.A., BARNES, C.J. Coregulators and chromatin remodeling intranuclear control. **Molecular Carcinogenesis**. v. 41, p. 221-230, 2004.

LACERDA, E.P.S. Atividade Citotóxica do Composto de Rutênio cis-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em células neoplásicas. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2003.

LANGFORD, G.M. Actin- and microtubule dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 7, p. 82-88, 1995.

LARRALDE, C., MONTOYA, R.M., SCIUTTO, E., DIAZ, M.L., GOVEZENSKY, T., COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 40, p. 282-290, 1989.

LIPPONEN, P., AALTOMAA, S., KOSMA, V.M., SYRJANEN, K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. **European Journal of Cancer**. v. 30, p. 2068-2073, 1994.

- LODISH, M.E., HABIB, F.A., MITTAL, V.K., YOUNG, S.C. Sentinel lymph node dissection for primary cutaneous melanoma: a community hospital's initial experience. **The American Surgeon**. v. 66, p. 291-295, 2000.
- MAKOKHA, M., HARE, M., LI, M., HAYS, T., BARBAR, E. Interactions of cytoplasmic dynein light chains Tctex-1 and LC8 with intermediate chain IC74. **Biochemistry**. v. 41, p. 4302-4311, 2002.
- MARSHAK, D.R., KADONAGA, J.T., BURGESS, R.R., KNUTH, M.W., BRENNAN, W.A. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Press, New York, 1996.
- MERMALL, V., POST, P.L., MOOSEKER, M.S. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. **Science**. v. 279, p. 527-533, 1998.
- MONTEIRO, C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 51, p. 1-4, 2003.
- MOORE, D.F., WU, Y., SHIH, W.J., Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, p.112-121, 2007.
- NISHIMURA, R., NAGAO, K., MYAYAMA, H., MATSUDA, M., BABA, K., MATUOKA, Y. Apoptosis in breast cancer and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis. **Journal of Surgical Oncology**. v. 71, P. 226-234, 1999.
- PATUSSI, E.V. Análise da expressão e distribuição subcelular da cadeia leve de dineína de 8 kDa na mitose e diferenciação em linhagens celulares de melanoma e HeLa. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2002.

PAZOUR, G.J., WILKERSON, C.G., WITMAN, G.B. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). **The Journal of Cell Biology**. v. 141, p. 979–992, 1998.

PEIXOTO, L.G. Detecção e localização de proteínas relacionadas às MRJPs e de suas possíveis proteínas sítio-ligantes no cérebro e glândula hipofaríngeal da abelha *Apis mellifera*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2006.

PFISTER, K.K., FAY, R.B., WITMAN G.B. Purification and polypeptide composition of dynein ATPases from *Chlamydomonas* flagella. **Cell Motility**. v. 2, p. 525-547, 1982.

PFISTER, K.K., SHAH, P.R., HUMMERICH, H., RUSS, A., COTTON, J., ANNUAR, A.A., KING, S.M., FISHER, E.M. Genetic Analysis of the Cytoplasmic Dynein Subunit Families. **PLoS Genetics**. v. 2, p. 303-11, 2006.

PIPERNO, G., LUCK, D.J. Axonemal adenosine triphosphatases from flagella of *Chlamydomonas reinhardtii* - Purification of two dyneins. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 254, p. 3084-3090, 1979.

PUTHALAKATH, H., HUANG, D.C., O'REILLY, L.A., KING, S.M.. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. **Molecular Cell**. v. 3, p. 287–296, 1999.

SAUNDERS, P.T., MILLAR, M.R., SHARPE, R.M., MAGUIRE, S.M., GAUGHAN, J. Colocalization of mRNA and protein using in situ hybridization and immunohistochemistry in testicular tissue. **Microscopy Research and Technique**. 32, p. 498-503, 1995.

SCHNORRER, F., BOHMANN, K., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. The molecular motor dynein is involved in targeting *Swallow* and *bicoid* RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. **Nature Cell Biology**. v. 2, p. 185-190, 2000.

SOHN, D. M., KIM, S. Y., BAEK, M. J., LIM, C.W., LEE, M.H., CHOW, M. S, KIM, T. Y. Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 60, p. 289- 292, 2006.

STORY, M., KODYM, R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. **Front Bioscience**. v. 3, p. 65- 75, 1998.

SUNDERLAND, M.C., McGUIRE, W.L. Prognostic indicators in invasive breast cancer. **The Surgical Clinics of North America**. v. 5, p. 989-1004, 1990.

THOMPSON, E.B. Special topic: apoptosis. Introduction. **Annual Review of Physiology**. v. 60, p. 525-532, 1998.

VADLAMUDI, R.K., BAGHERI-YARMAND, R., YANG, Z., BALASENTHIL, S., NGUYEN, D., SAHIN, A.A., DEN HOLLANDER, P., KUMAR, R. Dynein light chain1, p21-activated kinase1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. **Cancer Cell**. v. 5, p. 575–585, 2004.

VAISBERG, E.A., KOONCE, M.P., MCINTOSH, J.R. Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. **Journal of Cell Biology**. v. 123, p. 849–858, 1993.

VAKKALA, M., LAHTEENMAKI, K., RAUNIO, P., SOINI, Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. **Clinical Cancer Research**. v. 5, p. 319-324, 1999.

VALLEE, B.L., FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiology Review**. v. 73, p. 79-118, 1993.

VILELA, A.A., CALÁBRIA, L.K. COELHO, M.V., ESPINDOLA, F.S. Uso de proteína recombinante e produção de anticorpo para miosina-V e DLC no estudo de cérebro da abelha *Apis mellifera*. v. 1, p. 1-18, 2007.

WOLF, A.C., DAVIDSON, N.E. Primary systemic therapy in operable breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. V. 18, p. 1558-1569, 2000.

WU, X. JUNG, G., HAMMER, J.A. Functions of unconventional myosins. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 12, p. 42-51, 2000.

WYLLIE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**. v. 69, p. 251-306, 1980.

XIANG, Y.Y., WANG, D.Y., TANAKA, M., LI, X.R., LI, J.L., SHEN, Q., SUGIMURA, H., KINO, I. High prevalence of p53 protein over expression in patients with esophageal cancer correlation with dietary risk factors in India. **Clinical Cancer Research**. v. 15, p. 3089-3096, 1994.