



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES
(FAB) ANTI-CARCINOMA MAMÁRIO E OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS
LIGANTES DE ANTÍGENOS TUMORAIS POR *PHAGE DISPLAY***

ALUNA: THAISE GONÇALVES DE ARAÚJO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

UBERLÂNDIA – MG

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES
(FAB) ANTI-CARCINOMA MAMÁRIO E OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS
LIGANTES DE ANTÍGENOS TUMORAIS POR *PHAGE DISPLAY***

ALUNA: THAISE GONÇALVES DE ARAÚJO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A663c Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-

Construção de uma biblioteca de anticorpos recombinantes (FAB) anti-carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por *phage display* / Thaise Gonçalves de Araújo. - 2009. 134 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética molecular - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.21



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES (FAB)
ANTI-CARCINOMA MAMÁRIO E OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS LIGANTES DE
ANTÍGENOS TUMORAIS POR *PHAGE DISPLAY***

ALUNA: THAISE GONÇALVES DE ARAÚJO

COMISSÃO EXAMINADORA

PRESIDENTE: LUIZ RICARDO GOULART FILHO (ORIENTADOR)

Examinadores:

Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay (Instituto Nacional do Câncer)

Dra. Adriana Freitas Neves (Universidade Federal de Goiás)

Data de Defesa: 31/07/2009

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos"

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista a Deus, meu refúgio, minha força, meu Senhor. Que sempre esteve e estará comigo. Que em dias de medo me trouxe a esperança, em dias de angústia me trouxe a paz e em dias de desespero e incertezas me trouxe a certeza que sua obra é completa e que apenas me preparou para o que estava por vir.

Aos meus pais, meu porto seguro, que me deram a vida e muito apoio. Que em tantos momentos difíceis confortaram-me com palavras de força e alegria e que sempre acreditaram em mim, na minha capacidade, no meu sucesso e nos meus sonhos. Papai e mamãe, amo muito, muito vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

É preciso reconhecer que os sonhos não são realizados sozinhos e que existe sempre um pouco, de muitos que nos amam, nos apóiam e nos ajudam.

A cada um que esteve ao meu lado nessa caminhada e que, de maneira singular, deixou sua marca, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pela oportunidade oferecida e pela confiança em mim depositada. Obrigada pela amizade, orientação e por todos os ensinamentos. Obrigada por acreditar em meu trabalho e contribuir de forma decisiva para minha formação. Muito obrigada!

À Prof. Dra. Adriana Freitas Neves pelos momentos divididos, por ser a grande profissional que é e, acima de tudo, por ser uma grande amiga! Obrigada por tudo! Saudades!

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelos momentos compartilhados. Você sabe que é diretamente responsável por essa conquista!

A você Yara, pelo seu carinho, pela sua garra, pela sua força, pela sua ajuda e amizade. Esse trabalho não existiria sem você!

Às minhas eternas amigas Danielle, Bel, Patrícia, Dalila, Michele e Lara que sempre estiveram prontas para me ajudar e aconselhar. Amizades assim são eternas.

Às minhas grandes amigas conquistadas no laboratório: Karina, Jú, Flávia e Márcia. São amizades assim que nos dão força, pois sabemos que existem pessoas que gostam de nós e com quem podemos sempre contar. Não se esqueçam que podem sempre contar comigo viu?! Adoro vocês!

À Ângela, por todo apoio e ajuda. Muito obrigada pela competência e disponibilidade.

Aos demais amigos do laboratório: Gabi, Carol, Ana Paula Carneiro, Ana Carolina, Fausto, Rone, Patrícia, Érica, Janaína, Paula Cristina, Paula Souza, Washington, Rafael, Fabiana pelos momentos agradáveis e pela aprendizagem

diária. E àqueles que já não trabalham mais conosco, mas que deixam saudades: Guilherme, Sílvia, Weruska, Ana Paula Freschi, Waldesse, Luciana e Renata.

À Cici, minha segunda mãe, à Maria Augusta e à Dona Alice, pela certeza do apoio, pelas orações e pelo carinho.

Aos docentes do Instituto de Genética e Bioquímica pelos ensinamentos ministrados e pela cooperação.

Aos secretários do INGEB Gerson e Marlene, pela paciência e pelos serviços prestados.

À equipe médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia: Dr. Donizete, Dra. Luanda, Dra. Priscila, Dr. Thales, Dr. Alair, Dr. Sinval e Dr. Eduardo, Emília, Noêmia, Osmar, Vanessa, Gina, Cleonice, Aparecida, Maria de Fátima, Ana Aloisa, Divina. Sem o trabalho e compreensão de vocês nenhum resultado seria alcançado. Muito obrigada!

Às pacientes, que apesar de toda a dor e sofrimento contribuíram diretamente para a realização desse estudo.

Ao CNPq, financiador do meu trabalho.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia, meu trabalho e grande responsável pela minha formação profissional.

SUMÁRIO

	Página
Apresentação.....	01
Capítulo I: Fundamentação Teórica.....	05
Resumo.....	06
1. Glândula Mamária: Aspectos Biológicos e Histopatológicos.....	07
2. Câncer de Mama.....	08
2.1. Aspectos Epidemiológicos.....	08
2.2. Fatores de Risco.....	10
2.3. Diagnóstico e Tratamento.....	14
2.4. Aspectos Moleculares.....	15
3. Imunidade e Câncer.....	17
4. Imunoglobulinas.....	19
5. Engenharia de Anticorpos.....	24
6. Bibliotecas de anticorpos apresentadas em fagos filamentosos: <i>Phage Display libraries</i>	28
Referências Bibliográficas.....	33
Capítulo II: Construção de uma Biblioteca de Anticorpos recombinantes (Fab) anti-carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por <i>Phage Display</i>.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Objetivos.....	51
Casuística e Métodos.....	52
1. Obtenção das Amostras.....	52
2. Extração de RNA total e transcrição reversa.....	53
3. Construção da Biblioteca de Anticorpos: amplificação das sequências codificadoras de VH e VL por PCR e montagem do Fab..	56
3.1. Amplificação das cadeias VH e VL.....	56
3.2. Amplificação das regiões constantes das cadeias pesada e leve.....	56
3.3. Segundo ciclo de PCR: geração das cadeias pesada e leve por	

PCR de sobreposição.....	57
3.4. Terceiro ciclo de PCR: obtenção do Fab por PCR de sobreposição.....	57
3.5. Digestão dos fragmentos Fab e do vetor pComb3X com a enzima <i>Sfi</i> I.....	58
3.6. Ligação dos fragmentos de DNA Fab com o vetor pComb3X.....	58
3.7. Montagem da biblioteca combinatorial Fab.....	59
3.8. Seqüenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves.....	60
3.9. Análise das seqüências.....	61
4. Seleção da biblioteca de Fab expressa na superfície de fagos.....	61
4.1. Seleção de Fab contra tecidos mamários.....	61
4.2. Produção de Fab na forma solúvel em placa <i>deep well</i>	62
5. <i>Slot-Blot</i>	62
6. SDS-PAGE e <i>Western-Blot</i>	63
7. Análise dos fragmentos de anticorpos selecionados através de ensaios de ELISA.....	63
8. Purificação dos anticorpos solúveis.....	64
8.1. Produção de Fab em grande escala.....	64
8.2. Concentração do sobrenadante de cultura em coluna Centriprep.....	65
8.3. Purificação de Fab por cromatografia de afinidade em HPLC....	65
8.4. <i>Dot-Blot</i> para análise das moléculas de Fab.....	65
9. Imunohistoquímica.....	66
Resultados.....	67
1. Construção da biblioteca.....	67
2. Diversidade dos fragmentos de anticorpos.....	70
3. Seleção de fagos presentes na biblioteca combinatorial de anticorpos e expressão de moléculas em solução.....	75
4. Análise preliminar dos clones selecionados por ensaios de ELISA e purificação de Fab por HPLC.....	80
5. Imunohistoquímica.....	83
Discussão.....	85
Conclusões.....	93
Referências Bibliográficas.....	94
Anexo I: Reagentes e Soluções.....	100
1. Linhagens bacterianas.....	100

2. Plasmídeo.....	100
3. Bacteriófago auxiliar.....	101
4. Meios de Cultura.....	101
5. Antibióticos.....	102
6. Soluções de uso geral.....	102
7. Soluções utilizadas no procedimento de seleção da biblioteca.....	103
8. Soluções para eletroforese em Gel Agarose e de Poliacrilamida.....	104
9. Soluções para ELISA, <i>Dot blot</i> e <i>Western blot</i>	106
10. Soluções para purificação de proteína em Coluna de Níquel Sepharose (HPLC).....	107
11. Soluções para preparação de DNA plasmidial.....	108
12. Enzimas e <i>kits</i> utilizados.....	109
Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética.....	111
Anexo 3: Preparação de células XL1-Blue e TOP 10 eletrocompetentes....	112
Anexo 4: Preparação de DNA plasmidial em placa de Microtitulação.....	113
Anexo 5: Preparação do fago auxiliar VCSM13.....	115
Anexo 6: Reamplificação da biblioteca.....	117
Anexo 7: Purificação de Fab por cromatografia de afinidade em HPLC.....	119

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Fundamentação Teórica

Figura 1 -	Anatomia da Glândula Mamária.....	07
Figura 2-	Representação esquemática de uma IgG.....	20
Figura 3-	Relação dos segmentos gênicos das cadeias de imunoglobulinas.....	21
Figura 4-	Tecnologias de humanização de anticorpos	25
Figura 5-	Representação esquemática de uma molécula de imunoglobulina e de seus fragmentos gerados após clivagem com pepsina e papaína.....	26
Figura 6-	Esquema de um fago filamentoso.....	29

Capítulo II: Construção de uma Biblioteca de Anticorpos recombinantes (Fab) anti-carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por *Phage Display*

Figura 1-	Diagrama esquemático da construção do repertório Fab utilizando <i>Phage Display</i>	67
Figura 2-	Repertório de VH e VL da biblioteca original não-amplificada.....	70
Figura 3-	<i>Slot-Blot</i> de clones selecionados e induzidos por IPTG.....	75
Figura 4-	Análise da expressão de Fab de 4 clones aleatórios após a indução por IPTG.....	78
Figura 5-	Ensaio de ELISA do sobrenadante de cultura induzido sobre proteínas totais extraídas de pacientes normais, com doença benigna da mama e câncer de mama, análises de curva ROC para os melhores clones obtidos e razão do índice ELISA entre CAM/DBM e CAM/CONTROL.....	80
Figura 6-	<i>Dot-Blot</i> do clone C-4 purificado por HPLC utilizando anti-HA.....	81
Figura 7-	Imunohistoquímica de tecido mamário utilizando Fab C-4 selecionado por <i>Phage Display</i>	83

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Fundamentação Teórica

Tabela 1 -	Fragmentos de anticorpos Fab e scFv aprovados (ou em testes) nos EUA para uso terapêutico.....	27
-------------------	--	----

Capítulo II: Construção de uma Biblioteca de Anticorpos recombinantes (Fab) anti-carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por *Phage Display*

Tabela 1-	Oligonucleotídeos utilizados para a construção da biblioteca de fragmentos Fab.....	54
Tabela 2-	Sequência de aminoácidos deduzidas das regiões Vk de clones não selecionados.....	71
Tabela 3-	Sequência de aminoácidos deduzidas das regiões VH de clones não selecionados.....	73
Tabela 4-	Análise das sequências dos clones selecionados e induzidos por IPTG.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
Ac	Anticorpos
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
BCR	Receptor de células B
BSA	Soroalbumina bovina
C	Domínio Constante
C	Citosina
°C	Graus Celsius
c-erbB-2	Receptor de tirosina quinase
CEA	Antígeno Carcino-embriogênico
CDC	Citotoxicidade dependente do complemento
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CDR	Região determinante de complementariedade
CH	Domínio Constante de cadeia pesada
CID-O	Classificação Internacional de Doenças para Oncologia
CL	Domínio Constante de cadeia leve
CM	Câncer de Mama
D	Segmento de Diversidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Ensaio imunoenzimático
<i>ER</i>	Receptor de Estrógeno
Fab	Fragmento ligante de antígeno
Fc	Região constante
FDA	Administração de alimentos e drogas
Fv	Região variável

g	Gramas
G	Guanina
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
<i>HER-2</i>	Receptor 2 do Fator de crescimento epidermal humano
H ₂ O	Água
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HPV	Papilomavírus humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRP	Peroxidase
Ig	Imunoglobulinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo
IUAC	União Internacional contra o Câncer
J	Segmento de Junção
KCl	Cloreto de Potássio
kDA	Quilodaltons
M	molar
mAbs	Anticorpos monoclonais
μ L	Microlitros
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	nanogramas
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
pComb3X	Vetor de clonagem

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBL	Peripheral Blood Leucocytes
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PBST	Tampão Fosfato-Salino com Tween-20
pmoles	Picomoles
%	porcentagem
<i>PR</i>	Receptor de Progesterona
PEG	Polietileno Glicol
PIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação por Minuto
RT	Transcrição reversa
scFv	Fragmento variável de cadeia única
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
T	Timina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (Enzima DNA Polimerase)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TBS	Tampão Tris Base-Salino
TBST	Tampão Tris Base-Salino com Tween-20
TNM	Tumor-linfonodo-metástase
U	Unidade de Atividade Enzima
ufc	Unidades formadoras de colônias
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
V	Domínio Variável
VDS	Vídeo documentação <i>ImageSystem</i>
VH	Domínio Variável de cadeia pesada
VL	Domínio Variável de cadeia leve
V _k	Cadeia leve κ
V _λ	Cadeia leve λ

APRESENTAÇÃO

O Câncer de Mama (CM) é a neoplasia mais comum em mulheres em todo o mundo. Estima-se que o número de novos casos esperados aumentará de 20 milhões no ano 2000 para 30 milhões em 2020, e 60% desses casos ocorrerão em países em desenvolvimento. Após o câncer de pele não melanoma, o CM é o segundo mais comumente diagnosticado em mulheres no Brasil e nos Estados Unidos e a segunda causa de morte entre elas, após o câncer de pulmão.

A etiologia multifatorial do câncer de mama dificulta um estudo mais pontual de suas causas pela dificuldade em se isolar um único fator e calcular a sua verdadeira contribuição no desenvolvimento da doença. Os fatores prognósticos atuais são incapazes de prever a evolução da totalidade dos pacientes, assim como os marcadores preditivos não conseguem evitar que grande parte das pacientes com a doença seja submetida a tratamentos desnecessários.

O direcionamento terapêutico do Câncer de Mama exige esforços que incluam múltiplas abordagens, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia. Além disso, a busca de marcadores tumorais tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico é imprescindível para a detecção e o acompanhamento da evolução clínica da doença. Nesse sentido, a identificação dos mecanismos e processos envolvidos em sua gênese consiste no primeiro passo para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e terapias e medidas preventivas mais específicas e eficazes.

Diante desse quadro, qualquer tentativa de ampliar o entendimento acerca da biologia desse tumor se faz justificável, com perspectivas de aplicação imediata ou não, uma vez que conhecimentos moleculares contribuem para o desenvolvimento de estratégias mais adequadas no combate à doença. A imunologia molecular destaca-se na identificação de antígenos tumorais com potencial uso clínico, através do isolamento de anticorpos específicos utilizados como diagnóstico, prognóstico ou alvo terapêutico, ao neutralizar algum aspecto imprescindível para o desenvolvimento tumoral e progresso metastático.

A aplicabilidade da metodologia de *Phage Display* na apresentação de peptídeos ou bibliotecas protéicas na superfície de fagos filamentosos permite uma seleção altamente específica a determinados alvos. Uma vantagem crucial dessa tecnologia é a conexão direta entre o fenótipo experimental e o genótipo

encapsulado, a qual possibilita uma evolução clonal de ligantes selecionados. Nesse sentido, essa metodologia tem se mostrado significativa à prática clínica, ao permitir a seleção de peptídeos e anticorpos expressos na superfície viral.

Atualmente, terapias baseadas na utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) representam uma das mais promissoras áreas na indústria farmacêutica. Os anticorpos têm se mostrado um excelente paradigma na busca de moléculas altamente específicas a seus alvos protéicos desempenhando um papel central nas pesquisas pós-genômicas. Os pequenos fragmentos de anticorpos recombinantes têm emergido como uma promissora alternativa a essa terapia, pois mantêm sua especificidade, minimizam a exacerbação da resposta imunológica e apresentam um menor custo de produção.

A técnica de *Phage Display*, aliada à tecnologia de construção de bibliotecas combinatoriais de fragmentos de anticorpos, poderão gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento individualizado de pacientes. É muito provável que a análise do complexo conteúdo protéico de tecidos e diferentes fluidos biológicos tenha, no futuro, um impacto significativo na avaliação e no diagnóstico, não só do câncer, mas, também, de muitas outras patologias.

No trabalho aqui apresentado foram obtidos anticorpos monoclonais a partir da construção de uma biblioteca combinatorial tipo Fab, por *Phage Display*, capazes de reconhecer antígenos tumorais específicos do Câncer de Mama, os quais poderão auxiliar à prática clínica e terapêutica dessa patologia. O trabalho foi realizado a partir de um *pool* de pacientes com carcinoma ductal infiltrante. O RNA total foi extraído de leucócitos do sangue periférico e transcrito reversamente para obtenção de alvos de cDNA. Para a construção das porções constantes e variáveis das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas G e M, o cDNA obtido foi submetido a vários ciclos de PCR.

A biblioteca aqui obtida apresentou-se altamente diversa possibilitando seu uso no isolamento de anticorpos monoclonais tumores-específicos inéditos na literatura já descrita. Os ensaios imunológicos revelaram que os clones Fab reconheceram potenciais antígenos tumorais com perspectivas terapêuticas. As moléculas caracterizadas no presente trabalho, após validação em uma ampla amostragem, poderão se tornar novas ferramentas clínicas na terapia contra o

Câncer de Mama, além de fornecer novas informações moleculares que complementares aos parâmetros da rotina clínica utilizados atualmente.

CAPÍTULO I:

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

RESUMO

O Câncer de Mama é o câncer mais comumente diagnosticado em mulheres e a segunda causa de morte por doença maligna após o câncer de pulmão. Grande parte dos casos letais da doença é conseqüente de um diagnóstico tardio e, apesar das inúmeras conseqüências biológicas e psicológicas encontradas, os marcadores preditivos e diagnósticos até então disponíveis ainda são incapazes de definir todas as pacientes e de evitar tratamentos desnecessários. Nesse sentido, a apresentação de anticorpos na superfície de fagos filamentosos tem se mostrado como uma ferramenta eficiente na descoberta e desenvolvimento de anticorpos monoclonais com aplicação terapêutica. Diversos fragmentos de anticorpos já foram aprovados ou estão em validação clínica, de modo que a engenharia de anticorpos vem se apresentando como uma tecnologia promissora, explorando diversos mecanismos na busca de marcadores terapêuticos. Essa revisão visa descrever alguns aspectos do Câncer de Mama assim como explicitar o mecanismo de ação dos anticorpos e seus fragmentos na busca de alvos clínicos e descrever a tecnologia de *Phage Display*, a mais amplamente utilizada na construção e seleção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos.

Palavras chave: Câncer de Mama, Imunoglobulinas, *Phage Display*

1 GLÂNDULA MAMÁRIA: ASPECTOS BIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

A Glândula Mamária é constituída, basicamente por alvéolos secretórios (tecido glandular) conectados por um sistema de ductos embebidos em um tecido conectivo (Figura 1). As células epiteliais que compõem a glândula estão arranjadas em duas camadas: a camada epitelial luminal e a camada mioepitelial basal. Toda essa estrutura encontra-se circundada pela membrana basal (DEUGNIER et al., 2002).

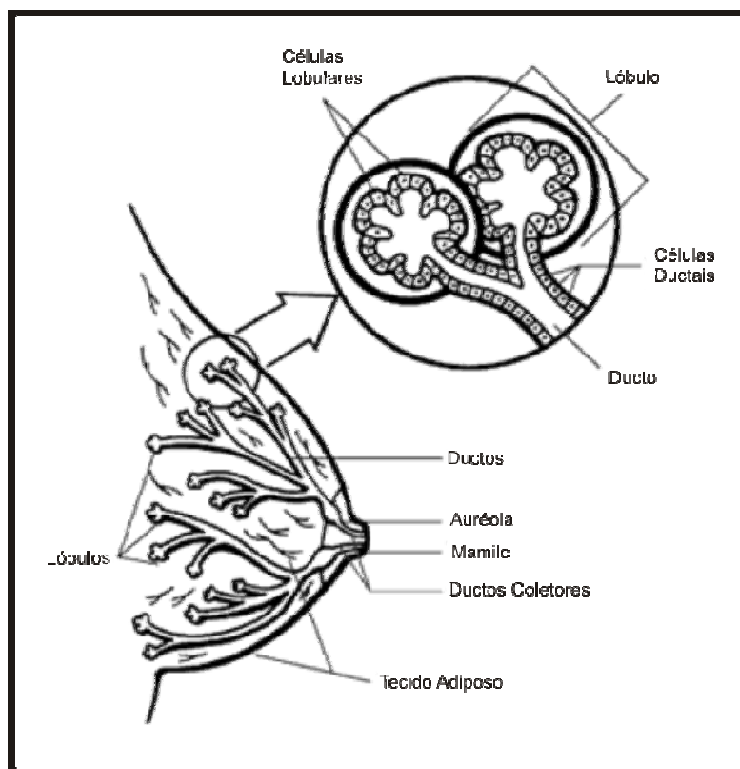


Figura 1: Anatomia da Glândula Mamária. Fonte: Ribeiro et al. (2002).

A biologia e patologia da mama são atualmente embasadas nesses dois tipos celulares, as células glandulares ou lumbais e as células mioepiteliais. Os ductos e lóbulos são revestidos por uma camada luminal de células secretórias cuboidais. As células mioepiteliais estão em contato com a membrana basal contendo proteínas de músculo liso (BIRNBAUM et al., 2004).

Histologicamente, a maior parte dos cânceres esporádicos da mama teria origem nas células epiteliais luminais, sendo este fato apoiado por evidências morfológicas, bioquímicas e moleculares (CALLAGY et al., 2003). No entanto, estudos de expressão gênica obtidos por *microarrays* de cDNA distinguiram duas classes principais de tumores, uma com características de células basais e/ou mioepiteliais e outra classe, de células luminais (DIRENZO et al., 2002). Estes estudos indicaram que uma proporção de casos de Câncer de Mama (CM) apresentaria características basais/mioepiteliais tendo como possível origem uma célula intermediária ao longo da via de diferenciação das células basais para células mioepiteliais (BIRNBAUM et al., 2004).

As diferentes células tumorais compartilham propriedades únicas que as diferenciam das células normais das quais se originam, quer seja sob o ponto de vista genético ou fisiológico. A transformação oncogênica, em geral, corresponde a uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular (GRIFFITHS & MORTON, 1999). Este comportamento leva a uma subversão da ordem tecidual, na qual o tumor está inserido, resultando em um colapso do sistema orgânico como um todo. Estas células ainda apresentam outras características importantes, como a habilidade de migrar do sítio onde se originaram e invadir tecidos normais adjacentes, resultando na formação de massas tumorais em diferentes regiões do organismo, o que constitui o processo metastático. Células que apresentam estas características, além de outras, tais como a perda das propriedades apoptóticas e de adesão, originam tumores malignos agressivos e que invariavelmente se mostram letais (ANACLETO, 2004).

2 CÂNCER DE MAMA

2.1 Aspectos Epidemiológicos

A necessidade de medidas paliativas que diminuam o progresso tumoral e melhorem a qualidade de vida dos pacientes tem evidenciado a importância do câncer no cenário global de doenças em todo o mundo. Estima-se que o número de novos casos esperados aumentará de 20 milhões no ano 2000 para 30 milhões em 2020, e 60% desses casos ocorrerão em partes do mundo que se

encontrarão em desenvolvimento (WHO, 2003). Esta patologia vem atingindo progressivamente um número maior de mulheres, em faixas etárias mais baixas, com taxa de mortalidade também crescente no Brasil. Entre 1979 e 1999, houve um aumento de 69% na taxa bruta de mortalidade por Câncer de Mama no Brasil (5,77 para 9,75 óbitos por 100 mil mulheres/ano). O número de novos casos de Câncer de Mama, estimados para o Brasil em 2008, foi de 49.400. O Rio de Janeiro apresenta a maior incidência para esse tipo de tumor (92,77/100.000). O estado de Minas Gerais tem uma taxa estimada de 42,46 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2009).

O Câncer de Mama é uma doença heterogênea que abrange uma ampla variedade de entidades patológicas, as quais apresentam comportamentos clínicos distintos. Após o câncer de pele não melanoma, o CM é o segundo mais comumente diagnosticado em mulheres no Brasil e nos Estados Unidos e a segunda causa de morte entre elas, após o câncer de pulmão (PARKIN et al., 2002; MEISNER et al., 2008). A incidência anual estimada de câncer de mama em todo o mundo corresponde a um milhão de casos, com 200 mil casos nos Estados Unidos e 320 mil casos na Europa. Países como os Estados Unidos, Reino Unido, Suécia, Itália e Uruguai, apresentam taxas de incidência de CM superiores a 100 casos por 100 mil mulheres/ano. Consequentemente suas taxas de mortalidade também são bastante elevadas, ficando ao redor de 40 óbitos por 100 mil mulheres/ano (PARKIN et al., 2002).

O câncer de mama é provavelmente, o mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo, pelos efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (INCA, 2009).

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e dos avanços em quimioterapia e radioterapia, observa-se que a mortalidade por essa afecção mantém-se em um patamar pouco variável, no entanto, quando detectado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade se reduzem de forma significativa (GREEBAUM, 2000). O progresso científico e clínico para a detecção e tratamento da doença é evidente, uma vez que mulheres atualmente diagnosticadas com Câncer de Mama apresentam uma probabilidade de

sobrevivência muito maior, comparadas às diagnosticas nos anos 70 e 80 (MEISNER et al., 2008). Portanto, devido à sua cura estar intimamente relacionada ao estágio de seu diagnóstico, muito necessita ser feito para um maior esclarecimento quanto à triagem e ao papel pessoal das pacientes na luta contra essa doença.

2.2 Fatores de risco

A etiologia multifatorial do câncer de mama dificulta um estudo mais pontual de suas causas pela dificuldade em se isolar um único fator e calcular a sua verdadeira contribuição no desenvolvimento da doença (PAIVA et al., 2002). Contudo, estudos epidemiológicos conduzidos em diversas populações têm demonstrado alguns fatores de risco para sua ocorrência.

O primeiro e mais evidente deles é o próprio gênero feminino, responsável por uma estimativa de 135 mulheres para cada homem (MEISNER et al., 2008). Depois do sexo, a idade é o mais importante fator de risco (HELMRICH et al., 1982), de modo que à medida que a mulher envelhece, aumenta sua chance de contrair a doença. Entre 30 e 40 anos, o risco é de 1/252; entre 40 e 50 anos, é de 1/8 (DIAB et al., 2000). Além disso, menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade são fatores relacionados com o risco de desenvolver câncer de mama (MARTIN & WEBER, 2000).

A influência dos fatores socioeconômicos sobre o carcinoma mamário foi avaliada em mulheres de múltiplas origens étnicas. Verificou-se que o nível de escolaridade tinha uma relação direta com o percentual de mulheres que realizavam mamografia em até dois anos pregressos ao estudo, ou seja, a proporção de mamografia era maior no nível educacional maior e mais baixa com os mais baixos níveis educacionais (BAQUET & COMISKEY, 2000).

O câncer de mama ocorre mais freqüentemente em caucasianas e em mulheres de classe social mais elevada, com maior incidência nos países desenvolvidos e industrializados (GOMES et al., 1995). As grandes variações na incidência de câncer de mama entre ou dentro de diferentes regiões em todo o mundo pode ser atribuída a diferenças genéticas entre as populações e ou a diferenças no estilo de vida, incluindo dieta e exposição ambiental (PARKIN,

2004). Além disso, mulheres com níveis sócio-econômicos elevados ou pertencentes a comunidades urbanas, apresentam um risco levemente aumentado de desenvolver o câncer, quando comparado com mulheres que apresentam menores condições sócio-econômicas e pertencentes a comunidades rurais (ROBERT et al., 2004). Contudo, as classes sociais menos favorecidas são prejudicadas, pois na grande maioria das vezes só tem seu diagnóstico estabelecido em uma fase avançada da doença (KARJAINEN & PULDEALA, 1990).

Além dos aspectos geográficos e sócio-econômicos destacam-se, também, os fatores reprodutivos envolvidos na etiologia da doença. Bittner (1948) foi o primeiro a sugerir que os hormônios poderiam aumentar a incidência das neoplasias. Na oncogênese mamária, o excessivo estímulo hormonal por estrógenos pode levar a um descontrole da função e do crescimento em um determinado órgão alvo e a resposta direta a essa modificação fisiológica envolve o aumento da atividade mitótica. Nesse cenário, torna-se eminente a transformação das células normais em células hiperplásicas, o que poderia culminar com a origem de células neoplásicas através do acúmulo de erros no processo de divisão celular (HENDERSON et al., 1982). Essa é a primeira evidência da atuação dos estrógenos na carcinogênese mamária. A segunda evidência é o papel genotóxico dos metabólitos gerados por esse hormônio que, por sua vez, participam de forma isolada ou sinérgica na formação dos tumores (MORETÃO et al., 2001).

A relação entre a utilização de anticoncepcionais orais e o risco para CM tem sido amplamente investigada (MARTIN & WEBER, 2000; MARCHBANKS, 2002, IARC, 2003). Em 1996, foi publicada uma meta-análise com 54 estudos epidemiológicos mostrando um aumento significativo no risco para CM em mulheres que utilizavam anticoncepcionais orais conjugados, independentemente da dosagem utilizada, idade do início do uso, tempo de uso e história familiar da doença (CANCER, 1996).

Quanto aos benefícios da terapia com reposição hormonal após a menopausa, as conclusões ainda são controversas, principalmente por apresentar um aumento no risco ao Câncer de Mama. Em média, essa terapia tem aumentado em 2% a taxa anual de câncer entre mulheres usuárias, quando

comparadas àquelas que não se submetem à reposição (MEISNER et al., 2008). Chlebowski e colaboradores (2003) verificaram que, após 5.6 anos de estudo, 245 das 8506 mulheres tratadas e 185 das 8102 não tratadas desenvolveram Câncer de Mama. Contudo, a probabilidade de desenvolver o tumor pode variar de acordo com a duração da exposição e se o estrógeno é administrado sozinho ou em combinação com progesterona (ROSS et al., 2000).

Outro importante fator de risco postulado para o Câncer de Mama é a história familiar. Embora a maioria dos carcinomas mamários (cerca de 85%) não sejam atribuídos a fatores hereditários, a presença de uma parente de primeiro grau acometida pela doença aumenta seu risco em aproximadamente duas vezes. Apenas cerca de 5% dos tumores de mama podem ser considerados hereditários e, atualmente, existem alguns marcadores moleculares para essa predisposição (MEISNER et al., 2008). Em famílias de alto risco, os mais importantes genes supressores de tumor associados com o câncer de mama são o *BRCA1* (*Breast Câncer 1*) e *BRCA2* (*Breast Câncer 2*).

As mulheres portadoras de mutações no *BRCA1* possuem até 80% de chances de desenvolverem o câncer de mama (DORSSERNS et al., 2004). Entretanto, se essas mulheres viverem até a idade de 70 anos, as suas chances de desenvolver um segundo câncer de mama chegam a 70% (PHAROAH et al., 1997). As mulheres que apresentam mutação no *BRCA2* possuem até 60% de chances de desenvolverem esta doença (BRODY & BIESECKER, 1998).

Existem outros fatores também relacionados à gênese da doença como álcool, tabagismo, atividade física e aspectos dietéticos. A literatura tem estabelecido uma associação causal entre o consumo de álcool e vários tipos de câncer como o da cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, fígado, cólon, reto e em mulheres o câncer de mama (BOFFETTA & HASHIBE, 2006). Contudo, o mecanismo pelo qual o álcool exerce influência na carcinogênese ainda não está completamente estabelecido (DUMITRESCU & COTARLA, 2005). Já o tabagismo é a principal causa isolada evitável de câncer. Além do câncer de pulmão, o uso do tabaco é também fator de risco para câncer de laringe, pâncreas, fígado, bexiga, rim, leucemia mielóide e, associado ao consumo de álcool, de câncer da cavidade oral e esôfago, e câncer de mama (INCA, 2009).

A atividade física tem ação direta em várias funções no corpo humano que incluem alterações na circulação dos hormônios endógenos, no balanço de energia, nas funções imunológicas e nas defesas antioxidantes, todas envolvidas em processos tumorais. Um trabalho de meta-análise com 19 estudos casos-controle e 4 estudos de coorte investigou a associação entre a prática de atividade física e o risco para a ocorrência do CM. Foi encontrada uma redução no risco de 20% em adolescentes e jovens adultos, de 12 a 24 anos, que praticavam atividade física regularmente (LAGERROS et al., 2004). A prática de atividade física provavelmente reduz o risco de CM pelo fato de postergar a data da primeira menstruação e pela modificação nos níveis hormonais de estrógeno (HANKINSON et al., 2003).

A relação entre o câncer e fatores dietéticos é complexa, porém estudos mostram que alguns componentes específicos de cada alimento como os fitoquímicos, carotenóides, vitaminas antioxidantes, compostos fenólicos, terpenóides, esteróides, indoles, fibras, métodos de preparação e conservação dos alimentos, volume ingerido, variedade da alimentação e equilíbrio calórico têm relação com o risco de câncer (IARC, 2003). A literatura tem mostrado que o consumo de frutas, legumes e verduras conferem grande proteção contra o câncer. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que até 2,7 milhões de vidas poderiam ser salvas anualmente no mundo se o consumo de frutas e verduras fosse adequado. O consumo recomendado é de pelo menos cinco porções diárias de frutas e vegetais, o que equivale a 400 gramas por dia (WHO, 2003). Nesse contexto, a avaliação do consumo alimentar pregresso tem sido um aspecto cada vez mais referido quando se trata de estimar a associação entre os fatores da dieta e o câncer, uma vez que o período de indução dessa enfermidade pode ocorrer muitos anos antes de sua manifestação clínica (ROHAN & POTTER, 1984).

A existência de inúmeros fatores de risco associada ao conhecimento ainda inicial quanto ao aparecimento e desenvolvimento do tumor evidencia a necessidade de busca de novos alvos diagnósticos e prognósticos. Novas descobertas a respeito da biologia desse câncer certamente terão um impacto substancial na expectativa e qualidade de vida das pacientes.

2.3 Diagnóstico e Tratamento

Desde a metade do século XVIII, é reconhecida a importância do diagnóstico precoce do câncer de mama, fase em que o tratamento oferece maiores chances de cura. Além da redução do índice de mortalidade, o diagnóstico precoce facilita o tratamento, diminui sua morbidade e possibilita cirurgias mais conservadoras e mais estéticas (SMITH et al., 2003).

Na prática clínica, o diagnóstico histopatológico fornece elementos necessários para uma adequada classificação do estadiamento do câncer, apresentando a descrição das características da neoplasia, do estado linfonodal e do comprometimento das margens cirúrgicas de ressecção, bem como o resultado dos marcadores prognósticos avaliados por imuno-histoquímica (SALLES et al., 2005). A Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) classificou os carcinomas da mama em: i) doença de Paget da aréola; ii) não-invasivos (ductal e lobular in situ) e iii) invasivos (ductal, lobular, mucinoso, medular, papilar, tubular, adenóide cístico, secretor juvenil, apócrino, escamoso, fusiforme, cartilaginoso e ósseo, tipo misto).

O estadiamento é realizado com base na classificação dos tumores malignos segundo seu tamanho, o comprometimento dos linfonodos e a ocorrência ou não de metástases (TNM), proposta pela *International Union Against Cancer* (IUAC, 2002). O tamanho do tumor juntamente com a condição dos linfonodos axilares são dois importantes indicadores prognósticos para o câncer de mama, pois auxiliam de forma significativa o direcionamento clínico (IUAC, 2002).

Lamentavelmente, em 80 a 85% do total de casos, o diagnóstico do câncer de mama vem sendo feito tardiamente, quando as esperanças de cura são remotas. Do ponto de vista prático, até o momento não há como prevenir a moléstia, porém há maneiras de detectá-la em época oportuna, melhorando a sobrevida e a qualidade de vida das mulheres (PINOTTI & TEIXEIRA, 2000).

Com o advento da mamografia e a gradual difusão do método, associada a uma maior conscientização da população sobre a sua importância, pôde-se observar a redução significativa no tamanho dos tumores diagnosticados em alguns países desenvolvidos. Além disso, tem se verificado uma diminuição de

cirurgias radicais (mastectomias), em favor das mais conservadoras (setorectomia/quadrantectomia) e menos traumáticas (FISHER et al., 1998).

Em 1952, Haagensen preconizou pela primeira vez o auto-exame das mamas (MARSILLAC, 1994). Apesar de ter sido amplamente estimulado como método capaz de melhorar o prognóstico do câncer de mama, atualmente, sua eficácia é discutível. Diversos estudos, em sua maioria tipo caso-controle, demonstraram que este método não foi capaz de promover impacto estatisticamente significativo na redução da mortalidade e na detecção em estádios mais precoces do câncer de mama. Constatou-se apenas aumento na taxa de biópsias de lesões benignas (BARRA et al., 2004).

O direcionamento terapêutico do Câncer de Mama exige esforços que incluam múltiplas abordagens, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia (MEISNER et al., 2008). Contudo, independentemente do tratamento, é imprescindível que se considere, também, em todos os casos, as características individuais, tanto clínicas, como psicológicas, visando obter uma melhor qualidade de vida pós-tratamento (NBCC, 2006). Além disso, as pesquisas em oncologia apontam que no futuro o diagnóstico precoce do câncer e os critérios prognósticos e terapêuticos serão guiados, principalmente, pelo monitoramento de marcadores tumorais, detectados em tumores sólidos, em células tumorais circulantes no sangue periférico, nos linfonodos, na medula óssea ou em outros fluidos corporais, preconizando novas perspectivas nessa área de estudo (LINDBLOM & LILJEGREN, 2000).

2.4 Aspectos Moleculares

No nível molecular, o câncer é tido como uma doença eminentemente genética onde modificações genômicas, herdadas ou adquiridas ao longo da vida, estão na base da sua gênese. Sólidas evidências indicam que modificações de bases, deleções, inserções, recombinações, amplificação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumores estão relacionadas com processos de tumorigênese e metástases (SUGIMURA & USHIJIMA, 2000). Enquanto alterações genéticas e epigenéticas na cascata de regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação de células epiteliais mamárias são prováveis

iniciadores da carcinogênese, evidências indicam que as respostas de células presentes no estroma tecidual podem promover a progressão do tumor, culminando em processos metastáticos (DE NARDO & COUSSENS, 2007).

Existem mais de 100 tipos de cânceres e diversos subtipos, mas todos eles ou, praticamente todos, compartilham alterações essenciais da fisiologia celular que, em conjunto, ditam o avanço tumoral. São elas: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento, 2) insensibilidade aos sinais de inibição clonal, 3) evasão a apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) autonomia angiogênica, 6) capacidade metastática (YANG et al., 2004).

Embora o diagnóstico histopatológico tenha sido largamente utilizado como referência no delineamento terapêutico, oncologistas, patologistas e cirurgiões acreditam que os parâmetros atualmente disponíveis não são suficientes na abordagem de todos os casos clínicos. Consequentemente, pesquisadores têm direcionado seu esforços no delineamento do perfil de expressão gênica apresentado pelos diversos tipos de tumores mamários (GEYER et al., 2009).

Os marcadores moleculares tumorais têm sido progressivamente utilizados na prática clínica com expressivo valor prognóstico e terapêutico. A expressão de Receptor de Estrógeno (ER), Receptor de Progesterona (PR) e Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidermal Humano (HER2) são rotineiramente rastreados em novos casos diagnosticados com Câncer de Mama. O ER e PR são marcadores para a capacidade responsiva a hormônio-terapia e o HER2, por sua vez, encontra-se super-expresso em 20% a 30% dos casos, sendo associado a maiores índices de recorrência e diminuição da sobrevida das pacientes (MEISNER et al., 2008).

As pacientes que apresentam positividade para o gene HER2 são candidatas ao tratamento com um anticorpo monoclonal humanizado que foi considerado o marco de uma nova fase no tratamento contra o Câncer de Mama, conhecido como *Trastuzumab* (HALL & CAMERON, 2009). A adição desse anticorpo recombinante ao tratamento tradicional em estágios iniciais e avançados do tumor tem melhorado os resultados contra a doença com poucas recorrências e mortes (MEISNER et al., 2008). Contudo, alguns pacientes não respondem ao tratamento, há progressão da doença após cerca de um ano e a

administração prolongada do medicamento tem culminado em perfis de cardiotoxicidade (HALL & CAMERON, 2009).

Portanto, os biomarcadores tumorais identificados podem tanto demonstrar mudanças genômicas, como deleções, amplificações ou polimorfismos, quanto alterações no perfil protéico do paciente tornando-se novos e possíveis alvos terapêuticos na luta contra o câncer (LATTERICH et al., 2008).

3 IMUNIDADE E O CÂNCER

As primeiras constatações de regressão tumoral em pacientes acometidos por alguma infecção bacteriana datam de 1892. Entretanto, apenas recentemente as inter-relações entre imunidade inata e adquirida vêm sendo sistematicamente estudadas e reconhecidas (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997). Em 1960 e 1970 MacFarlane Burnet e Melbourne formularam, baseados nos conhecimentos disponíveis nesse período, a teoria da sobrevivência imunológica (*immune surveillance*). Segundo esses autores os linfócitos seriam responsáveis por proteger os indivíduos imunocompetentes contra o aparecimento de tumores e o surgimento de uma doença neoplásica seria resultado de uma falha no sistema de vigilância. A maior incidência de câncer em indivíduos idosos ou com baixa resistência imunológica têm corroborado essa teoria. Além disso, para alguns tumores tais como melanoma e carcinoma mamário medular, a presença de infiltrado linfocítico é associada a um melhor prognóstico (DUPONT, 2002).

Contudo, dados recentes têm revelado que, em locais em que a exposição carcinogênica não se relaciona a fatores etiológicos da doença, muitas mulheres imunocomprometidas exibem um risco reduzido de desenvolver tumores epiteliais como o câncer de mama. Portanto, estudos epidemiológicos indicam que o risco global para o aparecimento e progressão do CM pode ser em parte, regulado pelo status imunológico individual das pacientes (DENARDO & COUSSENS, 2007).

Atualmente, o maior desafio no estudo da imunologia de tumores é a identificação de antígenos neoplásicos específicos ou associados capazes de desencadear uma resposta imune no paciente (PREUSS et al., 2002). Contudo, a imunogenicidade tumoral não se restringe a antígenos isolados, mas a múltiplos

marcadores, envolvidos em inúmeros processos e cascatas de sinalização (SAHIN et al., 1995).

O primeiro foco terapêutico baseado no conhecimento da imunologia de tumores concentra-se em estimular o sistema imune contra os antígenos neoplásicos. Nesse sentido, foram desenvolvidos inúmeros protocolos de vacinação contra o câncer, capazes de produzir anticorpos e ativar os linfócitos T, porém, sem eficácia clínica comprovada (DUPONT, 2002). O mapeamento de anticorpos produzidos por pacientes de câncer de próstata utilizando biblioteca de peptídeos apresentada em fagos foi capaz de identificar um potencial marcador de progressão tumoral, a proteína GRP78, altamente expressa em metástases (MINITZ et al, 2003). Essa abordagem, feita em larga escala, poderia permitir a identificação de marcadores moleculares específicos para cada tipo de tumor e, atualmente, já foram isolados anticorpos monoclonais específicos de carcinoma de mama utilizando a técnica de *Phage Display* (MAZUET et al., 2006).

Tradicionalmente, a maioria dos métodos de identificação de marcadores tumorais é baseada em anticorpos monoclonais contra proteínas das quais se tenha alguma suspeita. A utilização de metodologias de varredura sem conhecimento prévio das proteínas expressas no câncer propicia a identificação de novos e desconhecidos marcadores tumorais. A técnica de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos permite a utilização não apenas de um anticorpo monoclonal, mas de uma vasta biblioteca de anticorpos ou peptídeos contra o conjunto de proteínas do tumor (AUSTIN, 1989).

Novas perspectivas apontam, contudo, para pesquisas pós-genômicas na busca de alvos antigênicos capazes de mimetizar a especificidade apresentada pela resposta imune adaptativa. A utilização terapêutica de anticorpos monoclonais (mAbs) concentra-se basicamente na ligação e neutralização de seu alvo protéico com direta aplicação diagnóstica e terapêutica (FILPULA, 2007).

4 IMUNOGLOBULINAS

Os anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são moléculas capazes de localizar, reconhecer e ligar-se a antígenos específicos com a finalidade de inativar ou dar início à sua eliminação. Essas moléculas são produzidas por linfócitos B, têm caráter glicoprotéico e estão presentes no sangue circulante e na linfa. Existem cinco classes de imunoglobulinas diferentes (IgM, IgG, IgE, IgA, e IgD), sendo a IgG a mais abundante e mais utilizada para fins terapêuticos e biotecnológicos (SILVERTON 1977).

O esquema estrutural de uma molécula de anticorpo está representado na Figura 2. Os anticorpos são organizados em dois domínios com estruturas e funções distintas, que compreendem duas cadeias pesadas idênticas (50kDa) e duas cadeias leves idênticas (25kDa), sendo as últimas constituídas por um domínio variável (VL) e um domínio único constante (CL), enquanto as cadeias pesadas contêm um domínio variável (VH) e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). Funcionalmente, os anticorpos são divididos em partes: dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fabs) e uma região constante (Fc), permanecendo ambas unidas por uma região flexível na forma de dobradiça, estabilizadas por pontes dissulfeto. As regiões aminotermiais dos domínios variáveis nas cadeias leve (VL) e pesada (VH) constituem a região variável (Fv) e representam os pontos de ligação aos antígenos. Cada domínio variável (V) possui três regiões que são hipervariáveis em suas seqüências de aminoácidos, as quais ocorrem em forma de *loops*. Estes *loops* hipervariáveis, denominados regiões determinantes de complementariedade (CDRs), são os principais responsáveis pelo reconhecimento antigênico e, em conjunto, formam o paratopo do anticorpo. Os resíduos de aminoácidos presentes nas regiões variáveis, porém fora das CDRs, são enovelados de forma a dar suporte aos loops, assim, estes resíduos apresentam a função de manter cada loop em posição adequada para interagir com o antígeno (Figura 2) (KIM et al. 2005).

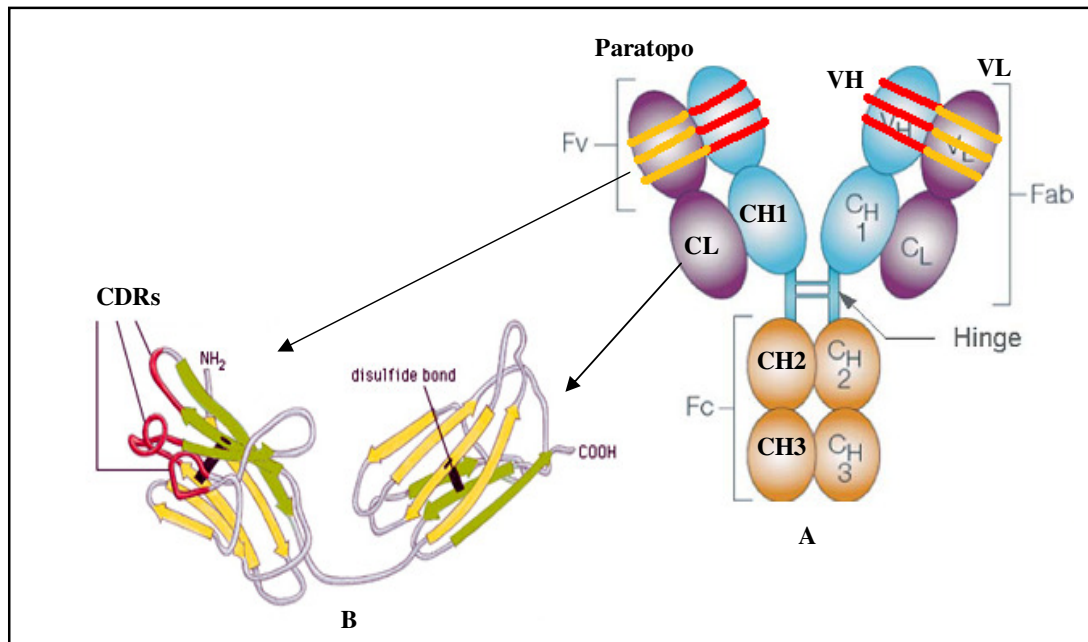


Figura 2. Representação esquemática de uma IgG. Em A: CH1, CH2 e CH3 representam os domínios constantes da cadeia pesada. CL aponta o domínio constante da cadeia leve. VL representa domínio variável da cadeia leve. VH indica o domínio variável da cadeia pesada. Linhas laranja e vermelhas representam as CDRs das cadeias leves e pesadas. Em B: A estrutura do domínio VL destacando-se as CDRs em forma de loops (vermelho), as folhas β pregueadas antiparalelas que estabilizam as alças (verde e amarelo); A estrutura do domínio CL mostrando as folhas β pregueadas antiparalelas (verde e amarelo) e uma ponte dissulfeto intracadeia (preto). Fonte: Kim et al. (2005).

A porção Fc do anticorpo medeia funções efetoras de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Em respostas tipo ADCC, os anticorpos utilizam a porção Fc para interação com células efetoras (células *Natural Killer* e macrófagos) podendo acionar os processos de fagocitose ou lise celular. Contudo, em respostas tipo CDC, os anticorpos destroem a célula alvo por desencadear a cascata do complemento na superfície celular. Além disto, a região Fc está associada com a meia-vida sérica do anticorpo, como exemplo, a IgG humana tipo 1 apresenta uma meia-vida de aproximadamente três semanas, já em fragmentos de anticorpos sem a porção Fc, a meia-vida reduz-se a algumas horas (KIM et al., 2005).

A variabilidade dos anticorpos em humanos é garantida por um processo de rearranjo gênico que ocorre em nível cromossomal nos *loci* de

imunoglobulinas. Três *loci* separados codificam, respectivamente, todas as cadeias pesadas, a cadeia leve κ e a cadeia leve λ das Igs e cada *locus* encontra-se em um cromossomo diferente (FARNER et al, 1999). A organização e a relação dos segmentos gênicos dos domínios das cadeias pesadas e leves da Ig estão representadas na Figura 3.

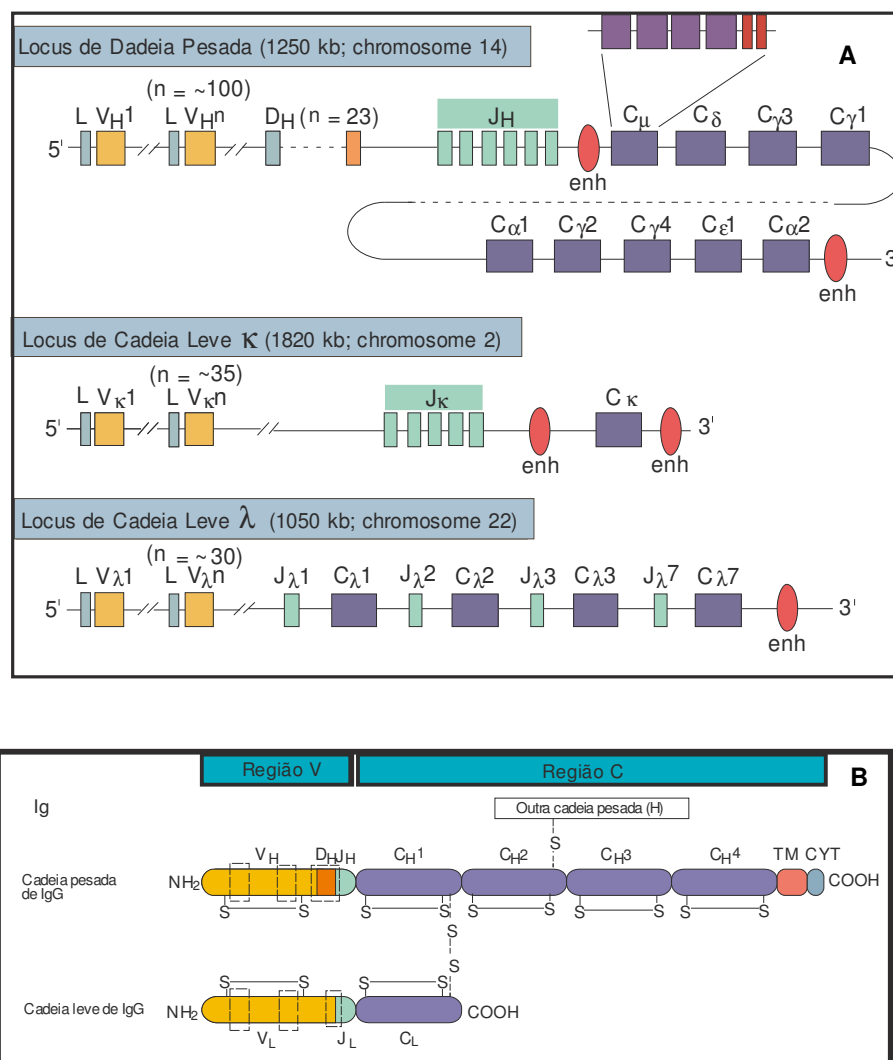


Figura 3: Relação dos segmentos gênicos das cadeias de imunoglobulinas. Em A: *Loci* de Ig humana na linhagem germinativa. São mostrados apenas os genes funcionais. Cada gene CH é representado como um quadro simples, mas composto de vários exons, como em C_μ. Os segmentos gênicos são indicados como segue: L, líder; V, variável; D, diversidade; J, junção; C, constante, enh, *enhancer*. Em B: Domínio das proteínas de Ig. Fonte: Abbas & Lichtman (2003).

Os genes das imunoglobulinas estão organizados essencialmente do mesmo modo em todos os mamíferos, embora a localização no cromossomo, o número e a seqüência dos diferentes genes possam variar. O *locus* em cada linhagem germinativa é feito de inúmeras cópias de pelo menos três diferentes tipos de segmentos gênicos, o V, C e o segmento de junção (J). Além disso, o *locus* da cadeia pesada tem um segmento adicional de diversidade (D). Dentro do *locus*, os agrupamentos de cada tipo de segmento são separados por regiões intrônicas (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

Embora cada segmento variável seja diferente em sua seqüência, os genes podem ser agrupados em múltiplas famílias. Os membros de cada família conservam cerca de 70% a 80% de homologia entre si, provavelmente devido à duplicação gênica durante o processo evolutivo. Os segmentos gênicos VH estão divididos em três subgrupos e sete famílias. O subgrupo I comporta as famílias VH1, VH5 e VH7, o subgrupo II as famílias VH2, VH4 e VH6 e, por último, o subgrupo III compreende apenas a família VH3, a mais abundante no repertório humano (HONJO & MATSUDA, 1995). Os genes Vk são divididos em seis subgrupos: Vkl, VkII, VkIII, VkIV, VkV e VkVI. A família Vkl possui o maior número de segmentos gênicos funcionais, porém o segmento mais representado no repertório humano é o A27, pertencente a família VkIII (VARGAS-MADRAZO et al., 1997).

A recombinação gênica acontece de forma a unir segmentos VH, D e JH (para cadeia pesada) e VL e JL para cadeia leve, com inserções e perdas nucleotídicas. O processo de rearranjo é o grande responsável pela variabilidade dos receptores de células B. Na medula óssea, o linfócito B maduro apresenta em sua superfície o receptor de célula B (BCR) sob a forma de uma IgM ou IgD transmembrânica, as quais se dirigem, posteriormente, aos órgãos linfóides secundários. Nesses compartimentos, antígenos reconhecidos pelos BCR realizam a seleção clonal com mudança isotípica (para IgG, IgA ou IgE) e transformação de linfócitos B em plasmócitos, células especializadas na produção de imunoglobulinas solúveis (ABBAS & LICHTMAN, 2003).

Os anticorpos possuem uma vasta aplicação, principalmente na área médica. Além de serem utilizados em tratamentos e diagnósticos de diversas doenças também podem atuar como marcadores celulares, moduladores da

rejeição em pacientes transplantados, na desintoxicação por drogas, na composição de conjuntos reativos (*kits*) para diagnóstico como, por exemplo, sarampo, dengue 1, 2, 3 e 4, hepatite A, B e C, leptospirose, febre amarela. Atualmente, essas proteínas têm sido também estudadas na terapia de uma grande variedade de doenças auto-imunes, como artrite, lúpus eritematoso, anemia e asma e ainda em diversas formas de imunoterapia, como no caso do tratamento de câncer (JÄGER & KNUTH, 2005).

Os principais modos de ação dos anticorpos na inibição do desenvolvimento de tumores incluem mecanismos imunes e mecanismos que interceptam as vias da tumorigênese. Dentre os mecanismos imunes encontram-se a ativação do sistema complemento e a resposta celular aos antígenos identificados. Os mecanismos que interceptam a tumorigênese abrangem tanto a indução apoptótica e o bloqueio angiogênico, quanto à inibição da proliferação celular com conseqüente interferência em inúmeras cascatas de sinalização e aceleração da internalização de receptores (BEM-KASUS et al., 2007).

Os linfócitos B são reconhecidos como grande contribuidores na resposta imune anti-tumoral, justamente por estarem envolvidos na secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas. Apesar de estar bem estabelecido que a ativação de células B participa na erradicação de estágios neoplásicos iniciais com espontânea regressão do tumor, dados recentes também têm indicado que a ativação crônica desses linfócitos pode, paradoxalmente, potencializar o desenvolvimento do câncer (DE NARDO & COUSSENS, 2007). Estudos têm demonstrado que aproximadamente 20% dos cânceres de mama invasivos contem um elevado número de células B que compreendem cerca de 60% da população linfocítica associada à neoplasia (PUNT et al., 1994). Essa situação exacerba o processo inflamatório e sugere que, nesses casos, o papel dos anticorpos esteja muito mais relacionado na resposta inata do que na regulação da sobrevivência de células neoplásicas. De fato, esse microambiente neoplásico pode ser propiciado pelo recrutamento de células da imunidade inata, como macrófagos e apresentadores de antígenos, ou pela ativação do sistema complemento, ambas direcionadas pela porção Fc dos anticorpos, favorecendo a proliferação celular e angiogênese (DE NARDO & COUSSENS, 2007). Portanto,

tornam-se necessários novos esforços na busca de alternativas biotecnológicas para o diagnóstico e tratamento do Câncer de Mama.

5 ENGENHARIA DE ANTICORPOS

Atualmente, terapias baseadas na utilização de mAbs representam uma das mais promissoras áreas na indústria farmacêutica. Os anticorpos têm se mostrado um excelente paradigma na busca de moléculas altamente específicas a seus alvos protéicos desempenhando um papel central nas pesquisas pós-genômicas (HUST & DÜBEL, 2004; HOLLIGER & HUDSON, 2005).

Em 1975, a tecnologia de hibridoma permitiu a construção de um anticorpo terapêutico murino anti-CD3, o primeiro aprovado oficialmente pelo FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) para uso em terapia no tratamento de rejeição aguda em transplantes de rins, coração e fígado (MORO & RODRIGUES 2001; LI et al. 2005). Apesar da enorme expectativa, essa molécula falhou em seus objetivos terapêuticos, ao induzir severa resposta imune contra o anticorpo construído. Buscando reduzir a imunogenicidade desencadeada por essa tecnologia, anticorpos quiméricos passaram a ser construídos a partir de regiões variáveis provenientes de camundongos e regiões constantes baseadas em genes humanos. Contudo, novamente constatou-se uma resposta imune contra esses anticorpos quiméricos (KIM et al., 2005).

Assim, em 1996, Jone e colaboradores construíram anticorpos humanizados visando, justamente, minimizar as limitações até então encontradas. Nessa nova estratégia, apenas os *loops* das CDR de murinos são fusionados às *frameworks* dos domínios variáveis humanos. Para a construção de um anticorpo totalmente humanizado, a porção constante do anticorpo humano é mantida e a porção variável de roedores é desenhada de forma que sua seqüência, fusionada ao anticorpo, se assemelhe ao máximo à Fv humana. Essas tecnologias de humanização de anticorpos estão ilustradas na Figura 4.

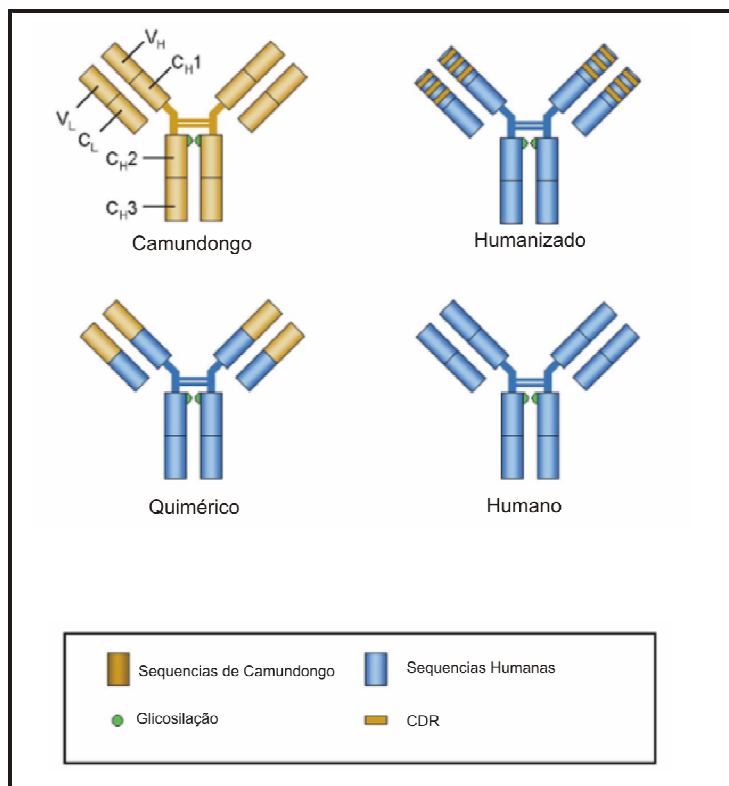


Figura 4: Tecnologias de humanização de anticorpos. Fonte: Kim et al. (2005)

Os domínios funcionais e estruturais dos anticorpos podem ser removidos por digestão protéica. A papaína, por exemplo, cliva a molécula de IgG na região de dobradiça e libera três fragmentos: dois Fab (fragmento de ligação ao antígeno) e um Fc (fragmentos constantes). Já a pepsina degrada o fragmento Fc e libera dois Fab ligados (Fab)₂ (Figura 5). Com o desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante criou-se a possibilidade de produzir esses fragmentos funcionais de anticorpos baseados na manipulação das suas seqüências codificadoras, o que possibilita gerar diversas combinações funcionais com grande potencial clínico (AZZAZY & HIGHSMITH JR, 2002). Estes fragmentos podem ser utilizados como agentes terapêuticos, pois seus paratopos não são afetados pela clivagem proteolítica, e a ausência do fragmento Fc heterólogo ao organismo humano contribui para minimizar os efeitos indesejáveis neste tipo de tratamento (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

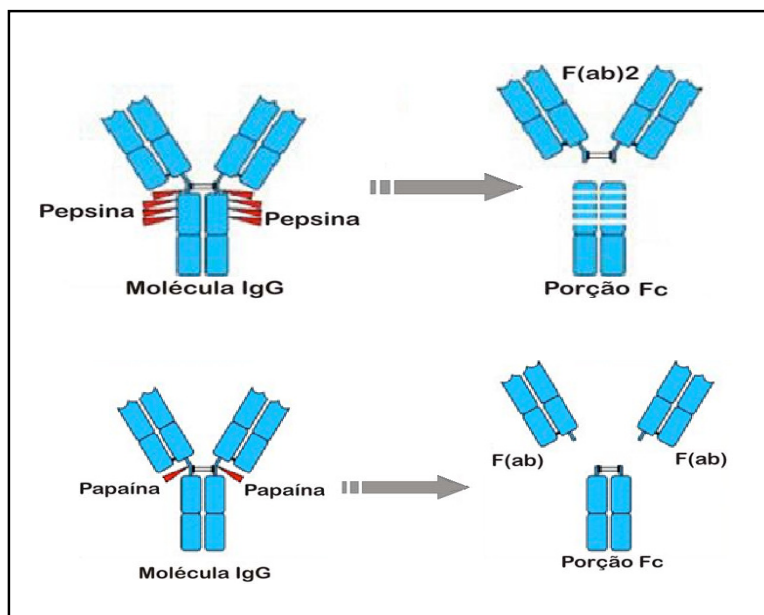


Figura 5: Representação esquemática de uma molécula de imunoglobulina e de seus fragmentos gerados após clivagem com pepsina e papaína. Fonte: França & Málaque (2003).

A molécula completa de anticorpo apresenta uma massa molecular de aproximadamente 150Kda, o que lhe confere pouca difusão vascular, penetração tecidual e clareamento após sua atuação. Os fragmentos de anticorpos do tipo Fab (fragmento ligante de antígeno), scFv (fragmento variável de cadeia única), *diabodies*, *triabodies* e multímeros apresentam ambos os domínios VH e VL com a garantida especificidade, monovalência e afinidade antigênica das IgG, porém sem a sua porção Fc, responsável por respostas indesejáveis, principalmente no tratamento de tumores (HOLLIGER & HUDSON, 2005; KIM et al., 2005).

Atualmente, existe uma série de anticorpos e fragmentos de anticorpos aprovados (ou em testes) pelo FDA para uso terapêutico humano, sendo que a maioria destinada às aplicações clínicas tem origem na engenharia genética. Como exemplos, estão descritas moléculas Fabs, scFvs, anticorpos quiméricos e ainda os denominados humanizados (*human-like*) (Tabela 1) (CO & QUEEN 1991; HOLLIGER & HUDSON 2005; KIM et al. 2005).

Tabela 1: Fragmentos de anticorpos Fab e scFv aprovados (ou em testes) nos EUA para uso terapêutico.

Tipo de fragmento/ fonte	Nome (genérico)	Molécula alvo	Indicação	Web site
Fab/ quimérico	ReoPro (abciximab)	GpIIb/gpIIIa	Doenças cardiovasculares	http://www.lilly.com/
Fab/ ovino	CroFab	Peçonha serpente	Rattlesnake bite (antídoto)	http://www.savagelabs.com/
Fab/ ovino	DigiFab	Digoxina	Overdose com digoxina	http://www.savagelabs.com/
Fab/ ovino	Digibind	Digoxina	Overdose com digoxina	http://www.gsk.com/
Fab/ camundongo	CEA-scan (arcitumomab)	CEA	Câncer colorretal	http://www.immunomedics.com/
Fab / humanizado	Lucentis (ranibizumab; Rhu-Fab)	VEGF	Degeneração macular	http://www.gene.com/
Fab/ humanizado	Thromboview	D-dímero	Trombose venosa	http://www.agenix.com/
Fab/ humanizado	CDP791	VEGF	Anti-angiogenesis	http://www.nektar.com
Fab/ humanizado	CDP870	TNF- α	Doença de Crohn	http://www.nektar.com
Fab/ humanizado	MDX-H210	Her2/Neu e CD64	Câncer de mama	http://www.medarex.com/
scFv/ humanizado	Pexelizumab	Complemento C5	Revascularização	http://www.alexionpharmaceuticals.com/
Diabody (V _H -V _L) ₂ /humano	C6.5K-A	Her2/Neu	Cânceres de mama e de ovário	
Minibody quimérico	10H8	Her2	Cânceres de mama e de ovário	
scFv / humano	F5 scFv-PEG	Her2	Câncer de mama	
Minibody quimérico	10H8	Her2	Cânceres de mama e de ovário	
Diabody (V _H -V _L) ₂ humano	L19 L19- Ψ IFN	EDB	Diagnostico: antiangiogenesis e placas artereoscleróticas	
Diabody (V _L -V _H) ₂ humano	T84.66	CEA	Diagnóstico: câncer colorretal	
Minibody (scFv-C _H 3) ₂ / quimérico	T84.66	CEA	Câncer colorretal	

Adaptado de Holliger & Hudson (2005).

Esses dados demonstram que a construção de fragmentos de anticorpos tem apresentado, progressivamente, um importante papel na busca de biomarcadores e no tratamento do câncer, ao identificar antígenos tumorais. O desenvolvimento de métodos de expressão dessas moléculas em bactérias e sua apresentação no capsídeo de fagos filamentosos têm se mostrado como uma tecnologia robusta capaz de gerar anticorpos recombinantes, mimetizando o próprio sistema imune na seleção clonal (KIPRIYANOV, 2004; KIM et al., 2005).

6 BIBLIOTECAS DE ANTICORPOS APRESENTADAS EM FAGOS FILAMENTOSOS (*PHAGE DISPLAY LIBRARIES*)

Em 1985, Smith expressou a enzima de restrição *Eco* RI ligada a proteína três (pIII) de um bacteriófago. Com este trabalho, ele introduziu a metodologia denominada *Phage display*, a qual tem por base a expressão de peptídeos ou proteínas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante permanece em seu genoma (SMITH & PETRENKO, 1997; AZZAZY & HICHSMITH, 2002).

Tipicamente, utilizam-se os vírus filamentosos bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1) (SIDHU, 2001) que parasitam bactérias Gram-negativas e que, necessariamente, apresentam pilus F. Em geral, o bacteriófago M13 não apresenta um ciclo lisogênico, mas é capaz de induzir um estado no qual a célula infectada origina e libera continuamente novas partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (SMITH & PETRENKO, 1997; AZZAZY & HICHSMITH, 2002, RUSSEL et al., 2004).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 6). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas do capsídeo. Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII, capaz de reconhecer moléculas alvos presentes no mais diversos substratos (SMITH & PETRENKO, 1997). A expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético permanece no interior desse. As novas partículas de fago são montadas no espaço periplasmático da bactéria (BENHAR, 2001).

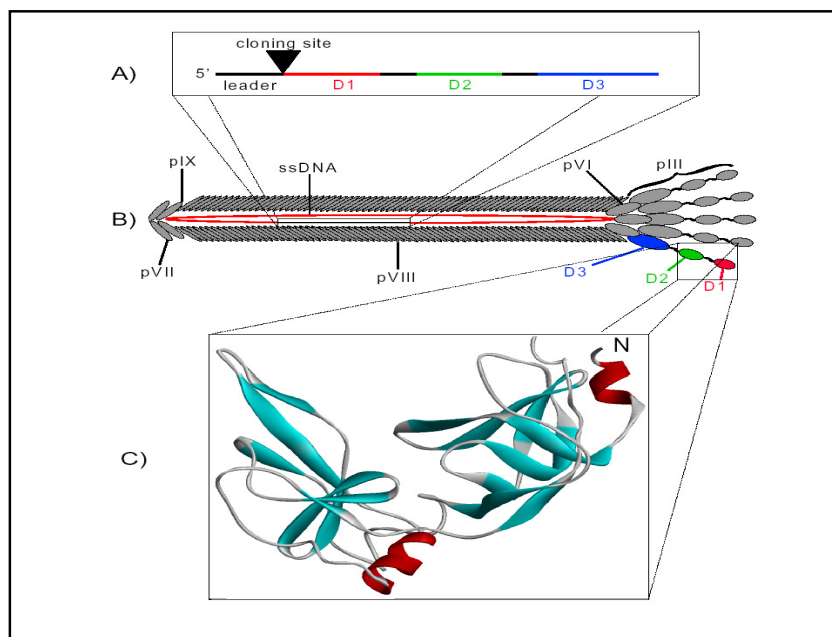


Figura 6: Esquema de um fago filamentosso. A) Composição do gene III, mostrando o sitio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínio D1 e D2 da proteína III, as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em azul ciano.

Recentemente, técnicas envolvendo a análise de bibliotecas protéicas vêm sendo empregadas para a seleção de moléculas com funções específicas. Tais técnicas têm sido utilizadas para aumentar a atividade de enzimas (DERMATIS et al., 1999), melhorar a afinidade de ligação e especificidade (ATWELL & WELLS, 1999), aumentar a estabilidade de proteínas, identificar melhores ligantes para receptores (KOIVUNEN et al., 1999) ou selecionar novos inibidores de proteinases (KIEZAK et al., 2001). Ao escolher uma estratégia de seleção para um determinado alvo, é preciso considerar como isolar e caracterizar proteínas funcionais de uma biblioteca. A técnica de expressão de proteínas na superfície de fagos filamentosos é uma tecnologia simples, que permite relacionar o fenótipo desejado à sequência do DNA, permitindo o escrutínio de bibliotecas com título de até 10^{12} diferentes fagos (WITTRUP, 1999).

Em 1990, foram obtidos os primeiros fragmentos de anticorpos expressos em fagos, tratando-se de uma das técnicas mais poderosas na seleção de anticorpos recombinantes (MCCAFFERTY et al. 1996). Nesse sentido, a técnica de *Phage Display* pode ser usada: (1) na geração de anticorpos monoclonais para

imunoterapia, (2) no isolamento de anticorpos a partir de pacientes exposto a um determinado patógeno e (3) no estudo de anticorpos autoimunes (AZZAZY & HICHSMITH, 2002).

Os fagomídeos representam uma alternativa prática ao uso e manipulação do DNA viral para expressão de anticorpos recombinantes. Os fagomídeos são plasmídeos que possuem: origem de replicação bacteriana (*E. coli*); origem de replicação viral; gene de fusão (*pIII* ou *pVIII*); sítio de inserção do fragmento codificante do anticorpo, ou qualquer outra proteína de interesse; e genes de resistência a antibióticos para seleção em meio apropriado. Como os fagomídeos não possuem todos os genes das proteínas necessárias para o encapsidamento da partícula viral, fagos auxiliares (*helper*) contendo todos os genes dos bacteriófagos filamentosos são utilizados nas culturas de células transformadas com o fagomídeo, permitindo o resgate da partícula viral (BRÍGIDO & MARANHÃO 2002; RUSSEL et al., 2004). Durante a infecção viral, o DNA proveniente dos fagomídeos é preferencialmente revestido pelas proteínas estruturais, pois os fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação, dificultando a reprodução e empacotamento de seu próprio material genético (BARBAS et al. 2001).

Os anticorpos expressos na superfície de fagos possibilitam a seleção de seqüências baseadas em sua afinidade de ligação a uma molécula alvo (antígeno) por um processo de seleção *in vitro*. Em um ciclo de seleção, as moléculas de anticorpos em solução são incubadas com a molécula alvo. Os fagos contendo anticorpos com afinidades pelo alvo são capturados e permanecem ligados; já os fagos não ligados (não específicos) são eliminados por sucessivas lavagens. O *pool* de fagos ligados ao alvo é então eluído e amplificado (amplificados em *Escherichia coli*). Os fagos resultantes deste processo são titulados e submetidos a uma nova seleção (ligação ao alvo, eluição e amplificação), visando obter anticorpos mais específicos. Após três ou quatro repetições deste processo, clones individuais são submetidos a ensaios imunológicos e suas seqüências de DNA podem ser obtidas por seqüenciamento (BARBAS et al. 2001).

Para a construção de uma biblioteca combinatória de anticorpos, é necessária a obtenção de genes rearranjados codificadores das cadeias variáveis

pesadas e leves. Estes genes podem ser sintetizados por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) e RT-PCR (transcrição reversa - PCR), realizadas a partir de mRNAs extraídos de células sanguíneas periféricas (em particular os linfócitos B) ou da medula óssea de pacientes (AZZAZY & HICHSMITH, 2002).

Diversas bibliotecas combinatoriais de fragmentos de anticorpos expressas na superfície de fagos filamentosos tem sido construídas com o intuito de selecionar anticorpos contra diferentes antígenos (GRIFFITHS et al., 1994; DE HAARD et al., 1999; WU et al., 2001; LU et al., 2002; PANSRI et al., 2009) incluindo proteínas de tumores como melanoma (CAI & GAREN, 1995), câncer colorretal (SOMERS et al., 2002), câncer de próstata (MINTZ et al., 2003; POPKOV et al., 2004; ZHANG et al., 2007) e câncer de mama (MAZUET et al., 2006).

As bibliotecas construídas a partir do repertório *naïve* de voluntários não expostos ao antígeno alvo, embora mais amplamente utilizadas, apresentam algumas desvantagens. Nessa estratégia, bibliotecas de tamanho reduzido tendem a apresentar anticorpos com baixa afinidade, o que exige esforços elevados durante a sua construção. Além disso, a qualidade dessa biblioteca é influenciada pela expressão desigual dos genes das cadeias variáveis, uma vez que o histórico de linfócitos B de cada doador é desconhecido. Por outro lado, bibliotecas construídas a partir do repertório imune de animais também possuem algumas limitações, como o longo período para sua imunização, a ausência de resposta a antígenos próprios, possibilidade da ausência de resposta o antígeno alvo e necessidade de humanização dos anticorpos obtidos para a prática terapêutica (AZZAZY & HICHSMITH, 2002). Embora pouco utilizadas, também há relatos de bibliotecas sintéticas na literatura com intuito terapêutico (YANG et al., 2009).

Uma solução para os problemas até então encontrados nessa tecnologia é a construção de bibliotecas combinatoriais a partir do repertório de indivíduos imunizados. Nesse caso, mesmo bibliotecas menores ($\sim 10^5$ fagos) são capazes de oferecer anticorpos altamente específicos. Além disso, como os genes já sofreram todo o processo de maturação *in vivo*, anticorpos podem ser isolados, sem a necessidade de qualquer mecanismo de maturação pós-seleção (KIM et al., 2005).

Atualmente, a maioria das bibliotecas são construídas no formato scFv. Contudo, esses fragmentos tendem a formar dímeros, através de um mecanismo sem qualquer possível predição. As moléculas de anticorpos multiméricas se ligam mais fortemente a um antígeno imobilizado, o que lhe confere uma maior avidéz. Contudo, tornam-se necessários trabalhos adicionais para a individualização dos clones com o intuito de se analisar sua real afinidade. Os fragmentos do tipo Fab, além de mais estáveis, ocorrem em formatos monoméricos, o que permite uma rápida triagem de clones baseada, impreterivelmente, em sua afinidade ao antígeno estudado (DE HAARD et al., 1999).

A técnica *Phage Display*, aliada à tecnologia de construção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos, poderão gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento individualizado de pacientes. É muito provável que a análise do complexo conteúdo protéico de tecidos e diferentes fluidos biológicos tenha, no futuro, um impacto significativo na avaliação e no diagnóstico, não só do câncer, mas, também, de muitas outras patologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H. Maturação dos linfócitos e expressão dos genes do receptor de antígenos. In:_____. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2003. cap. 7, p.133-167.

ANACLETO, C. *Aspectos da metilação do DNA em câncer colorretal e de pulmão na espécie humana*. 2004.161 f. Tese (Doutorado)- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

ATWELL, S.; WELLS, J.A. Selection for improved subtiligases by phage display. *Procedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 96, p. 9497-9502, 1999.

AUSTIN, P. Will dAbs challenge mAbs? *Nature*, v. 341, p. 484-485, 1989.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH JR, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v. 35, p. 425-445, 2002.

BAQUET, C. R.;COMISKEY, P. Socioeconomic factors and breast carcinoma in Multicultural Women. *Cancer*, v.88, n.5, p. 1256-1264, 2000.

BARBAS, C. F.; DENNIS, R. B.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Phage Display. In:_____. *Phage Display A laboratory Manual*. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, cap. 1, p. 1.1-1.37.

BARRA, A.; DE LUCENA, C. E. M.; LAGES, A. F.; SILVA, B. J.; BARRA, S. J.; SILVA JUNIOR, G. A.; SILVA, S. Z. C.; GARCIA, I. C. Controvérsias no rastreamento do câncer de mama. *Femina*, v. 32, p. 751-757, 2004.

BEN-KASUS, T.; SCHECHTER, B.; SELA, M.; YARDEN, Y. Cancer therapeutic antibodies come of age: Targeting minimal residual disease. *Molecular Oncology*, v. 1, p. 42-54, 2007.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnololgy Advances*, v. 19, p. 1-33, 2001.

BIRNBAUM, D.; BERTUCCI, F.; GINESTIER, C.; TAGETT, R.; JACQUEMIER, J.; CHARAFE-JAUFFRET, E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? *International Journal of Oncology*, v. 25, p. 249-258, 2004.

BITTNER, J. J. The causes and control of mammary cancer in mice. *Harvey Lectures*, v. 42, p. 221-246, 1948.

BOFFETTA, P.;HASHIBE, M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncology*, v.7, p. 149-56, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer*. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2009.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotechnoloiga-Ciência e Desenvolvimento*, v. 26, p. 44-51, 2001.

BRODY, L.; BIESECKER, B. Breast cancer susceptibility genes, BRCA1 and BRCA2. *Medicine*, v. 77, p. 208-226, 1998.

CAI, X.; GAREN, A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: Selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Procedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 92, p. 6537-6541, 1995.

CALLAGY, G.; CATTANEO, E.; DAIGO, Y.; HAPPERFIELD, L.; BOBROW, L. G.; PHAROAH, P. D.; CALDAS, C. Molecular classification of breast cancers using tissue microarrays. *Diagnostic Molecular Pathology*, v. 12, p. 27-34, 2003.

CANCER, C. G. O. H. F. I. B. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet Oncology*, v.347, p. 1713-1727, 1996.

CHLEBOWSKI, R. T.; HENDRIX, S. L.; LARGER, R. D. STEFANICK M. L.; GASS, M.; LANE, D.; RODABOUGH R. J.; GILLIGAN, M. A.; CYR, M. G.; THOMSON C. A.; KHANDEKAR, J.; PETROVITCH, H.; MCTIERNAN A. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA*, v. 289, p. 3243-3253, 2003.

CO, M. S.; QUEEN, C. Humanized antibodies for therapy. *Nature*, v.3 51, p.501-502, 1991.

DE HAARD, H. J.; VAN NEER, N.; REURS, A.; HUFTON, S. E.; ROOVERS, R. C.; HENDERIKX, P.; DE BRUÏNE, A. P.; ARENDS, J. W.; HOOGENBOOM, H. R. A large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 26, p. 18218-18230, 1999.

DEMARTIS, S.; HUBER, A.; VITI, F.; LOZZI, L.; GIOVANNONI, L.; NERI, P.; WINTER, G.; NERI, D. A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. *Journal of Molecular Biology*, v. 286, p. 617-633, 1999.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Balancing immune response: crosstalk between adaptative and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, v. 9, n.4, p.212-222, 2007.

DEUGNIER, M. A.; TEULIÈRE, J.; FARALDO, M. M. THIERY, J. P.; GLUKHOVA, M. A. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Research*, v. 4, p. 224-230, 2002.

DIAB, S. G.; ELLEDGE, R. M.; CLARK, G. M. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, p. 550-556, 2000.

DIRENZO, J.; SIGNORETTI, S.; NAKAMURA, N.; RIVERA-GONZALEZ, R.; SELLERS, W.; LODA, M.; BROWN, M. Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Research*, v. 62, p. 89-98, 2002.

DORSSERS, L. C. J.; GREBENCHTCHIKOV, N.; BRINKMAN, A.; LOOK, M. P.; VAN BROEKHOVEN, S. P. J. DE JONGE, D. PETERS, H. A.; PORTENGEM, H.; GELDER, M. E. M.; KLIJN, J. G. M.; VAN TIENOVEN, D. T. H.; GEURTS-MOESPOT, A.; SPAN, P. N.; FOEKENS, J. A.; SWEEP, F. C. G. J. The prognostic value of BRCA1 in patients with primary breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 10, p.6194-6202, 2004.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.9, p. 208-221, 2005.

DUPONT, B. Introduction: current concepts in immunity to human cancer and therapeutic antitumor vaccines. *Immunological Reviews*, v. 188, p. 5-8, 2002.

FARNER N.; DORNER T.; LIPSKY P. E. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertorie. *Journal of Immunology*, v. 162, p. 2137-2145, 1999.

FILPULA, D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular Engineering*, v. 24, p. 201-215, 2007.

FISHER, B.; COSTANTINO, J. P.; WICKERHAM, D. L.; REDMOND, C. K.; KAVANAH.M.; CRONIN, W. M.; ROBIDOUX, A.; DIMITROV, N.; ATKINS, J.; DALY, M.; WIEAND, S.; TAN-CHIU, E.; FORD, L.; WOLMARK, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and

Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*, v.90, p. 1371-1388, 1998.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, JR. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2003, p. 72-86.

GEYER, F. C.; MARCHIÒ, C.; REIS-FILHO, J. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology*, v. 41, p. 77-88, 2009.

GOMES, A. L.; GUIMARÃES, M. D.; GOMES, C. C.; CHAVES, I. G.; GOBBI, H.; CAMARGOS, A. F. A case control study of risk factors for breast cancer in Brazil. 1978-1987. *International Journal of Epidemiology*, v.24, p. 292-299, 1995.

GREEBAUM, L. That's what it is. *Lancet*, v. 355, p.745-746, 2000.

GRIFFITHS, A. D.; WILLIAMS, S. C.; HARTLEY, O.; TOMLINSON, I. M.; WATERHOUSE, P.; CROSBY, W. L.; KONTERMANN, R. E.; JONES, P. T.; LOW, N. M.; ALLISON, T. J.; PROSPERO, T. D.; HOOGENBOOM, H. R.; NISSIM, A.; COX, J. P. L.; HARRISON, J. L.; ZACCOLO, M.; GHERARDI, E.; WINTER, G. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal*, v. 13. n. 14, p. 3245-3260, 1994.

GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS L.; GRIFFITHS, K. (Eds). *Textbook of prostate cancer: pathology, diagnosis and treatment*. Londres: M. Dunitz, 1999 p. 51-74.

HALL, P.; CAMERON, D. A. Current perspective-Trastuzumab. *European Journal of Cancer*, v. 45, p. 12-18, 2009

HANKINSON, S. E.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Research*, v.6, p. 213-218, 2003.

HELMRICH, S. P.; SHAPIRO, S.; ROSENBERG, L.; KAUFMAN, D. W.; SLONE, D.; BAIN, C.; MIETTINEN, O. S.; STOLLEY, P. D.; ROSENSHEIN, N. B.; KNAPP, R. C.; LEAVITT JR, T.; SCHOTTENFELD, D.; ENGLE JR, R.; LEVY, M. Risk factors for breast cancer. *American Journal of Epidemiology*, v. 117, p. 35-45, 1982.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C.; CASAGRANDE, J. T. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Research*, v.43, p. 3232-3239, 1982.

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

HONJO, T.; MATSUDA, F. Immunoglobulin heavy chain loci of mouse and human. In: _____. *Immunoglobulin Genes*. 2ed. Academic Press, 1995. cap. 7, p. 145-171.

HUST, M.; DÜBEL, S. Mating antibody phage display with proteomics. *TRENDS in Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 8-14, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR REASEARCH ON CANCER (IARC). *World cancer report*. France, p.351, 2003.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (IUAC). *TNM classification of malignant tumors*. United States, p.272. 2002.

JÄGER, D.; KNUTH, A. Antibodies and vaccines—hope or illusion? *The Breast*, v.14, p.631-635, 2005.

JONE, P. T.; DEAR, P. H.; FOOTE, J.; NEUBERGER, M. S.; WINTER G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, v. 321, p. 522-525, 1996.

KARJAINEN, S.; PULDEALA, E. Social class as a prognostic factor in breast cancer survival. *Cancer*, v.66, p. 819-826, 1990.

KIEZAK, L.; KASZTURA, M.; KOSCIELSKA-KASPRZAK, K.; DADLEZ, M.; OTLEWSKI, J. Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage display library of basic pancreatrypsin inhibitor (BPTI). *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 2, p. 153-163, 2001.

KIM, S. J.; PARK, Y.; HONG, H. J. Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Molecules and Cells*, v. 20, p.17-29, 2005.

KIPRIYANOV, S.; LE GALL, F. Generation and Production of Engineered Antibodies. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p.39-60, 2004.

KOIVUNEN, E.; ARAP, W.; RAJOTTE, D.; LAHDENRANTA, J.; PASQUALINI, R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 40, p. 883-888, 1999.

LAGERROS, Y. T.; HSIEH, S. F.; HSIEH, C. C. Physical activity in adolescence and young adulthood and breast cancer risk: a quantitative review. *European Journal of Cancer Prevention*, v.13, p. 5-12, 2004.

LATTERICH, M.; ABRAMOVITZ, M.; LEYLAND-JONES, B. Proteomics: New technologies and clinical applications. *European Journal of Cancer*, v. 44, p. 2737-2741, 2008.

LI, S.; SCHMITZ, K. R.; JEFFREY, P. D.; WILTZIUS, J. J. W.; KUSSIE, P.; FERGUSON, K. M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, v. 7, p. 301-311, 2005.

LINDBLOM, A.; LILJEGREN, A. Tumors markers in malignancies. *Clinical Research ed*, v. 320, p.424-427, 2000.

LU, D.; JIMENEZ, X.; ZHANG, H.; BOLEEN, P.; WITTE, L.; ZHU, Z. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display for antiangiogenesis therapy. *International Journal of Cancer*, v. 97, p. 393-399, 2002.

MARCHBANKS, P. A.; MC DONALD, J.A.; WILSON, H. G.; FOLGER, S. G.; MANDEL, M. G.; DALING, J. R.; BERNSTEIN, L.; MALONE, K. E.; URSIN, G.; STROM, B. L.; NORMAN, S. A.; WINGO, P. A.; BURKMAN, R. T.; BERLIN, J. A.; SIMON, M. S.; SPIRTAS R.; WEISS, L. K. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, p. 2025-2032, 2002.

MARSILLAC, J. Introdução. In: CHAVES, E. (Ed): *Câncer de mama diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994, p1-2.

MARTIN, A. M.; WEBER, B. L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, p. 1126-1135, 2000.

MAZUET, C.; LEROUGE, D.; POUL, M. A.; BLIN, N. Breast carcinoma specific antibody selection combining phage display and immunomagnetic cell sorting. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 348, p. 550-559, 2006.

MCCAFFERTY, J.; HOOGENBOOMN, H. R.; CHISWELL, D. J. *Antibody Engineering, A Practical Approach*. 1 ed., Oxford: Oxford Univ. Press, 1996.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. JR. Innate immunity: impact on the adaptative immune response. *Current Opinion in Immunology*, v. 9, p. 4-9, 1997.

MEISNER, A. L.; FEKRAZAD, M. H.; ROYCE, M. E. Breast Disease: Benign and Malignant. *The Medical Clinics of North America*, v. 92, p. 1115-1141, 2008.

MINITZ, P. J.; KIM, J.; DO, K. A.; WANG, X.; ZINNER, R. G.; CRISTOFANILLI, M.; ARAP, M. A.; HONG, W. K.; TRONCOSO, P.; LOGOTHETIS, C. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 57-63, 2003.

MORETÃO, A. L.; ANGULSKI, C.; PIAZZA, M. J. Inibidores da aromatase e seu uso na prática clínica. *Femina*, v. 29, p. 695-700, 2001.

MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A. Anticorpos Monoclonais para a Clínica. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.22, p.32-35, 2001.

NATIONAL BREAST CANCER CENTRE (NBCC). *Breast cancer: prevalence, risk factors and management 2006*. Disponível em: <<http://www.nbcc.org.au>>. Acesso em 04 jun. 2009.

PAIVA, C. E.; RIBEIRO, B. S.; GODINHO, A. A. Risk factors for breast cancer in Juiz de Fora (MG): a case-control study. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.48, p. 231-237, 2002.

PANSRI, P.; JARUSERANEE, N.; RANGNOI, K.; KRISTENSEN, P.; YAMABHAI, M. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnology*, v. 9, 2009.

PARKIN, D. International variation. *Oncogene*, v.23, p. 6329-6340, 2004.

PARKIN, D. M.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, v.55, p.74-108, 2002.

PHAROAH, P.D. P.; DAY, N. E.; DUFFY, S.; EASTON, D. F.; PONDER, B. A. J. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, v. 71, p. 800-809, 1997.

PINOTTI, J. A.; TEIXEIRA, L. C. Câncer de mama: importância, epidemiologia e fatores de risco. In: HALBE, H. (Eds). *Tratado de ginecologia*. São Paulo: Roca, 2000, p 2019-2022.

POPKOV, M.; RADER, C.; BARBAS, C. F. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology. *Journal of Immunological Methods*, v. 291, p. 137-151, 2004.

PREUSS K. D.; ZWICK C.; BORMANN C.; NEUMANN F.; PFREUNDSCHUH M. Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunological Reviews*, v. 188, p. 43-50, 2002.

PUNT, C. J.; BARBUTTO J. A.; ZHANG, H.; GRIMES W. J.; HATCH, K. D.; HERSH, E. M. Anti-tumor antibody produced by human tumor-infiltrating and peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Immunology*, v. 38, p. 225-232, 1994.

RIBEIRO, L. C.; DEVINCENZI, M. U. D.; GARCIA, J. M.; HADLER, M. C. C. H.; SIGULEN, D. M. Nutrição e alimentação na lactação. *Compacta*, v. 4, p. 7-22, 2002.

ROBERT, S. A.; STROMBOM, I.; TRENTAM-DIETZ, A.; HAMPTON, J. M.; MCELROY, J. A.; NEWCOMB, P. A.; REMINGTON, P. L. Socioeconomic risk factors for breast cancer: distinguishing individual- and community-level effects. *Epidemiology*, v.15, p. 442-450, 2004.

ROHAN, T.; POTTER, J. Retrospective assessment of dietary intake. *American Journal of Epidemiology*, v.120, p. 877-887, 1984.

ROSS, R. K.; PAGANINI-HILL, A.; WAN, P. C.; PIKE, M. C. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *Journal of the National Cancer Institute*, v.92, p. 328-332, 2000.

RUSSEL, M.; LOWMAN H. B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. B. *Phage Display*. (Eds). Oxford: *Phage Display*. Oxford University Press, 2004. v.266, p. 1-26.

SAHIN, U.; TURECE, O.; SCHMITT H.; COCHOLOVIUS B.; JAHANNES T., SCHIMITS R.; STENNER F.; LUO G., SCHOBERT I.; PFREUNDSCHUH M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 92, p. 11810-11813, 1995.

SALLES, M. A.; MATIAS, M. A. R. F.; RESENDE, L. M. P.; GOBBI, H. Interobserver variation of the histopathologic diagnosis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.27, p.1-6, 2005.

SIDHU, S. S. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering*, v.18, p.57-63, 2001.

SILVERTON, E. W.; NAVIA, M. A.; DAVIES, D. R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v.74, p.5140-5144, 1977.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. *Chemical Reviews*, v. 97, p. 391-410, 1997.

SMITH, R. A.; SASLOW, D.; SAWYER, K. A.; BURKE, W.; COSTANZA, M. E.; EVANS, W. P.; FOSTER JR, R. S.; HENDRICK, W.; EYRE, H. J.; SENER, S. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: Update 2003. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 53, p. 141-169, 2003.

SOMERS, V.A.; BRANDWIJK, R.J.; JOOSTEN, B.; MOERKERK, P.T.; ARENDS, J.W.; MENHEERE, P.; PIETERSE, W.O.; CLAESSEN, A.; SCHEPER, R.J.; HOOGENBOOM, H.R.; HUFTON, S.E. A panel of candidate tumor antigens in

colorectal cancer revealed by serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 2772-2780, 2002.

SUGIMURA, T.; USHIJIMA, T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 462, p. 235-246, 2000.

VARGAS-MADRAZO, E.; LARA-OCHOA, F.; RAMIREZ-BENITES, M. C.; ALMARGRO, J. C. Evolution of the structural repertoire of the human V(H) and V kappa germline genes. *International Immunology*, v. 9, p. 1801-1815, 1997.

WITTRUP, K. D. Phage on display. *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 423-424, 1999.

WORLD HUMAN ORGANIZATION (WHO). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Geneva, p. 916, 2003.

WU, B.P.; XIAO, B.; WAN, T.M.; ZHANG, Y.L.; ZHANG, Z.S.; ZHOU, D.Y.; LAI, Z.S.; GAO, C.F. Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 7, p. 811-815, 2001.

YANG, H. Y.; KANG, K. J.; CHUNG, J. E.; SHIM, H. Construction of a large synthetic human scFv library with six diversified CDRs and High functional diversity. *Molecules and Cells*, v. 27, p. 225-235, 2009.

YANG, X.; YU, K.; HAO, Y. LI, D.; STEWART, R.; INSOGNA, K. L.; XU, T. LATS1 tumor suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nature Cell Biology*, v. 6, p. 609-617, 2004.

ZHANG, Q.; ZHANG, S. H.; SU, M. Q.; BAO, G. Q.; LIU, J. Y.; YI, J.; SHEN, J. J.; HAO, X. K. Guided selection of an anti-gamma-seminoprotein human Fab for antibody directed enzyme prodrug therapy of prostate cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v. 56, p. 477-489, 2007.

CAPÍTULO II:

**CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE
ANTICORPOS RECOMBINANTES (FAB) ANTI-
CARCINOMA MAMÁRIO E OBTENÇÃO DE
FRAGMENTOS LIGANTES DE ANTÍGENOS TUMORAIS
POR PHAGE DISPLAY**

RESUMO

O Câncer de Mama (CM) é, atualmente, considerado uma doença complexa e heterogênea apresentando anormalidades em diversas vias moleculares. Embora o CM seja líder em incidência de tumores entre mulheres e a segunda causa de mortalidade no mundo, os fatores prognósticos atuais são incapazes de prever a evolução da totalidade das pacientes e qual o tratamento adequado. A metodologia de *Phage Display* permite a construção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos monoclonais, o que viabiliza a identificação de anticorpos monoclonais humanos voltados à prática clínica e terapêutica. No presente trabalho foi construída uma biblioteca recombinante tipo Fab com o objetivo de reconhecer antígenos tumorais específicos em pacientes com câncer de mama. A partir dos transcritos de vinte pacientes com carcinoma ductal infiltrante foi construída uma biblioteca com diversidade de $1,7 \times 10^6$ clones diferentes, a qual foi selecionada contra tecidos mamários. Os ensaios de ELISA demonstraram a reatividade de 22 clones, dos quais foi escolhido aquele com maior diferença de reatividade entre os grupos de estudo. Os experimentos de imunohistoquímica confirmaram a especificidade do clone FabC-4 à antígenos tumorais. Este trabalho demonstra resultados biotecnológicos significantes com bibliotecas Fab recombinantes específicas na busca de anticorpos contra câncer de mama, criando novas possibilidades nas áreas diagnósticas e terapêuticas.

Palavras chave: *Phage Display*, anticorpos recombinantes, biblioteca combinatorial, câncer de mama.

ABSTRACT

Breast carcinoma (BC) is currently regarded as a complex and heterogeneous disease presenting abnormalities in several molecular pathways. Although BC is the leading female cancer in incidence and the second one in mortality worldwide, the prognostic and predictive factors known are incapable to predict the outcome of all patients as well as to avoid unnecessary treatment. Applicability of Phage Display technology allows the construction of antibody combinatorial libraries identifying human monoclonal antibodies to clinical and therapeutic practice. In this work was constructed a recombinant Fab library which aimed recognized tumor antigens in patients with breast cancer. Transcripts from twenty patients with diagnosed invasive ductal carcinoma were used to construct a library with $1,7 \times 10^6$ different clones, which was selected against breast tissues. ELISA assays demonstrated reactivity of 22 clones, of which was selected the one with the biggest difference between the study groups. Immunohistochemistry experiments confirmed the specificity of FabC-4 clone to tumor antigens. This work provided significant biotechnological results with a specific Fab recombinant library, which indicated its great potential in selecting antibodies for breast carcinoma, opening new possibilities in diagnostic and therapeutics areas.

Key words: Phage Display, recombinant antibody, combinatorial library, breast cancer

INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é o tumor maligno mais comum em mulheres norte-americanas (ACS, 2008), a segunda causa de morte, após o câncer de pulmão (PARKIN, 2002) e os parâmetros rotineiramente disponíveis não são suficientes para a identificação de sua complexidade etiológica e da variabilidade individual das pacientes (GEYER et al., 2009).

Durante a última década, a aplicabilidade de novas ferramentas baseadas nos conhecimentos genômicos vem demonstrando um sucesso crescente da caracterização molecular de tumores de mama. Esses avanços têm resultado em um esquema de classificação mais detalhado e produzido testes diagnósticos úteis à prática clínica (LATTERICH et al., 2008). Entretanto, uma doença eminentemente heterogênea que inclui uma ampla variedade de entidades patológicas, nas quais 40% dos pacientes ainda sucumbem, necessita de novas estratégias terapêuticas e da identificação de novos alvos que possibilitem um melhor tratamento (HANBY, 2005; GEYER et al., 2009).

A transformação maligna das células geralmente causa uma mudança dramática na expressão de diversas proteínas (POPKOV et al., 2004) e anticorpos têm se mostrado um excelente paradigma na construção de moléculas de alta afinidade (HOLLIGER & HUDSON, 2005). As terapias baseadas em anticorpos oferecem perspectivas no tratamento do câncer e, atualmente, a aplicação de um anticorpo monoclonal humanizado para um receptor de tirosina-quinase, conhecido como *Trastuzumab* marca o início de uma nova fase no tratamento do CM (KIM et al., 2005; BEN-KASUS et al., 2007; HALL & CAMERON, 2009).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são gerados tanto pela tecnologia de hibridoma, quanto por bibliotecas de anticorpos (POPKOV, 2004), as quais podem ser do tipo *naïve*, semi-sintética ou completamente sintética (HUST & DÜBEL, 2004). Diversas são as vantagens apresentadas por anticorpos recombinantes: podem ser produzidos em bactérias, fungos ou plantas, não necessitam de imunização e as suas propriedades intrínsecas que incluem imunogenicidade, afinidade, especificidade e estabilidade podem ser aprimoradas por tecnologias

mutagênicas (PANSRI et al., 2009). A construção e seleção de bibliotecas combinatoriais de anticorpos expressas em fagos filamentosos tem se tornado uma alternativa na busca de clones antígeno-específicos, sem reatividade cruzada, expressão indesejada do repertório gênico, mas com aplicação diagnóstica e terapêutica (KIM et al., 2005).

Essa tecnologia é baseada na amplificação de genes que codificam para a porção variável do anticorpo de um ou mais indivíduos, a partir de iniciadores que abrangem toda essa família gênica. A biblioteca é construída pela combinação randômica das regiões variáveis da cadeia leve (VL) e pesada (VH) produzindo fragmentos ligantes de antígenos (Fab) ou fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), os quais mantêm a especificidade, monovalência e afinidade antigênica de uma IgG, contudo, apresentando avanços quanto à penetrabilidade tecidual e aplicação farmacêutica (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

Na última década, a tecnologia de *Phage Display* tem se mostrado uma ferramenta robusta, versátil e amplamente utilizada na apresentação e seleção de fragmentos de anticorpos na superfície de fagos que mimetizam a seleção clonal do sistema imune (GRIFFITHS et al., 1994; HUST & DÜBEL, 2004). Uma vantagem crucial dessa tecnologia é a conexão direta entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, a qual possibilita uma evolução dos ligantes selecionados (SMITH & PETRENKO, 1997; AZZAZY & HIGHSMITH, 2002). Diversas bibliotecas combinatoriais de anticorpos humanos apresentadas na superfície de fagos filamentosos têm sido construídas com o intuito de selecionar ligantes contra diferentes antígenos protéicos (GRIFFITHS et al., 1994; DE HAARD et al., 1999; WU et al., 2001; LU et al., 2002; PANSRI et al., 2009) incluindo de melanoma (CAI & GAREN, 1995) câncer colorretal (SOMERS et al., 2002) e câncer de próstata (MINTZ et al., 2003; POPKOV et al., 2004; ZHANG et al., 2007).

A engenharia de fragmentos de anticorpos contra o câncer de mama pode se tornar parte de uma terapia protéica ao melhorar ou desacelerar o progresso da doença, sem os efeitos cardiotoxícos até então observados nos tratamentos com *Trastuzumab*. Além disso, esses fragmentos retêm a especificidade ao alvo observada nos anticorpos completos, mas podem ser produzidos de maneira mais econômica e com outras propriedades diagnósticas e terapêuticas.

O formato Fab permite uma rápida seleção entre um grande número de clones, uma vez que são fragmentos cuja formação é predominantemente monomérica (DE HAARD et al., 1999). Além disso, são mais estáveis e propícios de reterem sua estrutura natural e capacidade de reconhecimento e afinidade ao seu alvo, sem problemas quanto à avidéz observada em bibliotecas multiméricas de scFv (ZHANG et al., 2007).

A técnica *Phage Display*, aliada à tecnologia de construção de bibliotecas combinatoriais de fragmentos de anticorpos, poderão gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico e no tratamento individualizado de pacientes. É muito provável que a análise do complexo conteúdo protéico de tecidos e diferentes fluidos biológicos tenha, no futuro, um impacto significativo na avaliação e no diagnóstico, não só do câncer, mas, também, de muitas outras patologias.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterização de anticorpos específicos para antígenos tumorais de câncer de mama a partir de uma biblioteca Fab humana apresentada na superfície de fagos filamentosos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de uma biblioteca combinatorial de fragmentos de anticorpos ligantes de antígenos (Fab) a partir de transcritos de pacientes diagnosticadas com carcinoma mamário;
- Avaliação da diversidade de anticorpos presentes nessa biblioteca;
- Seleção Fabs ligantes de tumor por meio da técnica de *Phage Display*;
- Avaliar a reatividade diferencial dos clones selecionados por meio de ensaios de ELISA e Imunohistoquímica;
- Avaliar o potencial diagnóstico e/ou prognóstico dos clones selecionados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e pela equipe do Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas entre os anos de 2008 e 2009, mediante aprovação do comitê de ética em Pesquisa, sob o número de parecer 064/08 (Anexo 2). O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional às pacientes. As amostras de sangue periférico (PBL, do inglês *peripheral blood*) foram coletadas em tubos tipo vacutainer™ contendo K₂EDTA 7,2mg e mantidas à 4°C.

Para a construção da biblioteca combinatorial de fragmentos de anticorpos Fab, foram coletas amostras de PBL de 20 pacientes (média de idade de 54 anos) diagnosticadas com câncer de mama ductal invasivo grau I (1%), grau II (98%) e grau III (1%). Todos os casos foram submetidos à mastectomia mamária e classificados de acordo com os parâmetros histopatológicos, sem qualquer tratamento hormonal prévio, sessões de quimioterapia ou radioterapia. Além disso, as pacientes selecionadas não apresentavam diagnóstico de qualquer outra doença que oferecesse uma predominância clonal como HIV, HPV ou hepatite. O tecidos de mama utilizados nos ensaios de *biopanning* foram coletados de três pacientes com CM (média de idade de 52 anos), com 80% de acometimento tumoral, diagnosticadas com carcinoma ductal infiltrante sendo duas com grau II e uma com grau III e três tecidos de pacientes submetidas à cirurgia de redução de mama (média de idade de 50 anos), sem diagnóstico de qualquer patologia benigna da mama ou histórico familiar da doença, classificadas como controle saudável.

Para as análises de imunohistoquímica, fragmentos de adenocarcinoma de mama e tecido glandular mamário foram obtidos de biópsias e mamoplastias realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), os quais foram processados histologicamente pelos métodos convencionais (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983). Os diagnósticos dos exames histopatológicos

foram realizados pela médica patologista Dra. Tânia Machado de Alcântara, Hospital de Clínicas (UFU).

2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA total foi extraído a partir do sangue periférico de cada paciente usando os procedimentos descritos por Chomczynski & Sacchi (1987) com modificações. A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 %, por 1 hora à 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE 0,5 X, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Pharmacia Biosciences).

Quatro microgramas de RNA total do *pool* de amostras foram misturados a 10 pmoles de *primers* específicos (Tabela 1). Os oligonucleotídeos HulgG1 e HulgGMF foram utilizados para a síntese de cDNA das cadeias pesadas (VH) de IgG e IgM, respectivamente, e HuGκF para a região Vκ. As três reações individuais foram submetidas a temperatura de 70°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 10U de Transcriptase Reversa *SuperScriptII* (Invitrogen), 5X de Tampão da Enzima, 10U de inibidor de RNase (Invitrogen) e 200µM de cada dNTP. Essa solução foi incubada a 42°C por 1 hora e a reação foi finalizada com um aquecimento a 70°C por 15 minutos.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a construção da biblioteca de fragmentos Fab.

Reação No.	Alvo	Primers: Sequencia 5'→ 3'	Fragmento Esperado (pb)
-	Síntese de cDNA da IgG	HulgG1: GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT	-
-	Síntese de cDNA da IgM	HulgMF: TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT	-
-	Síntese de cDNA da cadeia Kappa	HuGkF: AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT	-
1	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH1-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG HFabVHJa-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	400
2	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH2-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GG HFabVHJa-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	400
3	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH35-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG SAG TCT GG HFabVHJa-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	400
4	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH3a-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG KTG GAG TCT G HFabVHJa-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	400
5	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH4-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG HFabVHJa-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	400
6	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH4a-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG CTG CAG CTA CAG CAG TGG GG HFabVHJa-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC	400
7	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH1-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG HFabVHJb-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC WGR GGA GAC GGT GAC CAG GGT BCC	400
8	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH2-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GG HFabVHJb-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC WGR GGA GAC GGT GAC CAG GGT BCC	400
9	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH35-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG SAG TCT GG HFabVHJb-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC WGR GGA GAC GGT GAC CAG GGT BCC	400
10	Região variável da cadeia	HFabVH3a-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG KTG GAG TCT G	400

	pesada (VH)	HFabVHJb-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC WGR GGA GAC GGT GAC CAG GGT BCC	
11	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH4-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG HFabVHJb-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC WGR GGA GAC GGT GAC CAG GGT BCC	400
12	Região variável da cadeia pesada (VH)	HFabVH4a-F: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG CTG CAG CTA CAG CAG TGG GG HFabVHJb-B: CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC WGR GGA GAC GGT GAC CAG GGT BCC	400
13	Região variável da cadeia leve (Vk)	Hsck1-F: GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC C HCK5-B: GAA GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT	400
14	Região variável da cadeia leve (Vk)	Hsck24-F: GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGA TGA CYC AGT CTC C HCK5-B: GAA GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT	400
15	Região variável da cadeia leve (Vk)	Hsck3-F: GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGW TGA CRC AGT CTC C HCK5-B: GAA GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT	400
16	Região variável da cadeia leve (Vk)	Hsck5-F: GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCA CAC TCA CGC AGT CTC C HCK5-B: GAA GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT	400
17	Região constante da cadeia pesada (CH)	HlgGCH1-F: GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC dpseq: AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC	400
18	Região constante da cadeia leve (Ck)	HKC-F: CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC Lead-B: GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC	400
19	Montagem final da cadeia pesada (VH-CH)	LeadVH: GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC dpseq: AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC	800
20	Montagem final da cadeia leve (Vk- Ck)/ (Vλ- Cλ)	RSC-F: GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC Lead-B: GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC	800
21	Montagem final do Fab	RSC-F: GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC dp-EX: GAG GAG GAG GAG GAG GAG AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC	1600

3 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE ANTICORPOS: AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DE VH E VL POR PCR E MONTAGEM DO FAB

3.1 Amplificação das Cadeias VH e VL

As amplificações dos cDNAs referentes às cadeias pesadas e leves para IgG e IgM foram realizadas a partir de 16 reações contendo: 2,0 µl de cDNA, 5 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs e 60 pmoles de *primers* direto e reverso. O volume final da reação foi de 100 µl, completado com água destilada. As condições de PCR foram: 94 °C por 5 min e mais 38 ciclos a 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C por 90 s seguidos por uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados utilizando-se o equipamento *ImageMaster VDS* (Pharmacia Biotech).

As combinações de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da região variável da cadeia pesada (VH) de IgG e de IgM e para a obtenção da cadeia leve (Kappa) estão descritas nas reações de 1 a 16 da Tabela 2.

As reações foram reunidas, precipitadas com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e eluídas em água. Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1% para purificação dos fragmentos de DNA correspondentes aos genes VH e VL, utilizando-se o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega). As amostras purificadas foram quantificadas em gel de agarose, 1% utilizando-se um marcador de Massa Molecular 100bp (Invitrogen).

3.2 Amplificação das Regiões Constantes das Cadeias Pesada e Leve

As reações 17 e 18 de amplificação dos fragmentos CH e Cκ (Tabela 2) foram realizadas utilizando 20 ng do vetor do vetor pComb3XTT como molde e nas mesmas condições anteriormente descritas. Os transcritos foram precipitados e purificados de acordo com procedimentos descritos no item anterior.

3.3 Segundo Ciclo de PCR: geração das Cadeias Pesada e Leve por PCR de sobreposição

Os oligonucleotídeos iniciadores das primeiras PCRs criaram sequências idênticas na extremidade 5' da porção constante e na extremidade 3' da região variável das cadeia leve e pesada. Os produtos amplificados e purificados no primeiro ciclo de reações foram, então, utilizados como molde nas reações de sobreposição, para a montagem da cadeia pesada VH-CH1 (Fd) e da cadeia leve completas.

Reação 19: LeadVH com dpseq (para essa reação foi utilizado como molde o *pool* de transcritos da região variável da cadeia pesada VH e o amplificado da região constante também da cadeia pesada CH).

Reação 20: RSC-F com Lead-B (para essa reação foi utilizado como molde o *pool* de transcritos da região variável da cadeia leve V κ e o amplificado da região constante também da cadeia leve C κ).

A reação de PCR foi realizada para um volume final de 100 μ l contendo: 100 ng de cada região purificada, 5 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.0 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs e 60 pmoles de *primers* direto e reverso. A reação foi incubada por 56°C por 1 min, 72°C por 5 min e 94°C por 5 min com posterior 11 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 50 s e mais 16 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 2 min e 72°C por 4 min finalizando com uma extensão final a 72°C por 10 min.

O produto gerado (~800pb) foi analisado em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio, visualizados utilizando-se o equipamento *ImageMaster VDS* (Pharmacia Biotech) e também purificados.

3.4 Terceiro Ciclo de PCR: Obtenção do Fab por PCR de Sobreposição

Dez reações de sobreposição foram realizadas utilizando os *primers* descritos na Tabela 2 (reação número 21) e como molde, os produtos gerados no segundo ciclo de PCR contendo sequências idênticas na extremidade 3' e 5' da cadeia leve e pesada, respectivamente. O produto de construção do Fab completo esperado é de ~1600pb.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador nas seguintes condições: 94°C por 5 min, 6 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 4 min, seguidos de 11 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 2 min, 72°C por 4 min e 72°C durante 11 minutos de extensão final:.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados com auxílio do equipamento *ImageMaster VDS* (Pharmacia Biotech). As reações foram reunidas e precipitadas com 2,5 volumes de etanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5.2. Os fragmentos Fab foram purificados com o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.5 Digestão dos fragmentos Fab e do vetor pComb 3X com a Enzima *Sfi*

Para a digestão do Fab e do vetor, foram montadas duas reações contendo 16 U de enzima *Sfi* I (New England Biolabs) por micrograma de DNA, 1X tampão NE Buffer 2 e água para o volume final de 200 µL. Quinze microgramas do produto final da PCR dos fragmentos Fab e 20 µg do vetor pCom3X foram utilizados na reações individuais de restrição enzimática.

As reações foram incubadas a 50°C durante 16 horas e, em seguida, precipitadas com 2,5 volumes de etanol a -80°C durante a noite. As digestões foram centrifugadas, ressuspensas em 20 µL e purificadas a partir de gel de agarose 1% utilizando o kit *Wizard SV Gel up-System* (Promega). Como controles também foram purificados os fragmentos liberados pelo vetor (*stuffer*).

3.6 Ligação dos fragmentos Fab com o vetor pComb3X

A eficiência do processo de clonagem do vetor ao fragmento amplificado foi testada através de ligações em pequena escala, da ligação do inserto controle (*stuffer*) e da autoligação do vetor. Todas as reações foram realizadas na proporção 2:1 (vetor:inserto). Para a montagem da biblioteca foi realizada uma ligação 10X mais concentrada, incluindo: 1400ng de pComb3X digerido com *Sfi* I, 700 ng de Fab digeridos com *Sfi* I, 40 µL de tampão da enzima 5X (Invitrogen), 10

μ L de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e água para um volume final de 200 μ L. As reações foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 horas e, em seguida, precipitadas com etanol/acetato de sódio, para posterior transformação das células competentes.

A preparação das linhagens de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes foi realizada conforme procedimentos descritos por Barbas et al. (2001) (Anexo 3).

3.7 Montagem da Biblioteca Combinatorial Fab

As transformações das células foram adaptadas do protocolo descrito por Barbas et al. (2001). Dez μ L do sistema de ligação foram misturados a 200 μ L de células competentes. Em seguida, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm previamente resfriada em gelo e submetida ao choque no eletroporador com os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω . O τ esperado nessas condições variar entre 4,0 e 5,0 milisegundos. Após a eletroporação, as células foram recuperadas, imediatamente, em 3 mL de meio SOC, transferidas para um tubo tipo Falcon de 15 mL estéril e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm durante 1 hora. Para a determinação da eficiência de transformação, diluições desta cultura foram semeadas em placa de petri com meio LB ágar contendo carbenicilina 100 μ g/mL. O DNA plasmidial foi extraído a partir das colônias isoladas presentes nas placas, para análise de seqüências gênicas presentes na biblioteca (Anexo 4). Quatro sistemas de transformação foram realizados nesse passo com a finalidade de se aumentar o número de transformantes obtidos no final da construção da biblioteca.

Foram adicionados 10mL de meio SB contendo carbenicilina (50 μ g/mL) e tetraciclina (10 μ g/mL) aos 3mL de cultura transformada. Após incubação adicional de 1h a 37°C sob agitação, foram novamente adicionados 100mL de SB suplementado com carbenicilina (50 μ g/mL) e tetraciclina (10 μ g/mL). Após 1 h de incubação, aproximadamente 10^{12} unidades formadoras de placas de lise do bacteriófago auxiliar VCSM13 (Stratagene) (Preparação descrita no Anexo 5) foram adicionadas ao meio, o qual cresceu por cerca de 2 h sob agitação. Após esse período foi adicionada Canamicina (70 μ g/mL) e a cultura incubada durante

15 horas a 37°C. Os fagos foram obtidos por precipitação por polietileno glicol/NaCl e ressuspensos em TBS contendo 1% de BSA.

3.8 Seqüenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves

As reações de seqüenciamento do Fab clonado no vetor pComb3X foram preparadas com o kit *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* utilizando-se o seqüenciador automático capilar MegaBace 1000 (GE Healthcare). As amostras foram preparadas para seqüenciamento em placas de 96 poços contendo aproximadamente 400 ng de DNA plasmidial e 2,5 pmoles do oligonucleotídeo MMB4 (5'-GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T-3') ou 2,5 pmoles do oligonucleotídeo MMB5 (5'-CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT C-3'), em um volume final de 10 µL. As condições de termociclagem para o seqüenciamento foram: 25 ciclos a 95 °C por 20 seg, 50 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min.

As amostras amplificadas foram precipitadas em 2,5µL de acetato de amônio 7,5M e 55µL de etanol 100% (v/v), seguido de homogeneização por inversão e centrifugação por 30 min a 2500 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, 120µL de etanol 70% (p/v) foram adicionados ao DNA precipitado. Após nova centrifugação a 2500 x *g* por 30 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado.

O álcool residual foi removido por rápida centrifugação até 800 rpm com a placa invertida sobre papel absorvente. As amostras foram ressuspensas em 10µL de *loading buffer* e agitadas em *vortex* durante 10 a 20 seg. As amostras foram injetadas no seqüenciador automatizado seguindo-se as instruções do fabricante.

3.9 Análise das seqüências

Os cromatogramas gerados foram processados e analisados nos programas *Phred basecalling* (ERWIN & GREEN, 1998). A qualidade das seqüências foi verificada manualmente e traduzidas com auxílio de alinhamentos realizados com o banco de dados do programa BlastX no NCBI

(www.ncbi.nlm.nih.gov). As famílias das regiões variáveis foram determinadas usando-se a ferramenta Ig-Blast. As regiões determinantes de complementaridade (CDRs) foram definidas manualmente e, em seguida, alinhadas pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

4 SELEÇÃO DA BIBLIOTECA DE FAB EXPRESSA NA SUPERFÍCIE DE FAGOS

4.1 Seleção de Fab contra tecidos mamários

A seleção de partículas virais (*biopanning*) foi realizada diretamente nos tecidos frescos benignos e com carcinoma ductal infiltrante da mama, imediatamente após a cirurgia.

A seleção subtrativa baseou-se nos antígenos expressos em tecidos de pacientes submetidas à mamoplastia, sem diagnóstico de doença benigna da mama e sem história familiar de câncer mamário.

Para cada ciclo de seleção as partículas virais foram reamplificadas (Anexo 6) e o tecido normal retirado foi mantido em um microtubo contendo PBS 1X até o seu processamento. Após a lavagem em solução de PBS 1X e 2% de BSA, o tecido foi incubado a 4°C durante 1 hora em 50 µL da biblioteca amplificada adicionada de PBS 1X e 2% de BSA para um volume final de 500 µL.

Os fagos não ligantes presentes no sobrenadante foram transferidos para o tecido tumoral fresco com o acréscimo de 0.05% de Tween 20 e incubado a 4°C por 2 horas. As partículas virais não ligantes foram descartadas e o tecido tumoral foi lavado 10 vezes em solução contendo 1X PBS, 2% BSA e 0.1% de Tween 20.

Os fagos ligantes foram eluídos competitivamente transferindo-se o tecido para a cultura de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes já na $OD_{600nm}=1.0$ para a infecção, amplificação e titulação dos bacteriófagos.

4.2 Produção de Fab na forma solúvel em placa *deep well*

Clones individuais, eluídos após o terceiro ciclo de seleção foram inoculados em 1mL de meio SB contendo 50µg/mL de carbenicilina e 2% de glicose, em placa *deep well* e crescidos durante a noite sob agitação a 37°C. Fagomídeos sem o inserto Fab foram inoculados em dois *wells*, como controles negativos. No dia seguinte, 50µL da cultura de cada clone foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, estéril, contendo 1 mL de meio SB suplementado com 50µg de carbenicilina e 2% de glicose e crescida a 37°C até atingir uma OD_{600nm} próxima de 1. Após esse período a cultura foi centrifugada a 3000 x *g* durante 10 minutos e o sedimento ressuspenso em 2 mL de SB suplementado com carbenicilina (50 µg/mL) e IPTG a 2 mM.

A placa foi incubada sob agitação a 30°C durante no máximo 18 horas seguida de centrifugação a 3000 x *g* por 20 minutos. O sobrenadante de cultura foi transferido para uma nova placa e armazenado a 4°C até ser utilizado nos ensaios de *Slot Blot* e ELISA.

5 SLOT-BLOT

Este ensaio foi realizado para detectar clones que secretavam Fab no sobrenadante de cultura induzida por IPTG.

Do sobrenadante da cultura de cada clone individual, foram pipetados 10 µL em membrana de nitrocelulose 0,22 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) acoplada ao aparato de slot. As amostras foram transferidas com o auxílio de uma bomba a vácuo. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 3% em PBS e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. A membrana foi lavada, rapidamente, por 3 vezes com PBST 0,05%, imersa em uma solução contendo o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Sigma) (diluído 1:5.000 em BSA 3%) e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes, rapidamente, com PBST 0,05%. O ensaio foi revelado com o substrato DAB (Sigma Fast™ DAB). Para parar a reação, a membrana foi lavada em água destilada.

6 SDS-PAGE E WESTERN-BLOT

Os ensaios de SDS-PAGE e Western-Blot foram desenvolvidos para a confirmação da presença do fragmento Fab esperado no sobrenadante de cultura.

O gel de SDS-PAGE foi preparado em concentração de 12,5% (p/v) e polimerizado com TEMED e Persulfato de Amônio 10%. Antes da corrida eletroforética 30µL de sobrenadante de cultura de clones selecionados randomicamente foram adicionados ao tampão de amostra (1/1) e a solução foi submetida à fervura em banho-maria por 4 minutos, seguido de resfriamento no gelo. A eletroforese foi conduzida a 25mA até o azul de bromofenol atingir a base do gel e o gel foi submetido à coloração com prata de acordo com a metodologia descrita por SAMBROOK et al. (1989).

As proteínas presentes no sobrenadante foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0,22µm – GE), utilizando-se o sistema de transferência *Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio Rad). As foram transferidas a 100V, 250mA durante duas horas. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceaut durante 5 minutos e, em seguida, lavada com água Milli Q. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com PBS-BSA 3% por 1 hora, à temperatura ambiente, sob leve agitação e lavada 3 vezes com tampão PBST 0,05%. Os fragmentos Fab solúveis foram detectados com o anticorpo Anti-HA conjugado com peroxidase diluído na proporção 1:5000 em PBS/BSA3%. Após duas horas de incubação a membrana foi lavada 3 vezes em PBST 0,05% e reveladas com DAB/HRP (Sigma Aldrich).

7 ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS SELECIONADOS ATRAVÉS DE ENSAIOS DE ELISA

A especificidade do Fab produzido foi testado por ensaios de ELISA. As proteínas totais foram extraídas de tecidos normais, diagnosticados com doença benigna e com carcinoma mamário, e 1 µg foi utilizado para sensibilizar cada *well* de três placas de microtitulação (Nunc Maxisorp). Após incubação durante a noite a 4°C a solução de proteínas foi descartada e a placa lavada 3 vezes com PBST 0,05%.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 350µL de Leite desnatado 5% diluído PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. Na seqüência, o bloqueio foi descartado e lavado 3 vezes com PBST 0,05% e foram adicionados 100µL do sobrenadante de cultura de indução dos Fabs. Seguiu-se incubação por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação. Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de um clone com pComb 3X vazio.

Após a incubação os sobrenadantes foram descartados e a placa lavada 5 vezes com PBST 0,05%. O anticorpo secundário anti-HA conjugado com peroxidase foi posteriormente adicionado na diluição de 1:1000 em PBS/Leite desnatado 5% e a placa foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. O anticorpo foi descartado e a placa lavada 5 vezes com PBST.

Para revelar a reação, utilizaram-se 100 µL do substrato OPD (SIGMAFAST™ OPD) incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por, pelo menos, 30 minutos. Em seguida, a reação foi parada com 20µL de H₂SO₄ 4N. Enfim, a leitura da reação foi realizada no comprimento de onda 450nm, considerando-se os poços da placa que não foram sensibilizados (brancos).

- **Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS™. Para a avaliação da aplicabilidade clínica dos clones selecionados foram gerados dados para a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) obtidos com índice de significância de 94%.

8 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS SOLÚVEIS

8.1 Produção de scFv em grande escala

O clone selecionado pelo teste de Elisa e que apresentou seqüências únicas de Fab após análises do DNA, foi utilizado para testes mais específicos. Para realizar os ensaios seguintes, o clone foi transformado em linhagem TOP10 não supressora e induzido novamente (como descrito no item 5.34), porém em volume maior de cultura (200mL). As quantidades de carbenilicina, glicose e IPTG foram ajustadas de maneira proporcional ao aumento de volume.

8.2 Concentração do sobrenadante de cultura em coluna Centriprep

O volume de 200 ml de sobrenadante foi concentrado. Quinze microlitros de sobrenadante de cultura foram transferidos para uma coluna Centriprep, centrifugados a 3.000 rpm por 15 min e a 4 °C. O precipitado foi descartado e as colunas foram novamente centrifugadas. O tampão PBS foi adicionado até completar 15 mL na coluna e centrifugada por 5 min. As centrifugações foram repetidas por mais duas vezes, para troca do meio de cultura por tampão fosfato. No fim do processo, os fagos foram eluídos da coluna.

8.3 Purificação de Fab por cromatografia de afinidade em HPLC

O protocolo de purificação das proteínas (Anexo 7) expressas com calda de histidina (His) foi desenvolvido utilizando o *Kit HisTrap* (GE Healthcare), seguindo-se as recomendações do fabricante.

8.4 Dot blot para análise de moléculas de Fab

Este ensaio foi realizado para verificar a purificação das moléculas Fab a partir de sua expressão em sobrenadante de cultura.

Da solução coletada após a purificação em HPLC, foram pipetados 5 µL em membrana de nitrocelulose 0,22 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) e deixados secar à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de BSA 3% em PBS e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. A membrana foi lavada, rapidamente, por 3 vezes com PBST 0,05%, imersa em uma solução contendo o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Sigma) (diluído 1:5.000 em BSA 3%) e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes, rapidamente, com PBST 0,05%. O ensaio foi revelado com o substrato DAB (Sigma Fast™ DAB). Para parar a reação, a membrana foi lavada em água destilada.

9 IMUNOHISTOQUÍMICA

Após seleção do Fab, sua afinidade de ligação ao tecido mamário foi verificada por imunohistoquímica.

Cortes de 5 μ m das biópsias de tecido mamário foram feitos em micrótomo (Richert-Jung). Para bloquear a peroxidase endógena, as secções foram incubadas a temperatura ambiente com peróxido de hidrogênio a 3% por 30 min e lavadas em água destilada.

Os sítios inespecíficos teciduais foram bloqueados com BSA 10% em PBS por 1h. Após uma lavagem com PBS, os cortes foram incubados com o Fab diluído em PBS/BSA 1% (1:25) por 15 horas. Após quatro lavagens, a reatividade do Fab associado à hemaglutinina (HA) com o tecido foi monitorada pelo anticorpo camundongo anti-HA conjugado com peroxidase (Sigma). Após 1h, as secções foram extensivamente lavadas em PBS (3x, 5 min cada) e, então, em água destilada. Os cortes utilizados como controles negativos da reação foram incubados somente com PBS.

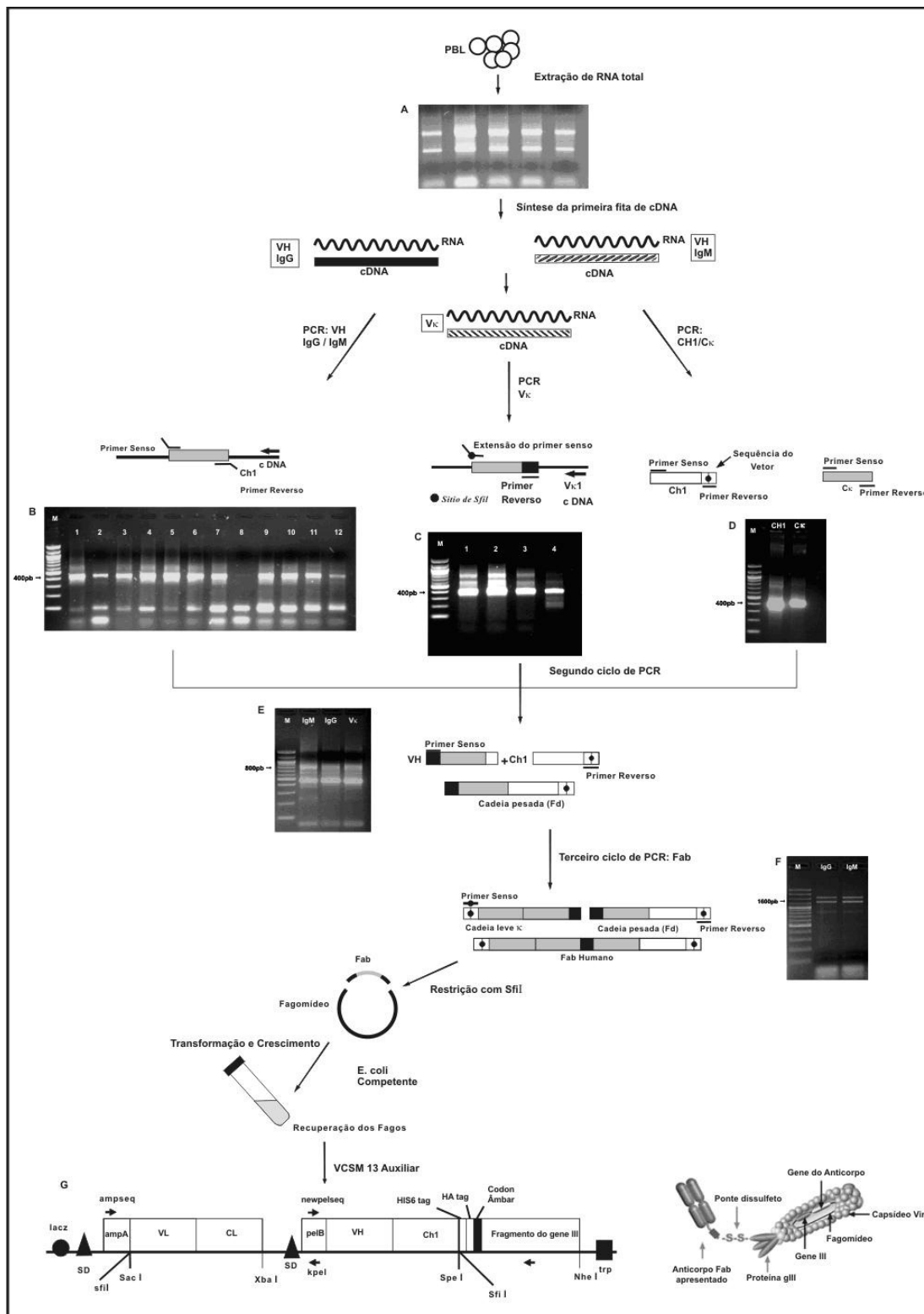
As lâminas foram reveladas com DAB (0,5mg/mL), examinadas ao microscópio de luz Olympus BX 40 e as fotomicrografias foram obtidas pelo *software* HLImage (Laboratório de Citologia, UFU).

RESULTADOS

1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA

No presente estudo, vinte pacientes atendidas no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas de Uberlândia, com diagnóstico confirmado de câncer de mama ductal invasivo, foram doadoras de genes de imunoglobulinas para a construção de uma biblioteca Fab humana. O RNA total foi extraído a partir do sangue periférico coletado antes da cirurgia e, de acordo com a estratégia metodológica adotada, foram utilizados três oligonucleotídeos iniciadores para a obtenção de três diferentes cDNAs: dois para as cadeias pesadas de IgG e IgM e um para cadeia leve. Após a síntese da primeira fita, essa foi usada como molde para a amplificação das regiões variáveis (VH e Vk), responsáveis pela variabilidade da biblioteca. Na figura 1 está representado todo o processo de construção da biblioteca combinatorial tipo Fab.

No primeiro ciclo de PCR foram realizadas 16 amplificações não quantitativas gerando um produto de aproximadamente 400pb, variável entre as diversas famílias gênicas. A amplificação da família VH2 (linhas 2 e 8 da figura 1B) foi inferior às demais, o que corresponde à sua pouca representatividade no repertório humano (cerca de 2%). Para a amplificação gênica da família VH3, a mais bem representada, foram utilizados dois oligonucleotídeos 5', com o intuito de produzir um maior número de transcritos diferentes. Os produtos de VH3 podem ser visualizados nas linhas 4 e 10, juntamente com a família VH5, e separadamente nas linhas 5 e 11 da figura 1B. Para a amplificação da região constante, tanto da cadeia pesada quanto da cadeia leve kappa utilizou-se como molde o vetor pComb3X. Os amplificados também apresentaram cerca de 400pb, como esperado.



reações de PCR (B) englobando as cinco famílias de VH. As amplificações de Vk (C) CH1 e Ck (D) também foram realizadas em um primeiro ciclo de PCR. Os produtos purificados dessas reações foram fusionados em um segundo ciclo de PCR (E) gerando um produto de aproximadamente 800pb. O Fab humano completo foi obtido em um terceiro ciclo de sobreposição (F) a partir dos transcritos obtidos na reação anterior. Após a digestão por *Sfi*I e a ligação do Fab com o fagomídeo, o sistema foi introduzido em bactérias *E. coli* eletrocompetentes. A cultura bacteriana foi posteriormente infectada com o fago *helper* VCSM13 e representada na proteína pIII do capsídeo desses vírus.

Todos os fragmentos de PCR produzidos no primeiro ciclo foram purificados em gel, quantificados e utilizados como molde para as reações de fusão gênica VL-Ck e VH-CH. No segundo ciclo de amplificação foram montadas a cadeia leve kappa inteira e a porção Fd da cadeia pesada. Os oligonucleotídeos utilizados no primeiro ciclo criaram sequências idênticas na extremidade 5' das porções constantes das cadeias leves e na extremidade 3' das regiões variáveis das duas cadeias criando a possibilidade de alinhamento favorável para a sobreposição, gerando um fragmento de aproximadamente 800pb (Figura 1E).

No terceiro e último ciclo de PCR, os produtos de amplificação obtidos no passo anterior foram misturados em quantidades iguais para gerar o produto final correspondente ao Fab. Os iniciadores utilizados no segundo ciclo criaram sequências idênticas na região 3' da cadeia leve e na extremidade 5' da cadeia pesada e possibilitaram a sua sobreposição para o produto amplificado de cerca de 1600pb (Figura 1F). Esses produtos gênicos Fab foram purificados, clivados com a enzima *Sfi*I, agrupados e clonados no vetor pCom3X também previamente digerido. Para estimar o tamanho da biblioteca, inicialmente foi realizada uma reação de ligação em pequena escala. Os três sistemas de ligação obtidos resultaram numa biblioteca de anticorpos na ordem $2,2 \times 10^6$ diferentes Fabs de pacientes com câncer de mama que foram apresentadas na superfície de fagos filamentosos

2 DIVERSIDADE DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

Para a análise da diversidade do repertório Fab e da qualidade da biblioteca, segmentos de DNA codificantes, provenientes de 96 clones randomicamente selecionados, foram avaliados por seqüenciamento. Como todos os clones foram construídos a partir da mesma região constante CH1 e Cκ e inseridos no mesmo vetor, diferenças nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos refletem diferenças no rearranjo gênico de VH ou Vκ.

As comparações foram realizadas a partir do programa Ig Blast, o qual possibilitou a definição das famílias e dos subgrupos das regiões variáveis dos anticorpos. Foram definidas 88 sequências e, embora todos os clones presentes na biblioteca possuam o inserto completo, 76% deles apresentaram a fusão VH/VL funcional, o que demonstra que a biblioteca apresentou uma variabilidade de $1,7 \times 10^6$ Fabs.

A região variável derivou de nove famílias diferentes de genes que codificam para essa cadeia, incluindo cinco famílias para VH (VH1, VH2, VH3, VH4 e VH5) e quatro subgrupos para VL (Vκ1, Vκ3, Vκ4 e Vκ5). Os repertórios VH e VL estão representados na figura 2. Além disso, foi verificada uma predominância da família VH3 e uma ausência de amplificação da família Vκ2.

As regiões determinantes de complementaridade (CDR) e as *frameworks* foram definidas com base no programa Kabat. Apenas sequências de alta qualidade foram utilizadas na tradução. A CDR3 das regiões VH e VL foram altamente diversas e, portanto, os fragmentos Fab encontram-se distribuídos ao longo de todo o repertório germinativo dos anticorpos (Tabelas 2 e 3).

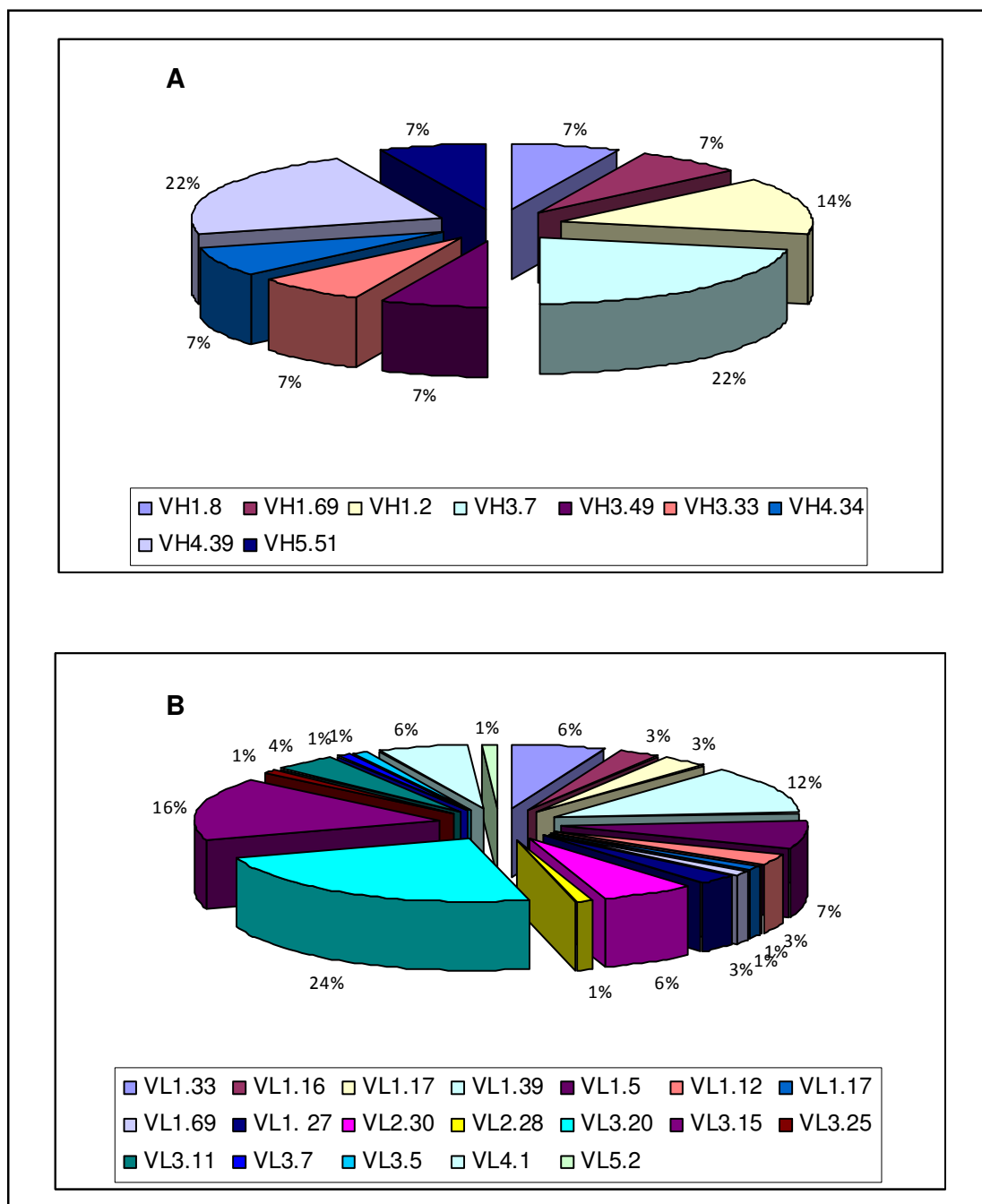


Figura 2: Repertório de VH e VL da biblioteca original não-amplificada. O gráfico representa a frequência das famílias gênicas de VH (A) e VL (B) em percentagem. As sequências foram alinhadas com a linhagem germinativa mais próxima utilizando-se o Ig Blast.

Tabela 2: Sequência de aminoácidos deduzidas das regiões V_K de clones não-selecionados. As regiões de arcabouço (Frames) e CDRs estão assinaladas. As famílias foram organizadas de acordo com os subgrupos aos quais pertencem.

	Frame1	CDR1	Frame2	CDR2	Frame3	CDR3 + Frame 4
Subgrupo 1						
IGKV1D-33*01	QMTQSPSSLSASVGDVITTC	QASQDISNYLN	WYQKPGKAPKLLIY	DASNLEP	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDRTTYC	QQYDKLLRRTYFGQGTKVEIT
GKV1D-33*01	QMTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPPELLIY	DASDLET	GVPSSSVGVDLGQILVPSAVCSLKIVQHITV	NSMRIFLSLSAEGPRWRSN
IGKV1D-33*01	QMTQSPSSLSASVGRHEVIITC	QAESGHQLFKV	GISRNGKGPLNSST	MLPIWNQ	ESHQGSVEVDLGQILLSPSAACSLKIEQHITV	NSMISSGILLARGPWRSH
IGKV1D-33*01	QIDPVSLPVCICRRQSHHQL	PGESGHPLFK	LVS AETRGDPGPD	RCIQFGN	RGPIKVQKWVWDRFYFHHQQPAARYCNILL	STASPVHFWPGDQAGDQT
IGKV1-16*02	QMTQSPSSVSASVGDVITTC	RASEGIGTYLA	WFQKPGKAPKIPDL	FCIHFAK	WGPIKVQRQVWDRFHHSHHQPADRFCNLLL	PTVQLPAHFRRRDQ
IGKV1-16*02	QMTQSPILTVCICRRQSHHHL	SGESGTVNNNLA	WFQKPGKAPKSLIY	AASSLRS	GVPSKFGSGSGTDFTLVSLQPEDFATYYC	QQYNSYPFTFGPGTKVDIK
IGKV1-17*01	QMTQSPSSLSASIGDRVITTC	RASQALEMTA	GISRNLGKPLSASM	LHPVCKV	GSHQVQRQVWDRVQSHNHQPADGSRNLLL	STILSLPSVVRPRDQGG
IGKV1-17*01	QMTQSPSSLVCIYRQSHHHL	PGKSGALEMTA	GISRNLGKPLSASM	LHPVCKV	GSHQGSAAVDLGQSSISQSPACRLRISQLITV	YNIITLCRSAGKPRWISN
IGKV1D-39*01	MTQSPSSLSASVGDVSIITC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	EASTLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFASYC	QQSYLPLTFGGGKVEI
IGKV1D-39*01	MTQSPSSLSASVGDVSIITC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	EASTLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFASYC	QQSYLPLTFGGGKVEI
IGKV1D-39*01	MTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSCSTLFTFGPGTKVDIK
IGKV1D-39*01	QMTQSPSSPSASVGGRVITTC	RASRTIYNFLN	WYQKPGKAPNLLIY	GTSTLQG	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYETPFTFGGKVEIK
IGKV1D-39*01	QMTQSPSSLVHLSDRVITTC	RASQHRHLFK	YGISRNQKGPLSSSM	LHPVCKM	GSHRGSAAVDLGQISLSLSTACSLKTLRLTFV	NRLTVSHSPSALGPKMS
IGKV1D-39*01	QMTQSPSSPVCICRRQSHHHL	PGQVGPFTTFI	GISKNGKQPNLLIY	GTXPCKV	GSHQGSAAVDXGTDFTYSHIRQSAN*RFCNLLXC	QQSYESPSTYGGNGQGGDQ
IGKV1D-39*01	QMTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYSPCTFGGKVEIK
IGKV1D-39*01	QMTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	WLLSTFAK	WGPIEVQWQWDRFSLXXVSLQPRFCNLLL	STKYVTTTFFKGR
IGKV1D-39*01	QMTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	RASNLSQ	GVPPRFGSGSGTFTPTISLQPDFFATYYC	QQYKSYSPYTLWPGDQAGDQT
IGKV1-5*03	QMTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	RRLVRM	ESHQGSAAVDLGRNLSLSPSACSLRITQLITA	NNMILFHSLSALGPNWISN
IGKV1-5*03	QMTQSPSTLTLTSSVVKTESPSRC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	KCIFRK	WGPIELQQRQVWDRFHHSHHQPAAFMQNTNYC	QHVLDVVRTMGPRW
IGKV1-5*03	MTQSPSSLSASVGDVITTC	PASQSVRNLA	WYQKPGKAPKLLIY	EASSLES	GVPSRFGSGSGTFTPTISLQPDFFATYYC	QQYENFSGYTFGQGTKLEMK
IGKV1-5*03	MTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	VRLVKE	GSHQGSAAVDLGRNLSLSPSACSLRITQLITA	QQYKTYCPVTFGVWDQGRGLQT
IGKV1D-12*02	QMTQSPSFVSASVGDRTITSC	RASQDIGRWL	WYQKPGKAPKLLIY	GATTLQR	GVPSRFGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYC	QQGNGFPYTFGQGTKLDFR
IGKV1D-12*02	MTQSPSSVSASVGDVITTC	RASQDIGRWL	WYQKPGKAPKLLIY	GASNLQS	GVPSRFGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYC	QQANSFPFTFGPGTKVDI
IGKV1-17*01	QMTSLHPPCLHLETESPSLA	GQVRALEMI	LVS AETRGKPLSASM	LHPVCKV	GSHQVQRQVWDRFHHSHHQPEDFCNLLL	STALPSDVRPRDQGGNQT
IGHV1-69*09	QVQLVQSAAEVKPGSSVKASCKASGGTFS	SYAIS	WVRQAPQGGLWWMG	RIIPILGIANYAQKFQ	QSHDYRGQIHEHSLHGAADLRTLRVLLCE	RWEAAGFILLGXGTLVXGS
IGKV1-27*01	MTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQGHQLFS	LVS AETRESSAPDL	CCIHFAI	RGPISVQRQVWDRFHHSHHQPAAFCNLLL	STRQLQPLVDVRPRDQGGNQT
IGKV1-27*01	MTQSPSSLSASVGDVITTC	RASQAISNALS	WYQVRPGMAPKLLLS	IASRLES	GVPSRFGSGSGSAAEYTLTISLQPEDFRHLL	STILXAAPYTFGQGDQVG
Subgrupo 2						
IGKV2-30*01	VMTQSPSLSPVTLVAGLHLLA	GLVKASYIETKPTT	GFHQXPGQSPRLLIF	QVSNRDS	GVVPVQIRQLGQALISHKSARGERAECXWVI	LLTQRYTTRRRTWFGQGTKVE
IGKV2-30*01	VMTQSPSLSPVTLGQPASISC	NSSQSLVFMWRHILE	LVSPECQANLQGAFL	RSLSGTL	GSQTDAAVGLGQALISHLSAGVEADDVGTFFC	MQGTHWPVTRPRDQSGDQT
IGKV2-30*02	MTQFSLSCRHLGQRLISA	VSKLVHSDGNTTI	GFSGQANLQAPNY	EISNRDS	GVQTDAAVGLGQALISHPSVGGGCGWGLL	HARYTVAVHFWPGDQPEIK
IGKV2-30*01	VMTQSPSLSPVTLGQPASISC	SVSKPRIRRKHLLE	LVSPECQANLQGAFF	SVSNRDS	GVPDPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC	MQGTHSSWTFGQGPWKS
IGKV2D-28*01	VMTQSPSLSPVTPGEPASISC	RSSQSLHTNGFNLYD	WYLQKPGQSPQVLFY	YRVLNGPP	GSLTGSVSAQAQIITLKISTSGGRMLGFYTL	HAKVYXIPRTFGREGPRW
Subgrupo 3						
IGKV3-20*01	TQSPDTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGLSLTFGQGTKLEIK
IGKV3-20*01	TQSPGTLSPGEGATLSC	RDQSQCQGLLS	LVP AETWPELPGSSSM	VHPAGPV	VSQTDAAVGLGTEFTLTISLQPDFFANLFL	PTVLDLQVQAKGPRW
IGKV3-20*01	TQSPGTLSPGGERATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQKPGQAPRLLIY	VHPAGPL	ASQTGSVAVGLGQTLSPSADWSLKILQCTTV	SSMVAHRGSAKGR
IGKV3-20*01	TQSPGTLSPGGERATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQKPGQAPRLLIY	AATRAT	GIPDRFSGSGSGTDFALTISRLEPEDFAVYYC	QYYLSLFPFGQGTREI
IGKV3-20*01	TQSPGTLSPFPVSHPLL	QWVPVTLAVPTP	GTSRNLAARLVLLIY	VYIQQWPL	ASQTGSVAVGLGQTLSPSADWSLKILQCTTV	SSMVAHLWFGQGTKVELK
IGKV3-20*01	TQSPGTLFVSSVKEPPSPA	VASHSVSRAYLA	WYQKPGQAPSAPHL	CVHPAGPL	ASQTGSVAVGLGQTLSPSADWSLKILQCTTV	SSMVAHRGSAKGRWNSN
IGKV3D-20*01	TQFSSHVPVCSRENRAIPSPA	RAKSRDVTHTQWP	CATSYETLRRSGVPLXLLSV	VHPPEXT	GYPQSQSVAVASGTFDFHSHHQTGCLRVFCSVLL	SAMVVALPVHFLASGPTLEIK

IGKV3-20*01	TQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQTVNNNYLV	WYQQKPGQAPRLVYV	DAFRAT	GIPDRFSGSGSGTEFTLTISRVEPEDFAVYYC	QQYGGSPPYTFGGQTELEIK
IGKV3-20*01	TQSPGTHVFRSPGEESTPSA	GPVRLATATP	GTSRNLQDAPRLLIY	GASSXDH	WHPRQVQWQWWDRLHSHHQQTGARFCRVLL	SAVWLTSDVPRDQSANQT
IGKV3-20*01	TQSPGTLSLSPVKSHPLL	QGQSECQQLA	WYQQKPGQAPRLLI	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYRRPPYTFGGQTKLEIK
IGKV3-20*01	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RARQSVGTSLA	WYQAETWRVPPKAPSSM	VHPSRAT	GYPRHGSVAVGLGQFTLTISRLEPERFCSVLL	SAVWWLTVVRKGPWRWSN
IGKV3-20*01	VMTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSASSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASNRAT	WHPRQVQWQWWSDRLHSHHQQTGTGFCSVLL	SAVWSLTVQFWPGDQAGDQT
IGKV3-20*01	VMTQSPRAPCLCLQGDTPPVSC	RASQGSAAATPP	GTGRNRGQPRLLI	GTSNRGH	WHPRQVHWQSVWRLQSHYHQTGTRFCSLL	SAVWSLTPVDVRPHQGGNQ
IGKV3-20*01	VLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSSIRTYLA	WYQHKPGQAPRLLIY	GASIRGR	WHPSQVQWQWWDRLHSHHHQPGA*RFCVLL	SAVWLTRGTLARGPSWRSN
IGKV3-20*01	VLTQSPGTLSLSPGDSATLSC	RASQSVTSNSLA	WYQQRPGQAPRLLIY	GASSRAT	GIPDRFTGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QHFSSSPSTFGRGTKLEIK
IGKV3-20*01	VLTQSPGTLSLSLGATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQQRPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGGSPWFGQGTKVELK
IGKV3-20*01	VLTQSPGTLSLSPGRKSHPLL	QGQQRILGKQLS	VPAQTWPQSGPHL	CIQQGPL	ASQPGSSGSRVWDRLHSHHRQDWSLEDFAVYYC	QASIGRL
IGKV3-20*01	VLTQPPATLSVSPGRKSHPLA	GPVRLSAATP	GISINLARLELLIY	GASSRGH	WHPRQVQWQWWDRLHSHHQQTGARFCVLL	DRLHSHHQQTGARFCVLLWLTGRGTKLEIK
IGKV3-15*01	TQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIH	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	QRYETFGQGTKVEIK
IGKV3D-15*01	TQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSKNLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASIRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISFQSEDSAVYYC	QHYNNWPPWFSFGQGTREIR
IGKV3-15*01	TQSPATLSVSPGESATLSC	RASHECQELS	LVSATWPASQAPHL	WHPPGPL	VSQPGSVAVGPGQSSLSTXSLSQSGDFAVILL	SASITGLRCLSCSGGXTKVEIQ
IGKV3D-15*01	TQSPGTLSPGERATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQQKPGQAPRLLI	GASTRAT	GIPAKFSGSGSGTEFSLTISALQSEDSAIYFC	QQYDRWLLYTFGQGTKLEIR
IGKV3-15*01	TQSPATLVCLQGKEPPSPV	VASQSVGNLA	WYQHKPGQAPRLLIY	NTTTRAT	GVPARFASAGSGTEFTLTISRLQSEDFAVYFC	QQSSTFGQGTKLEIR
IGKV3-15*01	TQSPATLVCVFQGNKSQPCPA	GPSQECIGDFLA	WYQQKSGQSPRLLIH	GASIRAT	GIPEQVQWQSVWDRIHSHHQQHAVRXCSSL	STILASDVPRDQGGNQ
IGKV3-15*01	VMTQSPATLSLSTGERATLSC	RASQSSQLLS	LVPATWPGSQAPHTM	LHPPETT	GIPARFSGSRVWDRVHSHHQQPSVLKILAXILL	SKRYDYLGPPLFSFGPGATVHFR
IGKV3-15*01	VMTQSPATLSVSPXKGHPLL	QGQSEYWHLPS	LVPATWVPSPSLHL	RIHQGH	CSSQVQWQWWWDRVRSHHQQSAVRFCSLFL	SAVLQLASWVQFWPGDQVGDQT
IGKV3-15*01	VMTQSPGTLSPGRMSHPLL	SVQVRVLGGNLA	WLPAETWPVSNSSSM	LHPPGAS	YPRPRFSGSGSGTEFTLTIXQMTSRERLLDF	NYMSDTLLXTGPPMYSFWPR
IGKV3-15*01	VMTQSPATLSLSPGERVTLPC	RASQSVRNFLA	WYQQKSGQSPRLLIH	GASIRAT	GIPGRFSGSGSGTEFTLTISMSQSEDFAVYYC	QQYNNWPWTFGQGTKLEIK
IGKV3-15*01	VMTQSPATLVCVSRGKEPPILLT	GTSQSVSSNLA	MDTSRNLDAQPRTPHTM	VHPPXPL	VSQPGSVAVGLGHEFT	SAVLVPDVRPRDQGGNQ
IGKV3-15*01	VLTQSPGTLSPGERATFSR	RASQNFSGNLA	WYQQKPGQAPRLIY	GASIRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISMSQSEDFAVYYC	QQYNNWPQTFGQGTKVEIK
IGLV3-25*02	LTQPSSVSANPGGTVKITC	SGGGGYG	WYQQKAPGSAPVTIY	DNTNRPS	DIPSRFSGSKSGSTHTLTITGVQAEDEAVYFC	AWDSSGSYDDIFGAGTTLTLVLGQSSRSSAVT
IGKV3-11*01	MTQSPATLSLSPGRKSPSPA	EASQELSERN	IEXWVWPNRKPWTKAAQGSSSM	NAIQQGH	LASQAQSSVAVGVSVDTFISSSIMSALIVLKILQFXTV	TSVSTGRGRSAKGP
IGKV3-11*01	TQSPATLSLSPGERATLSC	RASQNIKHLLS	LVPTRNLARLPASSFM	MHLPGPL	TSQPGSVAVGLGQTLSPSASLTILQFITV	SSVANWFTFGQGTKLEIK
IGKV3-11*01	VMTQSPATLSLSTRVKRATLSC	RASQNIINIYLA	WYQQXTWPGSQPPHL	LHLPEPL	TSQPGSVDSGSGTLHSHHQQPRARFCFITVS	SSXNWFTEFGQTATGNT
IGKV3-NL5*01	VMTQSPATLSVSPGDRATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	AASSRAT	GSPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC	QQRSNWLSITFGQGTKLEIK
IGKV3D-7*01	VMTQSPGTLSPGETATLSC	RASQSFSSSTYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYHC	QQANSFPLTFGGGTKVEI

Subgrupo 4

IGKV4-1*01	VMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQTLFKLQCELLS	LVPATRTASDTHL	LGIYPGI	WGPPVHWQRVWDRFHSHHQQPAGRCGSLLL	SAILCPVHFVPGDQGGDQT
IGKV4-1*01	VMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSLFHSALNVNYLA	WYQLRPGQPPKLLIY	WASTRES	RGPLTRFRWQRVLGQISLSPSAACRLKMWRFITV	SSFIVLLGHSAKGPWRKSN
IGKV4-1*01	VMTQSPGSLTVSLGERATISC	KSSQGVYTAPTIRITL	GTSRNQDSSLNCSFT	GHLPGNP	GSLLTDTVAAAGLGQISLSPSAACRLKMWQFITV	SNIIVLLSLSAEGPRCRSN
IGKV4-1*01	VMTQSPGSLTVSLGERATISC	KSSQGVLYSSNNKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRQS	GVPDRVSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYC	QQYYSTPVTFGGGTKVQK

Subgrupo 5

IGKV5-2*01	LTQSPAFMSATPGDKVNISC	KASQDIDDDMN	WYQQKPGEAIFIIQ	EATTLVP	GIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFC	LQHDNPWTFGQGTKVEIK
------------	----------------------	-------------	----------------	---------	----------------------------------	--------------------

Tabela 3: Sequência de aminoácidos deduzidas das regiões VH de clones não-selecionados. As regiões de arcabouço (Frames) e CDRs estão assinaladas. As famílias foram organizadas de acordo com os subgrupos aos quais pertencem.

	Frame1	CDR1	Frame2	CDR2	Frame3	CDR3 + Frame 4
Subgrupo 1						
IGHV1-8*01	SGSKQKTWGLSKFSCQASGYTSP	VMIST	GCEQATGQGLEMG	WMNPXSVTTGYAQKFQG	RVTMTRKQPPAQPTWSASLRSENTAXYYCAS	YRDGYNFFDYWGQGLTVTVSS
IGHV1-69*09	GKAFWRHLQ	QAYAYSS	WGADKAPLGTRAVDG	KDHPYPWYSKLRTEVPG	QSHDYRGQIHEHSLHGAEQPEIGHGRVLLCE	RWEAAGIFLLGPGNPGHRL
IGHV1-69*09	KPWSSGKALRKLLXPFS	SYAIS	LGANRAPTRAWEWMG	RIIPMPWYSKLRTEVPG	QSRLPRTPRAQPTWSAADLRTRPCITVRE	MGSSWYISTGAREPWSPSPQ
IGHV1-02	SWAEXKKPGGPQRSPARLSGT PFT	DNYIH	WCDRHPGQGLEWMG	WINPNSSGGTNYAQKFQG	RVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTALYYCAR	DVFVEVSASTWGDHGMVWGQGLTVTVS
Subgrupo 3						
IGHV3-7*01	GXLVQPRWVLRSLCSLRDSALV	DGGCL	GSARLPKGFGGSWVP	TTQDGGTELRLCERV	GLLSPRDNAKNSLSLQMNSLRVEDTAVYFCAS	GAERQWGFSSREGTLTVTVSS
IGHV3-7*02	GGPQKLSRVXLXDSALV	IAGCL	GSRQAPGKGLELGA	KHKPRWRNGTLRGLCEG	SVYYLQRQRQELTVSANEQPESREHGCVFCE	XGLRDSGVLLAAEREPWSPSPQ
IGHV3-7*02	GGGLVPSGGFPLXDFSCVPPDSALV	RCECL	GSRLGSSGKVVWNWVA	NINPRCSERNSTLDSVKG	RFIISRDAXAKNSLSLQMNSSESRGHGLVCISVRV	GAERHLWCFVSAERXTLTVTVSS
IGHV3-49*05	GS GF TLL	DYXLD	CSAKXSSGRLVELG	LSAARLMVGQQNTAAVESVA	GSPCQEMIHKAVAYLQLSKSGDRGHSRVFICT	PYXRLQASNRTGXREHWSPSPQ
IGHV3-33*01	FS	TLLACT	GSASSKGLEWLQ	LYGMMEVINTMQTPRA	DSPSPETIPRTRCICKTAWEPSTRLCITVRE	
Subgrupo 4						
IGHV4-34*02	PHGAPGLVETLWGDVSVTALSXWSFS	GXLWE	LNPASQERAGVDW	GNQIHSEAPITTRPSRV	ESSYQTRPTSSPSXSSVTDADTAVYYCAR	GGYDSNGYSSAEYFQHWGQGLTVTVS
IGHV4-39*07	-----	SSYTWA	IPPSQGGKGLGMEFA	SRYLVPXPYPVXXDLQRS	RVHHNAIDTVARNQFPSPALPLRTRPCITVRE	IGGRRTYYYDRDWYFDLWAVEPWSPSPQ
IGHV4-39*07	-----	SYIWA	WIRQPPGKGLVDC	QVLWYHLPPDPQE	SSHIDRHVREPVLPEAELCDRCGHGRVLLCE	XIGGAGRITMIATGTSISGAVEPW
IGHV4-39*01	-----	XS Y TGA	GSASPQGGGW EWIG	SIYYVGSTLLQVPVQE	SSHIRRHVQEPVLPSPALPPQTRLCITVRD	FRGITMIVVWSPLVRPLGPGNTGHRLP
Subgrupo 5						
IGHV5-51*01	KNPGXSLKIFMLRVMGVFT	NYLDR	PGLRPDCPWKGLEFDG	DHRSTGCTLTPDTPRXPQG	PGHHVSRQVHHHPSYLQWSSSEGLGHRHVLLCE	NEHCSRSLGPGNPGHRL

3 SELEÇÃO DE FAGOS PRESENTES NA BIBLIOTECA COMBINATORIAL DE ANTICORPOS LIGANTES ESPECÍFICOS AO CANCER DE MAMA E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS FAB EM SOLUÇÃO

Cada ciclo consistiu em uma seleção subtrativa contra tecidos de pacientes normais seguida de uma seleção positiva contra tecidos tumorais frescos. A eluição foi realizada, transferindo-se o tecido para uma cultura de bactérias. Após esses procedimentos, os fagos foram amplificados para o próximo ciclo. Como esperados, foi observado um enriquecimento no número de clones eluídos do primeiro para o terceiro ciclo.

A seleção de fagos obtidos na biblioteca combinatorial apresentou um enriquecimento no número de clones eluídos do primeiro para o terceiro ciclo. Após o ultimo ciclo de seleção, clones isolados obtidos das placas correspondentes ao eluato do terceiro ciclo foram amplificados em *E. coli* XL1-Blue em placas *deep well*. Parte das células bacterianas foi usada para extração de plasmídeos e parte foi induzida a expressar o Fab com IPTG. Após a indução o sobrenadante foi coletado. Apesar de não ser uma linhagem não-supressora, bactérias dessa linhagem são capazes de produzir anticorpos solúveis, porém em quantidades menores.

Ensaio de Slot-blotting permitiram uma abordagem rápida da produção e secreção de Fab. A detecção dos 96 clones Fab obtidos com o anticorpo anti-HA está apresentada na Figura 3. Na membrana foram aplicados 10µL de sobrenadante de cultura e o ensaio revelou a presença de Fab em 98% dos clones selecionados randomicamente a partir do eluato do terceiro ciclo e submetidos a ensaios de expressão de moléculas de Fab na forma solúvel.

A eficiência de seqüenciamento para o oligonucleotídeos MMB5 se mostrou bastante reduzida em comparação com o *primer* MMB4. Os resultados pós-sequenciamento com MMB4 seguido da tradução *in silico* estão apresentados na Tabela 4. A detecção de moléculas solúveis utilizando o anticorpo anti-HA evidenciou a presença da região VH, uma vez que o epitopo de hemaglutinina encontra-se fusionado a essa cadeia. Dos 95 clones que produziram Fab na forma solúvel, identificados por Slot-Blot, 49 tiveram sua seqüência de VL completamente identificada (Tabela 4).

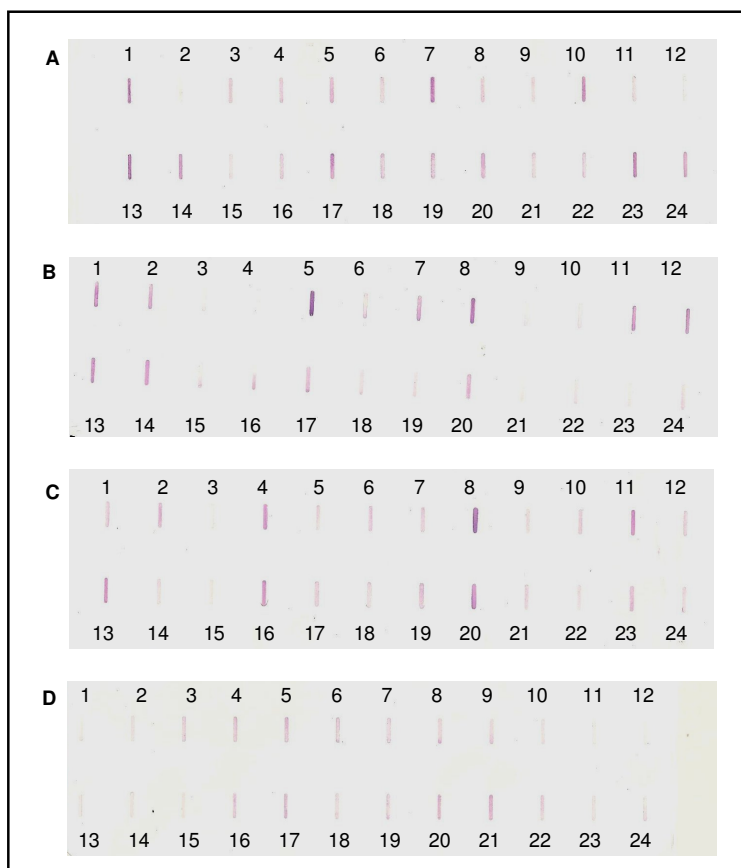


Figura 3: Slot Blot de clones selecionados e induzidos por IPTG. O clone 12 plotado na membrana D corresponde ao vetor pComb3X vazio utilizado como controle negativo de hibridização. As demais posições são ocupadas por sobrenadantes de clones com fagomídeos selecionados. A presença do anticorpo Fab solúvel foi detectada qualitativamente pelo anticorpo anti-HA , responsável por reconhecer a cauda de hemaglutinina fusionada à cadeia VH.

Tabela 4: Análise das sequências dos clones selecionados e induzidos por IPTG. Nota-se a presença de clones distintos entre os selecionados para sequenciamento da cadeia V_k.

Clone	Frame1	CDR1	Frame2	CDR2	Frame3	CDR3+Frame 4
1	QMTQSPSSVSASFSDVTITC	RASQDVGRWLA	WYQKPGKAPKFLIY	AVSTLQP	GVPSRFRGRSGSYFTLTIDNLQPEDFATYFC	QQASASPRTFGGGKTKVDIK
2	VQLVQSGGGVLKPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAPGKLEWVS	SISSSSHILTQTQRA	DSPSPETTPKNSLYLQXNSLRAEXRVYYCAK	RNGPNGSPNLYGAEPG
3	MTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFGSGSGSTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSLQYPSXVLARGPSWRSN
4	VMTQSPGTLSPGERATLVL	QGQSQC AGAYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GTSXRGH	WHPXQVQWQVWVW DRLHSHHQQTGA RFCSVTTV	SS MVAHRGSAKGRWNSN
5	VMTQSPGSLTVSLGERATISC	KSSQGVYAPTIRTTL	GTSRNQDSLNCST	GHLPGNP	GS�TDVAAGLGQISLSPSAACRLKMWQFITV	SNIIVLLSLSAEGPRCSRN
6	VQLVQSGAEVKPGSSVKVSCASGDTLS	NYGIS	WVRQAPGQGLEWMG	GIMPLFGTRNYAQKFQG	RVITITADESTNTAYMELSSLRSDDTAVYYCAR	EAGLG
7	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	DASNRGH	WHPSQVQWQVWVWDRHLHSHHQPRALERFCTVLFV	KAAQTWAVERFGPKGT
8	VMTQSPGTLSPGERATLSC	SGQSECQQLLS	LVPARNLARLPSSSM	VHPAGPL	ASQTGSAVAVGLGQTSLSPSADWSLKILQCTTV	SSMVDSPVVRPKDXWNSN
9	MTQSPSSLASIGDRVTMTC	QASRDIAYLS	WYQKPGKAPELLIS	AASNSEA	GVPSRFGSGSGSTHFTTISLQPEDFATYFC	QQYNRLPLTFGGQTRLVIE
10	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFVAVYYC	QQRSNWPWTFGGQTKVEIK
11	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLXPEDFVAVYYC	QQRRTGRGSAKGRWKS
12	TQSPSFLASVGDRTITTC	RASLDISRKLA	WYQRPQTAPKLLIF	AASTLES	GVPSRFGSGSGTDFTLTIGSLQPEDVANLLLV	NNFQRNPFIFGGPTIVEIK
13	QMTQSPSSVSASFSDVTITC	RASQDVGRWLA	WYQKPGKAPKFLIY	AVSTLQP	GVPSRFRGRSGSYFTLTIDNLQPEDFATYFC	QQASASPRTFGGGKTKVDIK
14	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFVAVYYC	QQRSNWPWTFGGQTKVEIK
15	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQGIRNDLG	WYQKPGNAPKVLIIY	AASTLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTIGSLQPEDFATYYC	LQDYDYPWTFGGQTKVEI
16	VLTQSPGTLSPGETATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQRPQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVAVYYC	QQYGGSPWFGGQTKVELK
17	VLTQSPATVSPGERATLSC	RASQNDIDNHLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASTRGH	WYPSQVQWQVWVWDRHLHSHHQGTGARFCSVLL	SAVWWLTVVRPDQGGTLT
18	TQSPGTLSPGERATLSC	RASHGVSRAVLA	WYQKPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVAVYYC	QQYGGSPWFGGQTKVELK
19	TQSPGTLSPGERATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVAVYYC	QQYGGSPWFGGQTKVELK
20	TQSPGTLSPGERATLSC	RASHSVSRAYLA	WYQKPGQAPRLLIY	GTSSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTIGSLQPEDFATYFC	QQSYSLPYTFGGQTKVEI
21	QMTQSPSPVSAVGDRTVTTC	RASQPISSYLA	WYQKPGKAPKLLIY	GATQLQS	GVPSRVRRQSIWDRFHSHHQQAARFCNLLL	STGQFPLHFHWPQDQGGGQT
22	VQAGAVWGRRGPAWEVETLLCKRLDSSSV	IMACT	GSARLQAKGLEWVA	VIWYNGDMNIMQTPRA	DSRISRQGFQEDIIIFGTACGSTDVAVYYVGT	RSNSGQLWGSLSLGGRTLGPR
23	RMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQDIRNDLG	WYQKPGKPPKTPDL	CCIHFQV	GSHQGSAAAGSGTEFTLTIPACKPEDFATYYC	QQLNNYPLTFGGQTKVDK
24	MTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVLYSSNNKNYLA	WYQKPGPPKLLIY	WASTRES	GVPDFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYC	QQYYSTPLFGGQTKLEIK
25	VMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAMYYC	QQYGGSPWFGGQTKVELK
26	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQGISSWLT	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSASGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQANSFPLTFGGGQTKVEIK
27	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQGISNYLA	WYQRPNGNAPKLLIF	AASTLQS	GGPISVQWQRIWDRFHSHHQQAARCCNLLL	SKVQPPHFRDRDGGNQ
28	TLTQSPAFMSATPGDKVNISC	KASQDIDDDMH	WSQKPGEAALFIIQ	EATTLVP	GISPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFC	LQHDNFVVRPDQGGNQ
29	VMTQSPVILSVSPGKEPHSPA	VASQSVSINLG	WYQKPGQAPRLLIY	DVSSRAT	GIPPRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVAVYYC	QQYGGSPKVTFGGQTKVEIK
30	QMTQSPSILSAVYGDRTSITC	RASQNITTYLR	LVSAAEARESPGLDL	GVFRTV	GSHQGSAAVDLQSSLSPIKPAAFGNLLL	PTVSLRFRFTFGQGNQGGN
31	QMTQSPSSLVCIIYRQSHHHL	PGKSGHRLS	WYQKPGKTPKRLIY	AAIQFAK	WGPIKVQRQWIDRVQSHNHQHCRRLISQLITV	YNIITLCRSAGKPRWISN
32	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQGIRNDLG	WYQKPGNAPKVLIIY	AASTLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTIGSLQPEDFATYYC	LQDYDYPWTFGGQTKVEI
33	VMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQKPGQAPRLLIY	GASTRGH	WYPSQVQWQVWVWDRVHSHNHRPAARCNLLL	SAALSADFVWPDQAGDQT
34	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQDISDSL	WYQKPRKAPELLIIY	DATNLEA	GGPFKVQEWFRGHILLSPFSSLPQPEILGTIFL	STLSSSPGMTLRAKGTGW
35	QMTQSPSLSAFVGDRTVTTC	RASQGIRDNLS	WFQKPGESPAPDL	KHPIKV	GSHPGSAAVDLGHFSLSPSPICSLKIWELISV	NNIIVTLGRSAKGRWKS
36	MTQSPSSLASVGDRTVTIAC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEEFATYYY	QQSYSTPPTFGGQTKVEIK
37	MTQSPDSLAVSLGERATLNC	KSSQSVFKSSNNKNYLA	WYQKAGQPPKLLIY	WASTRES	GVPDFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYC	QQYYSTPRTFGGQTKVEIK
38	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASQALEMIWA	GISRNQGMPLRSSM	LHPLYKV	GSHPGSAAVVLAQILLSPSAACSLKILQLITV	YKITITRGRSAKGRWKS
39	LTQSPAFMSATPGDKVNISC	KASQDIDDDMN	WYQKPGEAALFIIQ	EATTLVP	GIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFC	LQHDNPWTFGGQTKVEIK
40	VLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVRGDYIA	WYQTPGRAPRLLIF	EASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFVAVYYC	QQRSNWPSPFGGQTKLEIK
41	QMTQSPSSLASVGDRTVTTC	RASRGIRNDLG	WYQKPGKAPKRLIY	AASSLQG	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYTMPYTFGGQTKLEI
42	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFVAVYYC	QQRRTGRFTFGGQTKVEIK

43	VMTQSPSTLSLSPGERATLSC	RASQSISSRYFA	WYHQKPGQSPRLLIH	GTSNRGH	WRPRQVHWRVWVWDLRSHHQQTGARFRRVLL	SAVSVTVGVVRPDGGNQ
44	MTQSPSSLSASVGDRVITIC	RASQGISNYLA	WYQKPGKVPKLLIH	AASTLQS	GVPSRFSGSGSRDRFHSHHQQPAARCCNLLL	SRVQCPhFRPWDQSGYQT
45	VMTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAGQSVDSAFLA	WYQRRXGRLPDSSFM	VHPPGPL	GIPDRFSGSGSGTDFTLTVSRLEPEDFAVYYC	QYYGTSSPAVQARGPRWNSN
46	VLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RGQSECCQNAG	LVPAETWPGPQAPHL	WSIHQGGL	VSQPGSVAVGLGQSTLSPSAACSLKILQFIIV	SSIKTGPGRSAKGPRWRLN
47	VLTQSPGTVSLSPGDRATLSC	RPARQLPATIWP	VSAESCQAPRLLIY	GASSRGH	WHPRQVQWQVWVWDLRHSQHQQPARLCSLLL	SATRLVVHFWPGDQGGDQT
48	VLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSTSLA	WYQKPGQAPRVLIY	DASDRGH	WHPSQVQWQVWVWDLRHSQHQQTGRPEDFARCNY	CPGKYGSSPWVXVTGQGTK
49	MTQSPSSLSASVGDRVITIC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GAPSRFSGSGSGTHFTLTISLQPDDEFATYYC	QQSYSIPLFTFGPGTKVDIK

A molécula de Fab apresenta uma massa molecular de 56KDa, o qual apresenta a porção Fd da cadeia pesada associada à cadeia leve por pontes dissulfeto. Em análises em géis sob condições redutoras, as pontes dissulfeto são desassociadas separando as duas cadeias, em que cada uma apresenta 28KDa.

O perfil complexo de bandas observado no gel SDS-PAGE (Figura 4A) pode indicar que houve a lise bacteriana durante o crescimento em cultura. As análises do sobrenadante induzido dos quatro clones selecionados aleatoriamente demonstrou, por SDS-PAGE seguido de *Western-Blot*, que em todos ocorreu a dissociação das cadeias leves e pesadas de Fab (Figura 4B), devido à presença de um fragmento contendo 28KDa.

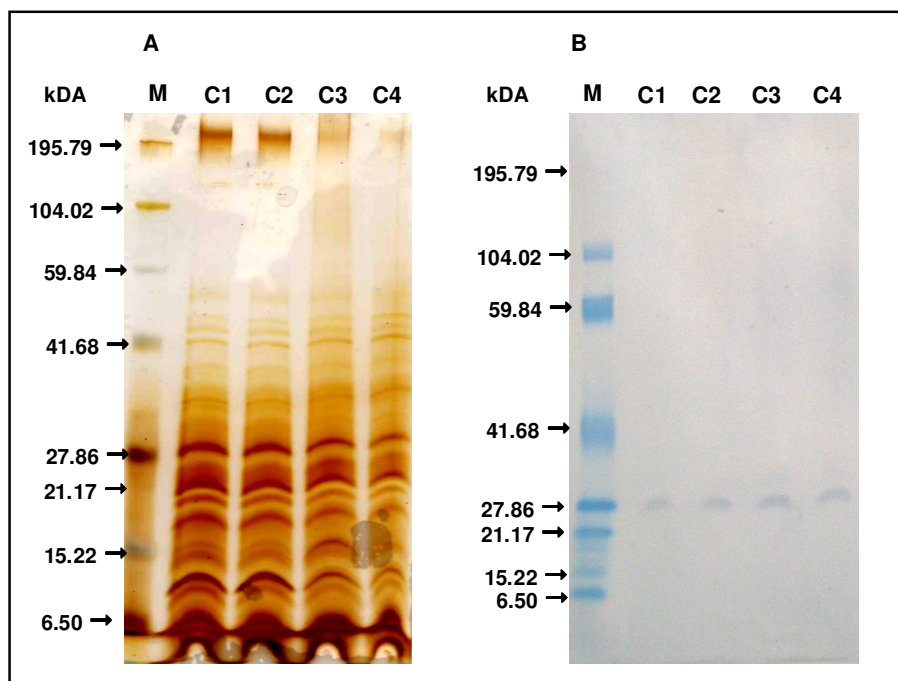


Figura 4: Análise da expressão de quatro clones Fab aleatórios após a indução por IPTG. Painei A: SDS-PAGE do sobrenadante de cultura induzido, apresentando fragmentação de colônias *in vitro*. Painei B: *Western-Blot* com o anticorpo anti-HA, apresentando marcação de um fragmento de ~28KDa. M corresponde ao marcador de massa molecular Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (Bio-Rad); C1-C4 correspondem a clones selecionados randomicamente da placa de expressão.

4 ANÁLISE PRELIMINAR DOS CLONES SELECIONADOS POR ENSAIOS DE ELISA E PURIFICAÇÃO DE FAB POR HPLC

Ensaio de ELISA foram realizados sobre o *pool* de proteínas totais extraídas de tecidos normais, diagnosticados com doença benigna e com carcinoma mamário. Foram observados 22 clones reativos (Figura 5A) contra o carcinoma mamário e, depois de identificados, foram realizados ensaios em duplicata para a sua confirmação. Nenhuma positividade foi encontrada utilizando-se o sobrenadante do vetor sem inserto sobre as proteínas normais, benignas e tumorais; o anticorpo secundário sobre essas mesmas proteínas e o sobrenadante de clone positivo sobre a placa sem sensibilização como controles.

Os resultados para a curva ROC (Figura 5 B-I) demonstraram que oito clones poderiam ser utilizados como bons marcadores tumorais. Contudo, devido a uma maior diferença na razão do índice ELISA entre o grupo com câncer e os demais grupos de estudo, apenas o clone C-4 (Figura 5AJ) foi selecionado para os demais experimentos de validação.

Esse clone, então, foi amplificado, seu DNA extraído e transformado em linhagem TOP 10 não-supressora. A linhagem não-supressora foi requerida para expressar moléculas Fabs livres da proteína III viral em solução e em quantidade maiores para sua purificação.

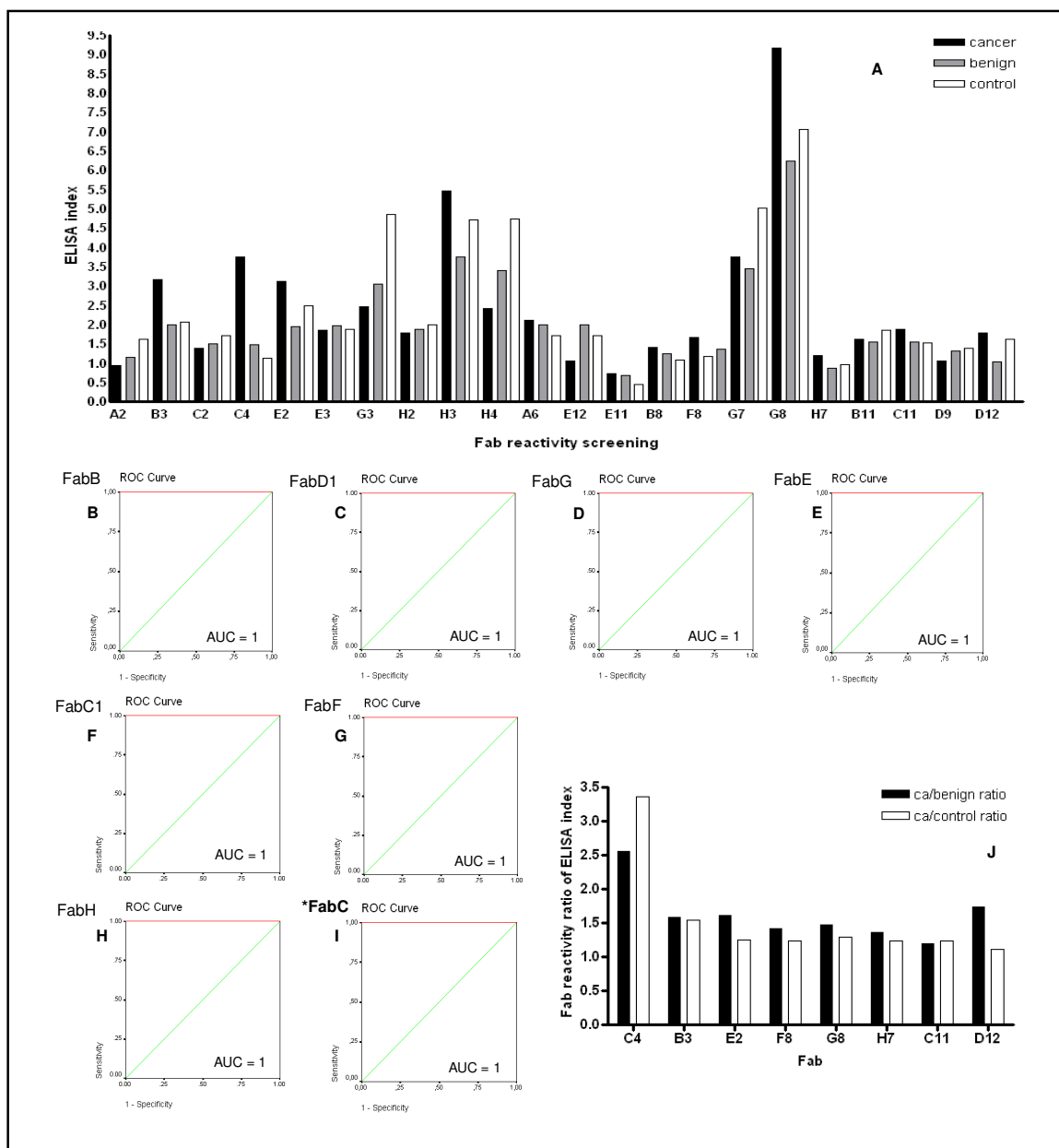


Figura 5: Ensaio de ELISA do sobrenadante de cultura induzido sobre proteínas totais extraídas de pacientes normais, com doença benigna da mama e câncer de mama, análises de curva ROC para os melhores clones obtidos e razão do índice ELISA entre CAM/DBM e CAM/CONTROL. Em A estão descritos os índices ELISA dos clones reativos às proteínas de câncer de mama, doença benigna e controle saudável. De B a I estão representadas a curva ROC dos melhores clones obtidos e em J está descrita a razão do índice ELISA entre CAM/DBM e CAM/CONTROL. O * evidencia o clone C4, com maior razão entre os índices analisados. O clone C4 foi utilizado para purificação em HPLC.

O clone selecionado foi induzido em 200 mL de meio SB; o sobrenadante foi concentrado em coluna centripep 10 e, posteriormente, purificado, utilizando-se coluna de níquel em sistema HPLC. Depois de aplicado o material, a coluna de níquel foi lavada com 10 mL de tampão fosfato e as moléculas ligadas foram eluídas com tampão imidazol.

Das 10 frações purificadas por cromatografia em sistema HPLC, três apresentaram maiores concentrações de proteínas e maiores reatividades com anticorpos anti-HA para o clone Fab C-4 cultivado (Figura 6). O conteúdo dos tubos com maiores concentrações protéicas foi agrupado e o tampão imidazol foi substituído por tampão fosfato em coluna Centripep. Depois de purificados, os anticorpos monoclonais foram liofilizados e armazenados a -20 °C. A quantificação dos Fab foi realizada espectrofotometricamente. O rendimento do clone Fab C-4 cultivado observado foi de 0,3 g/L.

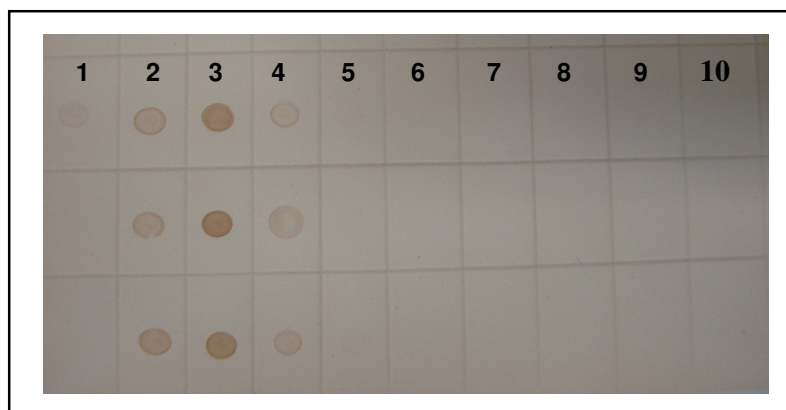


Figura 6: *Dot-Blot* do clone C-4 purificado por HPLC utilizando anti-HA. De 1 a 10 estão apresentadas as 10 frações obtidas após 3 corridas do sobrenadante de cultura induzido. Em 2, 3 e 4 observa-se maiores intensidades de marcação, o que corresponde a maiores concentrações de Fabs.

5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os resultados das análises imunohistoquímicas dos tecidos mamários, utilizando o clone Fab C-4 estão apresentados na Figura 7. No adenocarcinoma ductal infiltrante foi observada fraca imunorreatividade no citoplasma das células epiteliais dos ductos diferenciados (Figura 7a) e uma marcação mais intensa naquelas com características de indiferenciação (Figuras 7b, 7c), tal como razão núcleo:citoplasma alterada. Uma alta densidade desta imunorreatividade foi observada no citoplasma granular de células localizadas no lúmen dos ductos (Figura 7d). O tecido neoplásico apresentou regiões de desorganização histoarquitetural, mostrando células tumorais indiferenciadas dispersas no estroma tissular (Figura 7e). Em alguns desses tipos celulares associados à matriz extracelular foi detectada imunoafinidade intracitoplasmática pontual com o Fab C-4 (Figuras 7e-7g).

Nenhuma interação foi encontrada entre o Fab selecionado e o tecido mamário controle (Figuras 7h e 7i). Do mesmo modo, nas secções que foram incubadas apenas com PBS, utilizadas como controle da reação, não foi observada imunomarcacão (Figuras 7j e 7k).

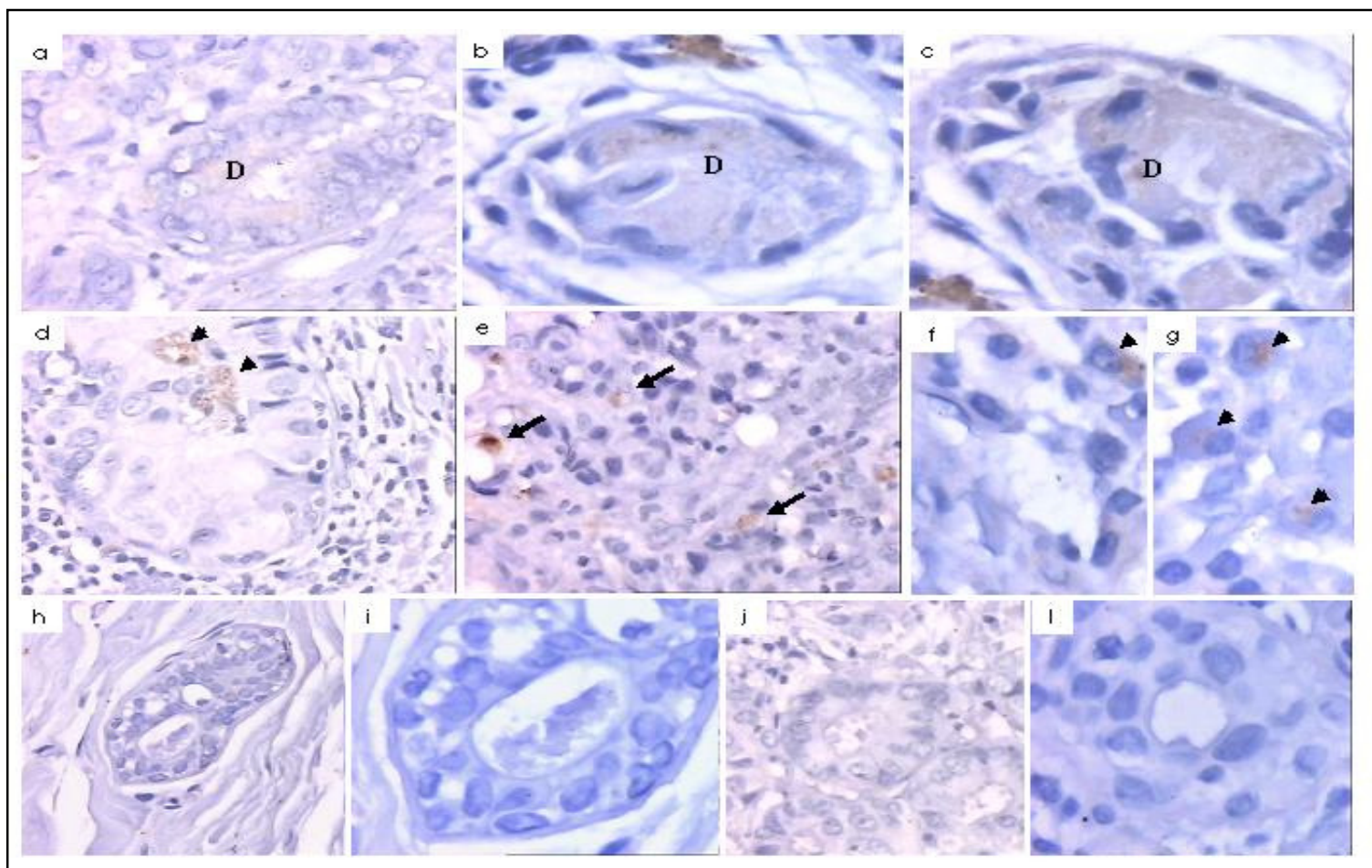


Figura 7: Imunohistoquímica de tecido mamário utilizando Fab C-4 selecionado por *Phage Display*. Os ductos bem diferenciados (a) e alterados (b, c) apresentaram imunorreatividade no citoplasma das células epiteliais (D). As células intraductais (d) apresentaram intensa marcação (cabeças-de-setas). As células indiferenciadas do estroma tumoral (e, f, g) foram imunorreativas para o Fab (setas). Os ductos normais revelaram ausência de reatividade (h, i). Nos controles negativos da reação (j, l) não foram observadas imunomarcacão. A contra-coloração foi feita com hematoxilina. Aumento 40x (a, d, c, h, j); 100x (b, c, f, g, i, l).

DISCUSSÃO

Anticorpos humanos são particularmente interessantes devido à sua aplicabilidade terapêutica (FILPULA, 2007) ao evitar a resposta HAMA frequentemente observada em anticorpos de origem murina. Para a produção de anticorpos, ou de fragmentos de anticorpos de origem humana, uma das técnicas mais eficientes é o *Phage Display* e há diversos relatos na literatura de bibliotecas de anticorpos geradas por essa técnica, seja de doadores imunizados (BARBAS & BURTON, 1996), de sequências de linhagem germinativa (GRIFFITHS et al., 1994) ou ainda de repertório *naïve* (VAUGHAN et al., 1996; DE HAARD et al., 1999), a partir das quais foi possível o isolamento de anticorpos ligantes de diversos haptenos, proteínas, peptídeos e carboidratos.

Recentes descobertas a respeito dos mecanismos moleculares e celulares subjacentes ao desenvolvimento tumoral revelaram que as células imunes são responsáveis por regular o desenvolvimento e progresso de células epiteliais cancerosas. Além disso, dados clínicos e experimentais indicam que o desenvolvimento tumoral é também resultado do tipo de resposta imune gerada contra a neoplasia (DENARDO & COUSSENS, 2007).

Esse trabalho foi desenhado com o propósito de clonar genes codificantes para o repertório de imunoglobulinas de pacientes com câncer de mama gerando uma biblioteca de fragmentos Fab apresentadas na superfície de fagos. Posteriormente, essa biblioteca foi empregada na seleção de potenciais marcadores de superfície de tecidos obtidos de pacientes com a neoplasia.

Linfócitos B são reconhecidamente envolvidos na luta contra o desenvolvimento da doença, devido à sua resposta imunológica via secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas. Apesar de estar claro o papel da ativação aguda desses linfócitos na erradicação de células neoplásicas recém formadas e na regressão da doença através de mecanismos envolvendo a biologia de anticorpos, dados recentes têm indicado que a ativação crônica de células B pode, paradoxalmente, potencializar o desenvolvimento do carcinoma (CURIGLIANO et al., 2007; DENARDO & COUSSENS, 2007).

Contudo, alguns experimentos têm revelado que a progressão resultante da resposta humoral encontra-se envolvida, diretamente, à resposta imune inata subjacente e não à regulação da sobrevivência de células neoplásicas (SIEGEL et al., 2000; SCHREIBER et al., 2000). No microambiente neoplásico, imunoglobulinas depositadas podem mediar o recrutamento de células imunes inatas via ativação do sistema complemento ou reconhecimento de receptores Fc expressos em células imunes inatas residentes ou recrutadas, as quais ativam diversas respostas celulares: fagocitose; apresentação antigênica; secreção de mediadores pró - inflamatórios e citotoxicidade anticorpo-dependente (BEN-KASUS et al., 2007). Como essas repostas ADCC e CDC, responsáveis por comprometer o quadro da doença, são mediadas pela porção Fc do anticorpo, a construção de anticorpos no formato Fab podem inibir essas funções efetoras, culminando em uma estratégia com propriedades superiores para fins diagnóstico e terapêutico.

A apresentação de fragmentos de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, através de sua fusão à proteína pIII do capsídeo viral e seleção de fagos contra potenciais antígenos, tem se mostrado uma ferramenta poderosa na obtenção de anticorpos a partir do repertório gênico das cadeias variáveis, os quais apresentam, assim, especificidade de ligação pré-definida (GRIFFITHS et al., 1994). Bibliotecas de anticorpos obtidas por *Phage Display* têm sido usada para gerar anticorpos com alta afinidade contra antígenos tumorais previamente identificados, como CEA e c-erB-2 (BEGENT et al., 1996; OSBOUM et al., 1996; SCHIER et al., 1996). Essa tecnologia tem se tornado popular ao criar sítios de ligação com aplicabilidade em diversas áreas incluindo pesquisa, medicina e indústria farmacêutica.

Nesse estudo, foi gerada uma biblioteca Fab a partir de transcritos obtidos do sangue periférico de *pool* de pacientes com câncer de mama invasivo. A resposta humoral de pacientes com câncer pode ser direcionada a antígenos não-autólogos expressos nas células neoplásicas. Assim, os pacientes produzem anticorpos contra o tumor sendo os linfócitos circulantes presentes no sangue periférico uma fonte plausível de potenciais ligantes a antígenos tumorais (CAI & GAREN, 1995).

Diversos métodos têm sido usados para clonar a diversidade gênica do repertório de anticorpos. Essa biblioteca imune foi construída a partir do método caracterizado por dois ciclos de PCR com fusão gênica, após a extração de RNA e síntese da primeira fita de cDNA. Anticorpos recombinantes gerados por *Phage Display* apresentam diversas vantagens em relação àqueles gerados pela tecnologia de hibridoma. Os anticorpos são clonados diretamente, consumindo menos tempo, eliminando o passo de imunização de animais e cultura celular em larga escala além de apresentarem elevada afinidade pelo alvo. A escolha pela construção de uma biblioteca sintética a partir de pacientes com câncer de mama evitou diversos problemas como: a baixa afinidade de anticorpos isolados a partir de bibliotecas *naïve* e a imunização de animais, ausência de resposta imune ao antígeno e reatividade cruzada encontradas em bibliotecas imunes (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002).

Para maximizar a diversidade da biblioteca, foram incluídas sequências das cadeias pesadas de IgG e IgM e genes das famílias V_K, a cadeia leve mais representativa (60%-70%) no repertório humano (SOLOMON & WEISS). A ausência da cadeia leve V_L é justificada pela sua pequena representatividade na resposta imune global e outros estudos obtiveram sucesso no isolamento de anticorpos de alta afinidade, mesmo na ausência dessa família (ITOH et al., 2003). Além disso, as famílias V_H6 e V_H7 também não foram incluídas na biblioteca, por também serem pouco representadas no repertório humano (COOK & TOMLINSON, 1995).

Uma vez que a biblioteca foi combinatorial, a montagem das cadeias leve e pesada foi feita ao acaso, podendo gerar fragmentos Fab inexistentes nos pacientes, o que contribui para o aumento da sua diversidade. Nos últimos anos foram construídas várias bibliotecas de anticorpos (MINTZ et al., 2003) mas não há relatos da construção de uma que represente a resposta imune natural proveniente do sangue periférico de pacientes com câncer de mama.

A biblioteca resultante apresentou $1,7 \times 10^6$ diferentes clones, estimados pelo número de transformantes obtidos após clonagem no vetor pComb3X. Uma correlação clara tem sido verificada entre o tamanho do repertório construído e a afinidade dos anticorpos isolados a partir dele. Anticorpos com afinidade micromolar têm sido isolados de bibliotecas com cerca de 10^7 clones, ao passo

que anticorpos com afinidades nanomolar têm sido obtidos de repertórios com 10^9 clones (HUST & DÜBEL, 2004). Entretanto, humanos expostos aos antígenos de interesse, seja através de vacinação ou através da própria doença, possuem altos níveis de anticorpos circulantes contra esses antígenos. Assim, mesmo bibliotecas menores ($\sim 10^5$) construídas a partir de doadores imunizados, originam anticorpos altamente específicos. Além disso, os genes que codificam para os anticorpos já passaram pelo processo de maturação *in vivo*, o que não requer a sua posterior submissão a esse tipo de tratamento (KIM et al., 2005). Na biblioteca aqui construída, dentre os clones presentes na biblioteca inicial não-selecionada, análises de seqüenciamento revelaram clones únicos com diferentes especificidades, os quais pertencem a um amplo repertório funcional com potencial aplicação na seleção de diferentes antígenos. Essas análises demonstram o grande potencial dessa biblioteca que poderá ser utilizada para isolar monoclonais contra outros alvos além do objetivo que era câncer, devido a grande quantidade e variabilidade das sequências dos anticorpos.

Quanto aos subgrupos encontrados foi verificada uma predominância da família VH3, o que corrobora com o repertório humano normal (COOK & TOMLINSON, 1995). Nenhuma amplificação de Vk2 foi observada. A ausência de detecção desses representantes, apesar do uso de oligonucleotídeos específicos, pode ser explicada por sua baixa frequência, apesar de não se poder descartar a possibilidade de ocorrência de polimorfismos ou até mesmo problemas no desenho dos *primers*.

Além do tamanho e diversidade da biblioteca, os parâmetros de *biopanning* também exercem grande influência na seleção de anticorpos humanos de alta afinidade (ZHANG et al., 2007). A dificuldade em se usar, no processo de seleção, um amplo repertório sintético reside na existência de anticorpos contra uma grande variedade de epítomos expressos na superfície antigênica. Conseqüentemente, anticorpos com a especificidade desejada podem ser mascarados por clones que se ligam a epítomos irrelevantes. Para direcionar a seleção de fagos de interesse contra antígenos específicos estratégias de subtração têm sido desenvolvidas de maneira bem sucedida (AMES et al., 1994; CAI & GAREN, 1995; POPKOV et al., 2004). No presente estudo, em cada ciclo, foi realizada uma seleção subtrativa contra tecidos normal obtidos de pacientes

submetidas à cirurgia de redução mamária, seguida de uma seleção positiva contra tecidos tumorais frescos. Como a biblioteca foi construída com a amplificação de genes que codificam para imunoglobulinas espera-se encontrar autoanticorpos presentes no sangue periférico contra o tumor.

Nota-se que a seleção através do método de imobilização deve considerar a integridade conformacional do antígeno imobilizado. Algumas bibliotecas apresentadas em fagos e selecionadas contra antígenos adsorvidos não são capazes de reconhecê-los em sua forma nativa (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002). Embora conveniente, uma desvantagem potencial na utilização de linhagem de células para a seleção de antígenos, reside no fato de células imortalizadas superexpressarem antígenos associados à proliferação, o que pode não ser um potencial alvo terapêutico. Assim, a escolha, no presente estudo, por tecidos frescos permite a seleção de diferentes antígenos em sua forma nativa, os quais podem ser cruciais para a tumorigênese.

Um dos problemas encontrados em bibliotecas criadas por *Phage Display* é a possibilidade de apresentação de anticorpos de maneira eficientemente distinta. De fato, algumas sequências não serão apresentadas e, conseqüentemente, não representadas na biblioteca resultante. A utilização de fagomídeos na construção pode culminar com problemas de instabilidade tanto do vetor quanto do inserto (RUSSEL et al., 2004). O empacotamento do fagomídeo no capsídeo viral é por si só, um evento de seleção biológica, o qual favorece pequenos insertos. Assim, fagos que não obtiveram a região VH durante sua construção ou insertos que perderam essas sequências por deleção, tendem a superar, em crescimento, aqueles fagos que possuem a sequência completa (DEBRUIN et al., 1999). Esse fato é ainda mais óbvio quando não se realiza nenhuma pressão de seleção positiva em favor da proteína apresentada. Para aumentar a estabilidade do fagomídeo pComb3X, eles foram amplificados em linhagens XL1-Blue, as quais apresentam um repressor do promotor *lacZ*. Além disso, os níveis de expressão basal obtidos a partir do promotor *lacZ* não induzido, também são suficientes para a expressão de fragmentos Fab (SCOTT & BARBAS, 2001). Para a expressão de Fab solúveis, os clones foram crescidos com glicose, antes de sua indução com IPTG. Em geral, o promotor *LacZ* é capaz de conduzir a síntese de pequenas quantidades de Fab em níveis basais. Estas poucas moléculas podem apresentar

toxicidade em graus variados para a célula e, devido a isso, o gene clonado pode ser excluído por recombinação gênica. A função da glicose nestas culturas é evitar esse tipo de pressão seletiva negativa, agindo como repressor metabólico para o gene *lacZ* (SAMBROOK *et al.* 1989).

Assim, a seleção de bibliotecas de anticorpos sofre ao falhar no enriquecimento de proteínas específicas recuperando apenas aqueles com baixa afinidade. A perda, durante os ciclos de seleção, de fagos com afinidade elevada pode ser evitada aumentando-se a estringência durante a eluição das partículas ligantes. Por isso, nesse trabalho foram realizadas lavagens acrescentando detergente. Análises de *Slot-blotting* dos clones selecionados demonstraram a presença da cadeia pesada, uma vez que a cauda de hemaglutinina encontra-se sob o controle do promotor de VH. Além disso, o seqüenciamento dos clones para a região Vk após o terceiro ciclo de seleção demonstrou que eles foram todos diferentes indicando que foi isolado uma coleção de diferentes fagos apresentando fragmentos Fab completos e não um único clone acidental.

Para testar a eficiência de seleção contra antígenos tumorais, a reatividade de Fab foi analisada por testes de ELISA. Para avaliar a presença de anticorpos recombinantes em frações obtidas por cromatografia, alguns autores realizam testes de ELISA (TAMAROZZI *et al.* 2006). O primeiro experimento de ELISA desse trabalho foi realizado com o intuito de triar clones positivos que reconhecem o *pool* de proteínas totais extraídas de tecidos normais, benignos e tumorais. Vinte e três clones foram positivos e posteriormente testados em duplicata. Apesar de quatro clones demonstrarem aplicabilidade como marcador tumoral apenas um clone demonstrou uma diferença para o índice ELISA entre o grupo de pacientes com câncer e os demais grupos de estudo. Esse fato permite inferir que seus alvos encontram-se mais expressos em tecidos neoplásicos do que em amostras benignas e normais, permitindo diferenciar as pacientes doentes podendo, após outros testes de validação, se tornar um alvo terapêutico.

A identificação de Fab por ensaios de *Dot-Blot* demonstrou que essa estratégia é mais rápida, fácil e utiliza menores quantidades de amostras, quando comparada ao ELISA. O rendimento da purificação de Fab foi de 0,3g/L. A produção de fragmentos scFv funcionais expressos em *E. coli* é maior do que seu correspondente Fab, uma vez que Fabs são maiores e obtidos em velocidades

muito menores. Entretanto, fragmentos Fabs são estruturalmente estabilizados por pontes dissulfeto entre o fragmento Fd e a cadeia leve, o que os torna mais estáveis (HUST & DÜBEL, 2004).

Em um estudo anterior, realizado por Belimezi e colaboradores (2006), foi realizada a construção de um Fab específico contra Her2/neu, uma oncoproteína, resultando na internalização rápida e na ação anti-proliferativa de células tumorais de mama *in vitro*. Neste ponto, vale ressaltar que o potencial diagnóstico/prognóstico e até mesmo terapêutico dos Fabs selecionados no presente trabalho, como proposto inicialmente, foi revelado pela análise imunohistoquímica.

Além disso, a tecnologia aqui adotada identificou novos e potenciais antígenos tumorais, os quais poderão permitir uma melhor caracterização da doença e delimitar novos alvos terapêuticos. Estes resultados demonstraram imunoafinidade específica do Fab C-4 especialmente a células tumorais indiferenciadas dos ductos mamários, enquanto que nas células diferenciadas do adenocarcinoma ductal infiltrante e do tecido saudável, obtido de mamoplastia, foi observada baixa ou nenhuma indicação de interação Fab-ligante, respectivamente. Em tumores sólidos, o grande desafio terapêutico reside na capacidade dos anticorpos gerados serem capazes de penetrar no tumor e atingirem seu alvo.

Esse anticorpo foi selecionado em tecido macrodissecado, a baixa temperatura para evitar internalização, com provável ligação em matriz extracelular ou na superfície celular. As análises de imunohistoquímica mostraram que esse Fab C-4 reconhece seu antígeno câncer específico no citoplasma, demonstrando que foi internalizado durante a seleção e que esta atingiu seus objetivos em reconhecer alvos presentes em amostras acometidas pelo tumor.

Diante do exposto, são necessárias futuras investigações como o mapeamento do seu epítipo, caracterização antigênica e posteriores validações *in vitro* e *in vivo* do monoclonal Fab C-4, aplicando-o em diagnósticos e terapia celular por manipulações direcionadas na geração de moléculas carreadoras de drogas ou uma molécula antitumoral efetiva.

Rotineiramente utilizada na seleção de anticorpos contra uma ampla variedade de antígenos, as bibliotecas de anticorpos expressos na superfície de

fagos filamentosos reduziram os gastos de tempo e dinheiro na produção de anticorpos monoclonais, por técnicas que incluem processos de humanização e imunização de animais, e obtenção de seus fragmentos correspondentes, sem a necessidade de imunização de animais.

CONCLUSÕES

- Essa nova biblioteca gerada poderá ser amplamente utilizada na busca de diferentes antígenos tumorais, uma vez que se demonstrou altamente diversa.
- Além disso, mostrou-se sensível a antígenos tumorais com reatividade diferencial entre os grupos de estudo.
- Foi selecionado um clone capaz de reconhecer antígenos tumorais e que necessita de posteriores testes para sua possível aplicação terapêutica.
- Foi possível a produção solúvel dos fragmentos de anticorpos permitindo sua purificação e produção em larga escala, embora o rendimento tenha sido baixo.
- Os anticorpos poderão ser utilizados como sondas para a investigação da natureza, localização e purificação de novos produtos gênicos.
- Essa biblioteca apresenta um importante papel na validação e descoberta de alvos na área genômica funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta, GA, 2008.

AMES, R. S.; TOMETTA, M. A.; JONES, C. S.; TSUI, P. Isolation of neutralizing anti-C5a monoclonal antibodies from a filamentous phage monovalent Fab display library. *Journal of Immunology*, v. 152, p. 4572-4581, 1994.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH JR, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v. 35, p. 425-445, 2002.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R. Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies. *Trends in Biotechnology*, v. 14, p. 230-234, 1996.

BARBAS, C. F.; DENNIS, R. B.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. General Procedures. In:____. *Phage Display A laboratory Manual*. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, appendix 3, p. A3.1-A3.14.

BEGENT, R. H. J.; VERHAAR, M. J.; CHESTER, K. A.; CASEY, J. L.; GREEN A. J.; NAPIER, M. P.; HOPE-STONE, L. D.; CUSHEN, N.; KEEP, P. A.; JOHNSON, C. J.; HAWKINS, R. E.; HILSON, A. J. W.; ROBSON, L. Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nature Medicine*, v. 2, p. 979-984, 1996.

BELIMEZI, M. M.; PAPANASTASSIOU, D.; MERKOURI, E.; BAXEVANIS, C. N.; MAMALAKI, A. Growth inhibition of breast cancer cell lines overexpressing Her2/neu by a novel internalized fully human Fab antibody fragment. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v. 55, p. 1091-9, 2006.

BEN-KASUS, T.; SCHECHTER, B.; SELA, M.; YARDEN, Y. Cancer therapeutic antibodies come of age: Targeting minimal residual disease. *Molecular Oncology*, v. 1, p. 42-54, 2007.

CAI, X.; GAREN, A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 92, p. 6537-6541, 1995.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, v. 162, p. 156-159, 1987.

COOK, G. P.; TOMLINSON, I. M. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunology Today*, v. 16, p.237-242, 1995.

CURIGLIANO, G.; RESCIGNO, M.; GOLDBIRSCHE, A. Immunology and breast cancer: Therapeutic cancer vaccines. *The Breast*, v. 16, p. 20-26, 2007

DE BRUIN, R.; SPELT, K.; MOL, J.; KOES, R; QATTROCCHIO, F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 397-399, 1999.

DE HAARD, H. J.; VAN NEER, N.; REURS, A.; HUFTON, S. E.; ROOVERS, R. C.; HENDERIKX, P.; DE BRUÏNE, A. P.; ARENDS, J. W.; HOOGENBOOM, H. R. A large non-immunized human Fab fragment Phage Library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 26, p. 18218-18230, 1999.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Balancing immune response: crosstalk between adaptative and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, v. 9, n.4, p.212-222, 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p. 186-194, 1998.

FILPULA, D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular Engineering*, v. 24, p. 201-215, 2007.

GEYER, F. C.; MARCHIÒ, C.; REIS-FILHO, J. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology*, v. 41, p. 77-88, 2009.

GRIFFITHS, A. D.; WILLIAMS, S. C.; HARTLEY, O.; TOMLINSON, I. M.; WATERHOUSE, P.; CROSBY, W. L.; KONTERMANN, R. E.; JONES, P. T.; LOW, N. M.; ALLISON, T. J.; PROSPERO, T. D.; HOOGENBOOM, H. R.; NISSIM, A.; COX, J. P. L.; HARRISON, J. L.; ZACCOLO, M.; GHERARDI, E.; WINTER, G. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal*, v. 13. n. 14, p. 3245-3260, 1994.

HALL, P.; CAMERON, D. A. Current perspective-Trastuzumab. *European Journal of Cancer*, v. 45, p. 12-18, 2009.

HANBY, A. M. The pathology of Breast Cancer and the role of histopathology laboratory. *Clinical Oncology*, v. 17, p. 234-239, 2005.

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

HUST, M.; DÜBEL, S. Mating antibody phage display with proteomics. *TRENDS in Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 8-14, 2004.

ITOH, K.; INOUE, K.; TEZUKA, T.; TADA, H.; HASHIMOTO, Y.; MASUKO, T.; SUZUKI, T. Molecular structural and functional characterization of tumor suppressive anti-erbB-2 monoclonal antibody by *Phage Display*. *Journal of Biochemistry*, v. 133, p. 239-245, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983, 123p.

KIM, S. J.; PARK, Y.; HONG, H. J. Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Molecules and Cells*, v. 20, n. 1, p. 17-29, 2005.

LATTERICH, M.; ABRAMOVITZ, M.; LEYLAND-JONES, B. Proteomics: New technologies and clinical applications. *European Journal of Cancer*, v. 44, p. 2737-2741, 2008.

LU, D.; JIMENEZ, X.; ZHANG, H.; BOLEEN, P.; WITTE, L.; ZHU, Z. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display for antiangiogenesis therapy. *International Journal of Cancer*, v. 97, p. 393-399, 2002.

MINTZ, P.J.; KIM, J.; DO, K.-A.; WANG, X.; ZINNER, R.G.; CRISTOFANILLI, M.; ARAP, M.A.; HONG, W.K.; TRONCOSO, P.; LOGOTHETIS, C.J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 57-63, 2003.

OSBOUM, J. K.; FIELD, A.; WILTON, J.; DERBYSHIRE, E.; EAMSHAW, J. C.; JONES, P. T.; ALIEN, D.; MCCAFFERTY, J. Generation of a panel of related human scFv antibodies with high affinities for human CEA. *Immunotechnology*, v. 2, p. 181-196, 1996.

PANSRI, P.; JARUSERANEE, N.; RANGNOI, K.; KRISTENSEN, P.; YAMABHAI, M. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnology*, v. 9, n. 6, 2009.

PARKIN, D. M.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, v.55, p.74-108, 2002.

POPKOV, M.; RADER, C.; BARBAS III, C. F. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology. *Journal of Immunological Methods*, v. 291, p. 137-151, 2004.

RUSSEL, M.; LOWMAN H. B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. B. *Phage Display*. (Eds). Oxford: *Phage Display*. Oxford University Press, 2004. v.266, p. 1-26.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, E. *Molecular Cloning: A Laboratorial Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHIER, R.; BYE, J.; APELL, G.; MCCALL, A.; ADAMS, G. P.; MALMQVIST, M.; WEINER, L. M.; MARKS, J. D. Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *Journal of Molecular Biology*, v. 255, p. 28-43, 1996.

SCHREIBER, H.; WU, T. H.; NACHMAN, J.; ROWLEY, D. A. Immunological enhancement of primary tumor development and its prevention. *Seminars in Cancer Biology*, v. 10, p. 351-357, 2000.

SCOTT, J. K.; BARBAS III, C. F. Phage Display Vectors. In: BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. *Phage Display Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, cap. 2, p. 2.1-2.19.

SIEGEL, C. T.; SCHREIBER, K.; MEREDITH, S. C.; BECK-ENGESER, G. B.; LANCKI, D. W.; LAZARSKI, C. A.; FU, Y. X.; ROWLEY, D. A.; SHREIER, H. Enhanced growth of primary tumors in cancer-prone mice after immunization against the mutant region of an inherited oncoprotein. *The Journal of experimental Medicine*, v. 191, p. 1945-1956, 2000.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. *Chemical Reviews*, v. 97, n. 2, p. 391-410, 1997.

SOLOMON, A.; WEIS, D. T. Structural and functional properties of human λ -light-chain variable-region subgroups. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 2, p. 387-394, 1995.

SOMERS, V.A.; BRANDWIJK, R.J.; JOOSTEN, B.; MOERKERK, P.T.; ARENDS, J.W.; MENHEERE, P.; PIETERSE, W.O.; CLAESSEN, A.; SCHEPER, R.J.; HOOGENBOOM, H.R.; HUFTON, S.E. A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 2772-2780, 2002.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1760, p.1450–1457, 2006.

VAUGHAN, T. J.; WILLIAMS, A. J.; PRITCHARD, K.; OSBOURN, J. D.; POPE, A. R.; EARNSHAW, J. C.; MCCAFFERTY, J.; HODITS, R. A.; WILTON, J.; JONHSO, K. S. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized Phage Display library. *Nature Biotechnology*, v. 14, p. 309-314, 1996.

WU, B.P.; XIAO, B.; WAN, T.M.; ZHANG, Y.L.; ZHANG, Z.S.; ZHOU, D.Y.; LAI, Z.S.; GAO, C.F. Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v, 7, p. 811-815, 2001.

ZHANG, Q.; ZHANG, S. H.; SU, M. Q.; BAO, G. Q.; LIU, J. Y.; YI, J.; SHEN, J. J.; HAO, X. K. Guided selection of an anti-gamma-seminoprotein human Fab for antibody directed enzyme prodrug therapy of prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*, v. 56, p. 477-489, 2007.

REAGENTES E SOLUÇÕES

1 LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas durante a realização deste trabalho foram:

- **XL1-Blue** (Stratagene) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' ProAB lacI^q lacIqZ M15Tn10(Tet^R)]* (SAMBROOK et al., 1989).

Essa linhagem foi utilizada na produção de partículas virais, transformação e amplificação de Fagomídeos.

- **Top 10** (Invitrogen) F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str^R) endA1 nupG*.

Essa linhagem foi empregada na expressão de scFv em solução.

2 PLASMÍDEO

pComb3XSS -f(-) - 4,5 kb, promotores *plac*, *ori ColE1*, *ori f1*, *Amp^R*. Possui a seqüência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos 230 a 406). Apresenta ainda um códon de parada âmbar (TAG), não reconhecido eficientemente por linhagens supressoras (Sup E49) como a XL1-Blue ou ER2537, mas reconhecido por cepas de bactérias não supressoras como a TOP 10. Isto possibilita tanto a expressão de proteínas fusionadas à proteína PIII do fago, quanto proteínas de fusão livre da proteína III. Possui uma região com seis histidinas (H6), logo após o sítio de clonagem do gene, para purificação em coluna de níquel e uma região codificadora de resíduos que constituem o epítipo de uma hemaglutinina (HA) que possibilita a detecção do scFv com utilização de um anticorpo anti-HA (SCOTT & BARBAS, 2001). Este plasmídeo foi obtido por doação da Profa. Dra. Andreia Queiroz Maranhão (UnB).

3 BACTERIÓFAGO AUXILIAR

VCSM13 – Derivado do bacteriófago M13 com o gene II mutado: origem de duplicação plasmidial derivada do p15 e gene de resistência à kanamicina. (Stratagene).

4 MEIOS DE CULTURA

- **Meio LB (*Luria Bertani*):**

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0.

- **Meio LB ágar:**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

- **Meio LB top ágar:**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 0,7% (p/v).

- **Meio SB (*Super Broth*):**

Peptona de caseína	3,0% (p/v)
Extrato de levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0.

- **Meio SOB:**

Peptona de caseína	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,05% (p/v)

KCl 0,00186% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0.

- **Meio SOC:**

Meio SOB 97 mL

Glicose 2M (filtrada) 1 mL

MgCl₂ 1M (autoclavado) 1 mL

MgSO₄ (autoclavado) 1 mL

Todos os meios foram autoclavados a 120 °C durante 20 minutos e conservados a temperatura ambiente até a utilização.

5 ANTIBIÓTICOS

- Soluções estoques: Ampicilina 100 mg/mL
Carbenicilina 100 mg/mL
Kanamicina 50 mg/mL

Essas soluções foram preparadas em água mili Q, esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

- Solução estoque: Tetraciclina (Sigma) 20mg/ml

Essa solução foi preparada em etanol, esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

6 SOLUÇÕES DE USO GERAL

- **Glicose 20%**

Glicose anidra 20% (p/v)

- **Glicerol 50%**

Glicerol 50% (v/v)

Esterilizada por autoclavagem.

- **PEG-8000 (Polietileno Glicol)** - Sigma

- **Azida Sódica** – (Sigma)

- **Solução de MgCl_2 (1M)**

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 101,65 g

H_2O q.s.p. 500 mL

Esterilizada por autoclavagem.

- **IPTG (isopropil- β -D- thiogalactopyranoside) 1M**

IPTG (SIGMA) 0,238 g

Água mili Q 1 mL

A solução foi esterilizada por filtração em filtro MILLIPORE 0,2 μm e estocada a - 20°C.

7 SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PROCEDIMENTO DE SELEÇÃO DA BIBLIOTECA

Todas as soluções utilizadas neste passo foram esterilizadas por filtração com membranas Millipore de 0,22 μm .

- **TBS 10X (estoque)**

Tris(hydroxymethyl)aminomethano 0,5 M

NaCl 1,5 M

O pH foi ajustado para 7,4

- **TBS/BSA 1%**

TBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 1% (p/v)

- **PBS 10X (estoque) pH 7.4**

Na_2HPO_4 1,2 M

KH_2PO_4 1,2 M

NaCl 1,37 M

KCl 2,7

H_2O q.s.p. 1000 mL

- **PBST pH 7,4**

PBS 1X adicionado de tween 20 a 0,05% (v/v).

- **PBS/BSA3%**

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 2% (p/v)

8 SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL AGAROSE E DE POLIACRILAMIDA

- **Tampão de corrida para gel de Agarose (TBE) 10X**

Trizma base	0,89M
Ácido Bórico	0,89
EDTA	0,002M
H ₂ O q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado para 8,0.

- **Tampão de amostra para Gel de Agarose 10X**

Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)
Água mili-Q	4,0mL

- **Solução de Brometo de etídio 20.000X**

Brometo de etídio	10 mg/mL
-------------------	----------

- **Tampão de corrida para SDS-PAGE (5X)**

Tris base	125 mM
Glicina	125 mM
SDS	0,5g

O pH foi ajustado para 9,2.

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 2X**

Tris-HCl pH 6,8	100 mM
SDS	4% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
B-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,2% (p/v)

- **Acrilamida 49%/Bis-acrilamida 0.5%**

Acrilamida	98 g
Bis-acrilamida	1 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL
Estocada a 4°C, ao abrigo de luz	

- **Tris-HCl 3 M, pH 8,3**

Tris	72,68 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

- **Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8**

Tris	12,11g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

- **SDS 10% (p/v)**

SDS	10 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

- **PSA 10% (p/v)**

Persulfato de amônio	100 mg/1 mL de água
----------------------	---------------------

- **Gel de empilhamento SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	10,41 mL
Tris-HCl pH 8,3	3,75 mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	1,50 mL
PSA 10% (p/v)	140 µL

TEMED	10 μ L
-------	------------

- **Gel de separação SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	5,90 mL
Tris-HCl pH 8,3	13,35 mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	13,25 mL
Glicerol	7,48 mL
PSA 10% (p/v)	140 μ L
TEMED	7 μ L

- **Solução corante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)
<i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250)	1% (p/v)

- **Solução descorante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

9 SOLUÇÕES PARA ELISA, *DOT BLOT* E *WESTERN BLOT*

- **PBS-BSA 3%**

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 3% (p/v)

- **Corante Ponceau – solução estoque 10X**

Ponceau S	2 g
Ácido Tricloracético	30 g
Ácido sulfosalicílico	30 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

- **Tampão de transferência**

Tris	48 mM
Glicina	39 mM

Metanol	20%
SDS	0,037%

- **Substrato para HRP:** Solução 3,3'- diaminobenzidina - DAB (Sigma Fast™ DAB)
- **Substrato para ELISA cujo conjugado possui HRP:** 1,2 ortofenilenodiamino – OPD (Sigma Fast™ OPD)

10 SOLUÇÕES PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA EM COLUNA DE NÍQUEL SEPHAROSE (HPLC)

- **Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)**

NaHPO ₂ -2H ₂ O	1.42 g
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	1.1 g
NaCl	23,38 g

Os solutos foram diluídos em 90 mL de água destilada, o pH da solução foi ajustado para 7,4, o volume foi completado para 100 ml e a solução foi filtrada com filtro de 0,45 µm. Concentrações finais: Fosfato = 160 mM e NaCl = 4M.

- **Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)**

Imidazol	13,63 g
Água destilada	90 mL

O soluto foi completamente diluído, o pH foi ajustado para 7,4 com HCl, o volume final foi completado para 100 mL e a solução, filtrada em filtro com poros de 0,45 µm.

- **Tampão de ligação (240 mL)**

Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)	30 mL
Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)	1,2 mL
H ₂ O q.s.p.	240 mL

Contrações finais: Fosfato = 20 mM, NaCl = 0,5 M, Imidazol = 10 mM.

O pH foi ajustado para 7,4.

- **Tampão de Eluição (80 mL)**

Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)	10 mL
Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)	20 mL
H ₂ O q.s.p.	80 mL

Contrações finais: Fosfato = 20 mM, NaCl = 0,5 M, Imidazol = 500 mM.

O pH foi ajustado para 7,4.

11 SOLUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

- **GET**

Glicose filtrada 20% (p/v)	0,92%
EDTA 0,5M pH 8,0 (autoclavado)	10 mM
Tris-HCl 1M pH 7,4 (autoclavado)	26 mM

- **KOAc 3M**

Ácido acético glacial	60 mL
KOAc 5M (filtrado)	11,5 mL
Água MilliQ (autoclavada)	28,5 mL

- **RNAse A - INVITROGEN**

RNAse A (10 mg/mL) diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e fervida em banho-maria por 20 minutos.

12 ENZIMAS E KITS UTILIZADOS

- **SuperScript™ II Transcriptase Reversa** – Invitrogen. Utilizada para síntese de cDNA.
- **Taq DNA Polimerase Platinum** - Invitrogen (5 U/μL) fornecida com o seu tampão de reação 10X. Utilizada nas reações de PCR.
- **T4 DNA Ligase** - Invitrogen (1 U/μL), fornecida com o seu tampão 5X. Utilizada nas reações de ligação.
- **Enzima de restrição Sfi I** – New England Biolabs (20 U/μL), acompanhada com tampão de reação NEB 2-10X.
- **dNTPs** - Invitrogen (100 mM/cada). Utilizados nas reações de PCR.
- **Wizard SV gel and PCR Clean-up System** – Promega. Utilizado para purificação de produtos amplificados a partir de gel de agarose.
- **Cubetas de 0,2 cm** – Bio-Rad. Utilizadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad.
- **Glicogênio** - Roche Molecular Biochemicals (20 mg/mL).
- **Oligo (dT)12-18 Celulose** - Invitrogen (0,5 μg/μL).
- **Centriprep 10** (Millipore, Amicon) – Utilizada para concentrar amostras de Fab a partir do sobrenadante de cultura.
- **DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace** – GE Healthcare – Mix para a reação de seqüenciamento.

- **Eletrophoresis Matrix for MegaBace** – GE Heathcare
- **Multi Screen** – Placas de filtração de material biológico. Utilizadas em preparações de plasmídeos nas placas para seqüenciamento automático (Millipore).
- **Placas de microtitulação com fundo chato** (Corning Costar)
- **Selo adesivo para placa de microtitulação** resistente a etanol (ICB Biomedicals)
- **Coluna HisTrap HP** – GE Healthcare – Coluna Níquel-Sepharose utilizada para purificar Fab por meio de cromatografia em HPLC.
- **Marcador de Massa Molecular Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range** (Bio-Rad). Em gel Bis-Tris, este marcador apresenta o seguinte padrão (Daltons): Miosina=195,79; β -galactosidase=104,02; Albumina sérica bovina=59,84; Ovoalbumina=41,68; Anidrase carbônica=27,85; Inibidor de tripsina=21,17; Lisozima=15,22; Aprotinina=6,50.
- **Marcador de Massa Molecular** – Invitrogen.
- **Anticorpo Monoclonal Anti-HA** – conjugado com peroxidase (Sigma).

Anexo 2



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Av. João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 176/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O
PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 064/08**

Projeto Pesquisa: “Seleção, caracterização e validação clínica de peptídeos miméticos e ligantes de proteínas associadas a tumores de mama obtidos por phage display”.

Pesquisador Responsável: Luiz Ricardo Goulart Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega 1º Relatório Parcial: maio/2009

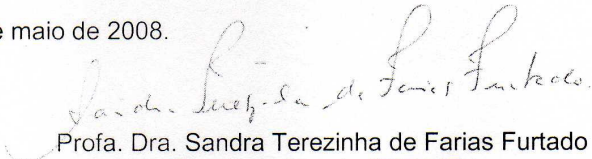
Data para entrega 2º Relatório Parcial: maio/2010

Data para entrega 3º Relatório Parcial: maio/2011

Data para entrega Relatório Final: maio/2012

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

Uberlândia, 30 de maio de 2008.


Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96/CNS.

Anexo 3**PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES**

1 - Uma colônia de células XL1-Blue foi isolada e inoculada em 10 mL de meio SB contendo tetraciclina (30 $\mu\text{g/mL}$). Este pré-inóculo foi incubado a 37°C durante a noite, sob agitação de 250 rpm.

2 - Cinco mL do pré-inóculo foram diluídos em 500 mL de meio SB contendo glicose 2% e MgCl_2 0,1 M e distribuídos em dois Erlenmeyers de 1000 mL. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm até $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0,7.

3 - Após ter atingido a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ desejada, os frascos foram resfriados no gelo durante 15 minutos. A partir deste passo, as células permaneceram no gelo, ou a 4 °C durante as centrifugações; além disso, frascos, ponteiras e glicerol utilizados nos passos seguintes foram resfriados antes do contato com as células.

4 - As culturas foram centrifugadas a 3000 x *g* durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos ressuspensos em 100 mL de glicerol 10% (v/v) gelado. A suspensão de células foi centrifugada a 3000 x *g* durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram submetidos a mais duas lavagens com 50 e 25 mL de glicerol 10% gelado.

5 - Após a terceira lavagem, as células foram ressuspensas no volume residual de glicerol, distribuídas em volume de 200 μL e transferidas para microtubos novos e estéreis.

6 - As alíquotas foram congeladas em banho de álcool e gelo seco e estocadas a -80°C até serem utilizadas para eletroporação e como pré-inóculo nos procedimentos de seleção.

Anexo 4**PREPARAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO**

1- Clones isolados obtidos na etapa anterior foram inoculados em 1 mL de meio SB suplementado com 100µg de carbenicilina em placas *deep well*. A placa foi selada e, para melhorar a aeração, foram feitos 2 furos sobre cada poço. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C durante 20 horas, sob agitação de 300 rpm.

2- Após a incubação, a placa foi centrifugada (4000 x g por 10 minutos), o sobrenadante descartado e aos sedimentos celulares foram adicionados 240µL de GET. A placa foi selada e os sedimentos ressuspensos por agitação (2 minutos).

3- Nova centrifugação foi realizada (4000 x g por 9 minutos, a temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e a placa ficou invertida sobre papel toalha por 5 minutos. Aos sedimentos foram acrescentados 80µL de GET e, sob agitação, as células foram ressuspensas.

4- Adicionaram-se 2,5µL de RNase A (10mg/mL) a cada poço de uma placa de microtitulação de fundo redondo, para o qual foi também transferido 80µL da suspensão de células. Todos os poços foram acrescidos com 60µL de NaOH 0,2N/SDS 1% (preparada na hora).

5- Logo em seguida, foram adicionados 80µL de KOAc 3M a cada poço, a placa foi agitada por inversão (30 vezes) e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e rápida centrifugação.

6- O adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse período o adesivo foi recolocado e a placa resfriada em gelo por 10 minutos, seguida de centrifugação a 4000 x g por 9 minutos, 20°C.

7- Os sobrenadantes foram transferidos para uma placa-filtro Millipore fixada com adesivo no topo de uma microplaca de fundo "V" e, em seguida, centrifugados por 6 minutos a 4000 x g, 20°C.

8- O volume de 100µL de Isopropanol foi adicionado a cada poço com filtrado, este material foi homogeneizado por inversão (30X) e centrifugado (4000 x g, 20°C, 45 minutos).

9- O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 200 μ L de Etanol 70% gelado com posterior centrifugação a 4000 x g por 5 minutos, 20°C. O sobrenadante foi removido e a placa invertida sobre papel absorvente foi rapidamente centrifugada até atingir 800 rpm.

10- Após a secagem da placa invertida à temperatura ambiente por 1 hora, o DNA foi ressuspenso em 20 μ L de água MilliQ, e deixado sob ligeira agitação a 4°C durante a noite toda. Posteriormente, o DNA foi estocado a -20°C.

PREPARAÇÃO DO FAGO AUXILIAR VCSM13

Obtenção de placas de lise

1- Foram inoculados 2 μ L de células XL1-Blue eletrocompetentes em 2 mL de meio SB contendo tetraciclina 10 μ g/mL, incubado a 37°C sob agitação, até atingir OD_{600 nm} de 0,6–1,0.

2- Alíquotas de 50 μ L de células foram distribuídas em microtubos.

3- A cada microtubo foi adicionado 1 μ L de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}), para garantir a formação de placas de lises isoladas, e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente.

4- Os 50 μ L da cultura foram adicionados em 3 mL de meio LB top ágar liquefeito (45-50°C) e vertido em uma placa de petri contendo LB ágar.

5- As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e, no dia seguinte, observou-se a formação de placas de lise.

Amplificação de placas de lise

1- Foram inoculados 10 μ L de células XL1-Blue eletrocompetentes em 10 mL de meio SB com tetraciclina 10 μ g/mL e incubado a 37°C durante uma hora sob agitação.

2- Uma placa de lise foi transferida com auxílio de um palito estéril ao tubo contendo a cultura de bactérias seguida de nova incubação a 37°C sob agitação durante 2 horas.

3- A cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 litro com 250 mL de meio SB pré-aquecido suplementado com 10 μ g/mL de tetraciclina e novamente incubada a 37°C sob agitação durante 1 hora.

4- Foi adicionada kanamicina 70 μ g/mL, seguida de incubação a 37°C sob agitação durante a noite.

5- No dia seguinte, a cultura foi transferida para tubos estéreis, centrifugada a 2500 x g durante 15 minutos e o sobrenadante coletado em tubos novos.

6- O sobrenadante foi submetido à incubação a 70°C durante 20 minutos seguida de nova centrifugação a 2500 x g, durante 15 minutos.

7- O sobrenadante foi estocado em tubos estéreis a 4°C.

Determinação do título da preparação de fagos auxiliares

1- Os fagos auxiliares foram inoculados em 2 mL de meio SB contendo tetraciclina (10 µg/mL), 2 µL de células XL1-blue eletrocompetentes e incubado a 37°C em agitação até atingir a OD_{600 nm} de 0,6 a 1,0.

2- As células foram aliquotadas (50 µL) em microtubos, adicionado 1µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) e incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos.

3- Foram adicionados os 50 µL de células infectadas a 3 mL de meio LB top ágar, misturado e espalhado em placas contendo meio LB ágar.

4- As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e, no dia seguinte, as placas de lise foram contadas e o título de fagos foi determinado em unidades formadoras de placas (pfu/mL) de fagos.

Anexo 6**REAMPLIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA**

1- Foram inoculados 50µL de células XL1-Blue eletrocompetentes em 50mL de meio SB contendo tetraciclina (10 µg/mL).

2- A cultura foi agitada a 37°C até atingir uma OD_{600nm} de 1,0.

3- À cultura foram adicionados 50 µL de fagos seguida da incubação a 37°C durante 1 hora.

4- Em seguida foram adicionados carbenicilina (50 µg/mL) e glicose para uma concentração final de 2%. Nesta etapa, é possível titular os fagos infectantes inoculando-se 1 µL e 10 µL de diluições de 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ da cultura infectada em placas contendo LB/ágar suplementado com carbenicilina e 2% de glicose. Após incubação durante a noite a 37°C, o número de transformantes foi obtido multiplicando-se o número de colônias pelo volume semeado e a diluição.

5- Os 50mL de cultura infectada foram incubados a 37°C durante 1 hora. Após esse período foram adicionados mais 15 µL de carbenicilina (100 µg/mL) seguida de nova incubação a 37°C por 1 hora.

6- A cultura foi sedimentada por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos e ressuspensa em 50mL de SB contendo os antibióticos nas proporções anteriores.

7- Em seguida foram adicionados 2mL do fagos auxiliar VCSM13 e 150mL de meio SB contendo carbenicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL).

8- A cultura total foi incubada a 37°C por 2 horas com posterior adição de 280 µL de Kanamicina (50 µg/mL) e incubação nas mesmas condições durante a noite.

9- No dia seguinte, a cultura foi submetida à centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi estocado a -20°C para futuras preparações plasmidiais. Ao sobrenadante foram adicionados 8g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 6g de cloreto de sódio e agitado a 250 rpm, durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos.

10- Os fagos foram coletados por centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa mantida invertida sobre papel toalha, por pelo menos 10 minutos. Para garantir a secagem do sedimento, as bordas da garrafa foram enxugadas com papel toalha.

11- O sedimento foi ressuspendido em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v), a suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 12000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante, contendo as partículas virais, foi transferido para um tubo novo e estocado a 4°C.

Anexo 7**PURIFICAÇÃO DE FAB POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM HPLC**

1- Antes da injeção da amostra (obtida no passo anterior) na coluna de níquel, na mesma foi diluído imidazol para uma concentração final de 10mM, ajustado o pH para 7.4 e a solução submetida à filtração em filtro Millipore de 0,22µm.

2- A coluna His-Trap foi previamente lavada com 5mL de água destilada e deaerada. Em seguida, foi equilibrada com 10 mL de tampão de ligação (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM, pH 7,4) com posterior injeção da amostra.

3- Em seguida o aparelho iniciou automaticamente o sistema de purificação, obedecendo aos seguintes parâmetros:

- Passagem de 10 mL de tampão de ligação para retirar as moléculas não ligadas à resina;

- Eluição com tampão Imidazol (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM, pH 7,4).

- Frações de 500 µL foram coletadas

4- Posteriormente, cada fração foi analisada por *dot blot*, e quantificada por leituras espectrofotométricas a 260 (A1) e 280 nm (A2). Em seguida, os valores obtidos foram calculados segundo a fórmula:

$$[] \text{ de proteína} = K3 \times A2 - K4 \times A1, \text{ onde: } K3 = 1552,0 \text{ e } K4 = 757,3$$

5- As frações que apresentaram maiores concentrações foram reunidas em um tubo, o volume foi completado para 15 mL com PBS, e o tampão de eluição com Imidazol foi substituído por PBS em coluna Centriprep. A amostra resultante foi congelada em nitrogênio líquido, e estocada a -20°C.

6- Imediatamente, antes do uso, a amostra liofilizada foi diluído em PBS/BSA1% e dosada novamente.