Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Expressão de proteínas RAP1 recombinantes e produção de anticorpos anti-RAP1: potencial uso como biomarcador no diagnóstico de tumores

por

Carolina de Souza Gonçalves

Belo Horizonte
Dezembro/2013
DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR C.S. GONÇALVES 2013

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Expressão de proteínas RAP1 recombinantes e produção de anticorpos anti-RAP1: potencial uso como biomarcador no diagnóstico de tumores

por

Carolina de Souza Gonçalves

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dra. Jaquelline Germano de Oliveira

Co-orientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Belo Horizonte

Dezembro/2013

Catalogação-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

G635e Gonçalves, Carolina de Souza.

2013

Expressão de proteínas RAP1 recombinantes e produção de anticorpos anti-RAP1: potencial uso como biomarcador no diagnóstico de tumores / Carolina de Souza Gonçalves. – Belo Horizonte, 2013.

XX, 85 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 99 - 105

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Neoplasias do colo de útero/imunologia 2. Imuno-histoquímica/utilização 3. Proteínas rap de Ligação ao GTP/uso diagnóstico I. Título. II. Oliveira, Jaquelline Germano de (Orientação). III. Silva, Carlos Eduardo Calzavara (Co-orientação). IV. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.994

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Expressão de proteínas RAP1 recombinantes e produção de anticorpos anti-RAP1: potencial uso como biomarcador no diagnóstico de tumores

por

Carolina de Souza Gonçalves

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Jaquelline Germano de Oliveira (Presidente)
Prof.(a) Dr.(a) Cristiana Ferreira Alves de Brito
Prof.(a) Dr.(a) Paula Ávila Fernandes
Suplente: Prof.(a) Dr.(a) Rosiane Aparecida da Silva Pereira

Dissertação defendida e aprovada em: 12/12/2013

“Tua caminhada ainda não terminou

A realidade te acolhe

dizendo que pela frente

o horizonte da vida necessita

de tuas palavras

e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,

lembra-te da fantasia e

sonha com tua próxima vitória.

Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter,

porque é uma vitória que surge da paz

e não do ressentimento.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre apoiou minhas escolhas, que esteve presente nos momentos em que precisei que torceu todos os dias desejando meu sucesso e que me deu o suporte necessário para que eu pudesse permanecer em Belo Horizonte.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada

À Dra. Jaquelline que me abriu as portas quando cheguei à Fiocruz para realizar o estágio, por acreditar em mim, sempre disposta a ajudar, por todo o aprendizado, apoio, pela inspiração e por estar presente e ser em parte responsável pela fase de maior amadurecimento profissional e pessoal da minha vida.

Ao Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva pela colaboração no desenvolvimento do projeto e ensinamentos.

Ao Dr. Marcelo Pascoal por toda a colaboração e apoio, sem ele esse projeto não seria possível.

Aos pesquisadores e técnicos do LICM: Rodrigo, Érica, Soraya, Kelly, Roberta Prado, Ester, Ana Thereza, Adriana, Ana Pacheco, Ricardo, Clari, Luciana, Ana Luisa, pelo auxílio, colaboração e convivência agradável.

Ao Dr. Paulo César Peregrino Ferreira pelo apoio e colaboração.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pela infraestrutura técnica.

Ao pessoal da secretaria acadêmica do CPqRR.

Ao Laboratório de Vírus da UFMG pelo fornecimento de materiais.

Aos técnicos e gerentes das plataformas tecnológicas do CPqRR: Dra. Rosiane e Maíra (Eletroforese 2D); Elisângela e Mariana (Sequenciamento Sanger); Dra. Rafaella e Vanessa (Produção de Anticorpos Monoclonais).

Ao Dr.Markus pela execução dos experimentos de espectrometria de massas).

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ Minas pela recepção e companhia, em especial à Izabella Andrade Batista pelo auxílio prestado quando cheguei ao laboratório sem conhecimento nenhum de bancada.

Ao Gui pela grande amizade que conquistamos ao longo desses dois anos e meio, por todo o apoio, pelas conversas e almoços diários, pelos desabafos, pelas risadas, enfim, pela sintonia tão especial que criamos como é natural das amizades sinceras.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto, intitulado “Avaliação da proteína Rap1GTPase como biomarcador para diagnóstico e prognóstico da neoplasia cervical associada à infecção por papilomavírus humano.”
Número do processo: 472165/2008 9

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto, intitulado “Busca de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico da neoplasia cervical associada à infecção por papilomavírus humano: papel da proteína RAP1GTPase“
Número do processo: CBB - PPM-00228-09

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo financiamento através do Programa de Incentivo á Inovação ao projeto, intitulado “Avaliação da proteína Rap1GTPase como biomarcador para diagnóstico e prognóstico da neoplasia cervical associada à infecção por papilomavírus humano”,
Número de processo: não se aplica

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS XII

LISTA DE TABELAS XV

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS XVI

RESUMO XIX

ABSTRACT XX

1 REVISÃO DA LITERATURA 21

1.1 A proteína RAP1 21

1.2 Expressão de RAP1 em tumores 22

1.3 Proteína Rap1 como biomarcador do câncer cervical 23

1.4 Câncer cervical 26

1.5 Prevenção e diagnóstico do câncer cervical 29

1.6 Problemas no diagnóstico do câncer cervical 32

1.7 Outros biomarcadores do câncer cervical 33

1.8 Expressão de proteínas heterólogas em bactérias 35

2 JUSTIFICATIVA 39

3 OBJETIVOS 40

3.1 Objetivo Geral 40

3.2 Objetivos Específicos 40

4 ESTRATÉGIA DE TRABALHO 41

5 MÉTODOS 42

5.1 Plasmídeos, bactérias hospedeiras e iniciadores 42

5.2 Desenho dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB 43

5.3 Eletroforese em gel de agarose 44

5.4 Preparo de bactérias competentes 44

5.5 Transformação bacteriana 45

5.6 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) 46

5.7 Preparação de DNA plasmidial em larga escala (maxiprep) 46

5.8 Clonagem de rRAP1A e rRAP1AB no vetor de expressão pQE9 47

5.8.1 Digestão com enzimas de restrição 47

5.8.2 Ligação no vetor de expressão pQE9 47

5.8.3 Verificação da presença do inserto por análise de restrição 48

5.9 Análise da expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1A em clones transformantes 48

5.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 49

5.11 Sequenciamento e análise dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP 49

5.12 Cinética e dose resposta da expressão das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB 50

5.13 Produção das proteínas rRAP1 em média escala 51

5.14 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel 51

5.15 Espectrometria de massas 53

5.16 Obtenção de anticorpos monoclonais 54

5.16.1 Inoculação de camundongos com os antígenos rRAP1 55

5.16.2 Geração de hibridomas e obtenção de clones policlonais e monoclonais 55

5.16.3 Purificação de anticorpos monoclonais 56

5.17 Obtenção de anticorpos policlonais de coelho 56

5.18 Ensaio Western Blot 57

5.19 Ensaios imuno-histoquímicos 58

6 RESULTADOS 60

6.1 Subclonagem dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB em vetor de expressão bacteriano 60

6.2 Verificação da capacidade de expressão das proteínas RAP1 pelos clones recombinantes 66

6.3 Sequenciamento dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB 69

6.4 Expressão das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB em sistema bacteriano 71

6.4.1 Cinética e dose resposta da expressão de RAP1 pelos clones 22 e 35 71

6.5 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade 73

6.5.1 Quantificação das proteínas recombinantes purificadas por método colorimétrico com ácido bicinconínico (BCA) 75

6.6 Espectrometria de massas 78

6.7 Obtenção de anticorpos anti -rRAP1 e anti-rRAP1AB 79

6.7.1 Anticorpos policlonais de coelhos 79

6.7.2 Anticorpos policlonais e monoclonais de camundongos 80

6.8 Testes de reconhecimento das proteínas rRAP1 e RAP1 humana pelos anticorpos anti-RAP1 80

6.8.1 Ensaio de Western Blot 80

6.8.2 Ensaios Imuno-histoquímicos 83

7 DISCUSSÃO 92

8 CONCLUSÃO 96

9 ANEXO 1 - LISTA DE SOLUÇÕES 97

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Imuno-histoquímica para RAP1 em biópsias de colo uterino realizada no estudo de identificação de RAP1 como proteína biomarcadora 25

FIGURA 2 Organização do genoma do HPV 27

FIGURA 3 Estrutura do epitélio cervical 28

FIGURA 4 Superexpressão de p16 no câncer cervical 34

FIGURA 5 Desenho esquemático do vetor pQE9 37

FIGURA 6 Fluxograma do trabalho 41

FIGURA 7 Alinhamento entre as sequências da proteína RAP1A humana e das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB 43

FIGURA 8 Digestão dos plasmídeos pUC57 contendo os insertos rRAP1A e rRAP1AB e do vetor pQE9 vazio com as enzimas BamHI (B) e HindIII (H) 61

FIGURA 9 Obtenção dos insertos rRAP1A (552pb), rRAP1AB (450pb) e do plasmídeo pQE9 digeridos com *Bam*HI e *Hind*III 62

FIGURA 10 Quantificação do plasmídeo pQE9 e insertos RAP1A e RAP1AB após purificação 63

FIGURA 11 Verificação da presença dos insertos (rRAP1A e rRAP1AB) nos clones transformantes de E. coli M15 por digestão enzimática 65

FIGURA 12 Verificação da presença dos insertos rRAP1AB nos clones transformantes de *E. coli* M15 por digestão enzimática 66

FIGURA 13 Verificação da expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1AB pelos clones transformantes induzidos ou não com IPTG 68

FIGURA 14 As sequências do inserto do plasmídeo pUC57-RAP1A e do gene sintético rRAP1A apresentam 100% de identidade 69

FIGURA 15 As sequências do inserto do plasmídeo pUC57-RAP1AB e do gene sintético rRAP1AB apresentam 100% de identidade 70

FIGURA 16 As sequências do inserto do plasmídeo pQE9-RAP1A e do gene sintético rRAP1A apresentam 100% de identidade 70

FIGURA 17 -As sequências do inserto do plasmídeo pQE9-RAP1AB e do gene sintético rRAP1AB apresentam 100% de identidade 71

FIGURA 18 Cinética de expressão de rRAP1A e de rRAP1AB após com 1 mM de IPTG 72

FIGURA 19 Figura 14. Efeito dose-resposta de IPTG na indução da expressão de rRAP1A e rRAP1AB 73

FIGURA 20 Purificação da proteína rRAP1A por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel sob condições desnaturantes 74

FIGURA 21 Purificação da proteína rRAP1AB por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel sob condições desnaturantes 75

FIGURA 22 Quantificação das frações purificadas de rRAP1A pelo ensaio com ácido bicinconínico (BCA) 76

FIGURA 23 Quantificação proteica de rRAP1AB por ensaio com ácido bicinconínico (BCA) 77

FIGURA 24 Obtenção das proteínas rRAP1A e rRAP1AB purificadas diretamente de gel de poliacrilamida após SDS-PAGE a 12% em fase de preparação para a espectrometria de massas 78

FIGURA 25 Membrana de nitrocelulose contendo rRAP1A e rRAP1AB 81

FIGURA 26 Teste de reconhecimento das proteínas recombinantes rRAP1 pelos anticorpos policlonais de coelho anti-rRAP1 e pelo anticorpo comercial (anti-RAP1A + RAP1B; Abcam) por ensaio de *Western Blot* 82

FIGURA 27 Verificação da expressão de RAP1 em amostras de mucosa cervical nãodisplásica com anticorpos anti-rRAP1 e anticorpo anti-RAP1 comercial, por ensaio imuno-histoquímico, em aumento de 100X 84

FIGURA 28 Verificação da expressão de RAP1 em mucosa cervical não-displásica com anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico, em aumento de 200X 85

FIGURA 29 Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 1 com anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 100X 86

FIGURA 30 Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 1 com anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 200X 87

FIGURA 31 Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 2/3 pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 100X 88

FIGURA 32 Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 2/3 pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 200X 89

FIGURA 33 Verificação da expressão de RAP1 em lesão de câncer cervical invasor pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 100X 90

FIGURA 34 Verificação da expressão de RAP1 em lesão de câncer cervical invasor pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 200X 91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Relação de anticorpos comerciais anti-RAP1 atualmente disponíveis no mercado com uso recomendado para imuno-histoquímica e seus respectivos preços em dólares americanos 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

> - Símbolo de maior que

% - Símbolo de percentagem

°C - Graus centígrados (Celsius)

A - Amperes

ASCUS - Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (sigla inglesa para células escamosas atípicas de significância indeterminada)

BCA - Ácido bicinconínico

BSA - Bovine Serum Albumin (sigla inglesa para albumina de soro bovino)

C - Citosina

CCE - Carcinoma de células escamosas

CDK - Ciclinas dependentes de quinases

CI - Intervalo de confiança

cm - Centímetros

CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Óptica

E. coli - *Escherichia coli*

ELISA -Enzyme-linked immunosorbent assay (sigla inglesa para Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima)

FDA - Food and Drug Administration

G - Guanina

GAP - GTPase activating protein (sigla inglesa para proteína ativadora de GTPase)

GDP - Guanosina difosfato

GEF- Guanine nucleotide exchange factor (sigla inglesa para fator de troca de nucleotídeos guanina)

GTP - Guanosina Trifosfato

h - Hora

HCl - Ácido clorídrico

HPV - *Human papillomavirus* (sigla inglesa para Papilomavírus humano)

HR-HPV - High Risk HPV (sigla inglesa para HPV de alto risco)

HSIL- High grade squamous intraepithelial lesion (sigla inglesa para lesão intraepitelial escamosa de alto grau)

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - Isopropil-B-D-1-Tiogalactopiranosídeo

ISEC - Inflamação sem efeito citopático viral

Kb - Kilobase

KDa - Kilo Daltons

LB - Meio Luria-Bertani

LIABG - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

LIEBG - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

LR-HPV- Low Risk HPV (sigla inglesa para HPV de baixo risco)

LSIL- Low-grade squamous intraepithelial lesion (sigla inglesa para lesão intraepithelial escamosa de baixo grau)

M - Molar

mL - Mililitros

mM - Milimolar

ng - Nanogramas

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NIC 1 - Neoplasia intraepithelial cervical grau 1

NIC 2/3 - Neoplasia intraepithelial cervical grau 2 e 3

OPD - o-Phenylenediamine (sigla inglesa para o-Fenilenodiamina)

PCR - Polymerase chain reaction (sigla inglesa para reação em cadeia da polimerase)

pb - Pares de bases

PDB - Protein Data Bank

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomole

pRb - Proteína do retinoblastoma

rpm - Rotações por minuto

p/v - peso por volume

SCC -Squamous cell carcinoma (sigla inglesa para carcinoma de células escamosas)

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SDS PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SIL -Squamous intraepithelial lesion (sigla inglesa para lesão intraepitelial escamosa)

SUS - Sistema Único de Saúde

TBS - Tris-buffered saline (sigla inglesa para tampão Tris-salina)

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

USA -United States of America (sigla inglesa para Estados Unidos da América)

V - Volts

VLP - Virus-like particle (sigla inglesa para partícula semelhante a vírus)

µg/mL - Microgramas por mililitro

µL - Microlitros

RESUMO

Alterações imunofenotípicas qualitativas e quantitativas na expressão da proteína RAP1, uma pequena GTPase da superfamília RAS, estão presentes em diversos tipos de cânceres, tais como carcinomas de células escamosas de orofaringe, câncer papilar da tireóide, câncer de mama, carcinoma de células renais, leucemia, melanoma, neoplasias intraepiteliais e câncer cervical. Entretanto, para a utilização de RAP1 como biomarcador para auxiliar no diagnóstico imuno-histoquímico de tumores, especialmente do câncer cervical, são necessários anticorpos anti-RAP1 a baixo custo, uma vez que, atualmente, os anticorpos disponíveis no Brasil são importados e de custo elevado, tornando inviável sua utilização no diagnóstico de rotina. Assim, este trabalho tem como objetivos a expressão de proteínas RAP1 recombinantes (rRAP1) em sistema bacteriano, e a produção de anticorpos monoclonais e policlonais anti-rRAP1, visando a sua aplicação no diagnóstico de diversos tumores por imuno-histoquímica. Dois genes RAP1 sintéticos codificantes para as proteínas rRAP1A e rRAP1AB foram desenhados, sintetizados e sub-clonados no plasmídeo de expressão bacteriano pQE9 e sua expressões obtidas na linhagem hospedeira *E.coli* M15. Após indução com IPTG, as proteínas rRAP1 foram purificadas por cromatografia líquida em coluna de afinidade de quelato de níquel, obtendo-se o rendimento, por litro de cultura bacteriana, de 185,6 mg/L de rRAP1A e 103,9 mg/L de rRAP1AB. As proteínas rRAP1 purificadas foram inoculadas em animais para a produção de anticorpos monoclonais e policlonais anti-rRAP1A e anti-rRAP1AB. Ensaios imuno-histoquímicos foram realizados em tecidos de pacientes com neoplasia cervical para a avaliação da reatividade dos anticorpos anti-rRAP1 com a proteína RAP1 humana. Uma intensa imunorreatividade foi verificada com o anticorpo anti-rRAP1A (policlonal produzido em coelhos) considerado, até o momento, o melhor candidato para uso na detecção da expressão de RAP1 em ensaios imuno-histoquímicos, o que pode auxiliar no diagnóstico de várias neoplasias, especialmente, do câncer do colo uterino.

ABSTRACT

Qualitative and quantitative immunophenotypical changes in the expression of RAP1 protein, a small GTPase of the RAS superfamily, have been detected in many types of cancers such as oropharyngeal squamous cell carcinomas, papillary thyroid cancer, breast cancer, renal cell carcinoma, leukemia, melanoma, intraepithelial neoplasia and cervical cancer. However, to use RAP1 as a putative biomarker for immunohistochemical assays to support tumor diagnosis, especially cervical cancer, anti-RAP1 antibodies at low cost are essential, since here in Brazil the anti-RAP antibodies available are imported and expensive making them impractical to use in routine diagnostics. This work aims to express recombinant proteins RAP1 (rRAP1) in bacterial system for the production of monoclonal and polyclonal anti-rRAP1 to be used for diagnosis of various tumors by immunohistochemistry. Two synthetic RAP1 genes coding for rRAP1A and rRAP1AB proteins were designed, synthesized, and subcloned into the pQE9 vector for recombinant protein production in *E. coli* (strain M15). After IPTG induction, both rRAP1 proteins were purified by nickel chelate affinity chromatography yielding, per liter of bacterial culture, 185,6 mg/L of rRAP1A and 103,9 mg/L of rRAP1AB protein. The purified rRAP1 proteins were used to generate polyclonal and monoclonal antibodies against rRAP1A and against rRAP1AB. Immunohistochemistry experiments were performed on tissues samples from patients with cervical neoplasia to evaluate the reactivity of the anti-rRAP1 antibodies to the human RAP1. An intense immunoreactivity was observed for a rabbit polyclonal anti-rRAP1A antibody, considered so far, the best candidate to be used for RAP1 immunohistochemical testing to support tumor diagnosis, especially cervical cancer.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A proteína RAP1

A proteína RAP1 foi descoberta por Kitayama e colaboradores, em 1989, como um produto do gene K-REV, capaz de suprimir o fenótipo maligno de fibroblastos transformados por K-RAS, um dos genes mutados de RAS (Kitayama et al., 1989). RAP1 é um pequena GTPase pertencente a superfamília RAS e possui duas isoformas, RAP1A e RAP1B que diferem entre si por alguns poucos aminoácidos. As proteínas GTPases pertencentes à família RAS funcionam como interruptores moleculares, regulando a sinalização de processos celulares como a proliferação, diferenciação, morfogênese e apoptose. Atualmente, as proteínas RAP em mamíferos são conhecidas por agirem independentemente de RAS e suas funções compreendem o controle do estabelecimento da polaridade celular (Shimonaka et al., 2003), ativação da adesão celular mediada por integrina (Katagiri et al., 2000; Reedquist et al., 2000; Tsukamoto et al., 1999; Duchniewicz et al., 2006), regulação do contato célula-célula (Hogan et al., 2004; Price et al., 2004), proliferação celular (Altschuler and Ribeiro, 1998) e secreção (Crittenden et al., 2004; D'Silva et al., 1998). Para ser ativada ou desativada, RAP1 se liga a moléculas GDP ou GTP, sendo que a ligação à GTP resulta na sua forma ativa e a ligação à GDP na sua forma inativa. O ciclo GDP-GTP é regulado pelos fatores de troca nucleotídeo guanina (GEF, sigla inglesa para *Guanine Exchange Factor*) que facilitam a liberação do nucleotídeo ligado e permitem que o GTP se religue. Já as proteínas ativadoras de GTPase (GAP, sigla inglesa para GTPase Activating Protein) induzem a hidrólise do GTP ligado e completam o ciclo (Bos et al., 2001).

RAP1 é encontrada predominantemente em membranas intracelulares na região perinuclear, em vesículas endocíticas e exocíticas, e em menores quantidades em membranas plasmáticas (Pizon et al.,1994). É particularmente abundante em plaquetas humanas nas quais está localizada principalmente na membrana plasmática e nos grânulos secretores, regulando a formação do grânulo e

exocitose (Torti, 1992; Berger, 1994; Franke et al.,1997). RAP1 também é abundantemente observada em neutrófilos na membrana plasmática e em grânulos específicos (Maridonneau and Gunzburg, 1992; Quinn et al., 1992). Em fibroblastos é principalmente localizada no compartimento médio do Complexo de Golgi ou nos endossomos (Pizon et al., 1994; Beranger et al., 1991).

1.2 Expressão de RAP1 em tumores

A expressão alterada da proteína RAP1 e de seus reguladores (GEFs e GAPs) tem sido implicada no crescimento de células cancerosas, invasão e metástase (Gloerich et al., 2011; Frische et al.,2010; Hattori et al.,2003). Vários estudos já demonstraram a expressão alterada de RAP1 e seus reguladores em distintas linhagens de células escamosas de carcinoma (SCC) de orofaríngе, câncer oral (D'Silva et al., 2003; Banerjee et al., 2011), SCC de cabeça e pescoço (Banerjee et al., 2012), câncer papilar da tireóide (Nellore et al., 2009), câncer de mama (Furstenau et al., 2011), carcinoma de células renais (Kim et al., 2012), leucemia (Qiu et al., 2012) e melanoma (Gao et al. 2006).

Evidências indicam que a proteína Rap1GAP, um fator de inativação de RAP1, é expressa em menor quantidade em vários tipos de câncer. No câncer de tireoide a baixa regulação de Rap1GAP aparece como consequência de degradação proteossomal (Zuo et al., 2010), no câncer pancreático e de tireoide papilar é devido à perda de heterozigosidade (Zhang et al., 2006), no câncer de melanoma e de tireoide devido à metilação do promotor (Zuo et al., 2010; Zheng et al., 2009) e no câncer de mama devido à mutações genéticas (Sjoblom et al.,2006). Apesar de ser frequente a baixa expressão de Rap1GAP em tumores humanos, as consequências biológicas dessa diminuição da expressão de Rap1GAP foram estudadas em apenas poucas linhagens de células cancerosas. Em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, Rap1GAP inibe o crescimento do tumor atrasando a transição de fase de G1/S no ciclo celular (Zhang et al., 2006). Rap1GAP também inibe a atividade de cinases reguladas por sinal extracelular, a proliferação celular, a sobrevivência e a migração de células do melanoma (Zheng et al., 2009). Estudos também demonstraram que a reintrodução de Rap1GAP em linhagens de células

cancerosas afeta algumas características das células transformadas. Por exemplo, a indução da superexpressão de Rap1GAP em linhagens celulares de carcinoma escamoso de orofaringe (Zhang et al., 2006) e pancreático (Zhang et al., 2006) bloqueia a formação de tumores em modelos animais. A superexpressão *in vitro,* de Rap1GAP diminui a proliferação celular do tumor, e aumenta a apoptose (Zhang et et al., 2006; Zheng et al. 2009; Mitra et al., 2008; Tsygankova et al., 2007). Essas evidências sugerem que RapGAPs, reguladores negativos das GTPases RAP1 e RAP2, funcionam como supressoras de tumor. A descoberta recente de que a oncoproteína E6 dos papilomavírus humanos de alto risco (HR-HPV) atua na carcinogênese cervical através da degradação da GAP E6TP1 pela ubiquitina ligase E6AP, reforça a teoria de capacidade supressora de tumor das RapGAPs. Isso porque a E6TP1 apresenta um domínio catalítico de proteínas ativadoras da ligação do nucleotídeo guanina (GTPase) similar ao domínio catalítico da proteína Rap1GAP. A proteína E6 dos HR-HPVs, promovendo a degradação da E6TP1, eleva os níveis de Rap1GTP, ativando Rap1 durante a transformação celular (Chakrabarti et al., 2003; Lee et al., 2007).

1.3 Proteína Rap1 como biomarcador do câncer cervical

A proteína RAP1 foi identificada e caracterizada como um biomarcador de câncer cervical pelo nosso grupo de pesquisa (Pascoal-Xavier, 2008; 2011) com potencial utilização no auxílio ao diagnóstico deste câncer. Neste estudo a expressão de RAP1 foi analisada por imuno-histoquímica, em 319 amostras de biópsias de colo uterino, no período entre 2006 e 2010, representativas de mucosa cervical normal ou alterada por inflamação sem efeito citopático viral (ISEC), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) e lesão intraepitelial escamosa de alto grau (LIEAG) correspondendo à mucosa cervical com neoplasia intraepitelial cervical (NIC), e amostras de mucosa cervical com carcinoma invasor de células escamosas (CCE).

A possibilidade da utilização da proteína biomarcadora RAP1 para auxiliar no diagnóstico do câncer cervical e de outros tumores, esbarra no fato de que o ensaio imuno-histoquímico para a verificação da expressão de RAP1 nas amostras teciduais

ainda depende de anticorpos anti-RAP1 importados, cujo custo inviabiliza sua potencial utilização na rotina de laboratórios da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) e até mesmo de laboratórios privados. A Tabela 1 mostra os preços, em dólares americanos, de anticorpos anti-RAP1 fornecidos por empresas estrangeiras.

A figura 1 ilustra a expressão de RAP1, em diferentes lesões neoplásicas cervicais, demonstrada no estudo realizado por Pascoal-Xavier (2011) utilizando o anticorpo anti-Rap1 (RAP1B AB40814) importado da Abcam mencionado na Tabela 1.

Tabela 1 Relação de anticorpos comerciais anti-RAP1 atualmente disponíveis no mercado com uso recomendado para imuno-histoquímica e seus respectivos preços em dólares americanos

Empresa	Anticorpo- número de catálogo	Quantidade	Preço em dólares americanos
GeneTex	Anti-RAP1- policlonal GTX61352	100 uL	289.00
Santa Cruz Biotechnology	Rap 1 antibody (121) sc-65.	200 ug/mL	279.00
OriGene Tech	Anti-RAP1A policlonal TA303849	100 uL	325.00
LifeSpan BioSci	Anti-RAP1A / RAP1 LS-C49691	100 uL	415.00
Abcam	Anti-RAP1A + RAP1B AB40814	100 uL	655.16

Fonte: http://www.biocompare.com/ acessado em 07/11/2013

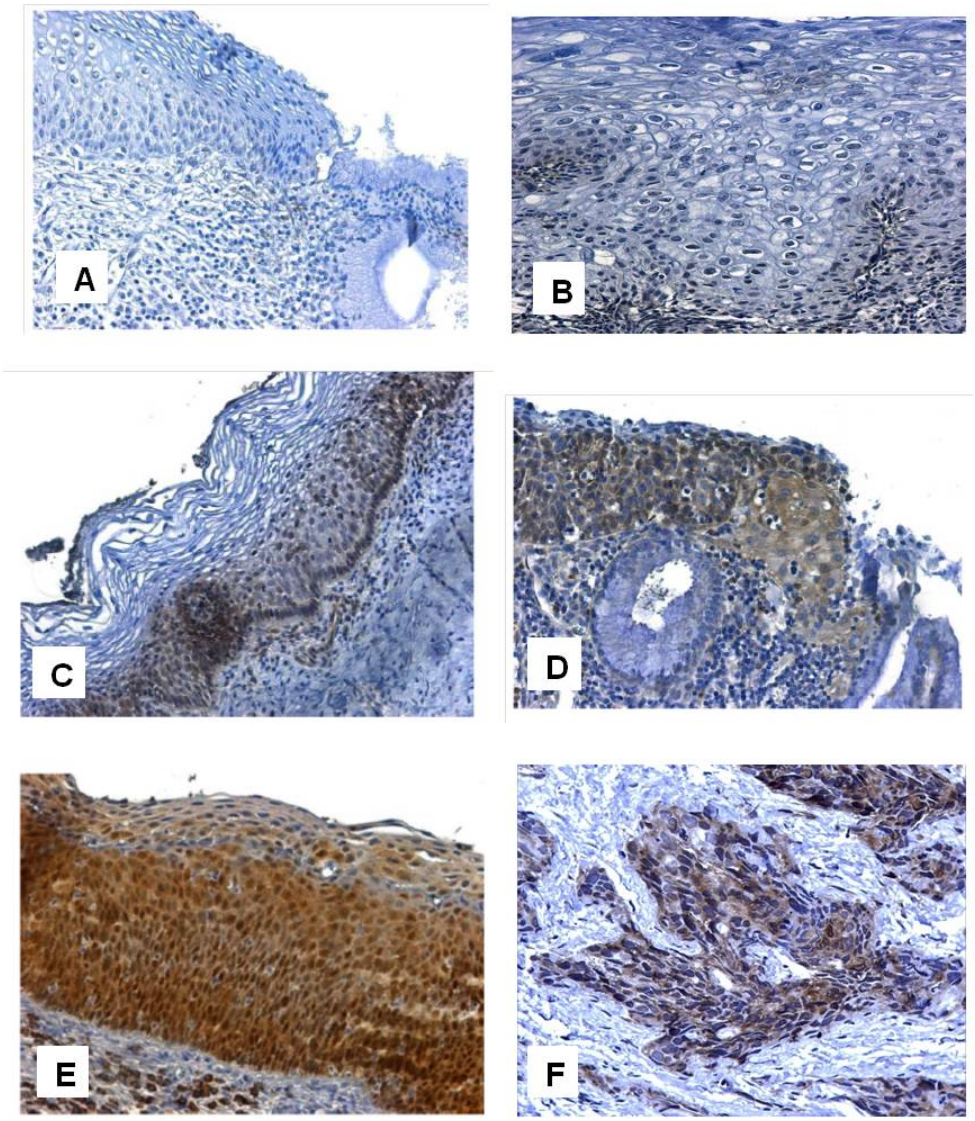

Figura 1. Imuno-histoquímica para RAP1 em biópsias de colo uterino realizada no estudo de identificação de RAP1 como proteína biomarcadora. (A) representa mucosa sem reação imuno-histoquímica positiva em tecido normal; (B) apresenta expressão esporádica e fraca de RAP1 no terço basal do epitélio de lesão de baixo grau (LIEBG); (C) apresenta expressão com intensidade intermediária, focal, no terço basal do epitélio de lesão de baixo grau (LIEBG). (D) e (E) exibem epitélios com forte e difusa expressão de RAP1, nos dois terços basais e em todo o epitélio em lesão de alto grau (LIEAG), respectivamente. (F) apresenta expressão de RAP1 no carcinoma invasor (CCE). Fonte: Pascoal-Xavier, 2011.

Uma vez que o presente trabalho tem como objetivo a expressão de proteínas RAP1 recombinantes (rRAP1) e a produção de anticorpos anti-rRAP1 para seu potencial uso no diagnóstico de tumores e, levando-se em conta os dados gerados pelo nosso grupo sobre a expressão de RAP1 no câncer cervical, este foi o modelo escolhido para a realização dos testes imuno-histoquímicos de reconhecimento da proteína RAP1 humana pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e para a demonstração do impacto que tais anticorpos podem ter no auxílio ao diagnóstico de neoplasias, especialmente, neoplasias cervicais.

1.4 Câncer cervical

O câncer ou neoplasia cervical é o segundo tipo de câncer mais prevalente entre a população feminina mundial, com 500 mil novos casos e 275 mil mortes anuais (WHO, 2012). Mais de 85% dos casos ocorrem em países de baixa ou média renda, sendo as maiores taxas de incidência na Ásia do Sul e Central, África Subsariana, América Latina e Melanésia. No Brasil, o câncer cervical corresponde a 9,3% dos casos de câncer, com uma estimativa de 17.540 novos casos em 2012, ficando atrás somente do câncer de mama (27,9% dos casos de câncer), segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012).

Para o desenvolvimento do câncer cervical e de sua lesão precursora imediata, a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grau 3 (NIC3), é necessária uma infecção cervical persistente pelo papilomavírus humano ou *Human papillomavirus* (HPV). Vários estudos epidemiológicos demonstraram a presença do HPV em aproximadamente 100% dos casos de câncer cervical (zur Hausen, 1996; Walboomers, 1999).

Aproximadamente 15% dos cânceres humanos são causados por vírus, e desses casos, a metade é atribuída à infecção pelo HPV (Parkin et al, 2006). Os HPVs são pequenos vírus de DNA de fita dupla circular (episssomal), não envelopados, que infectam o epitélio estratificado escamoso e cutâneo (zur Hausen, 2009). Mais de 120 tipos diferentes de HPVs já foram identificados e, aproximadamente um terço deles infecta especificamente as células epiteliais do

trato genital. Os outros dois terços restantes infectam células epiteliais em outros tecidos incluindo o epitélio cutâneo (Lorincz et al., 1992, Bernard et al., 2010).

O genoma do HPV codifica oito proteínas, das quais seis são denominadas precoces, a saber: E1, E2, E4, E5, E6, E7 (E de termo em inglês Early), e duas tardias L1 e L2 (do termo em inglês Late), como representado na Figura 2. As proteínas E6 e E7, consideradas oncoproteínas, atuam alterando ou anulando a função de reguladores do ciclo celular, de forma a permitir a persistência de genomas episssomais em células indiferenciadas e também garantindo a replicação de genomas em células diferenciadas. E1 e E2 são fatores de replicação codificados pelo vírus, E4 e E5 atuam regulando as funções virais tardias e, finalmente, L1 e L2 são as duas proteínas tardias que formam o capsídeo (Bodily et al, 2011).

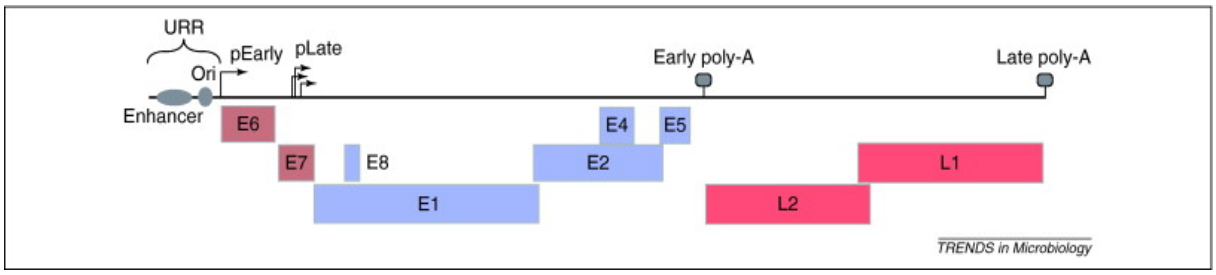

Figura 2. Organização do genoma do HPV. O DNA circular do genoma do HPV está mostrado de forma linear por motivos didáticos. A origem de replicação (Ori) e vários elementos reguladores da transcrição encontram-se na região reguladora URR. O promotor precoce do vírus, o promotor tardio diferenciação-dependente, e os dois sinais de poliadenilação definem os três grupos principais de genes virais que são coordenadamente regulados durante a diferenciação da célula hospedeira. Os genes E6 e E7 mantêm a capacidade de replicação. E1, E2, E4, E5 e E8 estão envolvidas na replicação do DNA do vírus, no controle da transcrição e de outras funções tardias. L1 e L2 são as proteínas do capsideo. Fonte Bodily & Laimins, 2011; http://origin-ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0966842X10001770-gr2.jpg

A infecção por HPV requer o acesso da partícula infecciosa às células da camada basal epitelial, através de perda da integridade epitelial (Figura 3). Após a infecção e o desnudamento, o genoma viral é mantido como episssomo no núcleo das células basais, com um baixo número de cópias, pela ação da proteína E2 (Doorbar, 2005; Oliveira et al., 2006; Bodily & Laimins, 2011).

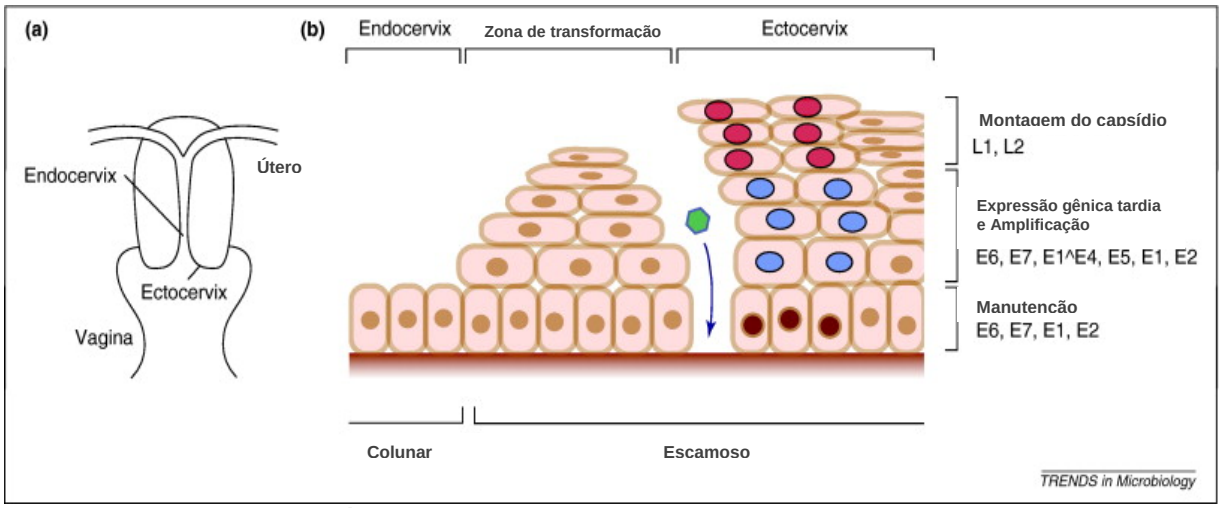

Figura 3. Estrutura do epitélio cervical. (a) A localização do epitélio endocervical e ectocervical. (b) Esquema do epitélio estratificado ectocervical, do epitélio colunar endocervical, e da zona de transformação (ZT). Infecções por HPV e as suas lesões benignas e malignas, preferencialmente, desenvolvem-se na ZT. A infecção inicia através microlesões que expõem a membrana basal e os queratinócitos basais. Os DNAs episssomais do vírus são mantidos nas células basais. À medida que as células hospedeiras se diferenciam, a expressão do genoma do HPV é coordenada para resultar na montagem do capsideo e liberação de vírions nas camadas diferenciadas superiores. Os núcleos estão coloridos para indicar as proteínas virais expressas durante as diferentes fases do ciclo de vida (ver também o Quadro1). Fonte Bodily & Laimins, 2011; http://origin-ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0966842X10001770-gr1.jpg

Os tipos de HPV encontrados preferencialmente em cânceres cervicais e anogenitais são designados como HPVs de alto risco (HR-HPV), enquanto aqueles encontrados em verrugas genitais e lesões benignas são denominados HPVs de baixo risco (LR-HPV). Os LR-HPV mais comuns são o HPV-6 e o HPV-11, enquanto que os HR-HPVs mais prevalentes são os HPV-16, -18, -31 e -45. Considerado o tipo mais carcinogênico, o HPV-16 é responsável por aproximadamente 55% a 60% dos casos de câncer cervical, sendo que o HPV-18 é responsável por 10% a 15% dos casos. Os demais tipos de HR-HPVs (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-52, HPV-58, HPV-59, HPV-68 e HPV-67) causam os 25% a 30% dos casos remanescentes (Walboomers, 1999; Munoz, 2003; de Sanjose, 2010). Os vários tipos de HPV possuem uma organização genética comum e as diferenças entre HPVs de alto e baixo risco são devidas às diferenças de aminoácidos em fatores comuns e não devido à presença de proteínas adicionais.

Aproximadamente 90% das infecções pelo HPV são transitórias, tornando-se indetectáveis entre um a dois anos (Plummer et al., 2007; Rodriguez, 2008). As mulheres que possuem uma infecção persistente estão em risco significativo de desenvolver lesões pré-cancerosas. A persistência por um ano (Castle, 2009) e dois anos (Kjaer, 2010) especialmente com o HPV-16, pode predizer um diagnóstico de NIC3 ou diagnósticos mais severos (NIC3+) nos anos subsequentes. Por exemplo, pacientes infectadas com HPV-16 por 1 a 2 anos apresentam um risco de 20 a 30% de desenvolver NIC3+ nos próximos 5 anos. Vale ressaltar que a lesão NIC3 não tratada tem 30% de probabilidade de se tornar câncer invasor ao longo de um período de 30 anos enquanto que lesões de NIC3 tratadas apresentam apenas 1% de chance de se tornarem invasivas (McCredie et al, 2008).

1.5 Prevenção e diagnóstico do câncer cervical

Atualmente existem duas vacinas contra HPV. Ambas protegem contra os HPVs tipos 16 e 18 de alto risco (vacina Cervarix produzida pela Glaxo Smith Kline), e uma delas protege também contra os tipos HPV-6 e 11 de baixo risco (vacina Gardasil produzida pela Merck). Tais vacinas consistem de partículas semelhantes a vírus (VLPs) produzidas por tecnologia do DNA recombinante, sendo, portanto, não infecciosas e mostraram alta eficiência para mulheres sem evidências de infecções prévias, com redução de mais de 90% de infecções persistentes e redução próxima a 100% de lesões cervicais moderadas e severas (WHO, 2007).

Poucas evidências suportam a recomendação de rastreamento anual do câncer cervical em mulheres de qualquer idade, pois pouco contribui para o aumento na prevenção deste câncer com um custo excessivo e desnecessário de procedimentos e tratamentos (Stout et al., 2008; Kulasignam et al, 2011). Dessa forma, os intervalos de triagem devem ser recomendados com base na idade e no histórico clínico da paciente (Saslow et al., 2012). Para mulheres com idade entre 21 e 29 anos, o rastreamento com citologia é recomendado a cada três anos. Devido à alta prevalência do HPV em mulheres até 30 anos recomenda-se que o teste para genoma do HPV não deve ser utilizado em mulheres desse grupo. Para mulheres com idade entre 30 e 65 anos o Guia para a Prevenção e Detecção Precoce do

Câncer Cervical, publicado em 2012, recomenda o rastreamento conjunto por citologia e teste para HPV a cada 5 anos (recomendável) ou apenas citologia a cada 3 anos (aceitável) considerando um histórico de rastreamento com testes negativos consecutivos [Dunne, 2007; Peyton, 2001; Division of Cancer Prevention and Control, Centers for Disease Control and Prevention acessado em novembro de 2013 (http://www.cdc.gov/cancer/cervical/basic_info/screening.htm); Saslow et al., 2012]

A rotina recomendada para o rastreamento do câncer cervical no Brasil é a repetição do exame Papanicolau a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados em um intervalo de um ano, priorizando mulheres entre 25 60 anos [NCA acessado em novembro 2013, (http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2687)]. O rastreamento por citologia (teste de Papanicolaou) tem obtido grande sucesso na redução da incidência de câncer e mortalidade em países onde o rastreamento de boa qualidade é disponível, ainda que resultados falso-positivos e falsos negativos sejam comuns (ALTS, 2003; Castle, 2010).

Outra metodologia disponível para a triagem do câncer do colo uterino é a citologia de monocamada em base líquida (ThinPrep, Cytyc Corp., USA), aprovada pelo FDA americano (US Food and Drug Administration). Nesta técnica, a amostra é coletada normalmente, como em um teste de Papanicolau convencional, porém as células são colocadas imediatamente em uma solução fixadora. As células são dispersas, colocadas em um filtro e transferidas para uma lâmina de microscópio para interpretação em forma de monocamada. Uma vez que as amostras são rapidamente fixadas após a coleta, poucos artefatos morfológicos celulares ocorrem e também poucas células na lâmina são obscurecidas, uma vez que o processo reduz a quantidade de outros materiais, como sangue e muco (Kavita et al., 2000).

Os testes de HPV podem prever, melhor do que a citologia, quais mulheres irão desenvolver NIC3+ ao longo dos próximos 5 a 15 anos (Sherman, 2003; Dillner, 2008; Schiffman, 2011). A incorporação do teste de HPV nas estratégias de rastreamento permite o aumento na detecção da doença e o aumento no tempo de intervalo dos rastreamentos, diminuindo danos como o impacto psicossocial de um resultado positivo, visitas clínicas, procedimentos adicionais e tratamentos de lesões destinadas a se resolver espontaneamente (Saslow et al., 2012). Entretanto, os

testes para detecção de DNA do HPV apresentam enormes desafios a serem superados para sua incorporação nos programas de prevenção e na rotina clínica ginecológica como, por exemplo, a inadequação para a triagem da neoplasia intraepitelial cervical, dificuldades na distinção entre infecção transitória e persistente, grande variabilidade nas estimativas de sensibilidade e especificidade, e a mudança de cultura médica para melhor aderência às necessidades da metodologia (Caetano et al., 2006; Tsoumpou et al., 2009; Schiffman al., 2011).

A utilização de métodos de inspeção visual para o rastreamento da neoplasia cervical começou com o uso do teste de Schiller nos anos 1930 (Schiller, 1933). Atualmente a técnica que utiliza lugol (VILI) é a mais utilizada, porque a aplicação desta solução cora células do epitélio vaginal ricas em glicogênio diferenciando as lesões proliferativas da mucosa cervical, como o CIN ou câncer, que contém menos glicogênio, sendo assim visualizadas em áreas não coradas (IARC Handbooks of Cancer Prevention). Entretanto, tais metodologias apresentam elevada percentagem de falso-positivos, que acarretam em número substancial de colposcopias desnecessárias, recomendando-se a utilização dessas ferramentas em associação com o teste Papanicolau ou de Captura Híbrida II (Denny et al., 2002; Belinson et al., 2001; Sarian et al., 2005).

A colposcopia é um procedimento que permite uma visão estereoscópica aumentada (normalmente de 6 a 40 vezes) do cérvix e da vagina, obtida com o auxílio de um espéculo vaginal e do colposcópio, após a aplicação de soluções que coram o colo do útero para facilitar as análises. O colposcópio consiste de um microscópio binocular com uma fonte de luz com intensidade variável (IARC Handbooks of Cancer Prevention).

O exame histopatológico é considerado o padrão ouro no diagnóstico do câncer cervical. É requerido quando uma área suspeita à colposcopia é identificada. A graduação histopatológica da biópsia cervical é denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de baixo ou alto grau onde neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau inclui NIC I e neoplasia intraepitelial cervical de alto grau inclui NIC II e NIC III. A classificação pelo sistema NIC equivale à categorização das lesões intra-epiteliais escamosas pelo sistema Bethesda (Gravitt et al., 2005).

1.6 Problemas no diagnóstico do câncer cervical

Apesar da disponibilidade das duas vacinas recombinantes contra os HPVs tipos 6, 11, 16 e 18 ser um importante passo na batalha contra o câncer cervical, os tipos virais para os quais essas vacinas oferecem proteção são responsáveis por apenas 70% dos casos (Kjaer, 2010). Além disso, supostamente tais vacinas não oferecem proteção para indivíduos que já foram expostos aos tipos de alto-risco do HPV, apesar de pesquisas recentes demonstrarem uma eficácia de 67% da vacina quadrivalente Gardasil em mulheres entre 24-45 anos soropositivas, no entanto, negativas para o DNA do HPV (Castellsague, 2011). Dessa forma, avanços no diagnóstico e no tratamento para o câncer cervical se fazem necessários.

Nos programas de rastreamento para câncer cervical, as mulheres que apresentaram resultados positivos de alteração na citologia são encaminhadas para colposcopia para avaliação do diagnóstico e biópsia de lesões (Wright Jr et al., 2006). As pacientes diagnosticadas com LIEAG (NIC2 ou NIC3+) são tratadas principalmente por excisão da lesão. Entretanto, vários autores concordam que nem todas as lesões NIC3 e, especialmente, nem todas as NIC2 são “pré-câncer” (Schiffman et al, 2008; Castle et al, 2007). Na verdade, uma grande proporção de lesões de NIC2 devem se resolver sem tratamento, e recomenda-se que lesões detectadas em mulheres jovens não sejam imediatamente tratadas (Wright Jr et al., 2006).

Os danos potenciais associados à detecção dessas lesões transitórias incluem a ansiedade associada ao resultado “positivo” para o teste de rastreamento do câncer, o potencial de estigmatização do diagnóstico de uma infecção transmitida sexualmente, o desconforto de diagnósticos adicionais, hemorragias e aumento no risco de complicações na gravidez, como o parto prematuro devido ao tratamento por excisão (Arbyn et al., 2008). Dessa forma os programas de prevenção para câncer cervical em adolescentes devem focar na vacinação contra HPV, a qual é segura e eficiente e quando aplicada em adolescentes que ainda não se tornaram sexualmente ativos possui elevado custo-benefício (Pimenta et al, 2013; Saslow et al., 2007; Markowitz, 2007).

Mortes causadas pelo câncer cervical também são devido a resultados falso-negativos. Erros de amostragem ocorrem quando células anormais na lâmina do exame Papanicolau são perdidas ou mal interpretadas. O erro mais comum de amostragem é a ausência de células da zona de transformação cervical (Buntinix et al., 1996). Estimativas precisas de sensibilidade e especificidade em testes citológicos são importantes porque devem ser utilizadas para determinar decisões, como: recomendações da frequência ótima de rastreamento e acompanhamento de lesões de grau intermediário. Tais questões elevam a importância de se obter um biomarcador capaz de indicar em quais circunstâncias as lesões são transitórias ou não, além de facilitar o diagnóstico correto do grau da lesão, evitando tratamentos desnecessários.

1.7 Outros biomarcadores do câncer cervical

O diagnóstico histopatológico de biópsias cervicais determina a conduta clínica de pacientes que apresentaram resultado anormal para o teste de rastreamento do câncer cervical, entretanto, tais testes ainda são propensos a uma reprodutibilidade ruim interobservadores. Outros biomarcadores além de RAP1 já foram propostos para o uso na triagem da displasia cervical em mulheres, tais como: $p16^{INK4A}$ (mais utilizado), KI-67, HPV L1, CDC6, MCM5, entre outros.

A proteína $p16^{INK4A}$ (aqui abreviada como p16), produto do gene CDKN2, é uma proteína supressora de tumor que inibe os complexos ciclina D/ciclinas dependentes de cinases (CDK)-4 e -6, as quais regulam o ponto de checagem da fase G1 do ciclo celular (Serrano et al., 1993; Koh et al., 1995). Como mostrado no Quadro 3, as CDKs fosforilam a proteína retinoblastoma (pRB), o que resulta em uma mudança conformacional e liberação do fator de transcrição E2F pela pRB. Assim, a inativação da função tanto de p16 ou de pRB permite que a célula entre na fase S após apenas uma pausa no ponto de checagem de G1 (Sano et al., 1998). A inativação de pRB ocorre através da oncoproteína viral E7, que se liga a pRB inativando-a (Dyson et al., 1989). Devido à expressão de p16 estar envolvida em um *feedback* negativo de pRB, a diminuição desta proteína leva a um aumento de p16.

Assim, a inativação mediada por E7 de pRB resulta em elevados níveis de p16 em células infectadas com HR-HPV (Li et al., 1994).

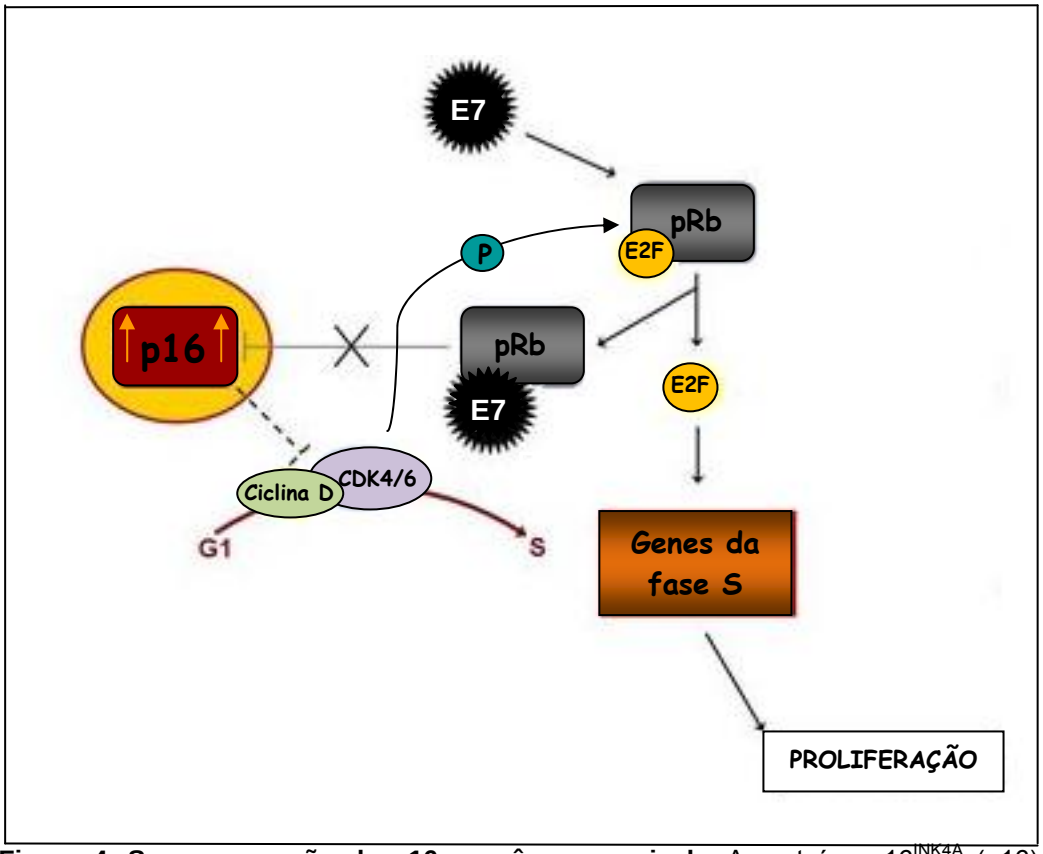

Figura 4. Superexpressão de p16 no câncer cervical. A proteína $p16^{INK4A}$ (p16) supressora de tumor, inibe os complexos ciclina D/ciclinas dependentes de cinases (CDK)-4 e -6, os quais regulam o ponto de checagem da fase G1 do ciclo celular. Os complexos ciclina-CDKs fosforilam a proteína retinoblastoma (pRB), o que resulta em uma mudança conformacional e liberação do fator de transcrição E2F pela pRB, induzindo a expressão de genes da fase S. A inativação de pRB ocorre através da oncoproteína viral E7, que se liga a pRB impedindo-a de se ligar a E2F e portanto inativando-a. Devido a expressão de p16 estar envolvida em um *feedback* negativo de pRB, a diminuição desta proteína em sua forma ativa leva a um aumento de p16. Assim a inativação mediada por E7 de pRB resulta em elevados níveis de p16 em células infectadas com HR-HPV. (Figura adaptada de https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/index.php?id=113203&L=1).

Estudos iniciais utilizando imuno-histoquímica em biópsias de neoplasias intraepiteliais cervicais e carcinomas demonstraram a expressão aumentada de p16 e ausência de sua expressão em mucosa normal e estroma, abrindo a possibilidade da utilização de p16 como biomarcador para diferenciar neoplasias de câncer ou de lesões no cervix (Sano et al., 1998). Muitos trabalhos demonstraram que os padrões

de imunocoloração com p16 são diferentes em biópsias cervicais infectadas com LR-HPVs de biópsias infectadas com HR-HPVs, fornecendo, portanto, informações valiosas sobre o tipo de HPV infectante sem a necessidade de testes moleculares como PCR, *Southern blotting* ou hibridização *in situ* (Sano et al., 1998). Entretanto, esta abordagem é controversa devido à possibilidade de haver coloração de p16 em alguns tipos celulares normais como células endocervicais, escamosas metaplásicas e atróficas (Trunk, 2004) que embora sejam encontradas de forma menos frequente e tenham uma coloração menos intensa pode resultar em diagnóstico falso-positivo em algumas amostras.

Além da p16, outros biomarcadores também têm sido estudados, entre eles, as proteínas topoisomerase IIα (TOP2A), a proteína 2 de manutenção do minicromossomo (MCM2); a p14, Ki67, p105, p107, RB2/p130, E2F4, p21 e Ciclina A (Santopietrp et al., 2006; Walts et al., 2009).

O ProEx™C é um ensaio imunocitoquímico composto por dois anticorpos monoclonais que reconhecem a TOP2A e a MCM2, que apresentam expressão aumentada em câncer cervical (Chen et al., 2003; Malinowski et al., 2007; Santin et al., 2005). A TOP2A é uma enzima que desenrola o DNA em preparação para a replicação, transcrição, segregação cromossomal e progressão do ciclo celular e a MCM2 é um marcador de proliferação celular (Badr et al., 2008).

1.8 Expressão de proteínas heterólogas em bactérias

O presente projeto visa a produção de proteínas recombinantes RAP1 (rRAP1) em sistema de expressão bacteriano para a obtenção de anticorpos monoclonais/policlonais anti-rRAP1 nacionais a preços acessíveis.

Nas últimas duas décadas, sistemas de expressão procarióticos, particularmente os de *E. coli*, tem sido explorados para a produção de uma variedade de proteínas terapêuticas em escala industrial. Normalmente, células procarióticas são os hospedeiros preferidos para a expressão de proteínas exógenas porque (i) necessitam de pequena quantidade de carbono para sua multiplicação, (ii) proporcionam uma rápida acumulação de biomassa, (iii) a produção das proteínas

pode ser feita em fermentadores e (iv) proporcionam processo de escalonamento simples (Sahdev et al., 2008).

Com uma escolha cuidadosa da linhagem hospedeira, vetores, e condições de crescimento, muitas proteínas recombinantes podem ser expressas em altos níveis. Entretanto, ocasionalmente, a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* pode gerar o acúmulo de agregados insolúveis sem atividade funcional, entre outros problemas, como toxicidade celular, instabilidade da proteína, processamento ou modificações pós-traducionais impróprias e tradução ineficiente.

Uma consideração primária para expressão de proteínas recombinantes é o propósito experimental para o qual a proteína vai ser utilizada. Para estudos bioquímicos e estruturais, é sempre importante aperfeiçoar as condições para a expressão de proteínas com atividade funcional, enquanto que, para produção de antígenos, a proteína pode ser utilizada tanto em sua forma nativa como desnaturada. Aproximadamente 80% das proteínas usadas para determinação de estruturas tridimensionais submetidas ao banco de dados Protein Data Bank em 2003 foram preparadas em sistemas de expressão E. coli (Sørensen and Mortensen, 2005).

Tão logo os primeiros sucessos com os experimentos de clonagem gênica foram apresentados em 1973, aplicações práticas dessa tecnologia se seguiram rapidamente. A importância de se produzir grandes quantidades de proteínas humanas, normalmente encontradas apenas em quantidades extremamente pequenas, foi prontamente compreendida por cientistas, médicos e empresas do ramo de negócios. A primeira proteína humana a ser produzida foi a somatostatina, um peptídeo neurotransmissor composto de quatorze aminoácidos clonado em um vetor plasmidial para expressão em *E coli. S*eguiu-se então a bem-sucedida expressão da insulina humana para o tratamento do diabetes, o primeiro produto comercial da indústria da biotecnologia (Watson et al.,1997). Atualmente, somente nos Estados Unidos, existem mais de 1300 empresas do ramo biotecnológico que empregam 5.3 milhões de cientistas, engenheiros e técnicos movimentando centenas de bilhões de dólares (http://selectusa.commerce.gov/industry-snapshots/biotechnology-industry-united-states, acessado em 25/11/2013).

O desenvolvimento de sistemas de expressão tem sido uma área de pesquisa importante em laboratórios industriais e acadêmicos. Os sistemas de expressão mais populares além da *E. coli* são a bactéria *Bacillus subtilis*, as leveduras e as células de inseto e de mamíferos propagadas *in vitro*. Como já mencionado, as células bacterianas oferecem simplicidade, curtos períodos de geração e altos rendimentos do produto a baixos custos (Watson et al.,1997).

Para a expressão das duas versões recombinantes da proteína RAP1 humana em *E. coli,* aqui proposta, o vetor de expressão pQE9 foi selecionado por gerar altos níveis de expressão de proteínas recombinantes com cauda de seis histidinas em *E. coli* (figura 5).

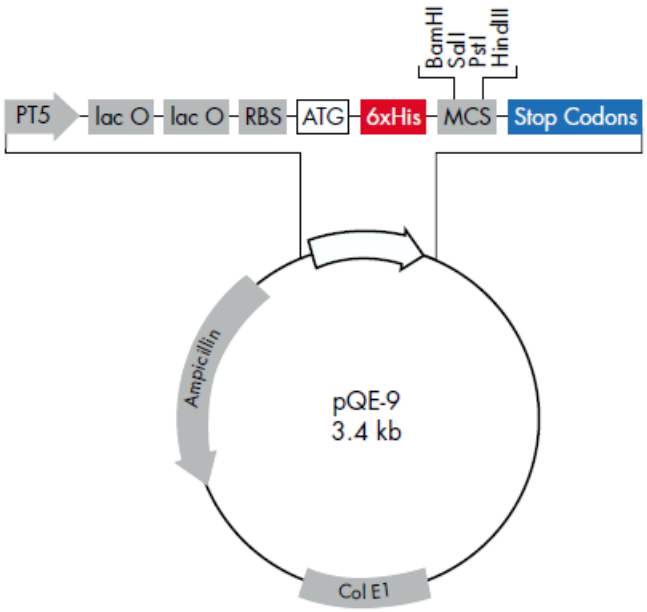

Figura 5. Desenho esquemático do vetor pQE9.
Fonte: http://www.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe9.pdf

A família de vetores pQE possui sistema transcrição-tradução do promotor T5 e originaram-se da família dos plasmídeos pDS. Esses plasmídeos de baixa cópia possuem características que facilitam a expressão de proteínas recombinantes tais como: (i) elemento promotor-operador do fago T5 (reconhecido pela RNA polimerase da *E. coli*) e duas sequências do operador *lac* as quais aumentam a ligação do

repressor e garantem uma eficiente repressão do promotor T5; (ii) sítio de ligação ribossomal sintético, RBSII, que gera altas taxas de tradução; (iii) sequência codificadora da cauda de seis histidinas tanto na extremidade 5' como 3' da região de clonagem; (iv) múltiplos sítios de clonagem e códons de terminação de tradução em todas as fases de leitura para uma preparação conveniente de construções de expressão; (v) dois fortes terminadores de transcrição: t_0 do fago lambda e T1 do operon rrnB de *E. coli*. O nível extremamente alto de transcrição iniciado pelo promotor T5 pode ser eficientemente regulado e reprimido apenas pela presença de altos níveis da proteína repressora *lac,* razão pela qual foi utilizada a linhagem hospedeira *E. coli* M15. Esta linhagem bacteriana contém o plasmídeo pREP4, que confere resistência à canamicina e permite a expressão constitutiva da proteína repressora *lac* codificada pelo gene *lac I*. Portanto, as múltiplas cópias de pREP4 garantem a produção de altos níveis da proteína repressora *lac,* que se liga ao operador inibindo fortemente a expressão da proteína recombinante. O plasmídeo pREP4 é compatível com todos os plasmídeos que carregam a origem de replicação ColE1, e é mantido na *E. coli* M15 pela pressão seletiva do seu cultivo na presença de canamicina. A expressão de proteínas recombinantes codificadas por vetores da família pQE é rapidamente induzida pela adição de IPTG, que se liga à proteína repressora *lac,* inativando-a. Assim, a RNA polimerase bacteriana pode transcrever as sequências conseguintes ao promotor. O sistema pQE9 expressa proteínas que possuem uma cauda de 6 histidinas que tem a propriedade de se ligarem à resina de níquel (Ni-NTA), comumente utilizada na etapa de purificação das proteínas recombinantes (http://web.mnstate.edu/provost/QiaExpressionist.pdf).

2 JUSTIFICATIVA

A expressão alterada da proteína RAP1, uma pequena GTPase da superfamília RAS, e seus reguladores (GEFs e GAPs), já foi demonstrada em diversos tumores como o câncer oral, de cabeça e pescoço, câncer papilar da tireóide, câncer de mama, carcinoma de células renais, leucemia e melanoma.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou a proteína RAP1 como um biomarcador do câncer cervical, com potencial uso em ensaios imuno-histoquímicos para auxiliar no diagnóstico desta neoplasia. Entretanto, o alto custo de anticorpos anti-RAP1 disponíveis no Brasil inviabiliza sua utilização na rotina de laboratórios públicos e privados, fazendo-se necessária a produção de anticorpos anti-RAP1 a preços acessíveis.

Este trabalho tem como objetivo a expressão de proteínas RAP1 recombinantes para uso como imunógeno e produção de anticorpos anti-rRAP1 para potencial uso para auxiliar no diagnóstico do câncer cervical e também de outros tumores. Destacamos que o câncer cervical foi utilizado como modelo de estudo para os testes imuno-histoquímicos de reconhecimento da proteína RAP1 humana pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos. Tal escolha se justifica porque o câncer cervical continua sendo a segunda neoplasia mais comum em mulheres no mundo e no Brasil. O rastreamento, isto é, a identificação da doença assintomática, é a base para a prevenção do estágio final do câncer invasor. Tal rastreamento é realizado por meio de análise citológica, colposcópica e histopatológica das alterações morfológicas epiteliais induzidas pelo HPV, entretanto, tais exames possuem grande variação interobservador e geram elevadas taxas de resultados falso-negativos e falso-positivos, o que prejudica a decisão clínica sobre o tratamento.

Portanto, a nossa hipótese é que as proteínas rRAP1 são capazes de gerar anticorpos úteis para auxiliar no diagnóstico imuno-histoquímico de diversos tumores a baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Expressar proteínas RAP1 recombinantes (rRAP1) em sistema heterólogo, produzir anticorpos anti-rRAP1 e verificar o reconhecimento quanto a proteína RAP1 humana expressa em tecidos contendo neoplasias cervicais.

3.2 Objetivos específicos

1- Subclonar os genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB no plasmídeo de expressão bacteriano pQE9
2- Expressar as proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB em bactérias *E. coli* M15
3- Purificar e quantificar proteínas rRAP1A e rRAP1AB por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel;
4- Confirmar a identidade das proteínas rRAP1A e rRAP1AB por espectrometria de massas.
5- Obter anticorpos monoclonais e policlonais anti-rRAP1A e anti-rRAP1AB
6- Verificar, por imuno-histoquímica, o reconhecimento da proteína RAP1 humana pelos anticorpos monoclonais e policlonais anti-rRAP1A e anti-rRAP1AB produzidos, em tecido de colo uterino.

4 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

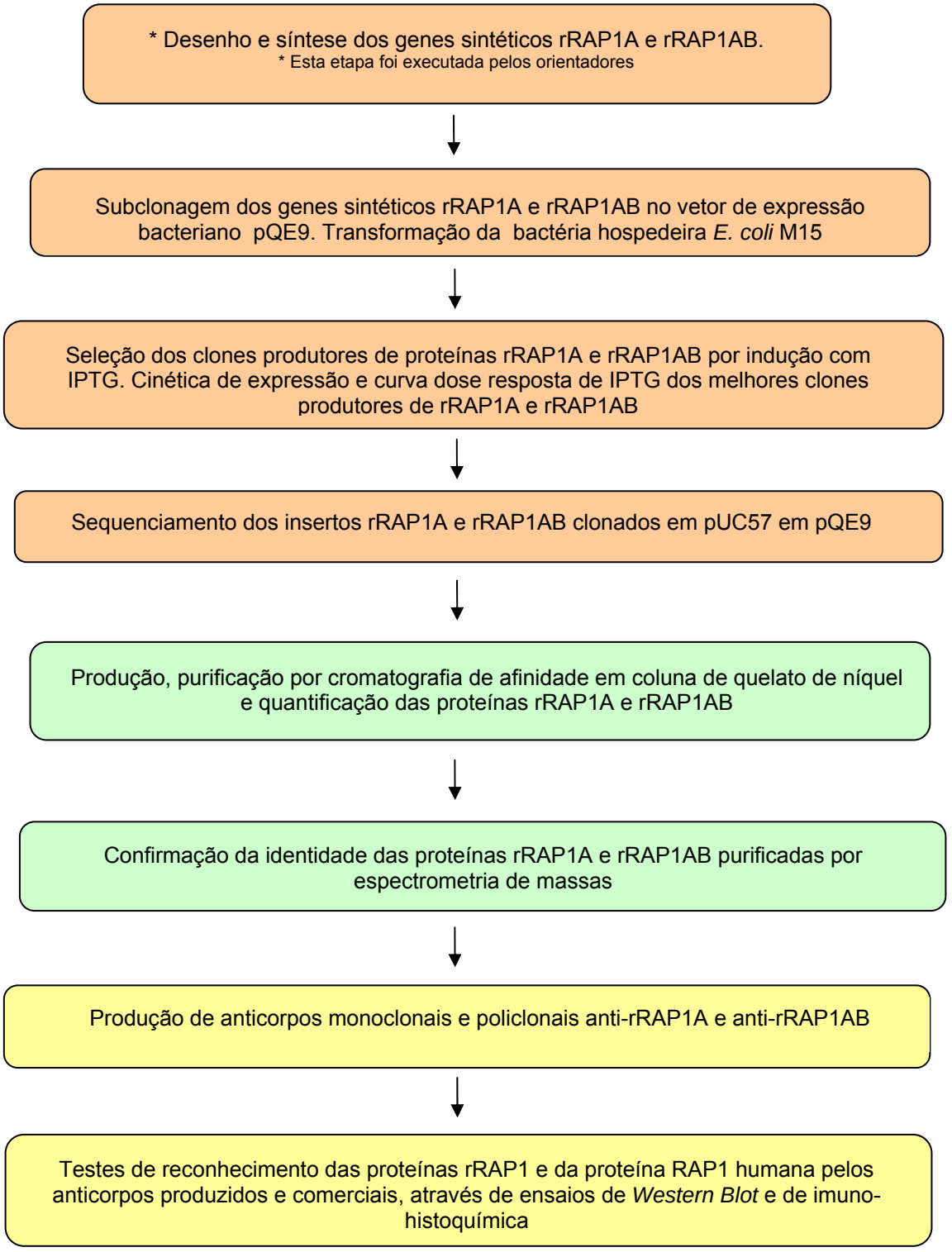

Figura 6. Fluxograma do trabalho: Em laranja as etapas relativas à clonagem gênica, em verde as etapas relativas à produção de proteínas recombinantes e em amarelo etapas realizadas na produção e testes dos anticorpos anti-rRAP1.

5 MÉTODOS

5.1 Plasmídeos, bactérias hospedeiras e iniciadores

Os plasmídeos pUC57-rRAP1A e pUC57-rRAP1AB foram fornecidos pela empresa GenScript conforme descrito em no item 5.2.

A linhagem da bactéria hospedeira *E. coli* DH5-alfa foi utilizada para a amplificação dos plasmídeos pUC57-rRAP1A e pUC57-rRAP1AB.

O plasmídeo pQE9 (figura 2) possibilita a expressão de proteínas com cauda de seis histidinas na extremidade N-terminal de proteínas recombinantes.

A linhagem da bactéria hospedeira *Escherichia coli* (*E. coli*) M15 utilizada para expressão de proteínas recombinantes carrega o plasmídeo pREP4 que codifica o repressor do operon lac, assegurando uma expressão altamente regulada da proteína recombinante desejada. O plasmídeo pREP4 é mantido por seleção com canamicina e, portanto, esta linhagem bacteriana é cultivada em meio contendo 25 ug/mL de canamicina.

As linhagens bacterianas *E. coli* DH5alfa, *E. coli* M15 e o plasmídeo pQE9 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Paulo César Peregrino Ferreira do Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. O clone de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pQE9 foi fornecido pela bióloga Izabella Andrade.

Os iniciadores utilizados para o sequenciamento de DNA do inserto em pUC57 foram M13 senso (5’ GTA AAA CGA CGG CCA GTG 3’) e anti-senso (5’ CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3’). Para o sequenciamento dos insertos dos plasmídeo pQE9 foram utilizados os iniciadores: pQE9 senso (5’ CCC GAA AAG TGC CAC CTG 3’) e pQE9 anti-senso (5’ GTT CTG AGG TCA TTA CGT G 3’).Todos os iniciadores foram comprados da Sigma (USA).

5.2 Desenho dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB

Para a construção dos genes sintéticos codificantes para as duas versões recombinantes da proteína humana RAP1, aqui denominadas de rRAP1A e rRAP1AB, as sequências de nucleotídeos dos genes RAP1A e RAP1B foram obtidas do banco de dados GenBank disponível pelo NCBI (**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank**).

A proteína rRAP1A foi desenhada de forma idêntica à proteína RAP1 humana e a proteína rRAP1AB constitui-se uma quimérica, apresentando porções relativas às proteínas RAP1A e RAP1B, entretanto, sem conter a porção relativa a RAS, a qual permite a classificação de tais proteínas como membro da superfamília de proteínas RAS. A figura 7 apresenta o alinhamento entre as sequências de RAP1A, rRAP1A e rRAP1AB. Em azul apresenta-se a porção relativa à RAS, ausente em rRAP1AB, em vermelho a porção relativa à RAP1A idêntica nas três proteínas e finalmente em preto, temos a porção relativa à RAP1B somente presente em rRAP1AB.

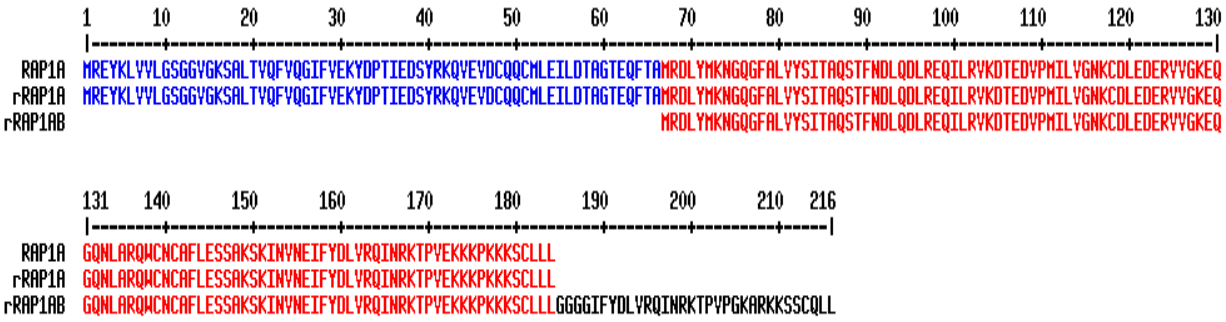

Figura 7. Alinhamento entre as sequências da proteína RAP1A humana e das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB.

Além disso, os cassetes de expressão foram construídos de modo a permitir a expressão das proteínas rRAP1 em diferentes sistemas de expressão. Sequências espaçadoras específicas foram utilizadas para o favorecimento da expressão, estrutura e exposição de cada componente. Os cassetes de expressão foram otimizados para expressão em bactérias através do software LETO 1.0 (Entelechon). Diferentes parâmetros como *codon usage*, estruturas secundárias, sítios de *splicing* e conteúdo G/C foram considerados. Os genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB,

otimizados e flanqueados pelos sítios múltiplos de clonagem de interesse, foram sintetizados comercialmente pela empresa GenScript (USA) clonados no vetor pUC57, aqui denominados pUC57-rRAP1A e pUC57-rRAP1AB, e recebidos na forma de filme seco. Tais plasmídeos foram ressuspendidos em água deionizada estéril e a concentração avaliada por espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) e armazenados a -20ºC.

5.3 Eletroforese em gel de agarose

Preparações contendo DNA (plasmídeos digeridos ou não) foram acrescidas de tampão de amostra de 6X *Loading Dye* (Fermentas) e fracionadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X em cuba para eletroforese horizontal MUPID EXu (Advance, Japão) contendo um volume apropriado de TAE 1X a 100V. A uma caneleta do gel foi aplicado um padrão de tamanho molecular conhecido. O gel contendo os fragmentos de DNA foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV) no Transilluminator 2UV BioDoc-It Systems**.** Para a visualização do DNA fracionado sob a luz UV, o corante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed® (Biotium, USA) foi adicionado ao gel de agarose e também ao tampão de corrida na concentração indicada pelo fabricante.

5.4 Preparo de bactérias competentes

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de bactérias hospedeiras: *E. coli* DH5 alfa *e E. coli* M15. Uma colônia isolada da bactéria foi inoculada em tubos cônicos de 50 mL contendo 10 mL de meio Luria Bertani (LB; bacto triptona a 1% p/v; extrato de levedura a 0,5% p/v; 171 mM de NaCl). Para o cultivo da *E. coli* M15, foram acrescidos 25 ug/mL de canamicina (Sigma) ao meio LB. A cultura foi incubada a 37^{o}C sob agitação a 200 rpm em agitador TE-422 (Tecnal, Brasil) até atingir densidade ótica (DO) DO_{600} = 0,5 a 0,7. Após, a cultura foi colocada em banho de gelo por 10 minutos, centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm a 4ºC em centrífuga Sorvall Legend RT, rotor Hereaus 75006445). O sobrenadante foi descartado e o

pellet dissolvido em 2,4 mL de solução gelada de cloreto de cálcio a 0,1M. Após, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm a 4ºC e o *pellet* foi novamente dissolvido em 2,4 mL da solução gelada de cloreto de cálcio a 0,1 M. Alíquotas de 50 uL foram transferidas para microtubos estéreis e estes armazenados a 4^{o}C. Vale ressaltar que bactérias competentes preparadas desta forma podem ser utilizadas, no máximo, até sete dias.

Antes de serem usadas em experimentos, as bactérias quimiocompetentes preparadas foram submetidas ao ensaio de eficiência de transformação como descrito por Sambrook & Russel (2001).

5.5 Transformação Bacteriana

Para a obtenção de clones recombinantes contendo os plasmídeos pUC57-rRAP1A, pUC57-rRAP1AB, bactérias *E. coli* DH5 alfa quimicamente competentes preparadas como descrito no item 5.4 foram transformadas com as respectivas preparações de DNA plasmidial fornecido pela empresa GenScript. Para tal, 10 a 30 ng de cada preparação foram adicionados a tubos contendo 50 uL de *E. coli* DH5 alfa quimiocompetente.

Para a obtenção de clones recombinantes contendo os plasmídeos pQE9-rRAP1A e pQE9-rRAP1AB, bactérias *E. coli* M15 quimicamente competentes foram transformadas com 5 a 10 uL de produto de ligação inserto-vetor (etapa posteriormente descrita no item 5.8.2).

Após a adição de DNA plasmidial ou de produto de ligação, as bactérias foram mantidas em banho de gelo por 30 min., aquecidas a 42^{o}C por 60 seg em banho-maria e, imediatamente, incubadas em banho de gelo por 5 minutos. Após internalização do DNA plasmidial, a suspensão bacteriana foi transferida para microtubos de 1,5 mL contendo 900 uL de meio LB sem antibiótico pré-aquecido a 37^{o}C, e, então, incubada a 37ºC por 60 minutos sob agitação leve (100 rpm) em agitador TE-422 (Tecnal, Brasil).

Após, 100 uL desta suspensão bacteriana foram plaqueados em LB-ágar adicionado de ampicilina a 100 ug/mL (para *E. coli* DH5-alfa) ou de LB-ágar

adicionado de ampicilina a 100 ug/mL e de 25 ug/mL de canamicina (para *E. coli* M15), com auxílio de pérolas de vidro estéreis.

Como controle de viabilidade celular 50 uL de bactérias competentes não transformadas foram adicionados a uma placa contendo LB-ágar sem antibiótico e para o controle do processo de transformação outros 50 ul de bactérias competentes foram transformadas com plasmídeos pUC57 e pQE9 sem insertos. As placas foram incubadas, em estufa a 37ºC, por 18 horas e armazenadas a 4^{o}C.

Para criopreservação, colônias isoladas dos clones transformantes foram inoculadas em tubos de 14 mL com fundo redondo (Falcon 352059) contendo 5 mL de meio LB líquido adicionado dos antibióticos apropriados e incubados a 37^{o}C, sob agitação a 200 rpm em agitador TE-422 (Tecnal, Brasil), de um dia para o outro. Pelo menos 6 alíquotas de cada cultura bacteriana (400 uL de cultura adicionados de 400 uL de glicerol a 40%), foram armazenadas a -70^{o}C.

5.6 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)

Para a extração do DNA plasmidial (miniprep) dos clones transformantes foram utilizados cerca de 5 mL de cultura bacteriana empregando-se o QIAprep Miniprep kit (Qiagen), segundo especificações do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi eluído em 50 uL EB Buffer, quantificado a 260 nm em espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e armazenado a -20ºC. A integridade do DNA purificado foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% (item 5.3).

5.7 Preparação de DNA plasmidial em larga escala (maxiprep)

Para extração do DNA plasmidial em larga escala (maxiprep) foram utilizados 500 mL de cultura bacteriana empregando-se o QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen), segundo especificações do fabricante. Cada preparação de DNA plasmidial obtida por maxiprep foi quantificada a 260 nm em espectrômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) e a integridade do DNA purificado analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% (item 5.3). As preparações de DNA plasmidial foram armazenadas a -20ºC.

5.8 Clonagem de rRAP1A e rRAP1AB no vetor de expressão pQE9

5.8.1 Digestão com enzimas de restrição

Para a clonagem dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB no vetor de expressão bacteriano pQE9 nos sítios de *Bam*HI e *Hind*III, 2 ug do plasmídeo pQE9 (figura 2) vazio e 3,3 ug de DNA de cada um plasmídeos pUC57 contendo os genes sintéticos rRAP1 (pUC57-rRAP1A e pUC57-rRAP1AB) foram digeridos simultaneamente com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Para tal, em uma reação com volume final de 30 uL, foram utilizados 10 U de cada enzima de restrição Fast Digest (Fermentas), 3 uL de tampão 10X da enzima fornecido pelo fabricante. Como controle da digestão, 300 ng de cada plasmídeo foram digeridos com apenas uma das enzimas (*Bam*HI ou *Hind*III). As reações foram incubadas por 2 horas a 37ºC em banho-maria e a verificação da eficiência da digestão foi feita por eletroforese em gel analítico de agarose a 1% (como descrito no item 5.3) no qual foram aplicados 3 uL de cada reação de digestão.

Uma vez verificada a liberação dos insertos correspondentes aos genes sintéticos rRAP1, os produtos da reação de digestão foram fracionados por eletroforese em gel preparativo de agarose a 1%. As bandas do DNA de interesse (rRAP1A e rRAP1AB) e do plasmídeo pQE9 digerido, visualizadas sob luz UV, foram excisadas do gel, com auxílio de bisturi. A extração do DNA contido na agarose foi realizada com o QIAquick^{R} Gel Extration Kit (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. A quantificação dos DNAs purificados do gel de agarose foi feita, comparativamente, por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo uma amostra de DNA plasmidial de concentração conhecida.

5.8.2 Ligação no vetor de expressão pQE9

Para a subclonagem dos insertos rRAP1A e rRAP1AB no vetor de expressão pQE9 foram feitas reações de ligação, com volume final de 10 uL, contendo 50 a 100 ng do vetor de expressão pQE9 digerido com *Bam*HI e *Hind*III e os respectivos

insertos na proporção vetor:inserto de 1:5, adicionados da enzima T4 ligase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante da enzima. A reação foi incubada a 4°C de um dia para o outro. A transformação foi realizada em bactérias *E.coli* M15 como anteriormente descrito no item 5.5.

5.8.3 Verificação da presença do inserto por análise de restrição

A verificação da presença do inserto foi obtida pela digestão de DNA plasmidial extraído dos clones transformantes com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Para tal, 300 ng de cada preparação de DNA foram digeridos simultaneamente com duas enzimas de restrição, em uma reação com volume final de 20 uL. Foram utilizados 0,3 U de cada enzima de restrição, *Bam*HI e *Hind*III *Fast Digest* (Fermentas), 2 uL de tampão 10X da enzima fornecido pelo fabricante. Como controle da digestão foram utilizados 300 ng do plasmídeo pUC57-rRAP1A. As reações foram incubadas por 2 horas a 37ºC em banho-maria. A verificação da presença do inserto foi feita por eletroforese em gel analítico de agarose a 1% (como descrito no item 5.3).

5.9 Análise da expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1A em clones transformantes

Todos os clones transformantes com inserto foram submetidos ao teste de indução da expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1AB por IPTG (isopropil-β-D1-tiogalactopiranosídeo). Para tal, 150 uL de cultura do clone foram adicionados a microtubos de 1,5 mL contendo 850 uL de meio Super Broth contendo ampicilina a 100 ug/mL e canamicina a 25 ug/mL e após atingirem uma DO= 0,9 foram adicionados ou não de 1 mM de IPTG. Em seguida, as culturas foram incubadas por 4 horas a 37ºC, a 200 rpm, em agitador TE-422 (Tecnal). As culturas foram então centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente em centrifuga Eppendorf 5415C e o sobrenadante descartado. Os *pellets* foram dissolvidos pela adição de 200 uL de tampão de amostra Laemmli 2X .

Os lisados bacterianos foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) para verificação da expressão das proteínas recombinantes de interesse como descrito no item 5.10.

5.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Lisados bacterianos ou amostras de rRAP purificadas (item 5.14) diluídas em tampão de amostra Laemmli 2X foram aquecidas a 99ºC por 5 minutos e em seguida centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf 5415C. Foram aplicados 40 uL de cada amostra em gel de SDS-PAGE a 12% para análise da expressão, juntamente com aplicação do padrão de peso molecular para análise do tamanho das bandas. A eletroforese foi realizada em placas de 1,5 mm de espessura utilizando-se o aparato Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) em tampão glicina. A corrida foi iniciada a 60 V até que as amostras atingissem o gel de separação e, então, a voltagem foi aumentada para 110 V. O gel foi corado em *Coomassie Blue* por 30 minutos e após, descorado em solução descorante (metanol e ácido acético) por 40 minutos.

5.11 Sequenciamento e análise dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB

O sequenciamento de DNA foi feito pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977) no sequenciador automático 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems®). Os DNA plasmidiais pUC57-rRAP1A e pUC57-rRAP1AB utilizados no sequenciamento foram obtidos a partir da extração do DNA por maxiprep de culturas de clones de *E. coli* DH5 alfa transformantes. Também foram sequenciadas as amostras de DNA plasmidial obtidas por miniprep de pQE9-rRAP1A e pQE9-rRAP1AB dos clones de *E. coli* M15 considerados como os melhores para expressão das proteínas rRAP1A (clone 22) e rRAP1AB (clone 35).

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, Life Technologies) em um volume final de 10 uL, adicionando-se 150 a 300 ng de DNA plasmidial; 5 picomoles

do iniciador; 1 uL de Big Dye; 1 uL de tampão BigDye 10X e o volume de água necessário para completar 10 uL. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento do inserto em pUC57 foram M13 senso (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') e anti-senso (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'). Para o sequenciamento dos insertos dos plasmídeo pQE9 foram utilizados os iniciadores pQE9 senso (5'-CCC GAA AAG TGC CAC CTG-3') e pQE9 anti-senso (5'-GTT CTG AGG TCA TTA CGT G-3'). A reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços (N801-0560 MicroAmp 96–well Reaction plate, Applied Biosystems) em termociclador Applied Biosystems® GeneAmp Thermal Cycler 9700, (Life Technologies). Inicialmente, as amostras foram aquecidas a 96°C por um minuto para desnaturação das fitas e, após, submetidas por 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 96ºC por 15 segundos para desnaturação; 50ºC por 15 segundos para pareamento do iniciador e 60°C por 4 minutos para extensão. Após, as reações de sequenciamento foram submetidas a um processo de precipitação para eliminação dos iniciadores e dos dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos sendo o DNA precipitado desnaturado pela adição de 10 uL/poço de formamida HIDI. Imediatamente antes da corrida no sequenciador automático 3730 DNA Analyzer, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 95ºC. Os resultados obtidos foram analisados pelos programas Chromas Lite 2.1.1 (http://technelysium.com.au/?page_id=13) e Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/).

5.12 Cinética e dose resposta da expressão das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB

Para análise das condições ótimas de expressão das proteínas rRAP1 foi realizado um estudo de cinética e dose resposta da indução com IPTG, avaliando-se o melhor tempo e melhor concentração de IPTG para a expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1AB pelos clones selecionados 22 e 35. A indução da expressão para análise da cinética foi realizada com culturas de 20 mL de cada um dos clones 22 e clone 35, com DO_{600nm}=0,9, em meio LB adicionado de ampicilina a 100 µg/ml e canamicina 25µg/ml. Os tempos avaliados após a adição de IPTG a 1 mM foram 0h (sem indução), 1h, 2h, 3h, 4h e 5h e as culturas permaneceram incubadas em

agitador a 37°C e 200 rpm. Em cada tempo foram retiradas alíquotas de 1 mL para imediata centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm em centrífuga Eppendorf 5415C. O pellet bacteriano foi dissolvido em 200 uL de *Loading Buffer* 2X.

O estudo dose resposta foi realizado em culturas dos referidos clones 22 e 35 distribuídas em cinco volumes de 1 mL, com DO_{600nm}=0,9, em meio LB adicionado de ampicilina a 100 µg/ml e canamicina 25 µg/ml. Todas as culturas foram induzidas por 5 horas em agitador a 37°C e 200 rpm sendo que cada amostra recebeu diferentes concentrações de IPTG a serem testadas: 0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2 mM. Ambas as análises tiveram seus resultados analisados por SDS-PAGE.

5.13 Produção das proteínas rRAP1 em média escala

A expressão em média escala foi obtida pela inoculação de 11 mL dos clones 22 (rRAP1A) ou 35 (rRAP1AB) em 500 mL de meio SuperBroth, pré aquecido a 37^{o}C, suplementado com ampicilina a 100 ug/mL e canamicina a 25 µg/Ml com incubação a 190 rpm e 37°C até que atingissem DO=0,9. Como verificado nos estudos de cinética e dose resposta (item 5.12), ambas as culturas foram incubadas por 5 horas, diferindo na concentração final de IPTG adicionada, sendo 1,5mM para o clone 22 (rRAP1A) e 1,0 mM para o clone 35 (rRAP1AB). Após, as culturas foram centrifugadas por 25 minutos a 4ºC e 3200 rpm em rotor 6441 em centrífuga Sorvall (Du Pont). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram armazenados a -20ºC.

5.14 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel

A purificação das proteínas rRAP1A e rRAP1AB foi realizada sob condições desnaturantes, segundo o protocolo sugerido pelo The QIA*expressionist* (http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf) para proteínas marcadas com a cauda de histidinas. Para a dissolver os *pellets* ainda congelados foram adicionados 40 mL de tampão guanidina 6M HCl (tampão A) (item 5.13) . A dissolução do pellet, com auxílio de uma pipeta de 10 mL acoplada a um

pipetador automático, foi feita por pelo menos 20 minutos. Após, os lisados foram submetidos à agitação por 1 hora a temperatura ambiente em agitador TE-422 (Tecnal, Brasil) a 200 rpm para lise completa das células. O lisado foi centrifugado por 2 horas a 4000 rpm a 15ºC em rotor 6441 em centrífuga Sorvall (Du Pont). O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno de 50 mL para nova centrifugação por 20 min. a 4500 rpm, 15ºC e, em seguida, o pH conferido e ajustado para 8,0 a 8,5.

Para a cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel a coluna de purificação foi montada em seringa de 50 mL na qual uma camada de aproximadamente 3 mm de lã de vidro foi colocada no fundo e sobre a camada de lã de vidro adicionaram-se 4 mL de resina de Ni-NTA (QIAGEN). O primeiro passo consistiu na lavagem da coluna com 40 mL de tampão A (os tampões utilizados na cromatografia estão descritos no Anexo1). Em seguida todo o volume do lisado bacteriano foi aplicado à coluna e o filtrado desprezado. Novamente foram adicionados 40 mL de tampão A à colunas. Após, a coluna foram lavadas com 10 mL de tampão de ureia 8M pH 8,0 (tampão B). Os demais tampões utilizados contendo ureia 8M (tampões de eluição) tinham diferentes pH: pH 6,3 (tampão C), pH 5,0 (tampão D), pH 4,0 (tampão E) os quais foram adicionados em volumes de 40 mL. A cada adição dos tampões de eluição os filtrados eram coletados em frações de 4 mL numeradas de 1 a 10. Para conservação, as colunas foram lavadas com 10mL de solução 6M guanidina-HCL 0,2M ácido acético pH2,7 (tampão F) e em seguida com 40 mL de tampão A. As frações contendo as proteínas purificadas foram analisadas por SDS-PAGE. O volume de cada fração coletadas foi de 4 mL, entretanto, tais frações foram divididas em dois microtubos de 2 mL para facilitar a armazenagem. As amostras com maior concentração de proteínas, foram renomeadas e tiveram as duas subfrações quantificadas, por exemplo D1 e D1'. A quantificação foi realizada pelo método colorimétrico com ácido bicinconínico (BCA) do kit Pierce^{R} BCA Protein Assay (Thermo Scientific) segundo especificações do fabricante.Nem todas as frações foram quantificadas, foram selecionadas frações representativas do início, meio e fim das etapas de eluições feitas com cada tampão, sendo os valores das amostras não quantificadas estimados por comparação. As frações D1; D1'; D2; D2'; D3; D3' referentes à rRAP1A foram diluídas a uma proporção de 1:4 para que

fossem quantificadas pois, devido a alta concentração, os valores não se encaixavam na curva padrão. No caso de rRAP1AB uma diluição na proporção de 1:3 foi realizada para tais frações.

5.15 Espectrometria de massas

A confirmação da identidade das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB produzidas e purificadas foi realizada por espectrometria de massas. A primeira etapa consistiu na preparação das amostras de forma a remover contaminantes, incluindo proteínas truncadas e eliminar o tampão de uréia utilizado na purificação. Para tanto, 60 ug das proteínas rRAP1A e rRAP1AB foram submetidas a SDS-PAGE a 12%. Após, o gel foi embebido em solução fixadora [ácido ortofosfórico 2% (v/v); etanol 18% (v/v); sulfato de amônio 15% (p/v)] por 30 minutos, por 3 vezes, antes de passar pela coloração por dois dias com solução *Coomasie* G-250 (1 mL de *Coomassie* coloidal a 2% em 100 mL da solução fixadora). O excesso de corante foi removido em etanol a 20% por 5 minutos. A imagem do gel foi capturada no densitômetro GS-800 Calibrated Densiometer (BioRad) e as bandas foram excisadas do gel com uma ponteira anti-aderente a proteínas e acondicionadas em microtubos siliconados de 1,5 mL lavados em metanol-água-metanol. As bandas excisadas foram descoradas com 1 mL de solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8. Foram realizadas quatro lavagens com agitação em vórtex, trocando-se a solução descorante a cada 15 minutos. Como os fragmentos de géis não descoraram totalmente uma 5ª lavagem foi realizada por 18 horas sendo a solução descorante então descartada. Procedeu-se com a desidratação dos fragmentos dos géis com a adição 500 uL de acetonitrila 100% por 5 minutos. Após secagem das amostras, as mesmas foram armazenadas a temperatura ambiente por três dias.

A redução das proteínas foi realizada adicionando-se 150 uL de ditiotreitol (DDT) a 10 mM com incubação durante uma hora a 56ºC. Após o DTT foi descartado e as proteínas foram alquiladas adicionando-se 150 uL de iodoacetamida a 55 mM aos tubos embalados em papel alumínio, posteriormente incubados em temperatura ambiente por 45 minutos e homogeneizados em vórtex a cada 15 minutos. Em

seguida, os fragmentos de géis foram lavados em bicarbonato de amônio a 25 mM em pH 8 durante 10 minutos sob agitação. Procedeu-se com a desidratação dos géis em solução de 25 mM de bicarbonato de amônio a 25 mM e acetonitrila a 50% com posterior remoção da solução e secagem das amostras no concentrador a vácuo (SpeedVac, Savant).

A digestão tríptica das proteínas recombinantes foi realizada adicionando-se 50 uL de tripsina a 25 ug/mL com incubação em gelo por 10 minutos e após, adição de 20 uL de solução 40 mM de bicarbonato de amônio em acetonitrila a 10% com incubação por 18 horas a 37ºC. Em seguida, todo o volume de líquido contidos no tubo foi coletado e armazenado. Ao tubo contendo o gel fragmentado foram adicionados 100 uL de solução de ácido fórmico 5%/ACN 50%, seguido de agitação por 30 minutos para remoção dos peptídeos trípticos.

A primeira etapa do processo de identificação das proteínas consistiu na separação dos peptídeos de acordo com seu grau de hidrofobicidade por cromatografia de fase reversa (High Performance/Pressure Liquide Chromatography) realizada em cromatógrafo Finnigan Surveyor Autosampler plus (Thermo Scientific) em coluna de dimensão 2,1mm x 50 mm constituída de sílica e partículas de 3 µm recoberta de C18. Utilizou-se gradiente de separação de 2% a 60% de acetronitrila (solvente orgânico) a um fluxo de 200 uL/minuto.

Em seguida os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas no espectrômetro Maxis ETD (Bruker), no modo MS/MS. As análises de massas dos fragmentos foram realizadas utilizando-se as ferramentas de bioinformática BioTools, Mascot e o banco de dados SwissProt. Os peptídeos gerados para as duas proteínas recombinantes (rRAP1A e rRAP1AB) na espectrometria de massas foram sobrepostos à sequência de aminoácidos de RAP1A humana de forma a se avaliar a similaridade entre as sequências produzidas e esperadas.

5.16 Obtenção de anticorpos monoclonais

A produção de anticorpos monoclonais anti-rRAP1A e anti-rRAP1AB foi realizada pela Plataforma de Produção de Anticorpos Monoclonais do PDTIS/Fiocruz, vinculada ao Laboratório de Esquistossomose do CPqRR, que tem como responsável técnica a Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz.

5.16.1 Inoculação de camundongos com os antígenos rRAP1

Os anticorpos monoclonais foram obtidos pela inoculação das proteínas purificadas rRAP1A e rRAP1AB em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c. Foram selecionados 4 camundongos para cada antígeno, imunizados intraperitonealmente com 100 ug do imunógeno (rRAP1A ou rRAP1AB) em intervalos de 15 dias, totalizando-se cinco imunizações para rRAP1A e quatro para rRAP1AB. A cada inoculação amostras de sangue eram coletadas. Apenas para primeira inoculação adicionou-se o adjuvante de Freund completo aos antígenos e nas demais utilizou-se o adjuvante de Freund incompleto. O controle da produção de anticorpos pelos animais foi realizado a partir da terceira imunização, por ensaio de ELISA, utilizando-se as amostras de soro coletadas. Uma vez atingido um título de anticorpos representado por uma OD>2,0 para um comprimento de onda de 450nm, os animais foram selecionados para realização das próximas etapas.

5.16.2 Geração de hibridomas e obtenção de anticorpos policlonais e monoclonais

Os camundongos selecionados tiveram o baço retirado do qual foram isolados os linfócitos produtores de anticorpos que apresentaram reação positiva no teste de ELISA para o reconhecimento das proteínas rRAP1A ou rRAP1AB. Tais linfócitos foram fundidos com células Sp2/0Ag14 (ATCC® CRL1581™) não produtoras de imunoglobulinas, as quais foram formadas pela fusão de células do baço de camundongos BALC/c com células de mieloma, utilizando polietilenoglicol de forma a gerar novos hibridomas. Os melhores “pools” de hibridomas produtores de

anticorpos anti-rRAP1 foram selecionados para obtenção dos clones produtores de anticorpos monoclonais.

A obtenção dos clones produtores de anticorpos monoclonais específicos anti-rRAP1A e anti-RAP1AB foi realizada através da diluição de 100 uL de “pools” de hibridomas em 10 mL de meio DMEM. Os hibridomas diluídos foram redistribuídos em volumes de 100 uL em placa de 96 poços para a obtenção de 1 clone por poço. A verificação dos melhores clones produtores de anticorpos contras as duas proteínas rRAP1 (A e AB) foi feita por ELISA.

5.16.3 Purificação de anticorpos monoclonais

Os anticorpos produzidos pelo “pool” de clones aqui chamados “anticorpos policlonais” de camundongo foram purificados em etapa única por precipitação em solução saturada de sulfato de amônio, em seguida, dialisados por três dias e dosados por método de Lowry.

Os anticorpos monoclonais foram purificados em duas etapas, primeiro, por precipitação em solução saturada de sulfato de amônio seguida de diálise e depois por cromatografia em coluna de afinidade. A dosagem foi realizada por método de Lowry.

5.17 Obtenção de anticorpos policlonais de coelho

Os anticorpos policlonais de coelhos foram produzidos pela empresa Célula B da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre. Para tanto foram enviadas 1,5 mg de cada umas das proteínas purificadas rRAP1A e rRAP1AB. As proteínas foram aplicadas em SDS-PAGE a 12% retirando-se dessa forma a uréia contida no tampão. Em seguida as bandas de interesse foram excisadas dos géis e armazenadas. Além disso, foram enviadas amostras contendo 2 mg de cada uma das proteínas purificadas no próprio tampão de ureia para uso testes imunológicos realizados para controle da imunização. O envio das amostras para a empresa célula B com sede em Porto Alegre foi feito em caixas de isopor contendo gelo químico. Os anticorpos policlonais gerados em coelhos foram recebidos aproximadamente três

meses depois. Juntamente com as preparações de IgG anti-RAP1A e anti-RAP1AB também foram recebidas amostras de soros pré-imune e soro hiper imune dos coelhos.

5.18 Ensaio *Western Blot*

O ensaio de *Western Blot* foi realizado para avaliação da reatividade das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB com os anticorpos policlonais produzidos em coelhos anti-rRAP1A e anti-rRAP1AB. Também foi testado o reconhecimento das proteínas recombinantes rRAP1 pelo anticorpo comercial policlonal de coelho anti-RAP1A + anti-RAP1B (AB40814 da Abcam) .

Para tal, amostras de 1 ug de cada proteína purificada rRAP1A e de rRAP1AB foram fracionadas por SDS-PAGE a 12%. O marcador de peso molecular utilizado foi o See Blue^{R} Plus 2 Standart 1X (Invitrogen). O fracionamneto das proteínas rRAP1 foi feito por SDS-PAGE a 12% como descrito no item 5.10. Após foi feita a transferência das bandas das proteínas rRAP1 do gel para membrana de nitrocelulose (BioRad Trans-Blot^{R} Transfer Medium Pure Nitrocelulose Membrane, nº cat:162-0115) de aproximadamente 40 cm² (5 cm x 8 cm). Previamente à transferência a membrana e os outros aparatos como esponjas, papéis de filtro e géis foram incubados em tampão de transferência gelado por 10 minutos. A transferência foi realizada colocando-se a cuba em banho de gelo e com o tampão de transferência gelado. Uma vez que o gel apresentava espessura de 1,5 mm a transferência foi feita por duas horas com amperagem aproximada e constante de 300 mA.

Após a transferência, a membrana foi rapidamente corada em reagente Ponceau até o aparecimento das bandas, e lavadas com TBS1X para retirar o excesso de corante. Uma vez verificada a presença das bandas, as membranas foram fotografas para logo em seguida serem descoradas com TBS contendo Tween 20 (TTBS) até que ficassem totalmente brancas.

O bloqueio de proteínas inespecíficas na membrana de nitroceluose foi realizado em solução bloqueadora (leite em pó desnatado a 5% em TBS 1X) à

temperatura ambiente por 1 hora,sob agitação, e, em seguida, as membranas foram lavadas com TTBS por três vezes de 5 minutos sob agitação.

Os seguintes anticorpos primários foram testados: Anticorpo 1 – Policlonal de coelho anti-RAP1A + RAP1B (Abcam AB40814) em diluição 1:2000; Anticorpo 2 – Policlonal de coelho anti-rRAP1A em diluição 1:2000; Anticorpo 3 – Policlonal de coelho anti-rRAP1AB em diluição 1:2000. Os anticorpos primários foram diluídos em solução bloqueadora e foram adicionados sobre as membranas permanecendo em incubação por 18 horas a 4ºC. Após, as soluções contendo os anticorpos primários foram descartadas e as membranas foram lavadas três vezes em solução TTBS por 5 minutos.

O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (A0545 da Sigma) diluído a 1:1200 em TBS1X e a incubação ocorreu por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação leve. O método de revelação selecionado foi com peróxido de hidrogênio.

5.19 Ensaios imuno-histoquímicos

Para os ensaios imuno-histoquímicos foi utilizado o kit Novo Link Max Polymer Detection Novocastra^{TM} (Leica Microsystems). Para tal, foram selecionadas lâminas contendo amostras cervicais parafinadas com diferentes níveis de lesão, NICI, NICII/III, CCE e também amostras de tecido cervical normal. Previamente as lâminas contendo os cortes parafinados foram incubadas por 18 horas a 56ºC em estufa. Após, foram submetidas a etapas de desparafinização e re-hidratação por lavagem em xilol por 10 minutos, em álcool etílico (PA) por 5 minutos e, por fim, em água corrente por 10 minutos. Após, foi realizada a recuperação antigênica dos tecidos, processo necessário para induzir a exposição dos antígenos, no qual as lâminas foram aquecidas em solução de citrato de sódio a 0,01 M (pH 6) a 98ºC por 20 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. A peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas em diferentes etapas utilizando-se as soluções específicas fornecidas no kit. Os seguintes anticorpos foram testados quanto ao reconhecimento da proteína RAP1 humana presente nas amostras:

policlonais produzidos de coelho anti-rRAP1A e anti-rRAP1AB, policlonais e monoclonais de camundongos anti-rRAP1A (6B3B3 e 4E5A6) e anti-rRAP1AB (5G3F12 e 5G3H10) obtidos pela Plataforma de Produção de Anticorpos Monoclonais do CPqRR, além dos anticorpos comercias anti-RAP1A (RAP1 121 SC-65, 200 ug/mL) e anti-p16 (H-150 SC-759, 200 ug/mL) ambos da Santa Cruz Biotechnology. Várias testes para verificação da concentração ideal foram realizados, incluindo diluições de anticopos que variaram de 1:10 até 1:2000 em diluente fornecido pelo kit (Novocastra IHC Diluente REF= RE 7133). A incubação com os anticorpos primários foi realizada por 1 hora a temperatura ambiente. O bloqueio pós-primário foi feito por 30 minutos utilizando-se solução específica do kit. A seguir foi adicionado sobre as lâminas o polímero contendo os anticorpos secundários anti IgG de coelho e camundongo seguido de incubação por 30 minutos. A revelação também foi realizada com soluções do kit contendo o cromógeno diaminobenzidina 3,3 (DAB) com incubação por aproximadamente 5 minutos.

A contra coloração foi realizada mergulhando-se as lâminas em hematoxilina por aproximadamente 2 segundos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 minutos e, em seguida, lavadas 3 vezes em álcool etílico e 2 vezes em xilol. Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss Axio (com as objetiva de 10x e 20x) e as imagens obtidas pela câmera digital AxioCam MRc.

6 RESULTADOS

6.1 Subclonagem dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB em vetor de expressão bacteriano

Para subclonar os genes sintéticos no vetor de expressão bacteriano pQE9, as preparações de DNA plasmidial obtidas a partir dos clones transformantes contendo os plasmídeos pUC57-RAP1A, pUC57-RAP1B e pQE9 (obtidas como descrito em Material e Métodos) foram digeridas simultaneamente com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, para a liberação dos insertos correspondentes a rRAP1A e rRAP1AB e, também, para linearizar o plasmídeo pQE9. Como controle, foram feitas reações de digestão dos DNAs plasmidiais com apenas uma das enzimas (*Bam*HI ou *Hind*III). O fracionamento dos produtos da digestão por eletroforese em gel analítico de agarose está mostrado na figura 8. A digestão liberou os insertos com tamanho esperado de RAP1A de 552 pb e RAP1AB de 450 pb, assim como promoveu a linearização do plasmídeo vetor pQE9 (3400 pb), entretanto observou-se que digestão dos plasmídeos foi parcial, nas condições utilizadas (figura 8).

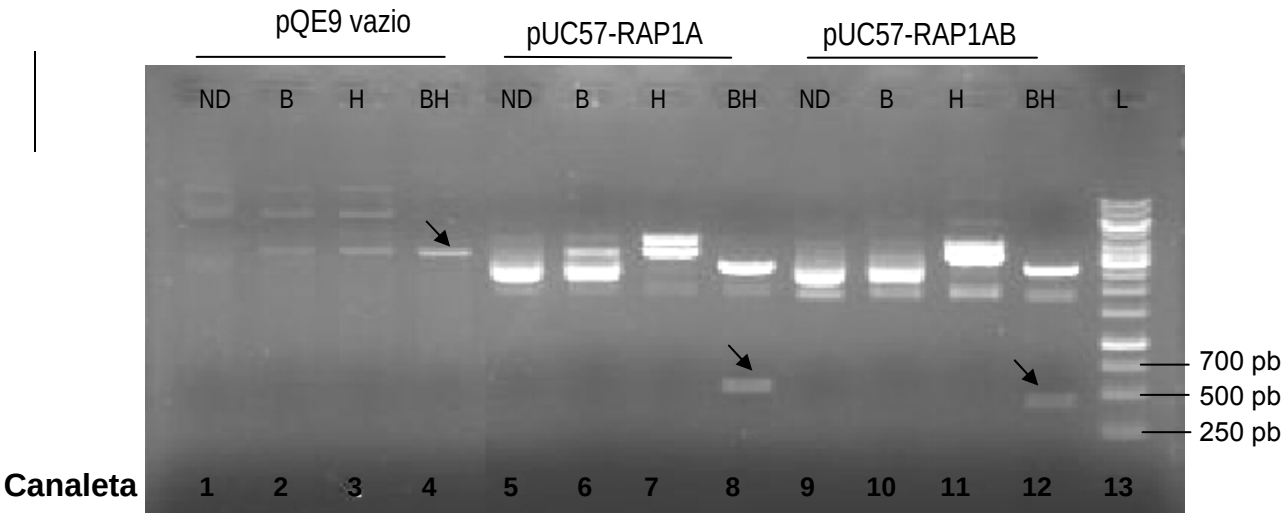

Figura 8. Digestão dos plasmídeos pUC57 contendo os insertos rRAP1A e rRAP1AB e do vetor pQE9 vazio com as enzimas *Bam*HI (B) e *Hind*III (H). Os plasmídeos pUC57-rRAP1A, pUC57-rRAP1AB e pQE9 vazio foram submetidos à digestão enzimática conforme descrito no item 5.8.1. As abreviações correspondem a amostras não digeridas (ND), digeridas com *Bam*HI (B), digeridas com *Hind*III (H) e digeridas simultaneamente com *Bam*HI e *Hind*III (BH).O padrão de tamanho molecular (L) utilizado foi o Ladder 1Kb SM1163 da Fermentas (canaleta 13). As bandas correspondentes aos insertos de 552 pb de RAP1A e de 450 pb de RAP1AB, assim como o pQE9 linearizado estão indicadas pela seta.

A figura 9 mostra o gel de agarose preparativo no qual todo o volume das reações de digestão foi aplicado, para que as bandas de interesse fossem excisadas do gel. O gel preparativo foi fotografado somente após o recorte das bandas de interesse, evitando-se assim a exposição desnecessária dos DNAs à luz UV, o que causa danos às fitas de DNA.

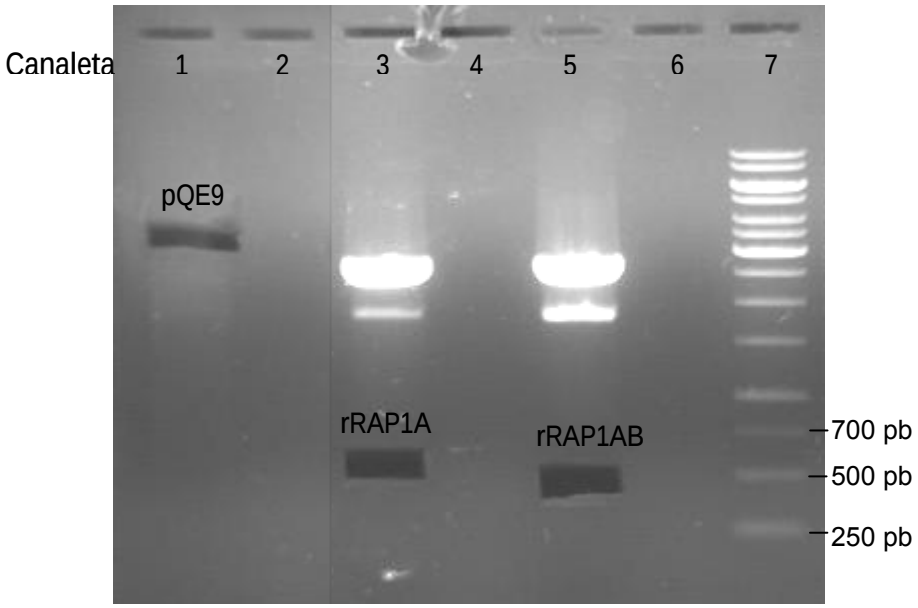

Figura 9. Obtenção dos insertos rRAP1A (552pb), rRAP1AB (450pb) e do plasmídeo pQE9 digeridos com *Bam*HI e *Hind*III. Está representado o gel de agarose preparativo no qual todo o volume das reações de digestão foi aplicado, para que as bandas de interesse fossem excisadas do gel, a saber: pQE9 (canaleta 1), inserto RAP1A (canaleta 3) e inserto RAP1A (canaleta 5). O padrão de tamanho molecular utilizado foi o Ladder 1Kb SM1163 da Fermentas (canaleta 7).

A figura 10 representa a quantificação dos DNAs extraídos do gel de agarose, relativos ao pQE9 linearizado (caneleta 1), ao inserto RAP1A (canaleta 2) e RAP1AB (canaleta 3), feita comparando-se a intensidade das bandas com o DNA plasmidial aplicado na canaleta 5, na qual foram aplicados 100 ng de pQE9 não digerido. A concentração de pQE9 linearizado purificado foi de 10 ng/ul, e a concentração de ambos os insertos rRAP1A (canaleta 2) e rRAP1AB (canaleta 3) de 20 ng/uL. Dessa forma, o rendimento estimado para pQE9 linearizado foi de 300 ng totais e ambas as preparações dos insertos RAP1A e RAP1AB renderam 510 ng totais cada. Portanto, foram obtidas quantidades suficientes de DNA para a realização da etapa de ligação dos insertos RAP1A e RAP1AB ao vetor de expressão pQE9.

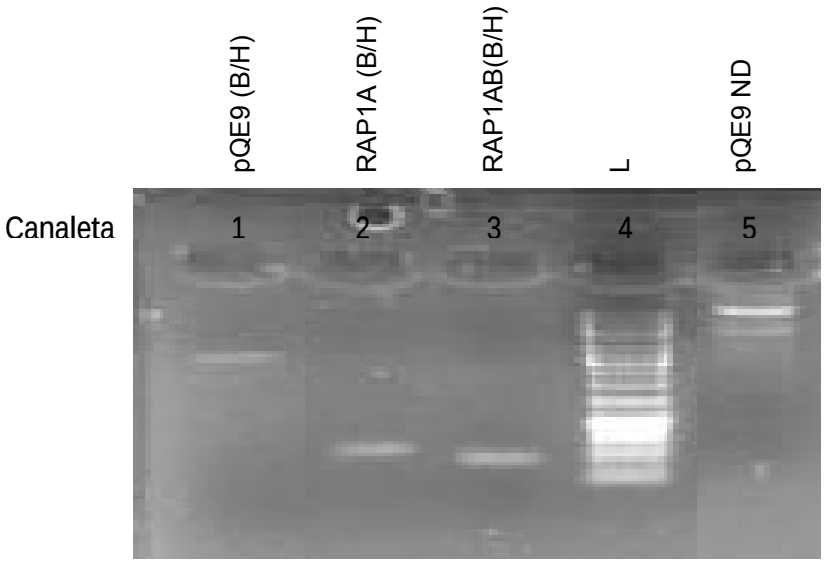

Figura 10. Quantificação do plasmídeo pQE9 e insertos RAP1A e RAP1AB após purificação. A quantificação do plasmídeo pQE9 e dos insertos RAP1A e RAP1AB, digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, foi realizada por estimativa, comparando-se a intensidade da banda referente a 100 ng de pQE9 não digerido (ND) (canaleta 5). Nas canaletas 1 a 3 foram aplicados 3 uL das respectivas amostras. O padrão de tamanho molecular (L) utilizado foi o *Ladder* 1Kb SM1163 da Fermentas (canaleta 4)

A partir da transformação de bactérias hospedeiras *E. coli* M15 quimiocompetentes com os produtos de ligação dos insertos RAP1A e RAP1AB no

plasmídeo de expressão pQE9, foram obtidos 5 clones transformantes para RAP1A e 10 para RAP1AB. Para a verificação da presença do inserto, as preparações de DNA plasmidial extraído dos 15 clones transformantes foram digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Como mostrado na figura 11, a presença do inserto de 552 pb de RAP1A foi verificada em todos os 5 clones transformantes testados, aqui denominados de clones 21, 22, 23, 24 e 25 (canaletas 3; 5 a 8). Da mesma forma, a presença do inserto de 450pb de RAP1AB nos clones transformantes 26, 27 e 28 (canaletas 9 a 11) da Figura 11 e nos clones transformantes 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35 (canaletas 1; 3 a 8) da figura 12 também foi verificada. Como controle da reação, o plasmídeo pUC57-RAP1A foi digerido simultaneamente com as duas enzimas (canaleta 9 da figura 12).

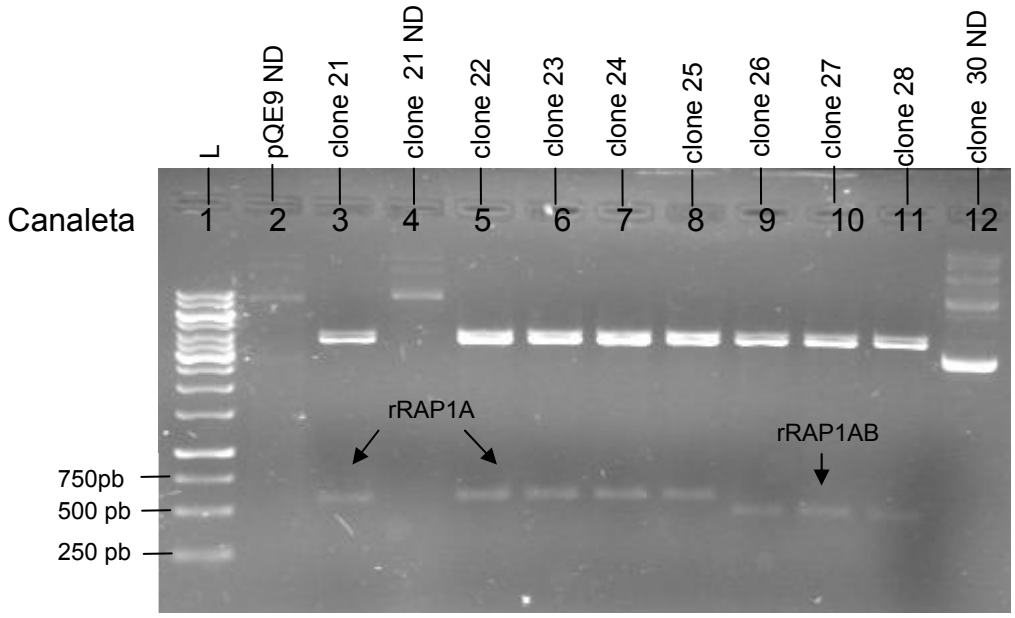

Figura 11. Verificação da presença dos insertos (rRAP1A e rRAP1AB) nos clones transformantes de *E. coli* M15 por digestão enzimática. DNAs plasmidiais extraídos dos clones transformantes de pQE9-rRAP1A (clones 21 a 25) e de pQE9-rRAP1AB (clones 26 a 28) foram digeridos simultaneamente pelas enzimas *Bam*HI (B) e *Hind*III (H) e os produtos da digestão fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1% como descrito no item 5.8.3. No gel analítico aqui representado as canaletas correspondem às seguintes amostras: 1- Padrão de tamanho molecular Ladder 1Kb SM1163 da Fermentas (L); 2- pQE9 não digerido (ND); 3- clone 21 digerido; 3- clone 21 não digerido; 5 a 11- clones 22 a 28 digeridos, 12 – clone 30 não digerido. As bandas correspondentes aos insertos de 552 pb de RAP1A e de 450 pb de RAP1AB estão indicadas pela seta.

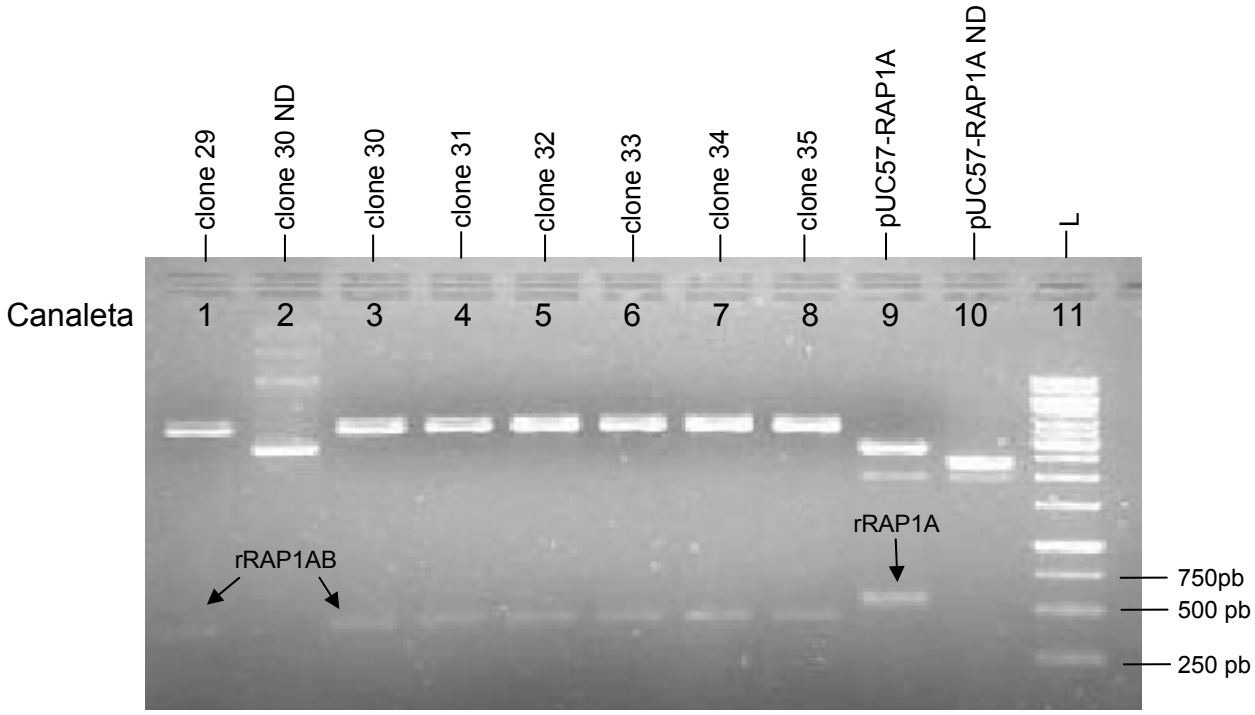

Figura 12. Verificação da presença dos insertos rRAP1AB nos clones transformantes de *E. coli* M15 por digestão enzimática. DNAs plasmidiais extraídos dos clones transformantes de pQE9-rRAP1AB (clone 29 a 35) foram digeridos simultaneamente pelas enzimas *Bam*HI (B) e *Hind*III (H) e os produtos da digestão fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1% como descrito no item 5.8.3. No gel analítico aqui representado as canaletas correspondem às seguintes amostras: 1-clone 29 digerido; 2- clone 30 não digerido (ND); 3- clone 21 digerido; 3 a 8- clones 30 a 35 (respectivamente) digeridos; 9- pUC57-RAP1A digerido (controle); 10- pUC57-RAP1A não digerido. O padrão de tamanho molecular (L) utilizado foi o Ladder 1Kb SM1163 da Fermentas (canaleta 11). As bandas correspondentes aos insertos de 552 pb de RAP1A e de 450 pb de RAP1AB estão indicadas pela seta.

6.2 Verificação da capacidade de expressão das proteínas RAP1 pelos clones recombinantes

Visto que todos os clones transformantes RAP1A e RAP1AB continham o inserto desejado, todos eles foram utilizados no ensaio de indução pelo IPTG (descrito no item 5.9) para a verificação da expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1AB e, também para a seleção dos melhores clones produtores. Os lisados obtidos de culturas dos clones transformantes induzidos ou não por 1 mM IPTG por 4

horas, foram fracionados por eletroforese em SDS-PAGE. Como mostrado na figura 13 (paineis A - D), todos os clones transformantes testados expressaram as proteínas de interesse após indução com IPTG. Todos os clones transformantes RAP1A (clones 21 a 25) expressaram uma proteína de peso molecular estimado de 20,2 KDa correspondente ao tamanho esperado para rRAP1A (banda indicada pela seta nas canaletas 1, 3, 6 e 8 do painel A; e na canaleta 1 do painel B). Nos paineis C e D da figura 13 observa-se que os todos os clones transformantes RAP1AB (clones 26 a 35) expressaram uma proteína de peso molecular estimado de 16,5 KDa correspondente ao tamanho esperado para rRAP1AB (bandas indicadas pela seta nas canaletas 1, 3, 5, 7 e 9 do painel C; e canaletas 2, 4 e 6 do painel D). O clone 22 (canaleta 3, painel A da figura 7) e o clone 35 (canaleta 5, painel D da figura 13) que expressaram as proteínas rRAP1A e RAP1AB, respectivamente, foram selecionados como os melhores produtores e foram utilizados para a produção em média escala.

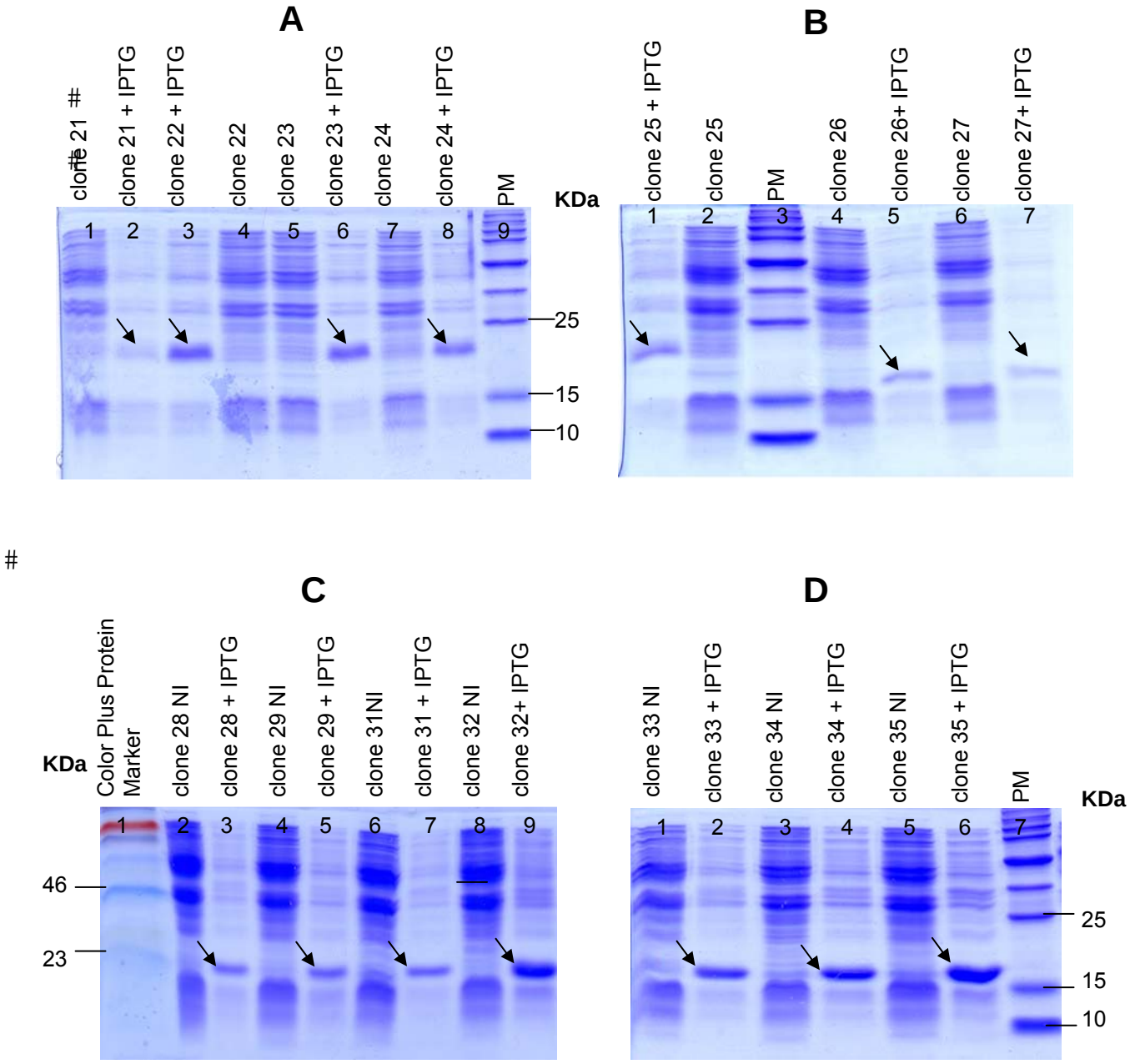

Figura 13. Verificação da expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1AB pelos clones transformantes induzidos ou não com IPTG. Os clones transformantes de *E. coli* M15 contendo pQE9-rRAP1A (clones 21 a 25) e pQE9-rRAP1AB (clones 26 a 35) foram induzidos ou não com 1mM de IPTG (como descrito 5.9) e os lisados bacterianos foram fracionados por SDS-PAGE como descrito no item 5.10. Nos paineis A, B, C e D estão representados os clones bacterianos induzidos (+IPTG) ou não induzidos (NI). As bandas referentes às proteínas rRAP1A de 20,2 KDa (clones 21 a 25) e rRAP1AB de 16,5 KDa (clones 26 a 35) produzidas pelos clones testados estão indicadas pelas setas. O padrão de peso molecular (PM) utilizado foi o 10-225 KDa da Promega está indicado nos painéis A,B e D. No painel C foi utilizado o padrão de peso molecular ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 KDa) da New England Biolabs.

6.3 Sequenciamento dos genes sintéticos rRAP1A e rRAP1AB

A análise de sequenciamento confirmou a identidade dos genes rRAP1A e rRAP1AB fornecidos no vetor pUC57 (figuras 14 e 15) e após a subclonagem no plasmídeo de expressão pQE9 (figuras 16 e 17) sem alterações nas sequências. Os resultados do alinhamento das sequências esperadas com as sequências obtidas nos sequenciamentos que apresentaram 100% de identidade para pUC57-rRAP1A (figura 14), pUC57-rRAP1AB (figura 15), pQE9-rRAP1A (figura 16) e pQE9-rRAP1AB (figura 17) estão representados.

pUC57-rRAP1A

Figura 14. As sequências do inserto do plasmídeo pUC57-RAP1A e do gene sintético rRAP1A apresentam 100% de identidade. Está representado o alinhamento feito pelo software Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) das sequências de nucleotídeos do inserto rRAP1A em plasmidio pUC57 do clone transformante de *E. coli* DH5-alfa selecionado e do gene rRAP1A sintético fornecida pela empresa GenScript.

pUC57- rRAP1AB

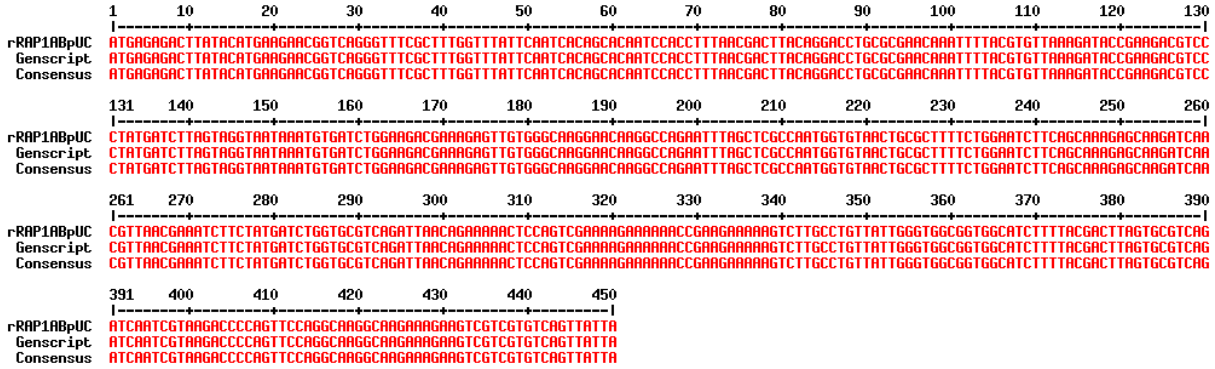

Figura 15. As sequências do inserto do plasmídeo pUC57-RAP1AB e do gene sintético rRAP1AB apresentam 100% de identidade. Está representado o alinhamento feito pelo software Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) das sequências de nucleotídeos do inserto rRAP1AB em plasmideo pUC57 do clone transformante de *E. coli* DH5-alfa selecionado e do gene rRAP1AB sintético fornecida pela empresa GenScript

pQE9-rRAP1A

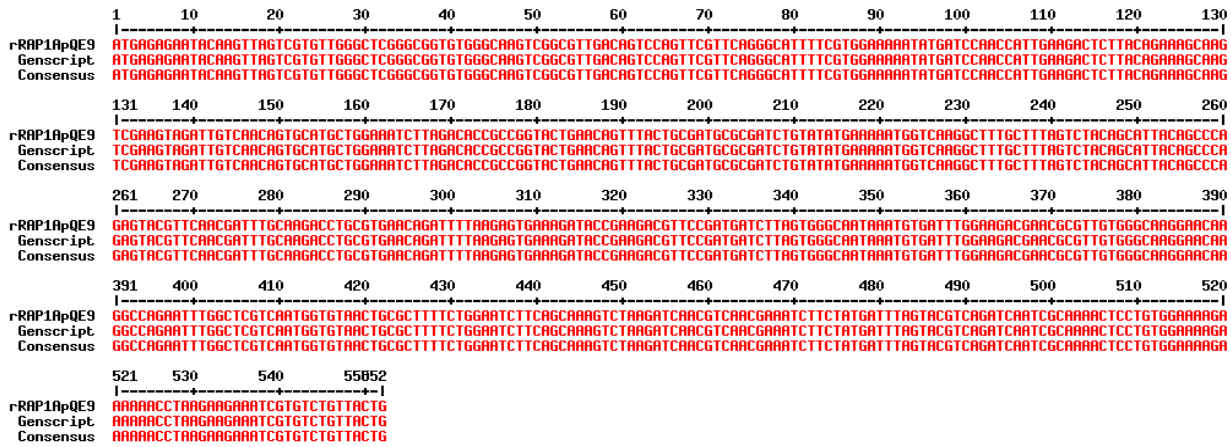

Figura 16. As sequências do inserto do plasmídeo pQE9-RAP1A e do gene sintético rRAP1A apresentam 100% de identidade. Está representado o alinhamento feito pelo software Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) da sequência de nucleotídeos do inserto rRAP1A em plasmídeo pQE9 do clone 22 de *E. coli* M15 e do gene rRAP1A sintético fornecida pela empresa GenScript.

pQE9- rRAP1AB

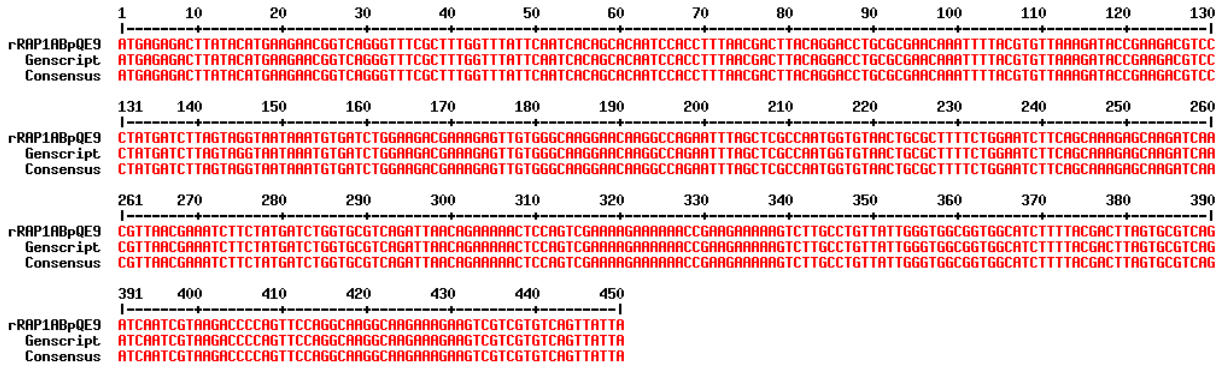

Figura 17. As sequências do inserto do plasmídeo pQE9-RAP1AB e do gene sintético rRAP1AB apresentam 100% de identidade. Está representado o alinhamento feito pelo software Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) da sequência de nucleotídeos do inserto rRAP1AB em plasmidio pQE9 do clone 35 de *E. coli* M15 e do gene rRAP1AB sintético fornecida pela empresa GenScript

6.4 Expressão das proteínas recombinantes rRAP1A e rRAP1AB em sistema bacteriano

6.4.1 Cinética e dose resposta da expressão de RAP1 pelos clones 22 e 35

No estudo de cinética da produção de rRAP1A pelo clone 22 não foi observada uma diferença considerável na expressão das proteínas nos diferentes tempos de 1 a 5 horas (painel A da figura 18) como observado para o clone 35 produtor de rRAP1AB, no qual a melhor expressão ocorre nitidamente no tempo de 5 horas (painel B da figura 18). Entretanto, mesmo no caso de rRAP1A a banda parece estar levemente mais intensa após 5 horas de indução, portanto, escolhemos este tempo como sendo o melhor para a expressão de ambas as proteínas recombinantes (Figura 18).

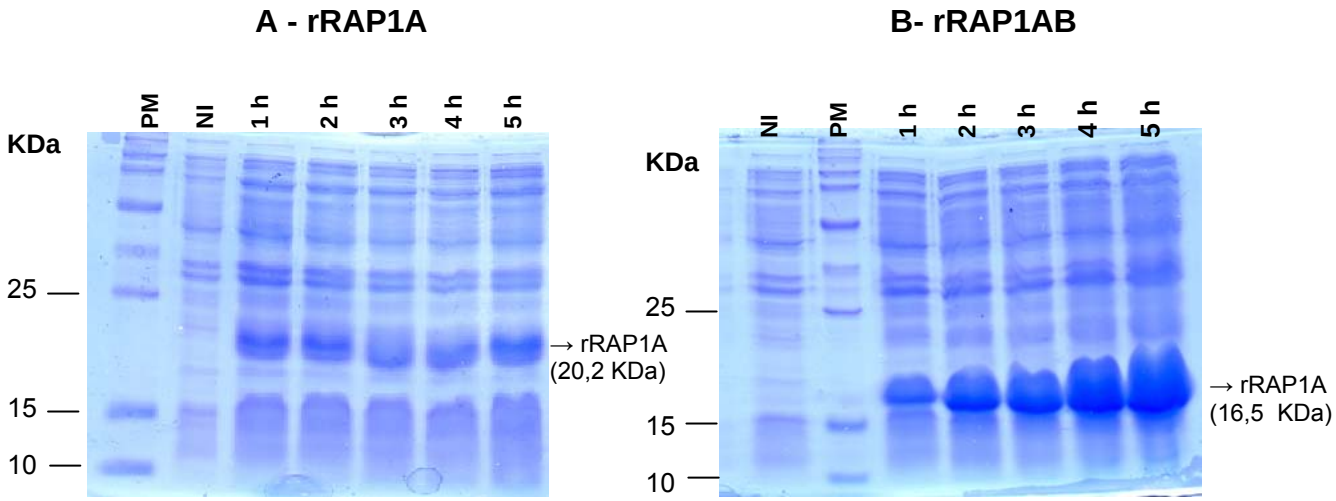

Figura 18. Cinética de expressão de rRAP1A e de rRAP1AB após adição de 1 mM de IPTG.
Os clones bacterianos contendo os plasmídeos pQE9-RAP1A (clone 22) e pQE9-RAP1AB (clone 35) foram multiplicados na ausência de IPTG (NI) ou na presença de 1 mM de IPTG como descrito no item 5.9, nos tempos indicados: 1h, 2h, 3h, 4h e 5h. Foram aplicados 20 uL dos lisados bacterianos os quais foram fracionados por SDS-PAGE como descrito no item 5.10. As bandas referentes às proteínas rRAP1A de 20,2 KDa (painel A) e rRAP1AB de 16,5 KDa (Painel B) produzidas pelos respectivos clones estão indicadas pelas setas. O padrão de peso molecular (PM) utilizado foi o Broad Range Protein Molecular Weight Markers 10-225 KDa da Promega. As posições das bandas de 25, 15 e 10 KDA do padrão de peso molecular (PM) estão indicadas.

A concentração ótima de IPTG verificada no estudo de dose resposta para o clone 22 produtor de rRAP1A foi de 1,5 mM (painel A da figura 19), suficiente para alta produção da proteína, não apresentando diferença em relação a indução com 2 mM de IPTG. Não houve diferença considerável na expressão da proteína rRAP1AB pelo clone 35 nas diferentes concentrações de IPTG testadas, sendo que a concentração de 0,5 mM foi suficiente para induzir altos níveis de rRAP1AB, semelhante aos observados nas concentrações maiores utilizadas (painel B da figura 19).

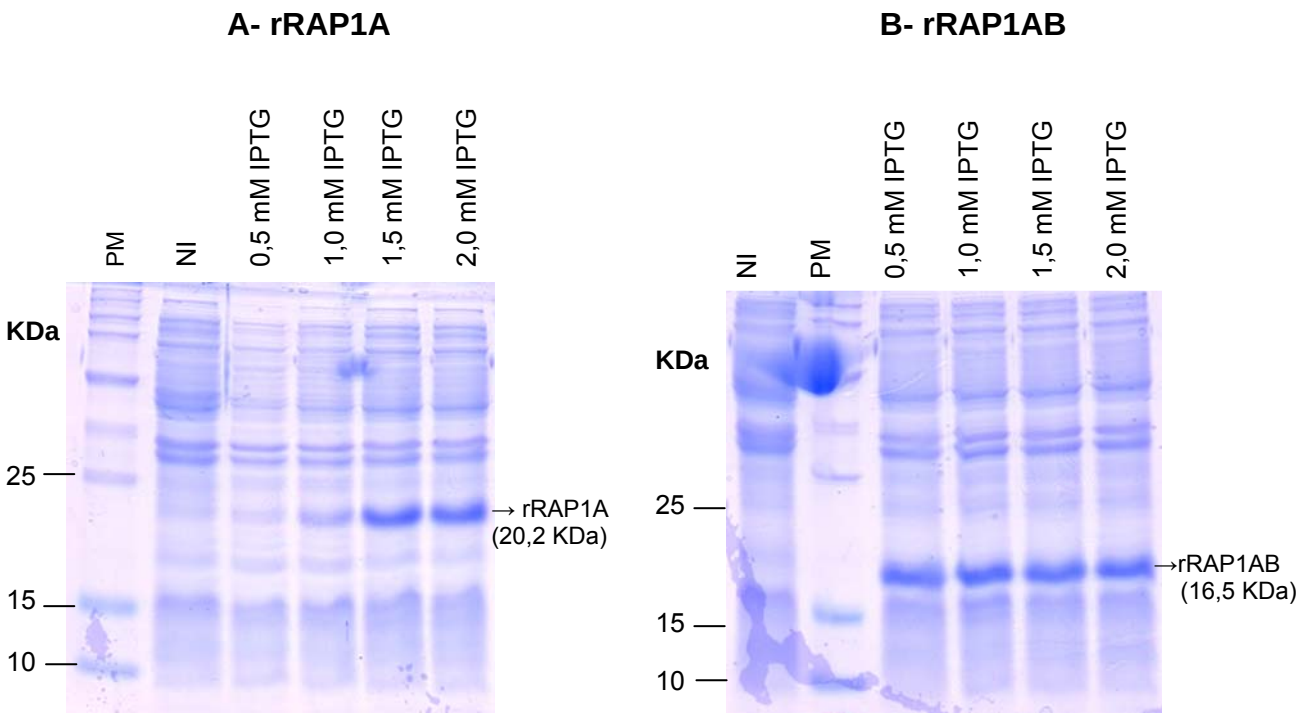

Figura 19. Efeito dose-resposta de IPTG na indução da expressão de rRAP1A e rRAP1AB. Os clones bacterianos contendo os plasmídeos pQE9-RAP1A (clone 22) e pQE9-RAP1AB (clone 35) foram multiplicados nas seguintes concentrações de IPTG: 0 mM (controle não induzido NI), 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM durante 5 horas. Os lisados bacterianos foram fracionados por SDS-PAGE como descrito no item 5.10. As bandas referentes às proteínas rRAP1A de 20,2 KDa (painel A) e rRAP1ABde 16,5 KDa (Painel B) produzidas pelos respectivos clones estão indicadas. O padrão de peso molecular (PM) utilizado foi o Broad Range Protein Molecular Weight Markers 10-225 KDa da Promega. As posições das bandas de 25, 15 e 10 KDa do padrão de peso molecular (PM) estão indicadas.

6.5 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

A purificação das proteínas recombinantes rRAP1A (20,2 KDa) e rRAP1AB (16,5 KDa) realizada em coluna de NI-NTA foi bem sucedida, como pode ser verificado na figuras 20 e 21. Poucas bandas inespecíficas aparecem após a purificação quando comparadas aos controles (clones induzido sem purificação, canaletas 3 e 16 das figuras 20 e 21) apesar do aparecimento de algumas bandas de tamanhos não esperados, principalmente nas frações contendo a maior concentração de proteínas purificadas (frações C2, C3, D1, D2 e D3). O

aparecimento dessas bandas consideradas não específicas pode ser justificado pela produção de proteínas RAP1 truncadas ou contaminantes. Nota-se que a maior concentração de proteínas eluídas foi obtida no tampão de ureia em pH 5, correspondente ao tampão D, principalmente nas frações D1, D2 e D3 de rRAP1A e frações D2, D3 e D4 de rRAP1AB, porém, uma quantidade significativa de proteínas também aparece na maioria das frações C, especialmente na C2 e C3.

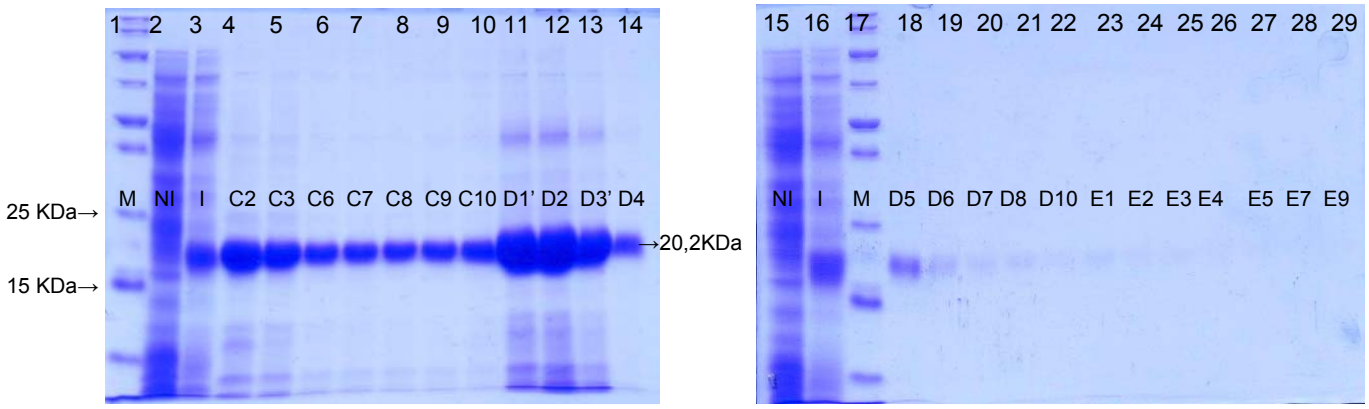

Figura 20. Purificação da proteína rRAP1A por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel sob condições desnaturantes. O clone bacteriano 22 contendo o plasmídeo pQE9-RAP1A foi multiplicado na ausência de IPTG (NI) ou na presença de 1,5 mM de IPTG (como descrito no item 5.13) por 5 horas. Após as culturas foram submetidas à purificação da rRAP1A por cromatografia em coluna de quelato de níquel como descrito no item 5.14. Aliquotas dos eluatos proteicos obtidos foram fracionadas por SDS-PAGE como descrito no item 5.10. As letras C, D e E seguidas de números correspondem as frações obtidas com os tampões de eluição utilizados (tampão C pH=6,3; tampão D: pH=5 ; tampão E: pH= 4). O padrão de peso molecular (M) utilizado foi o Broad Range Protein Molecular Weight Markers 10-225 KDa da Promega. As posições das bandas de 25 e 15 KDa do padrão de peso molecular (M) estão indicadas.

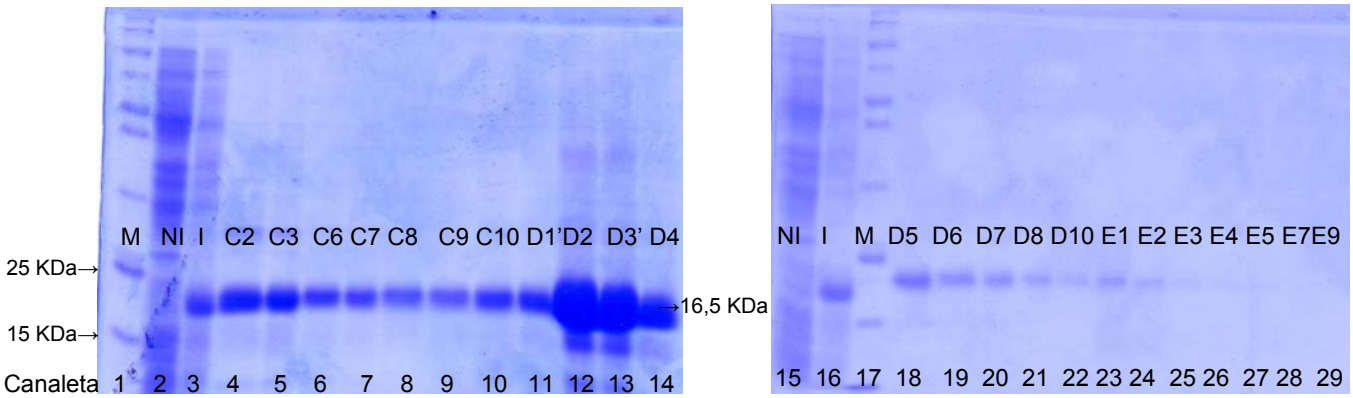

Figura 21. Purificação da proteína rRAP1AB por cromatografia de afinidade em coluna de quelato de níquel sob condições desnaturantes. O clone bacteriano 35 contendo o plasmídeo pQE9-RAP1AB foi multiplicado na ausência de IPTG (NI) ou na presença de 1,0 mM de IPTG (como descrito no item 5.13) por 5 horas. Após as culturas foram submetidas à purificação da rRAP1AB por cromatografia em coluna de quelato de níquel como descrito no item 5.14. Aliquotas dos eluatos proteicos obtidos foram fracionadas por SDS-PAGE como descrito no item 5.10. As letras C, D e E seguidas de números correspondem as frações obtidas com os tampões de eluição utilizados (tampão C: pH=6,3; tampão D: pH=5 ; tampão E: pH= 4). O padrão de peso molecular (M) utilizado foi o Broad Range Protein Molecular Weight Markers 10-225 KDa da Promega. As posições das bandas de 25, 15 KDa do padrão de peso molecular (M) estão indicadas.

6.5.1 Quantificação das proteínas recombinantes purificadas por método colorimétrico com ácido bicinconínico (BCA)

Os valores obtidos na quantificação por BCA das varias frações das proteínas rRAP1 purificadas refletem a produção eficiente destas proteínas como já evidenciado nas figuras 20 e 21. Os valores obtidos para as quinze frações quantificadas (Figura 22) somado aos valores estimados das outras frações, resultou em uma produção total final estimada em 92,8 mg de proteína rRAP1A. O mesmo cálculo realizado para rRAP1AB estimou uma produção final de 51,95 mg da proteína (Figura 23).

Unknowns (mg/ml)

Sample	Wells	OD_Values	R	Concentration	MeanConc	SD	CV	Dilution	AdjConc
C1	C1	0,197		0,144	0,138	0,009	6,8	1,0	0,138
	C2	0,179		0,131					
C2	C3	1,446		1,196	1,455	0,366	25,1	1,0	1,455
	C4	2,003		1,714					
C3	C5	0,836		0,657	1,053	0,560	53,2	1,0	1,053
	C6	1,720		1,448					
C4	C7	0,860		0,678	0,674	0,005	0,7	1,0	0,674
	C8	0,853		0,671					
C7	C9	0,374		0,278	0,307	0,041	13,4	1,0	0,307
	C10	0,448		0,336					
D1	D1	0,144		0,106	0,108	0,002	2,3	1,0	0,108
	D2	0,149		0,109					
D1'	D3	1,187		0,963	0,902	0,086	9,6	1,0	0,902
	D4	1,049		0,841					
D2	D5	1,610		1,346	1,343	0,004	0,3	1,0	1,343
	D6	1,603		1,340					
D2'	D7	1,252		1,021	1,255	0,331	26,4	1,0	1,255
	D8	1,764		1,489					
D3	D9	0,197		0,144	0,152	0,011	7,1	1,0	0,152
	D10	0,218		0,159					
D3'	D11	0,517		0,391	0,406	0,021	5,2	1,0	0,406
	D12	0,554		0,421					
D6	E1	0,036		0,034	0,034	0,000	0,9	1,0	0,034
	E2	0,035		0,034					
E1	E3	-0,017	R	0,003	0,003	0,000	8,6	1,0	0,003
	E4	-0,018	R	0,003					
E2	E5	-0,026	R	Range?	0,000	0,000	0,0	1,0	0,000
	E6	-0,025	R	0,000					
E7	E7	-0,025	R	Range?	Range?	Range?	Range'	1,0	Range?
	E8	-0,028	R	Range?					

R = Outside standard range

Figura 22. Quantificação das frações purificadas de rRAP1A pelo ensaio com ácido bicinconínico (BCA). Devido a alta concentração de proteína rRAP1A eluída, as frações D1; D1'; D2; D2'; D3; D3' foram diluídas na proporção 1:4 em solução de uréia 8M. Os resultados destacados pelos quadrados em vermelho apontam as frações com concentrações de rRAP1A acima de 1,5 mg/mL. A dosagem foi realizada em leitor de microplaca Spectra Max M5 (Molecular Devices). Os dados obtidos são coerentes com as bandas observadas na figura 14.

Unknowns (mg/ml)

Sample	Wells	OD_Values	R	Concentration	MeanConc	SD	CV	Dilution	AdjConc
C1	C1	0,689		0,659	0,639	0,029	4,5	1,0	0,639
	C2	0,641		0,618					
C2	C3	0,702		0,670	0,694	0,033	4,7	1,0	0,694
	C4	0,758		0,717					
C3	C5	0,462		0,463	0,438	0,036	8,2	1,0	0,438
	C6	0,405		0,413					
C4	C7	0,612		0,594	0,485	0,153	31,6	1,0	0,485
	C8	0,365		0,377					
C7	C9	0,233		0,251	0,258	0,010	3,9	1,0	0,258
	C10	0,247		0,265					
D1	D1	0,803		0,755	0,745	0,014	1,9	1,0	0,745
	D2	0,779		0,735					
D1'	D3	0,140		0,154	0,158	0,006	3,6	1,0	0,158
	D4	0,147		0,162					
D2	D5	1,380		1,234	1,219	0,021	1,8	1,0	1,219
	D6	1,343		1,204					
D2'	D7	1,304		1,171	1,137	0,048	4,2	1,0	1,137
	D8	1,223		1,103					
D3	D9	0,538		0,530	0,529	0,002	0,3	1,0	0,529
	D10	0,535		0,528					
D3'	D11	1,153		1,045	0,953	0,131	13,7	1,0	0,953
	D12	0,930		0,860					
D6	E1	0,146		0,161	0,162	0,003	1,6	1,0	0,162
	E2	0,149		0,164					
E1	E3	0,050		0,041	0,042	0,001	2,9	1,0	0,042
	E4	0,051		0,042					
E2	E5	0,016	R	Range?	Range?	Range?	Range'	1,0	Range?
	E6	0,019	R	Range?					
E7	E7	0,001	R	Range?	Range?	Range?	Range'	1,0	Range?
	E8	0,019	R	Range?					

R = Outside standard range

Figura 23. Quantificação proteica de rRAP1AB por ensaio com ácido bicinconínico (BCA). Devido a alta concentração de proteína rRAP1AB eluída as frações D1; D1'; D2; D2'; D3; D3' foram diluídas a uma proporção 1:3 em solução de uréia 8M. Os resultados destacados pelos quadrados em vermelho apontam as frações com concentrações de rRAP1AB acima de 1,5 mg/mL. A dosagem foi realizada em leitor de microplaca Spectra Max M5 (Molecular Devices). Os dados obtidos são coerentes com as bandas observadas na figura 15.

6.6 Espectrometria de massas

A confirmação da identidade das proteínas recombinantes rRAP1 purificadas foi obtida por espectrometria de massas. A primeira etapa consistiu no fracionamento das amostras por SDS-PAGE, promovendo uma etapa adicional de purificação, de onde as proteínas foram retiradas diretamente pelo recorte das bandas do gel (Figura 24).

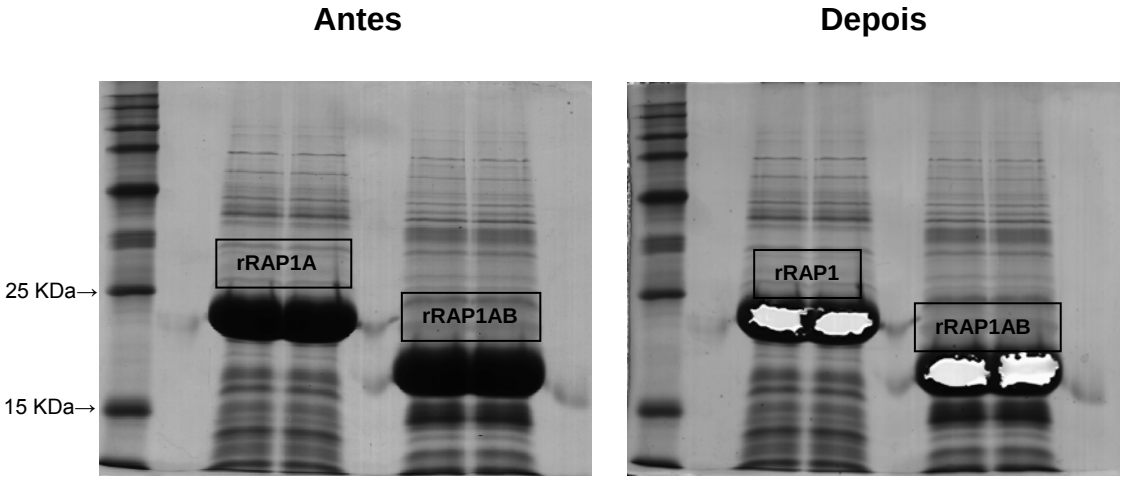

Figura 24. Obtenção das proteínas rRAP1A e rRAP1AB purificadas diretamente de gel de poliacrilamida após SDS PAGE 12% em fase de preparação para a espectrometria de massas. Foram aplicados no gel 60 ug de cada proteína para a eletroforese (antes). A segunda imagem mostra o gel após retirada das bandas das proteínas. Tal etapa promoveu purificação das mesmas eliminando proteínas truncadas, inespecíficas e o tampão de uréia. Padrão molecular utilizado V8491 (Promega).

O programa Mascot comparou todas as massas dos fragmentos de peptídeos obtidas, com as massas teóricas do banco de dados SwissProt, de forma a determinar as sequência dos aminoácidos. A análise dos peptídeos gerados permite predizer a qual proteína eles provavelmente pertencem e dessa forma, faz-se uma análise de similaridade dos peptídeos com a proteína em questão através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

No caso de rRAP1A recombinante, a maior identificação encontrada foi relativa a proteína rRAP1A humana para a qual obteve-se 84% de cobertura da sequência

desta pelos peptídeos gerados na espetrometria de massas, demonstrado abaixo com os aminoácidos em vermelho representado a cobertura obtida:

```
1    MREYKLVVLG SGGVGKSALT VQFVQGIFVE KYDPTIEDSY RKQVEVDCQQ
51   CMLEILDTAG TEQFTAMRDL YMKNGQGFAL VYSITAQSTF NDLQDLREQI
101  LRVKDTEDVP MILVGNKCDL EDERVVGKEQ GQNLARQWCN CAFLESSAKS
151  KINVNEIFYD LVRQINRKTP VEKKKPKKKS CLLL
```

O resultado encontrado é considerado ótimo uma vez que a correspondência entre 20% dos aminoácidos da sequência já poderia ser utilizada como confirmação da identidade da proteína. Como é possível observar, as regiões que não apresentaram similaridade possuem alta ocorrência dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R), sítios onde a tripsina digere as ligações peptídicas, o que gera fragmentos de aminoácidos isolados ou peptídeos muito pequenos que não são corretamente identificados na espectrometria de massas.

Resultados semelhantes foram obtidos para rRAP1AB a qual também apresentou maior similaridade com a proteína RAP1A humana. Após O alinhamento entre as sequências pelo BLAST, foi obtida uma cobertura de 50% com relação a proteína RAP1A:

```
1   MREYKLVVLG SGGVGKSALT VQFVQGIFVE KYDPTIEDSY RKQVEVDCQQ
51  CMLEILDTAG TEQFTAMRDL YMKNGQGFAL VYSITAQSTF NDLQDLREQI
101 LRVKDTEDVP MILVGNKCDL EDERVVGKEQ GQNLARQWCNCAFLESSAKS
151 KINVNEIFYD LVRQINRKTP VEKKKPKKKS CLLL
```

Uma vez que rRAP1AB é uma proteína recombinante quimérica, que contém um segmento relativo a RAP1A e outro relativo a RAP1B, além de não possuir o sítio Ras, o resultado obtido é o suficiente para confirmar a identidade da mesma.

6.7 Obtenção de anticorpos anti -rRAP1 e anti-rRAP1AB

6.7.1 Anticorpos policlonais de coelhos

Como mencionado na metodologia foram utilizadas 3,5 mg de cada umas das proteínas purificadas rRAP1A e rRAP1AB para a produção dos anticorpos pela

empresa Célula B. Os anticorpos foram recebidos aproximadamente três meses após o envio das proteínas. Juntamente com as IgGs purificadas também foram recebidas amostras contendo os soros dos animais pré-imunes e o soros imunes. Foram recebidos aproximadamente 5,0 mL de soro contendo IgG purificadas de rRAP1A e 3,0 mL de soro contendo IgG purificadas anti-rRAP1AB.

6.7.2 Anticorpos policlonais e monoclonais de camundongos

O processo de produção de anticorpos anti-rRAP1 em camundongos gerou oito “pool” de hibridomas produtores de anticorpos policlonais para rRAP1A (7F7; 6B3; 2A4; 4E5; 4F4; 9F11; 9H3; 3D8) e nove clones produtores de anticorpos monoclonais (4F4A1; 2A4F2; 4E5A6; 4E5B2;4E5C2; 6B3B3; 6B3F4; 9F11E10; 9F11F4) dos quais apenas 4E5, 4E5A6 e 6B3B3 passaram pela etapa de purificação e foram testados em ensaios inumo-histoquímicos.

Para rRAP1AB foram obtidos onze “pool” de hibridomas produtores de anticorpos policlonais (5H1; 4H8; 10A6; 4A11; 5G5; 5G7; 5G9; 5G8; 5G4; 5G6; 5G3) e nove clones produtores de anticorpos monoclonais (5G3H11; 5G3H10; 5G3H9; 5G3C8; 5G3B12; 5G3A7; 5G3F12; 5G3A8 5G3E12) dos quais apenas 5G8, 5G3H10 e 5G3F12 passaram pela etapa de purificação e foram testados em ensaios inumo-histoquímicos.

6.8 Testes de reconhecimento das proteínas rRAP1 e RAP1 humana pelos anticorpos anti-RAP1 comerciais e produzidos

6.8.1 Ensaio de *Western Blot*

As bandas referentes às proteínas recombinantes rRAP1A (20,2 KDa) e rRAP1AB (16,5 KDa) foram transferidas de um gel SDS PAGE a 12% para membranas de nitrocelulose (Figura 20) como descrito em Materiais e Métodos.

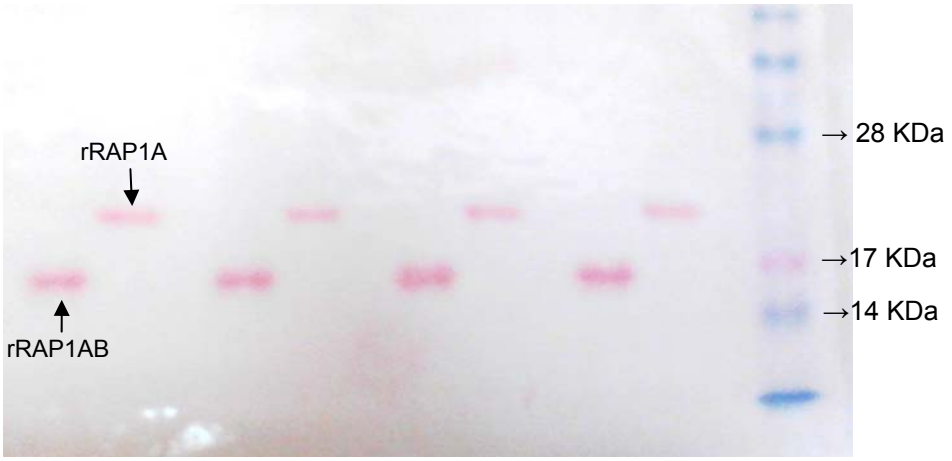

Figura 25. Membrana de nitrocelulose contendo proteínas rRAP1A e rRAP1AB. A figura mostra a transferência eficiente das bandas das proteínas rRAP1A (20,2 KDa) e rRAP1AB (16,5 KDa) para a membrana de nitrocelulose corada em solução de Ponceau. O padrão molecular utilizado foi o See Blue^{R} Plus 2 Standard (Invitrogen).

A figura 26 apresenta os resultados obtidos no ensaio de Western Blot. As bandas relativa a rRAP1A com maior intensidade observado nas membranas 1 e 2 sugerem que houve reconhecimento desta proteína recombinante em questão pelos anticorpos comerciais (Abcam anti-RAP1A + anti-RAP1B) e pelos anticorpos anti-rRAP1A policlonais, respectivamente. Entretanto, nos controles negativos (membrana 4), observa-se reatividade do anticorpo secundário utilizado com a banda de rRAP1A e mais fortemente com rRAP1AB indicando que houve reação cruzada.

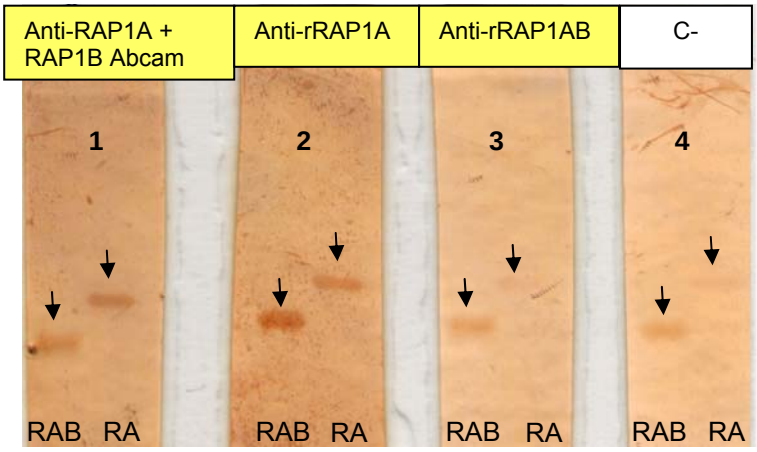

Figura 26. Teste de reconhecimento das proteínas recombinantes rRAP1 pelos anticorpos policlonais de coelho anti-rRAP1 e pelo anticorpo comercial (anti-RAP1A + RAP1B; Abcam) ensaio de *Western Blot*. Está representado o ensaio de *Western Blot* descrito no item 5.18. Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi recortada em tiras permitindo a incubação das bandas de rRAP1A (RA) e rRAP1AB (RAB) com os diferentes anticorpos primários anti-RAP1A + RAP1B da Abcam (membrana 1), anti-rRAP1A (membrana 2) e anti-rRAP1AB (membranas 3). A membrana 4 (C-) foi incubada apenas com o anticorpo secundário (anti-rabbit IgG conjugado a peroxidase da Sigma).

Além do ensaio de *Western Blot* representado na figura 26, três outros ensaios diferentes foram realizados, variando-se o anticorpo secundário e os métodos de revelação, entretanto, todos apresentaram resultados inconclusivos devido ao aparecimento de bandas correspondentes as proteínas rRAP1A e rRAP1AB nos controles negativos e por isso apenas um resultado foi ilustrado.

6.8.2 Ensaios Imuno-histoquímicos

A identificação do melhor anticorpo anti-rRAP1 para uso na detecção da expressão da proteína RAP1 em neoplasias foi realizada em amostras de mucosa cervical de diferentes graus de lesão e de câncer cervical por ensaios imuno-histoquímicos nos quais como controle do padrão de reconhecimento de RAP1 foi utilizado o anticorpo anti-RAP1 comercial sc65 (Santa Cruz Biotchnologies).

Dados muito promissores foram obtidos com o anticorpo anti-rRAP1A policlonal de coelho, que apresentou marcação com padrão esperado similar ao anticorpo comercial de amostras cervicais com diferentes graus de lesão como observado nas micrografias B das figuras 27 a 34.

Nenhum dos anticorpos anti-rRAP1AB assim como os demais anticorpos produzidos contra rRAP1A não evidenciaram o padrão de reconhecimento esperado para a expressão de RAP1 humana nas amostras cervicais testadas.

As micrografias A e B das figuras 27 e 28 mostram o padrão similar de reconhecimento em mucosa cervical não displásica pelos anticorpos anti-rRAP1A e o anticorpo comercial anti-RAP1 (Santa Cruz Biotechnology), observando-se uma marcação discreta (sombra marrom) no terço basal e no estroma, como já demonstrado em estudos anteriores (dados não publicados).

A marcação com anticorpo anti-p16 em mucosas normais e com lesão de baixo grau a reação foi negativa (micrografias D das figuras 27 a 30), observando-se marcação evidente nas lesões intraepiteliais de grau 2 e 3 (micrografias D das figuras 31 e 32) e câncer invasor (micrografias D das figuras 33 e 34).

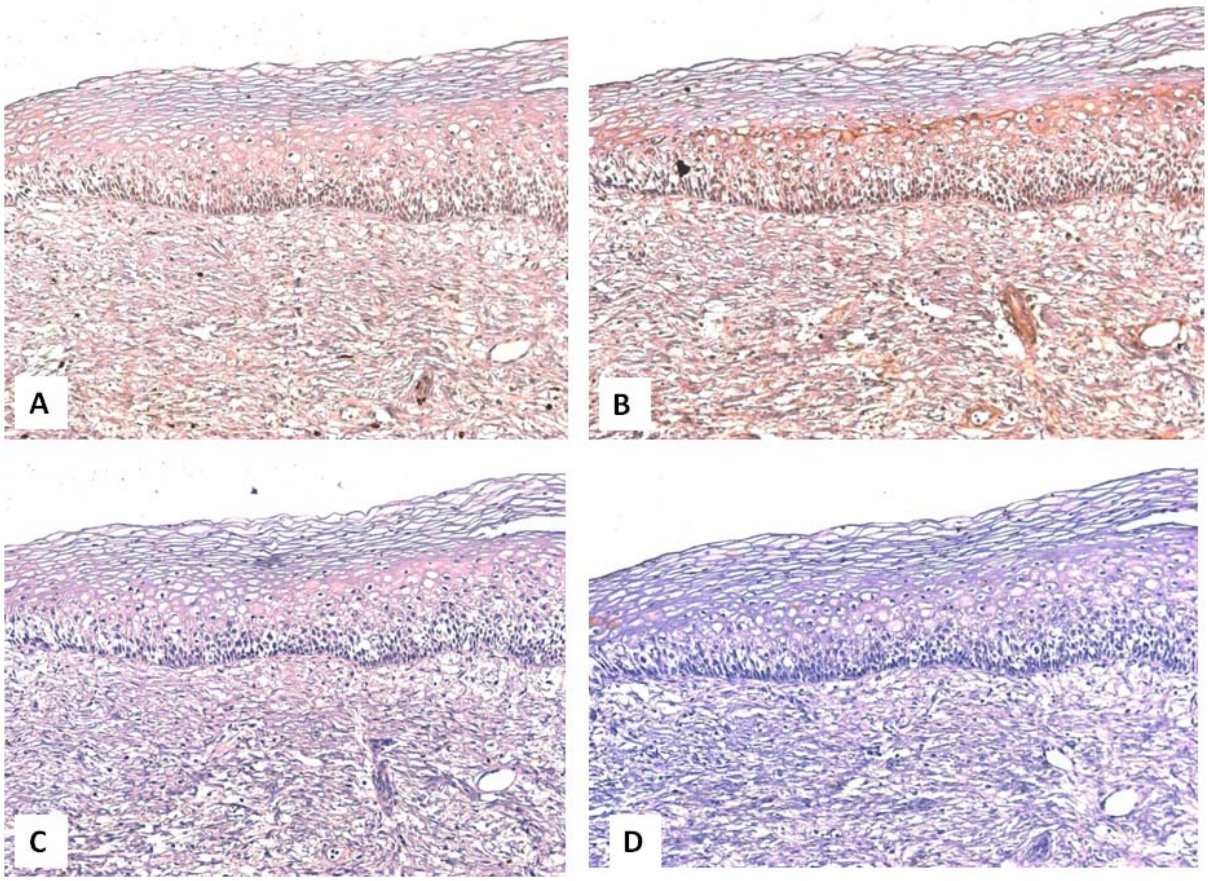

Figura 27. Verificação da expressão de RAP1 em amostras de mucosa cervical não displásica com anticorpos anti-rRAP1 e anticorpo anti-RAP1 comercial, por ensaio imuno-histoquímico, em aumento de 100X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: **(**A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology); (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias.

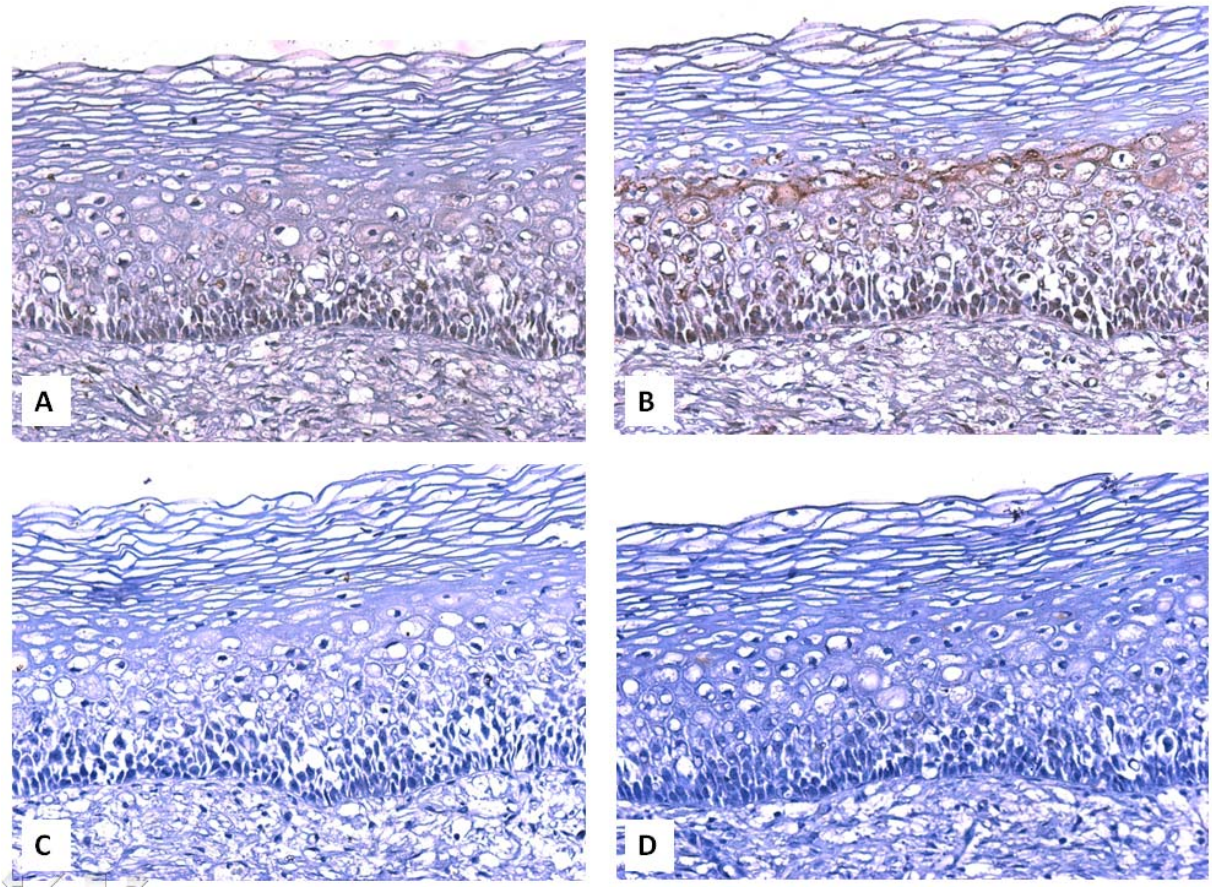

Figura 28. Verificação da expressão de RAP1 em mucosa cervical não-displásica com anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico, em aumento de 200X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: (A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados como descrito no item 5.19.

Nas figuras 29 e 30 é possível notar a proliferação celular desordenada no terço basal provocada pela lesão pré-cancerosa, gerando agrupamentos de células, o que identifica a lesão intraepitelial cervical grau 1. Observa-se nitidamente que as lesões foram coradas pelos anticorpos anti-RAP1 comercial (A) e pelo anti-rRAP1(B) sendo que a intensidade produzida pelo último é mais intensa. Já o anticorpo monoclonal rRAP1AB 5G3H10 e o anticorpo anti-p16 (D) não apresentam nenhuma

marcação da lesão. Fica evidente que a marcação com os anticorpos anti-RAP1A e anti-rRAP1A facilita enormemente na identificação destas lesões.

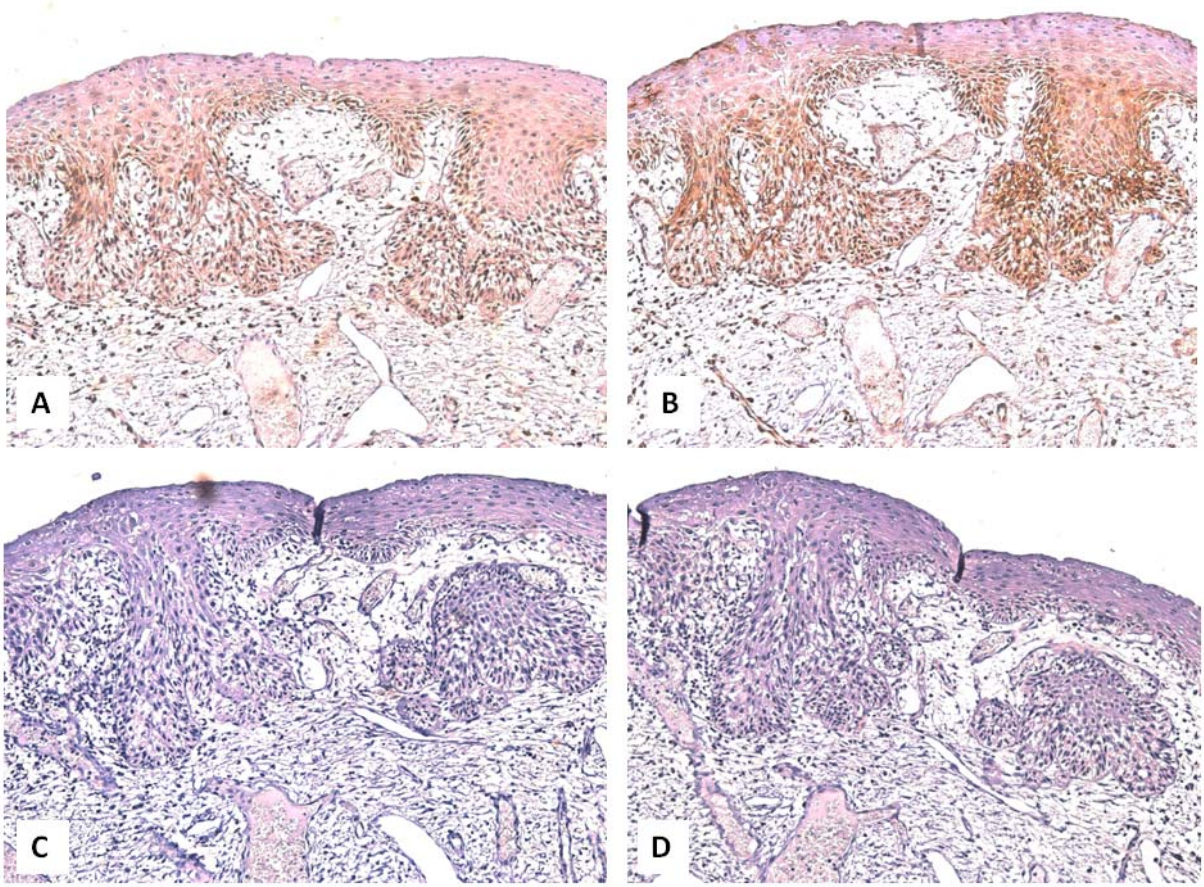

Figura 29. Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 1 com anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de de 100X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: (A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados como descrito no item 5.19.

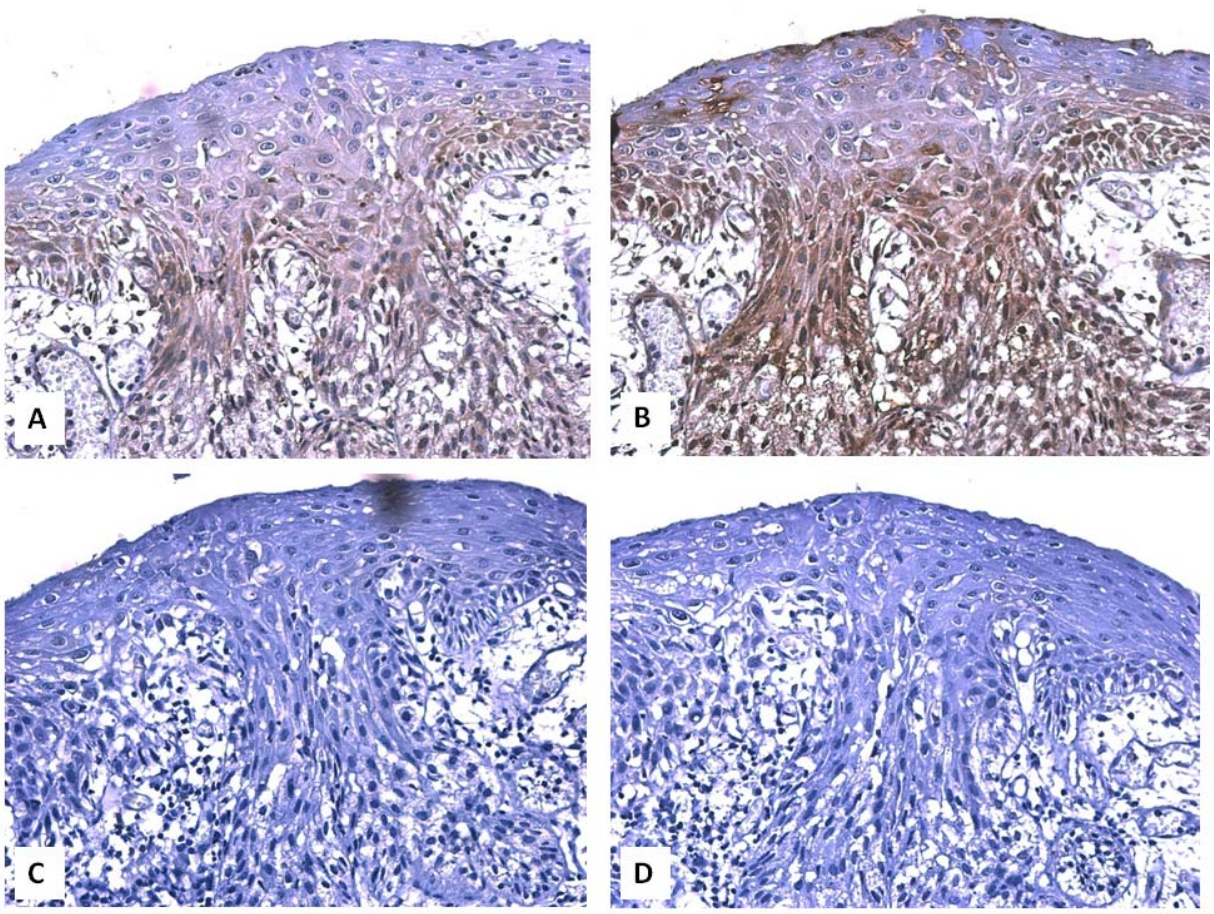

Figura 30. Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 1 com anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de de 200X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: (A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados como descrito no item 5.19.

Em amostras de lesão intraepitelial cervical grau 2/3 (figuras 31 e 32) marcadas com anticorpo anti-rRAP1 observa-se coloração mais intensa do epitélio (B), do que com os anticorpos comerciais anti-RAP1 (A) e p16 da Santa Cruz (D). A marcação que aparece no estroma em A e B pode ser devido à presença de células

inflamatórias, neutrófilos e linfócitos, onde a expressão de RAP1 é comumente observada.

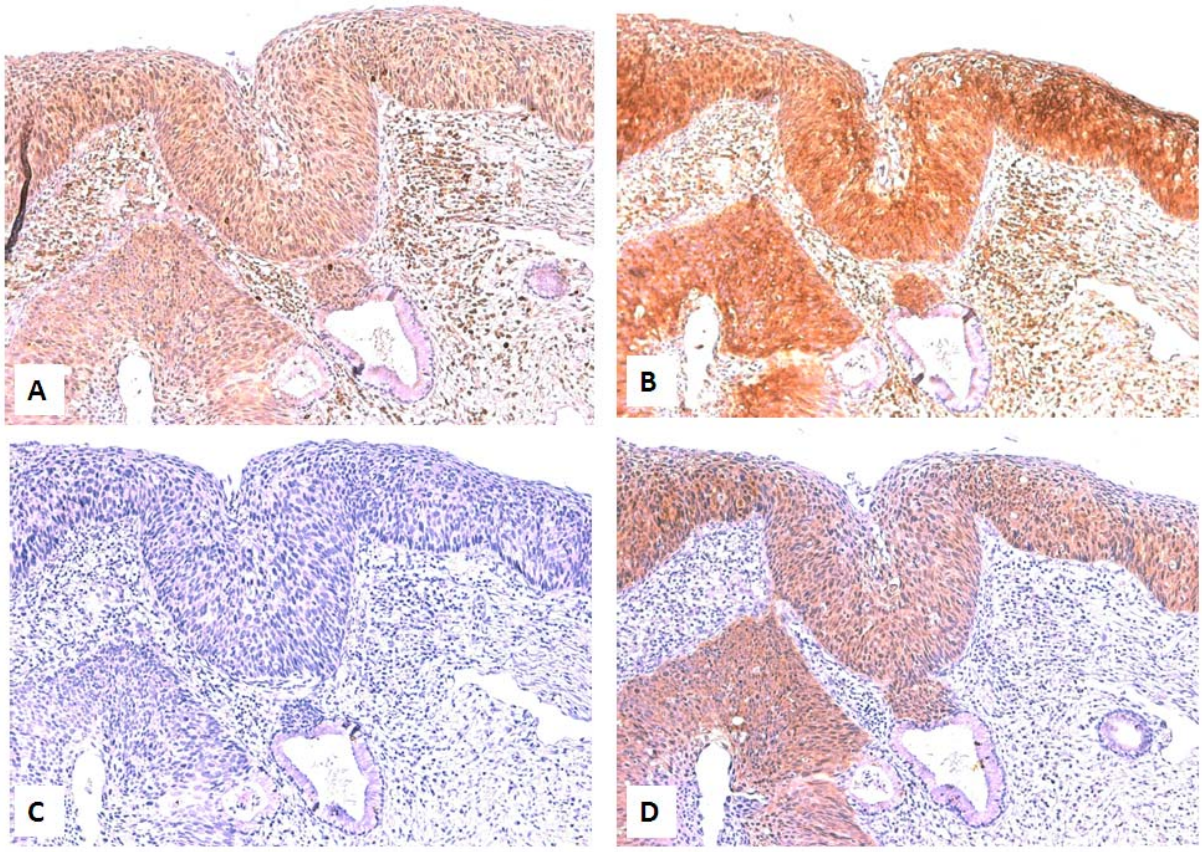

Figura 31. Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 2/3 pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 100X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: (A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados como descrito no item 5.19.

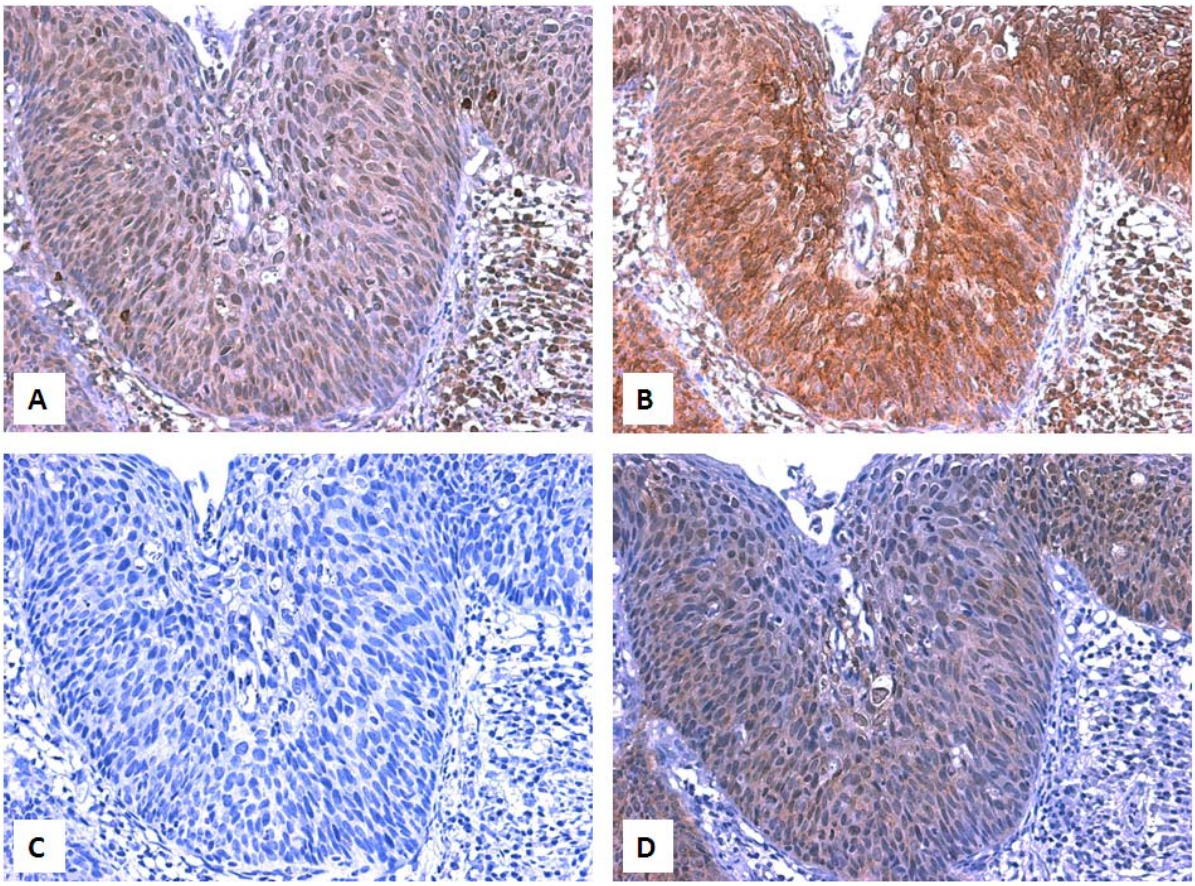

Figura 32. Verificação da expressão de RAP1 em lesão intraepitelial cervical grau 2/3 pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 200X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: (A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados como descrito no item 5.19.

Da mesma forma, em amostras de câncer cervical invasor (figuras 33 e 34) o anticorpo anti-rRAP1A promoveu uma forte marcação das células malignas tornando as lesões muito mais nítidas (letra B).

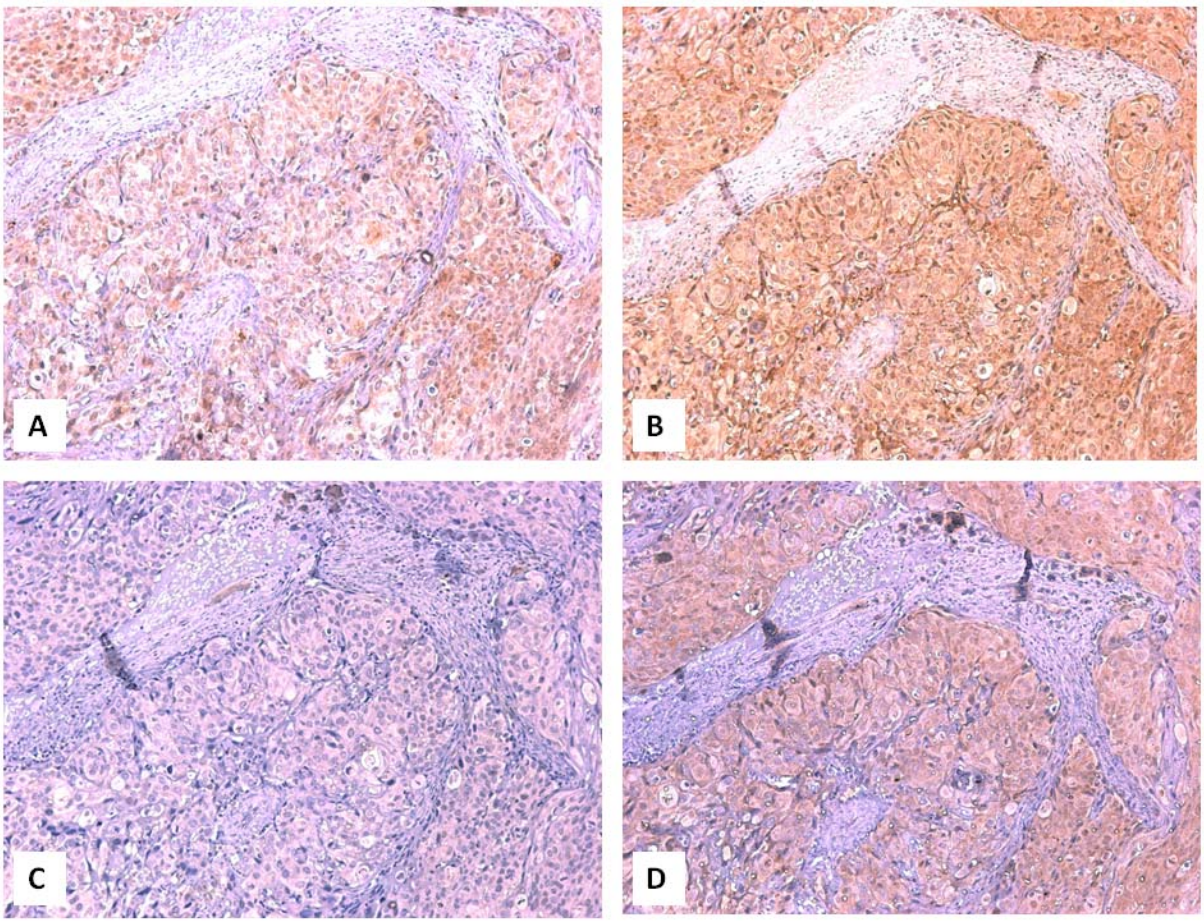

Figura 33. Verificação da expressão de RAP1 em lesão de câncer cervical invasor pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 100X. As micrografias indicadas pelas letras A a D correspondem às marcações com os seguintes anticorpos: (A) anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), (B) anticorpo policlonal anti-rRAP1A, (C) anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e (D) anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados como descrito no item 5.19.

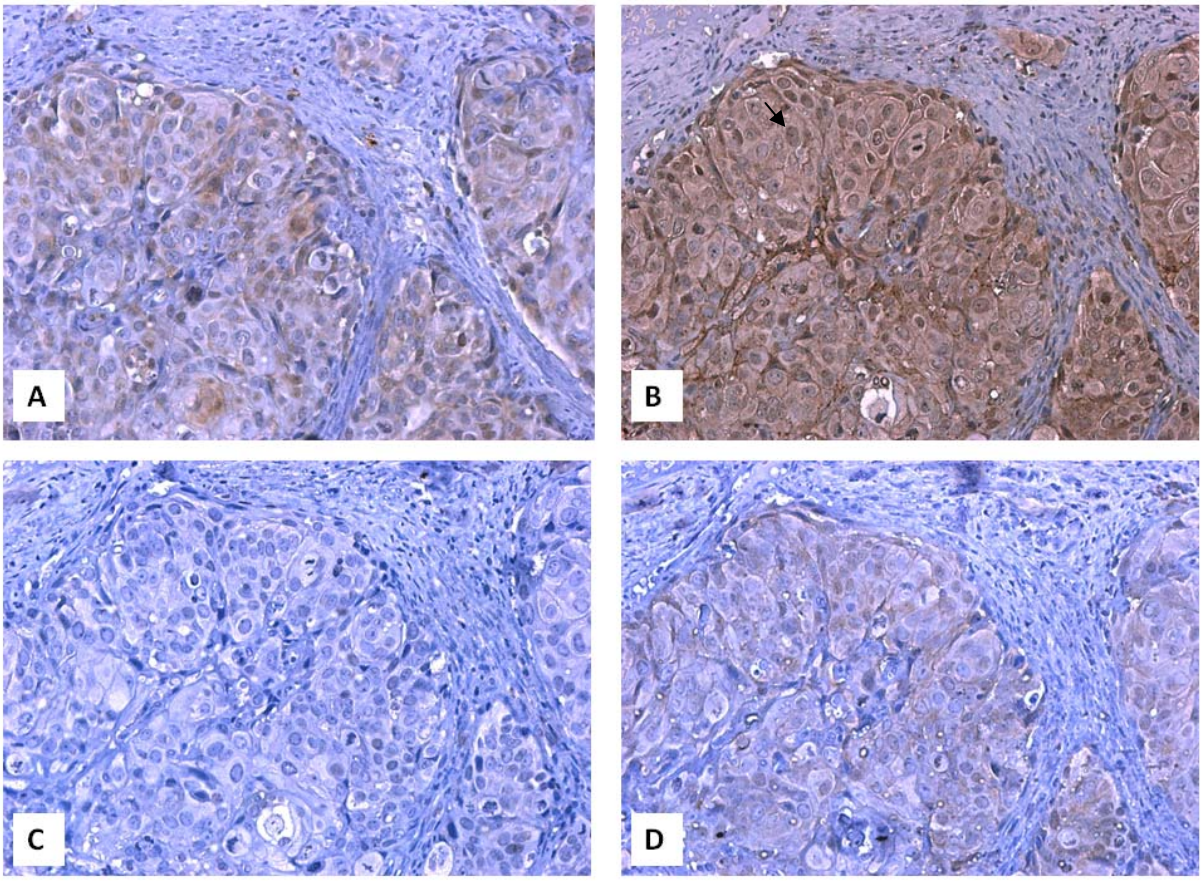

Figura 34. Verificação da expressão de RAP1 em lesão de câncer cervical invasor pelos anticorpos anti-rRAP1 produzidos e comerciais por ensaio imuno-histoquímico em aumento de 200X. A – anticorpo comercial anti-RAP1A (Santa Cruz Biotechnology), B – anticorpo policlonal anti-rRAP1A, C – anticorpo monoclonal anti-rRAP1AB 5G3H10 e D – anticorpo comercial anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology). Para realização de análise comparativa foram fotografados os mesmos campos nas lâminas preparadas a partir das mesmas biópsias. Os ensaios imuno-histoquímicos em biópsias de câncer comprovam a eficiência do anticorpo anti-rRAP1A (B) para a identificação de neoplasias pela forte marcação promovida e pela facilidade de diferenciação entre o epitélio e o estroma (marcado de azul).

7 DISCUSSÃO

No mundo, a cada ano são diagnosticados cerca de 500 mil novos casos de câncer cervical, fazendo 274.000 vítimas fatais (Arbyn, 2011). O câncer ou neoplasia cervical em estágios iniciais pode ser tratado com sucesso, mas cânceres localizados e avançados são caracterizados por uma alta taxa de recorrência e prognóstico ruim.

O rastreamento do câncer cervical pelo exame de Papanicolau, amplamente difundido em países desenvolvidos, alcançou uma redução substancial na morbidade e mortalidade para essa doença nos últimos 50 anos. Entretanto, por causa do grande número de resultados citológicos falso-negativos, os guias médicos recomendam o rastreamento anual ou trienal (na maioria), o que sobrecarrega o sistema de saúde de muitos países. O surgimento da citologia em base líquida tem mitigado alguns desses problemas melhorando a eficiência dos laboratórios no processamento do número, mas, na verdade, dificuldades como a baixa sensibilidade, interpretação subjetiva da morfologia celular e erros de amostragem não foram resolvidas.

Tão importante quanto o diagnóstico precoce, a precisão dos exames se faz necessária para que medidas de tratamento sejam tomadas nos casos mais graves (NIC II, NIC III e CCE) e para que sejam evitados tratamentos desnecessários nos casos mais brandos da doença (ASCUS e NIC I). Por isso, a busca por novos biomarcadores e estudos para a utilização dos biomarcadores já identificados no diagnóstico do câncer cervical vêm se ampliando, uma vez que sua utilização pode ser útil também no monitoramento da progressão da doença e/ou no monitoramento da resposta ao tratamento (Panicker et al.,2010).

Os estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a proteína celular RAP1 possui expressão aumentada em lesões cervicais, e pode ser utilizada como potencial biomarcador para o diagnóstico das lesões por imuno-histoquímica. Assim, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de insumos para a confecção futura de um “kit RAP1” para uso em exames imuno-histoquímicos utilizados para auxiliar no diagnóstico do câncer cervical e de outros tumores. A estratégia utilizada para a obtenção de tais insumos foi inicialmente o

desenho de genes rRAP1 sintéticos para a expressão de proteínas RAP1 humanas recombinantes em sistema procarioto. As proteínas recombinantes foram utilizadas como imunógenos para a geração de anticorpos anti-rRAP1 que foram testados em exames imuno-histoquímicos de amostras de lesões cervicais em comparação com os anticorpos anti-RAP1 comerciais importados. Estes anticorpos importados já estão disponíveis no mercado brasileiro, entretanto, o preço elevado torna sua utilização na rotina de diagnóstico de laboratórios de patologia clínica inviável e, por isso, a sua produção é de suma importância.

As sequências dos genes rRAP1 sintéticos correspondentes aos genes RAP1 humanos foram otimizadas pela utilização do *codon usage* apropriado para a expressão em *E. coli* e pela inserção de espaçadores entre as partes referentes a RAP1A e RAP1B na proteína rRAP1AB. Vale ressaltar que nenhum dos fabricantes dos anticorpos anti-RAP1 disponíveis no mercado (Origene, Abcam, GeneTex, LifeSpan BioSciences e Santa Cruz Biotechnology) revela a sequência proteica dos imunógenos utilizados para a obtenção de seus anticorpos, citando apenas que foram gerados contra peptídeos sintéticos próximos ao N-terminal ou C-terminal de RAP1 humana.

A viabilidade de produção dos anticorpos depende diretamente das proteínas utilizadas como imunógeno e, por isso, o rendimento na produção de tais imunógenos deve ser considerado. No caso das proteínas rRAP1A e rRAP1AB aqui obtidas, tal rendimento pode ser considerado excelente, pois foram obtidos 185,66 mg de rRAP1A e 103,9 mg de rRAP1AB por litro de cultura bacteriana. Vale ressaltar que a quantidade necessária para a imunização de coelhos para a produção de 1 lote de anticorpos anti-rRAP1 foi de apenas 3,5 mg de cada uma das proteínas purificadas.

Considerando-se que: (i) para a produção de um lote contendo 5 mL de anticorpo purificado IgG anti-RAP1A foram utilizados 3,5 mg de proteína rRAP1A purificada (ii) tal lote de anticorpo foi diluído a 1:300 nos testes imuno-histoquímicos, (iii) são utilizados 100 uL desta diluição por amostra de tecido (teste); podemos estimar, a grosso modo, que os 92,8 mg de rRAP1A purificada (obtidos no experimento representado na Figura 21) seriam suficientes para a produção de 26 lotes de anticorpos IgG anti-rRAP1A. Assim, o volume de IgG anti-rRAP1A que

temos em mãos (5 mL) seria suficiente para cerca de 15.000 testes e ainda, os 26 lotes de anti-rRAP1A seriam suficientes para a realização de mais de 340.000 testes.

Considerando-se ainda que: (i) o valor pago à empresa Célula B para a produção do referido lote contendo 5 mL de IgG anti-rRAP1A foi de 1250 reais; (ii) apenas 0,1 mL do anticorpo anti-RAP1 da Santa Cruz Biotechnology custa cerca 1800 reais no mercado brasileiro; (iii) todos os custos de desenvolvimento e produção do futuro "kit RAP1" não foram ainda calculados, podemos estimar "a título de curiosidade" que 0,1 mL nosso anticorpo custaria 50 reais, ou seja, um custo 36 vezes menor.

Os sequenciamentos dos insertos rRAP1A e rRAP1AB dos plasmídeos pUC57 e pQE9, somado à análise das duas proteínas recombinantes rRAP1 por espectrometria de massas, serviram como controle de qualidade dos produtos obtidos. A origem e qualidade dos imunógenos utilizados na produção dos anticorpos anti-rRAP1 foi comprovada pela identidade de 100% constatada pelo alinhamento das sequências de nucleotídeos dos insertos rRAP1A e rRAP1AB clonados em pQE9 com os seus respectivos genes sintéticos, assim como pela cobertura de 84% da sequência de aminoácidos rRAP1A e 50% de cobertura de rRAP1AB comparadas à sequência de peptídeos da proteína RAP1A humana. Vale ressaltar que uma cobertura de 20% já seria considerada satisfatória.

Os resultados obtidos pelos ensaios de *Western blot* realizados para verificação do reconhecimento das proteínas rRAP1A e rRAP1B pelos anticorpos específicos produzidos em coelho (IgG anti-rRAP1A e IgG anti-rRap1AB) e pelo anticorpo anti-RAP1 importado foram inconclusivos. Isso porque nos controles negativos foram observadas bandas de rRAP1, o que indica reação cruzada entre as proteínas recombinantes e anticorpo secundário utilizado.

Todavia, o anticorpo anti-rRAP1A de coelho, quando testado em ensaios imuno-histoquímicos, em lesões de colo uterino, apresentou o desempenho esperado quanto ao reconhecimento da proteína RAP1. Na verdade, é sabido que vários dos anticorpos disponíveis no mercado possuem indicações para uso específico, isto é, podem ou não ser apropriados/recomendados para utilização em uma determinada técnica.

Os ensaios imuno-histoquímicos indicam que o anticorpo anti-rRAP1A policlonal (produzido em coelho) é capaz de reconhecer a proteína RAP1 humana expressa em tecidos normais não displásicos, em lesões de baixo grau, lesões de alto grau e de câncer invasor.

Como já demonstrado por Pascoal-Xavier (2011) com anticorpo anti-Rap1 importado, os ensaios imuno-histoquímicos realizados com o anticorpo policlonal anti-rRAP1A foi capaz de detectar os níveis aumentados da proteína RAP1 em amostras de lesões de baixo grau, o que facilita a visualização da área da lesão no tecido examinado pelo patologista e indica a proliferação desordenada de células neste tipo de lesão (figuras 29 e 30).

As lesões de alto grau (figuras 31 e 32) foram fortemente marcadas assim como as de câncer invasor (figuras 33 e 34) onde foi observada inclusive a marcação do núcleo celular. Sabe-se que em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, proteína RAP1A em sua forma ativada é altamente expressa no núcleo, sugerindo seu papel no processo de transformação neoplásica (Mitra et al.,2003). Contudo, o mecanismo envolvido no aumento de RAP1 em neoplasias ainda não está elucidado.

Nossos resultados mostraram que, independente do grau da lesão cervical testada, o anticorpo anti-rRAP1A produzido em coelhos apresentou marcação nos mesmos locais que o comercial anti-RAP1 utilizado, e ainda com a vantagem da maior intensidade da coloração. Novos testes podem demonstrar a possível utilização deste anticorpo em ensaios imuno-histoquímicos de outros tipos de tumores, não restringindo sua utilização somente no diagnóstico do câncer cervical. Vale ressaltar que o anticorpo anti-p16 utilizado como controle, não foi capaz de marcar lesões de baixo grau como verificado como o anti-rRAP1. Como se sabe, a marcação da p16 é fraca ou inexistente nos estágios iniciais da neoplasia cervical o que sugere que sua expressão não está nitidamente aumentada no estágio inicial da doença. Este é um dos motivos pelos quais a p16 não é utilizada para o diagnóstico precoce do câncer cervical.

Até o momento, apenas um anticorpo policlonal e dois anticorpos monoclonais, produzidos em camundongos contra as rRAP1, pela Plataforma de Anticorpos Monoclonais do CPqRR, foram testados quanto a reatividade contra

RAP1A humana em ensaios imuno-histoquímicos. Em breve, os demais anticorpos, a saber: sete anticorpos policlonais e sete anticorpos monoclonais anti-rRAP1A, somados a dez policlonais e sete monoclonais rRAP1AB obtidos, serão também testados.

Finalmente, apesar do anticorpo anti-rRAP1A policlonal produzido em coelho ter funcionado da maneira esperada, se faz necessária a realização de estudo comparativo (semelhante ao estudo feito por Pascoal-Xavier, 2011) do desempenho deste anticorpo, ou de outro eventualmente identificado entre os vários anticorpos anti-rRAP1 ainda não testados, frente aos anticorpos anti-RAP1 comerciais e p16.

8 CONCLUSÃO

O excelente rendimento obtido na expressão das proteínas rRAP1A e rRAP1AB mostra que sua produção em média escala é economicamente viável.

A verificação da expressão de RAP1 em amostras cervicais com o anticorpo policlonal anti-rRAP1A indica que este anticorpo é um potencial candidato a ser utilizado em ensaios imuno-histoquímicos para auxiliar no diagnóstico do câncer cervical e suas lesões precursoras.

9 ANEXO - LISTA DE SOLUÇÕES

MEIO LB SUPERBROTH:
- Triptona 32 g/L
- Extrato de levedura 20 g/ L
- Hidroxido de sódio 0,2 g/L

TAMPÃO TRIS GLICINA HCL 1X:
- Tris base 3 g/L
- Glicina 15,21 g/L
- SDS 1 g/L

SOLUÇÃO COMASSIE BLUE:
- 50% Metanol
- 10% Ácido acético
- Comassie Brilliant Blue 2,5 g/L

SOLUÇÃO DESCORANTE PARA SDS PAGE:
- 45% Metanol
- 10% Ácido acetico glacial

TBS1X
- Tris base 2,42 g/L
- Cloreto de sódio 8,77 g/L

TBS TWEEN 20
- 0,1% Tween 20
- Tris base 2,42 g/L
- Cloreto de sódio 8,77 g/L

TAE 1X pH8,0
-Tris-acetato a 0,04M,
-EDTA a 1 mM,

TAMPÃO DE AMOSTRA LAEMMLI 2X
- 2-mercaptoetanol a 10%,
- SDS a 6%,
- glicerol a 20%,
- 0,2 mg/mL de azul bromofenol,
- 0,025X do tampão Laemmli stacking buffer (Laemmli stacking buffer 2.5 X: Tris-Cl a 0.3 M, pH 6,8, SDS a 0,5%)

SOLUÇÕES DE *WESTERN BLOT*

SOLUÇÃO DE PONCEAU
-Ponceau 1 g/L
- 5% Ácido acético

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA pH= 8,3
- Tris-Base a 25 mM
- Glicina a 192 mM
- 20% Metanol
- 0,1% SDS

TAMPÃO 6M GUANIDINA-HCl (tampão A)
- Fosfato de sódio sódio monobásico monohidratado 13,8 g/L
- Tris base 1,2 g/L
- Hidrocloreto de guanidina 573 g/L

TAMPÃO DE UREIA 8M pH 8,0 (tampão B)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado 13,8 g/L
- Tris base 1,2 g/L
- Ureia 480 g/L

TAMPÃO DE UREIA 8M pH 6,3 (tampão C)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado 13,8 g/L
- Tris base 1,2 g/L
- Ureia 480 g/L

TAMPÃO DE UREIA 8M pH 5,0 (tampão D)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado 13,8 g/L
- Tris base 1,2 g/L
- Ureia 480 g/L

TAMPÃO DE UREIA 8M pH 4,0 (tampão E)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado 13,8 g/L
- Tris base 1,2 g/L
- Ureia 480 g/L

TAMPÃO F pH 2,7
- Guanidina 6 M
-Ácido acético 0,2M

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschuler DL, Ribeiro Neto F. Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein RAP1b. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95:7475–7479.

American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Journal of Clinical Pathology 2012.

Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, et al. Perinatal mortalityand other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis.*BMJ.* 2008;337:a1284

ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1383-1392.

Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S. BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. Am J Surg Pathol 2008;32:899-906.

Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. RAP1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. Cell Signal. 2011; 23(7):1110-8.

Banerjee R, Russo N, Liu M, Van Tubergen E, D'Silva NJ. RAP1 and its regulatory proteins: the tumor suppressor, oncogene, tumor suppressor gene axis in head and neck cancer. Small GTPases. 2012; 3(3):192-7.

Belinson JL, Pretorius RG, Zhang ZH, et al. Cervical cancer screening by simple visual inspection after acetic acid. Obstet Gynecol 2001;98:441–4

Beranger F, Goud B, Tavitian A, de Gunzburg J. Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:1606-1610

Berger G, Quarck R, Tenza D, Levy TS, de Gunzburg J, Cramer EM. Ultrastructural localization of the small GTP-binding protein Rap1 in human platelets and megakaryocytes. Br J Haematol. 1994; 88:372-382

Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. Trends in microbiology 2011; 19:33–39.

Bos JL, Rooij J, Reedquist KA. RAP1 sinalling: adhering to new models. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001; 2(5):360-377.

Buntinx F, Brouwers M. Relation between sampling device and detection of abnormality in cervical smears: a meta-analysis of randomised and quasi-randomised studies. BMJ. 1996;313:1285-90.

Caetano R, Vianna CMM, Thuler LCS, Girianelli VR. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. Physis: Rev Saúde Coletiva 2006; 16 (1): 99-118.

Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, et al. Proyecto Epidemiologico Guanacaste Group. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. BMJ. 2009;339:b2569.

Castle PE, Carreon JD. Practice improvement in cervical screening and management: symposium on management of cervical abnormalities in adolescents and young women J Low Genit Tract Dis. 2010;14:238-240; author reply 240.

Castellsague X, Munoz N, Pitisuttithum P, et al. End-of-study safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24–45 years of age. Br J Cancer 2011;105:28–37.

Chakrabarti O, Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. J Biosci. 2003; 28(3):337-48.

Chen Y, Miller C, Mosher R, et al. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. Cancer Res 2003;63:1927-35.

Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD et al. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. Nat. Med. 2004; 10:982–986.

de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Lancet Oncol. 2010;11:1048-1056.

D'Silva NJ, Mitra RS, Zhang Z, Kurnit DM, Babcock CR, Polverini PJ, Carey TE. RAP1, a small GTP-binding protein is upregulated during arrest of proliferation in human keratinocytes. J Cell Physiol. 2003; 196(3):532-40

Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. BMJ 2008; 337:a1754.

Duchniewicz M, Zemojtel T, Kolanczyk M, Grossmann S, Scheele JS, Zwartkruis FJ. rRAP1A-deficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion. Mol. Cell. Biol. 2006;26:643–653.

Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. JAMA. 2007;297:813-819.

Dyson N, Howley P, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus- 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science. 1989;243:934–937.

Franke B, Akkerman JW, Bos JL. Rapid Ca2+-mediated activation of Rap1 in human platelets. EMBO J 1997; 16(2):252-259.

Freeman H, Wingrove B. Excess Cervical Cancer Mortality: A Marker for Low Access to Health Care in Poor Communities. Rockville, MD: National Cancer Institute; 2005.

Frische EW, Zwartkruis FJ. RAP1, a mercenary among the Ras-like GTPases. Dev Biol. 2010; 340(1):1-9.

Furstenau DK, Mitra N, Wan F, Lewis R, Feldman MD, Fraker DL, Guvakova MA. Ras-related protein 1 and the insulin-like growth factor type I receptor are associated with risk of progression in patients diagnosed with carcinoma in situ. Breast Cancer Res Treat. 2011; 129(2): 361-72.

Gao L, Feng Y, Bowers R, Becker-Hapak M, Gardner J, Council L, Linette G, Zhao H, Cornelius LA. Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis. Cancer Res. 2006; 66(16):7880-8.

Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. Trends Cell Biol. 2011; 21(10):615-23.

Gravitt PE, Jamshidi R. Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. Infect Dis Clin North Am. 2005; 19(2): 439-58.

Hattori M, Minato N. RAP1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. J Biochem. 2003; 134(4):479-84

Hogan C, Serpente N, Cogram P, Hosking CR, Bialucha CU, Feller SM et al. RAP1 regulates the formation of E-cadherin-based cell–cell contacts. Mol. Cell. Biol. 2004;24:6690–6700.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Cervix Cancer Screening. IARC Press 2005 v10.

Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. J Natl Cancer Inst 2010;102:1478–88.

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, Kinashi T. RAP1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. Mol. Cell. Biol. 2000; 20:1956–1969.

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. Cell 1989;56(1): 77–84.

Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, et al. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. J Natl Cancer Inst. 2010;102:1478-1488.

Kim WJ, Gersey Z, Daaka Y. RAP1GAP regulates renal cell carcinoma invasion. Cancer Lett. 2012; 320(1):65-71

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E: Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. Nature 1995, 375:506–510

Kulasingam S, Havrilesky L, Ghebre R, et al. Screening for Cervical Cancer: A Decision Analysis for the US Preventive Services Task Force. Rockville, MD: Agency for Healthcare. Research and Quality; 2011. AHRQ Pub. No. 11-05157- EF-1.

Lee C, Wooldridge TR, Laimins LA. Analysis of the roles of E6 binding to E6TP1 and nuclear localization in the human papillomavirus type 31 life cycle. Virology. 2007; 358(1):201-10.

Li Y, Nichols M, Shay J, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res. 1994; 54:6078–6082.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet.Gynecol 1992; 79: 328–337

Malinowski DP. Multiple biomarkers in molecular oncology. I. Molecular diagnostics applications in cervical cancer detection. Expert Rev Mol Diagn 2007;7:117-31.

Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, et al; Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2007;56(RR-2):1-24.

Maridonneau PI, de Gunzburg J. Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. J Biol Chem 1992; 267:6396-6402.

McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. Lancet Oncol. 2008;9:425-434.

Mitra RS, Zhang Z, Henson BS, Kurnit DM, Carey TE, D'Silva NJ. Rap1A and rap1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. Oncogene. 2003; 22(40): 6243-56.

Mitra RS, Goto M, Lee JS, Maldonado D, Taylor JM, Pan Q et al. Rap1GAP promotes invasion via induction of matrix metalloproteinase 9 secretion, which is associated with poor survival in low N-stage squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2008; 68(10):3959-69.

Moore DH. Chemotherapy for recurrent cervical carcinoma. Curr Opin Oncol 2006;18:516–9.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348:518-527.

Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD et al. Accuracy of the Papanicolaou Test in Screening for and Follow-up of Cervical Cytologic Abnormalities: A Systematic Review. Annals of Internal Medicine, 2000. Vol. 132(10)2000, pp 810-819

Nellore A, Paziana K, Ma C, Tsygankova OM, Wang Y, Puttaswamy K, Iqbal AU, Franks SR, Lv Y, Troxel AB, Feldman MD, Meinkoth JL, Brose MS. Loss of RAP1GAP in papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94(3):1026-32.

Pascoal-Xavier MA. Expressão e caracterização da proteína RAP1 como biomarcador da neoplasia intraepitelial cervical associada à infecção por papilomavírus humano. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Ciências na área de Ciências Biológicas] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.

Pascoal-Xavier MA. Avaliação do padrão de expressão das proteínas Rap1GTPase e p16 em lesões intra-epiteliais cervicais associadas à infecção por papilomavírus humano. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine. 2006;24(suppl 3):S3/11-25

Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, et al. Determinants ofn genital human papillomavirus detection in a US population. J Infect Dis. 2001;183:1554-1564.

Pimenta JM, Galindo C, Jenkins D, Taylor SM. Estimate of the global burden of cervical adenocarcinoma and potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination. BMC Cancer 2013, 13:553.

Price LS, Hajdo-Milasinovic A, Zhao J, Zwartkruis FJ, Collard JG, Bos JL. Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell–cell adhesion. J. Biol. Chem. 2004 ;279:35127–35132.

Plummer M, Schiffman M, Castle PE, et al; ALTS Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. J Infect Dis. 2007;195:1582-1589.

Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zerial, M. Association of Rap1 and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. J. Cell Sci. 1994; 107:1661–1670.

Qiu T, Qi X, Cen J, Chen Z. RAP1GAP alters leukemia cell differentiation, apoptosis and invasion in vitro. Oncol Rep. 2012; 28(2):622-8.

Quinn MT, Mullen MX, Jesaitis AJ, Linner JG, Quinn MT, Jesaitis AJ et al. Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. Blood 1992; 79:1563-1573.

Reedquist KA, Ross E, Koop EA, Wolthuis RM, Zwartkruis FJ, van Kooyk Y, et al. The small GTPase, Rap1, mediates CD31- induced integrin adhesion. J. Cell. Biol. 2000;148:1151–1158.

Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. J Natl Cancer Inst. 2008;100:513-517

Sahdev S, Khattar S K, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 307(1-2):249-64, 2008

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T: Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. Pathol Int 1998, 48:580–585

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression Status of p16 Protein Is Associated with Human Papillomavirus Oncogenic Potential in Cervical and Genital Lesions. American Journal of Pathology, Vol. 153, No. 6, December 1998

Santopietro R, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, et al. Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in

Santin AD, Zhan F, Bignotti E, et al. Gene expression profiles ofprimary HPV 16– and HPV 18–infected early stage cervical cancersand normal cervical epithelium: identification of novel candidatemolecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. Virology 2005;331:269-91.

Sarian LO, Derchain SF, Naud P, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, et al. Evaluation of visual inspection with acetic acid (VIA), Lugol's iodine (VILI), cervical cytology and HPV testing as cervical screening tools in Latin America. This report refers to partial results from the LAMS (Latin AMerican Screening) study. J Med Screen 2005; 12: 142–149.

Saslow D, Castle PE, Cox JT, et al. American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. CA Cancer J Clin. 2007;57:7-28.

Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain JM. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. J Low Genit Tract Dis. 2012;16(3):175-204

Schiffman M, Rodriguez AC. Heterogeneity in CIN3 diagnosis. Lancet Oncol 2008 May;9(5):404–406.

Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. J Natl Cancer Inst. 2011 Mar 2;103(5):368-83

Schiller, W. Early diagnosis of carcinoma of the cervix. Obstet. Gynecol 1933; 66:210–220

Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 1993, 366:704–707

Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. J Natl Cancer Inst. 2003;95:46-52.

Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. J. Cell. Biol. 2003; 161:417–427.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science. 2006; 314(5797):268-74

Stout NK, Goldhaber-Fiebert JD, Ortendahl JD, et al. Tradeoffs in cervical cancer prevention: balancing benefits and risks. Arch Intern Med. 2008;168:1881-1889.

Sørensen HP; Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. Journal of Biotechnology 115: 113–128, 2005

Torti M, Lapetina EG. Role of rap1B and p21ras GTPase-activating protein in the regulation of phospholipase C-gamma 1 in human platelets. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(16):7796-800.

Trunk MJ, Dallenbach-Hellweg G, Ridder R, et al. Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. Acta Cytol. 2004;48:771–782

Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis Cancer Treat Rev. 2009 May;35(3):210-20.

Tsukamoto N, Hattori M, Yang H, Bos JL, Minato N. Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. J. Biol. Chem. 1999;274:18463–18469.

Tsygankova OM, Prendergast GV, Puttaswamy K, Wang Y, Feldman MD, Wang H, et al. Downregulation of Rap1GAP contributes to Ras transformation. Mol Cell Biol. 2007;27(19):6647-58.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999;189:12-19.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J; Zoller M. O DNA recombinante, UFOP Segunda Edição, cap 23, p.449-451, 1997.
Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S, Doeberitz MvK. Evaluation of a Nuclear Score for p16INK4a-Stained Cervical Squamous Cells in Liquid-Based Cytology Samples.

World Health Organization: WHO. Cervical Cancer Prevention and Control Costing Tool (C4P) User's Guide, Geneva, Switzerland: WHO 2012

World Health Organization: WHO. Human papillomavirus and HPV vaccines: technical information for policy-makers and health professionals 2007.

Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. Am J Obstet Gynecol 2007 Oct;197(4):340–345.

Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines
for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. Am J Obstet Gynecol 2007 Oct;197(4):346–355. [PubMed: 17904957]

Zhang Z, Mitra RS, Henson BS, Datta NS, McCauley LK, Kumar P et al. Rap1GAP inhibits tumor growth in oropharyngeal squamous cell carcinoma. Am J Pathol. 2006;168(2):585-96.

Zheng H, Gao L, Feng Y, Yuan L, Zhao H, Cornelius LA. Down-regulation of Rap1GAP via promoter hypermethylation promotes melanoma cell proliferation, survival, and migration. Cancer Res. 2009; 69(2):449-57.
zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1996;1288(2):F55–78.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology 2009; 384:260–265.

Zuo H, Gandhi M, Edreira MM, Hochbaum D, Nimgaonkar VL, Zhang P et al. Downregulation of Rap1GAP through epigenetic silencing and loss of heterozygosity promotes invasion and progression of thyroid tumors. Cancer Res. 2010; 70(4):1389-97.