



**IPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102015027283-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** BR 102015027283-9

**(22) Data do Depósito:** 28/10/2015

**(43) Data da Publicação Nacional:** 30/10/2018

**(51) Classificação Internacional:** C07K 16/30; G01N 33/574.

**(30) Prioridade Unionista:** BR 1020140269720 de 29/10/2014.

**(54) Título:** ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33 E SUA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO , 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200

**(72) Inventor:** GISELI KLASSEN; GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA.

**Código de Controle:** D5D6F3858903BF5F 69CD521E42037532

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 28/10/2015, observadas as condições legais

**Expedida em:** 08/02/2022

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

## **ANTICORPO MONOCLONAL anti-ADAM33 E SUA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA.**

### CAMPO DE APLICAÇÃO

[001]. A presente invenção aplica-se à área médica e farmacêutica, referindo-se ao hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-ADAM33, a proteína ADAM33 está presente no epitélio mamário normal, já no tecido tumoral de mama, em carcinomas do tipo lobular invasor, sua expressão encontra-se diminuída. Esta invenção refere-se, também, ao processo de preparação do anticorpo monoclonal, do hibridoma, de um kit de diagnóstico de câncer de mama e de um método diagnóstico de câncer de mama.

### ESTADO DA TÉCNICA

[002]. O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, que envolve variações morfológicas e clínicas, sendo o resultado de alterações genéticas e epigenéticas (WEIGELT *et al.*, 2010; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2010; ESWARAN *et al.*, 2012). Esse é o tipo de câncer mais frequente nas mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (INCA, 2014).

[003]. No Brasil, o câncer de mama é a principal causa de morte entre todos os tipos de câncer em mulheres. O número de casos novos esperados para o Brasil em 2014 é de 52.120, com um risco estimado de 56 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). As metástases são a causa de morte em 90% dos pacientes com câncer. Ainda não é possível prever o risco de desenvolvimento de metástases, no câncer de mama, por isso no momento mais de 80% das pacientes com diagnóstico de câncer recebem terapia adjuvante e, apesar disso, em 40% dessas ocorre recidiva e morte devido às

metástases em um período de cinco anos (WEIGELT *et al.*, 2005; SETHI & KANG, 2011).

[004]. No câncer de mama existe uma heterogeneidade que não pode ser explicada apenas por parâmetros clínicos, tais como tamanho do tumor, envolvimento dos linfonodos, grau histológico, idade, ou por biomarcadores como receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2) rotineiramente utilizadas no diagnóstico e tratamento de pacientes (SIMPSON *et al.* 2005; EROLES *et al.*, 2011). A necessidade de conhecer mais sobre a doença desencadeou um grande crescimento na pesquisa sobre a biologia molecular do câncer de mama. Avanços nas tecnologias têm permitido aos pesquisadores investigar a natureza do câncer mama, revelando que essa doença requer a interligação de várias vias de sinalização e que tanto o microambiente celular, as características inatas do paciente e a fisiopatologia da doença tem influência no tempo de sobrevida e também na resposta ao tratamento (SIMPSON *et al.*, 2005) VALLEJOS *et al.*, 2010; EROLES *et al.*, 2011).

[005]. O estudo do gene *ADAM33* identificamos sua expressão diminuída devido ao silenciamento por hipermetilação do promotor em carcinomas lobulares invasivos (CLIs) (SENISKI *et al.*, 2009). Nesse trabalho, foram utilizadas linhagens tumorais de mama que apresentaram diminuição da expressão deste gene devido à metilação do promotor (demonstrado por sequenciamento). Com os dados de sequenciamento, foi utilizada a técnica de MSP (methylation specific PCR) para extrapolar os dados obtidos para tumores primários de mama. Foram utilizadas 76 amostras de tumores de pacientes do Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba-PR). Sendo que destas, 51 amostras eram de carcinoma ductal invasivo (CDI) e 21 de carcinoma lobular invasivo (CLI). Entre todas as análises de correlação com dados clínico-patológicos foi encontrada diferença significativa nos carcinomas lobulares invasivos com 76,2% das amostras com o promotor do gene *ADAM33* hipermetilado ( $p = 0,0002$ ) (SENISKI *et al.*, 2009).

[006]. Os carcinomas lobulares possuem uma frequência na população com câncer de mama, em torno de 10-15 %. Este tipo de tumor pode se apresentar como uma massa palpável, assim como os carcinomas ductais, ou então como uma lesão mal definida e difusa, com multifocalidade e multicentricidade, o que dificulta sua detecção e diagnóstico inclusive pela mamografia (BIGLIA *et al.*, 2007; BROUCKAERT *et al.*, 2014). Em contraste aos CDIs, carcinomas lobulares, tanto *in situ* como invasivos, apresentam pouca coesão na sua aparência histológica, e possuem morfologia celular singular, além disso, apresentam perda total de polaridade. A perda da expressão de E-caderina, uma importante proteína de adesão no epitélio da mama, reflete a morfologia histológica dos CLIs. A perda de adesão também poderia explicar porque os CLIs tendem a formar metástases para localizações mais remotas, tais como leptomeninges, trato gastrointestinal e sistema reprodutor feminino, quando comparado com CDIs que se deslocam preferencialmente para linfonodos, pulmão, pleura, fígado e ossos. E ainda, o aparecimento de múltiplos focos de metástases no mesmo órgãos é mais frequente nos CLIs do que nos CDIs (YODER, WILKINSON, & MASSOLL, 2007; LEE *et al.*, 2010; GOBBI, 2012; WELLS, PIPA, SHIN, 2014).

[007]. Huang *et al.* (2005) mostraram que a ADAM33 inibe a migração celular por interagir com integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$  (HUANG, BRIDGES, & WHITE, 2005). É bastante interessante, e provavelmente não ao acaso, que a proteína ADAM33 que tem função de adesão celular, sofra silenciamento epigenético, e assim altere as interações celulares, como acontece com a E-caderina, e essa descoesão seja uma das características histológicas observadas nos CLIs.

[008]. Pelas características da proteína ADAM33 e as evidências discutidas, o produto deste gene pode auxiliar na falta de coesão entre as células nos CLIs, nos quais o gene ADAM33 é desligado epigeneticamente. Dessa forma, a proteína ADAM33 poderia ser utilizada como um novo marcador para a diferenciação entre os carcinomas lobulares e ductais, sendo que ocasionalmente as características destes dois tipos de tumores se

sobrepõem principalmente nos casos de carcinomas mistos. Existe a necessidade de se encontrar novos marcadores de utilidade clínica, que possam direcionar um melhor manejo da paciente, além da E-caderina, para ser empregado na diferenciação dos tipos de tumores (TURASHVILI *et al.*, 2005; TURASHVILI *et al.*, 2007; KRISTIANSEN & PILARSKY, 2008).

[009]. A maioria dos conceitos em relação ao câncer é definida através da imunohistoquímica, que utiliza diversos marcadores moleculares bem estabelecidos nas rotinas clínicas. Entretanto, a biologia molecular, vem mudando a maneira que o câncer de mama é visto. Já não o percebemos como um caminho único, mas como uma série complexa de acontecimentos moleculares que levam para vias distintas e divergentes em relação ao câncer de mama invasivo (SIMPSON *et al.*, 2005).

[010]. Apesar dessas novas técnicas possibilitarem informações de grande valor para o entendimento da biologia tumoral, são técnicas de alto custo e pouca aplicabilidade clínica. Técnicas que fogem a realidade na maior parte dos centros que tratam pacientes com câncer de mama. O uso de técnicas de imunohistoquímica possibilita a identificação de subtipos moleculares descritos nos estudos de análise da assinatura genética, de fundamental importância, principalmente quando consideramos as limitações econômicas encontradas em países como o Brasil.

[011]. A validação da proteína ADAM33 como biomarcador molecular de CLIs depende de sua utilização em imunohistoquímica.

[012]. Por esta razão, pretendemos obter anticorpos monoclonais úteis como bioferramenta de diagnóstico e, também, para o estudo funcional da proteína ADAM33 em tumores de mama e em outras patologias. Assim, utilizando ferramentas de biologia molecular pretendemos produzir uma ferramenta de uso no laboratório de anatomia patológica e que atenda a uma demanda de diagnóstico qualificado aos oncologistas.

## OBJETIVOS

[013]. Uma vez que o diagnóstico molecular de câncer de mama é realizado por imunohistoquímica na rotina clínica, e percebendo a importância da proteína ADAM33 no câncer de mama, e que até o momento não existia um anticorpo monoclonal específico para a ADAM33 em tecido mamário, com elevada especificidade e auto título, que possibilitou a análise de tumores em tecido parafinizado, sendo possível demonstrar que há uma variação da expressão dessa proteína nos diversos tipos de tumores.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[014]. A presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a proteína ADAM33 presente em tecido mamário normal e que está diminuída no carcinoma lobular invasor.

[015]. O anticorpo monoclonal em questão pertence à classe IgG e apresenta o isotipo IgG1κ. O processo de preparação deste anticorpo monoclonal compreende as seguintes etapas:

- i. Imunização de quatro animais com a proteína recombinante ADAM33 domínio rico em cisteínas.
- ii. Remoção do baço dos referidos animais imunizados e separação das células esplênicas.
- iii. Fusão das células esplênicas obtidas em (ii) com células mielomatosas e cultivo destas células em um meio seletivo pertinente, que permita que somente a sobrevivência dos hibridomas, para a obtenção de hibridomas que produzam anticorpos contra a proteína ADAM33.
- iv. Após o tempo de cultura, a avaliação do sobrenadante por um método adequado, quanto à presença do anticorpo que se liga à proteína recombinante ADAM33 e em extrato de linhagens celulares de câncer de mama que expressam a proteína ADAM33.
- v. Seleção e clonagem dos hibridomas que produzem os anticorpos reativos contra a ADAM33 recombinante e de extrato de linhagens celulares.

vi. Purificação dos anticorpos monoclonais obtidos.

## 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Amplificação e clonagem de uma parte do gene ADAM33 em vetor de expressão de proteínas

[016]. A proteína ADAM33 foi inicialmente comparada à todas as proteínas da família ADAM utilizando o programa Clustalw ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). A região de interesse para clonagem foi determinada como aquela que apresentava o maior número de aminoácidos diferentes entre as proteínas da família ADAM. A região selecionada foi amplificada e clonada inicialmente em vetor adequado para sequenciamento (pGEM®Teasy) e em seguida subclonada após a digestão com a enzima de restrição EcoRI (Invitrogen) e ligada ao vetor pET28a (Novagen).

[017]. As reações de amplificação utilizaram o cDNA de células de mama normais, usando os seguintes iniciadores: Universal: 5' ACC TAC TGG ACG GCT CAC C e Reverso: 5' GCA GGA AGG TGT CAT GGT TT. Esses iniciadores (*primers*) foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). E conferidos através do alinhamento com o genoma humano usando o programa BlastN, disponível em ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blast&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BLASTSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blast&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BLASTSearch)).

[018]. A reação de PCR foi realizada com 1 µL de cDNA em volume final de 20 µL contendo tampão 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 1U Taq Platinum (Invitrogen) e 8 pmol de iniciadores específicos sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação por 5 minutos a 95 °C e em seguida 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos as moléculas tiveram um tempo de extensão extra de 5 minutos a 72°C. O produto de PCR foi purificado a partir de gel de

agarose utilizando o kit Qiaex (Qiagen), em seguida ligado no vetor pGEM®Teasy (Promega) e transformado em *E. coli* DH10B por eletroporação (descrito a seguir).

[019]. A seleção de clones ocorreu por alfa complementação, sendo que, a presença do inserto foi confirmada por amplificação de DNA de colônias brancas utilizando os iniciadores específicos. Para isso a reação de PCR realizada em volume de 10 µL contendo 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 1U Taq e 8 pmol de iniciadores específicos e uma porção da colônia branca de interesse foi coletada com auxílio de um palito. As condições de amplificação foram desnaturação por 5 minutos a 95 °C e em seguida 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Ao final dos ciclos as moléculas tiveram um tempo de extensão extra de 5 minutos a 72 °C. Os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida revelado com nitrato de prata, usando o marcador de massa molecular 100 bp (Fermentas).

[020]. As colônias contendo o inserto do tamanho adequado foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) e utilizadas para purificação do DNA plasmidial utilizando o Kit de purificação de plasmídeos (Qiagen).

[021]. Os clones obtidos foram confirmados através de sequenciamento de DNA. A reação de sequenciamento foi realizada com 300 a 500 nanogramas de DNA dos plasmídeos utilizando o protocolo BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) disponível para o sequenciamento automático no sequenciador ABI 3110 (Applied Biosystems-Perkin Elmer) segundo as especificações dos fornecedores. As reações foram feitas em um sistema de 10 µL contendo: 3 µL de BigDye Terminator v3.0, 1 µL de Tampão Save Money 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 10 pmol de iniciadores universal ou reverso M13 (Invitrogen). As condições da reação de sequenciamento foram: desnaturação 95°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos e 30 segundos para anelamento e extensão.

[022]. Após a confirmação da clonagem e também de que nenhuma base foi alterada, o plasmídeo recombinante denominado pGM04 foi

produzido em larga escala utilizando kit de midiprep (Qiagen). O DNA purificado foi digerido com enzima de restrição *EcoRI* (Gibco) que flanqueia o inserto no vetor utilizado (não existem sítios dessa enzima no fragmento de interesse). Em seguida, o produto obtido foi purificado utilizando o protocolo da Qiagen de extração de fragmento de DNA do gel de agarose. Posteriormente o fragmento foi subclonado no vetor de expressão de proteína pET28a (Novagen) digerido com a mesma enzima *EcoRI* gerando o plasmídeo pGM05 que foi também confirmado por sequenciamento.

### 1.2 Transformação bacteriana por eletroporação

[023]. Para o preparo de células eletrocompetentes, um pré-inóculo de 5 mL da célula foi crescido sob agitação durante a noite em meio LB com os antibióticos adequados. O inóculo foi preparado a partir de 2 mL de pré-inóculo em 200 mL de meio SOB, em frasco erlenmeyer de 1 L e crescido até atingir  $DO_{600}$  entre 0,4 e 0,7. A cultura foi mantida por 30 minutos no gelo e centrifugada a 3000 x g durante 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. As células foram lavadas duas vezes em água destilada gelada estéril e uma vez em glicerol 15% gelado. Toda a manipulação foi feita no gelo.

[024]. Para a eletroporação, 1 a 2  $\mu$ L de DNA plasmidial (aproximadamente 100 ng) ou 1  $\mu$ L de ligação foram adicionados a 40  $\mu$ L de células eletrocompetentes e a mistura transferida cuidadosamente para as cubetas de eletroporação. As células foram submetidas a um rápido pulso elétrico de 10 Kv/cm (4 K $\Omega$ , 330  $\mu$ F) (Eletroporador BioRad), e em seguida foram ressuspensas em meio SOC sob agitação a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio LA seletivo contendo os antibióticos apropriados.

### 1.3 Expressão do domínio recombinante da proteína ADAM33

[025]. A expressão da proteína ADAM33 recombinante foi realizada em estirpes de *E. coli* BL21 Ai. As bactérias foram transformadas e selecionadas com antibióticos apropriados, e a presença do plasmídeo após eletroporação confirmada através PCR de colônia.

[026]. Para indução da expressão das proteínas recombinantes utilizamos o protocolo que consiste em inocular 3 colônias da bactéria de escolha em 3 mL de meio LB a 37°C e sob agitação a 200 rpm por toda noite. Após aproximadamente 18 horas de crescimento uma alíquota de 100 µL de pré-inóculo foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo antibióticos. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação constante até DO<sub>600</sub> próxima de 0,6. Nesse ponto a expressão foi induzida com 1,0 mMol/L de IPTG e 2% de arabinose. A induções foi feita por 4 horas a 200 rpm e 37°C. Como controle negativo, foi reproduzido o experimento, porém sem adição do agente indutor. Após o período de indução as bactérias foram aliquotadas (1,5 mL) em tubos tipo eppendorf, centrifugadas por 5 min 3000 x g e o precipitado submetido à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) como descrito a seguir.

#### 1.4 Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes

[027]. As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% e do gel de empilhamento foi de 4%. As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e fervidas durante 5 minutos antes da aplicação. A voltagem da corrida variou de 180 a 200V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Bio-Safe™ Coomassie (Bio-Rad) ou transferidas para membrana (western blot) dependendo do ensaio.

#### 1.6 Expressão da proteína recombinante para a purificação

[028]. Após determinação da estirpe de *E. coli*, condições de indução e tampão adequados para expressão da proteína, a estirpe BL21 Ai contendo o plasmídeo pGM05 foi cultivada em 10 mL de LB durante a noite. A cultura foi utilizada para inocular 100 mL de LB a 37°C sob agitação de 200

rpm até  $DO_{600}$  próxima de 0,6. Neste ponto foi adicionado 1mmol/L de IPTG e 2% de arabinose, seguido de incubação sob agitação a 37°C por 4 horas. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 5 minutos. O meio sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em 30 mL de tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8; NaCl 50mM, 20 mM imidazol, 8 M uréia e glicerol 10%. As células foram então lisadas por sonicação em um sonicador Heat System equipado com microponta, em banho de gelo, por 6 ciclos de 20 segundos, intercalados com 30 segundos de intervalo. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C, para separação das frações solúvel e insolúvel.

### 1.7 Purificação da proteína ADAM33 recombinante

[029]. A proteína ADAM33 fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal foi purificada utilizando coluna HiTrap Chelating-Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare) como descrito pelo fabricante, acoplada ao cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare). A coluna de 1 mL acoplada foi equilibrada com 5 mL do tampão de sonicação para ADAM33 (TP1: 50 mM Tris-HCl pH8; NaCl 50mM, 20mM imidazol, 8M uréia e glicerol 10%) em seguida, 30 mL do extrato livre de células, preparado como descrito anteriormente, foram aplicados na coluna. A solução de proteínas foi injetada, num fluxo de 1mL/min na coluna, em seguida, essa foi lavada com 10 mL de TP1. A proteína ADAM33 foi eluída utilizando um gradiente contínuo de 20 mM a 1 M de imidazol equivalente a 20 mL. As amostras foram coletadas em alíquotas de 1 mL. Amostras de 10 µL das frações obtidas e correspondentes ao pico de eluição no cromatograma foram coletadas para análise em gel SDS-PAGE. As frações que apresentaram maior pureza foram reunidas e dialisadas em 1 L de solução de diálise contendo: 50 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-HCl e 10% glicerol pH 8,0. A diálise foi realizada a temperatura de 4°C por 48 horas.

[030]. Após a diálise, procedeu-se a quantificação da concentração protéica das amostras utilizando o método de Bradford (1976) como descrito a seguir.

### 1.8 Identificação da proteína recombinante ADAM33

[031]. A proteína recombinante teve sua identidade confirmada pelo método MALDI-TOF/MS realizada como descrito por Westermeier & Naven (2004) com adaptações. A banda correspondente à proteína de interesse foi recortada do gel e o corante Coomassie removido utilizando a solução descolorante (solução de acetonitrila 50 %, bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0). O gel foi em seguida desidratado utilizando uma solução de acetonitrila 100%. A proteína contida no gel foi digerida com uma solução de tripsina (20 ng/ $\mu$ L) e incubada por 20 minutos em gelo. O gel foi em seguida coberto com solução tampão contendo 40 mmol/L de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila e incubado por 12h a 37°C. A amostra (1  $\mu$ l) foi misturada a igual volume de solução contendo a matriz HCCA (Ácido ciano-4-hidroxicinamímico) e aplicada sobre uma placa metálica. A análise dos peptídeos foi realizada pelo método MALDI-TOF/MS (Espectrometria de Massas de Ionização a Laser com Tempo de Vôo) no espectrômetro de massa Bruker Daltonics Inc., no modo refletor positivo. A calibração do aparelho foi realizada utilizando-se uma mistura de padrões de peptídeos (Bruker Daltonics Inc.). Após a análise de cada amostra foram gerados espectrogramas que foram visualizados utilizando o programa Flexanalysis (Bruker Daltonics Inc.).

[032]. A identificação das proteínas foi realizada através do programa Aldente (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>), que utiliza os bancos de dados do Swiss-Prot. Foram utilizados os valores dos picos monoisotópicos referentes à m/z para a submissão nos bancos de dados.

### 1.9 Quantificação de proteínas

[033]. As concentrações das proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As reações foram preparadas em microplacas de 96 poços, o sistema de reação continha 170  $\mu$ L da solução corante (Reagente de Bradford – Sigma) e 1  $\mu$ L da amostra. A curva padrão utilizou albumina de soro bovino (BSA) como padrão em concentração de

0,6 a 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas em 595 nm. O limite de sensibilidade do método é de 1 a 10  $\mu\text{g}$  de proteína.

#### 1.10 Imunodeteção de proteínas ou Western Blot

[034]. As amostras a serem analisadas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12% utilizando o método descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um sistema de transferência semi-seco (Pharmacia). A transferência utilizou a placa do anodo coberta com 4 camadas de papel filtro contendo o tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) seguido da membrana de PVDF (Hybond ECL- GE Healthcare ativada com metanol). O gel, então foi colocado sobre a membrana evitando-se bolhas de ar no sistema. Outras quatro camadas de papel filtro previamente imersas em tampão de transferência foram colocadas sobre o gel. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 100 mA, em 25 V por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (Thermo Scientific) na membrana.

[035]. Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST três vezes e incubada com 10 mL de solução de leite 5% TBST com o anticorpo primário 1:10.000, sendo mantida sob agitação durante 18 horas a temperatura ambiente. O anticorpo primário foi retirado através de três lavagens sucessivas com TBST. O anticorpo secundário foi o Anti-mouse IgG HRP (Sigma) de concentração 1 mg/mL diluído 1:10.000 vezes. Depois de cinco lavagens com TBST a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com Kit ECL Plus Western Blotting Detection GE contendo peroxidase utilizando filme de RaioX seguido de revelação com tampões revelador e fixador.

[036]. Nos experimentos de western blot para identificação inicial da proteína recombinante ADAM33, foram usados 5 µg de proteína após a purificação. O anticorpo primário usado nessa etapa foi o anti-histidina (Amersham) na diluição 1:10.000.

[037]. A especificidade do anticorpo-policlonal, também, foi testada por western blot utilizando linhagens tumorais e será descrito a seguir.

### 1.11 Obtenção dos anticorpos policlonais

[038]. Foram utilizados quatro camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c, mantidos no biotério setorial do Centro de Ciências Biológicas da UFPR, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento. A produção de anticorpos foi realizada como descrita por Harlow & Lane (1988).

[039]. Os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com o certificado número 435 (processo 23075.010136/2010-20).

[040]. Antes das imunizações os animais foram sangrados pela via do plexo retroorbital para retirada de soro pré-imune (aproximadamente 200µl de sangue total/animal), que foi mantido por 1 h em temperatura ambiente até sua coagulação e então centrifugado 900 x g por 5 minutos para separação do soro. O soro foi armazenado a -20°C até sua utilização. Após 14 dias da terceira imunização os animais foram sangrados novamente para obtenção do soro policlonal.

[041]. Para obtenção dos anticorpos policlonais os animais foram imunizados. Uma dose de 50 ng da proteína purificada foi utilizada por camundongo, para cada uma das 3 imunizações que foram feitas por via subcutânea. A primeira imunização foi suplementada com Adjuvante Completo de Freund, a segunda e a terceira imunização com Adjuvante Incompleto de Freund. O intervalo entre as imunizações foi de 14 dias.

### 1.10.1 Titulação dos Anticorpos policlonais

[042]. Microplacas descartáveis de poliestireno de 96 cavidades (Falcon) foram utilizadas, e todos os imunoreagentes ensaiados no volume de 100 µl. Entre todos os passos da reação, as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20. Para a sensibilização das placas foram utilizados 10 ng da proteína purificada por poço, diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 9,6), sendo a incubação de 14 h a 4°C. A seguir, foi feito o bloqueio contra reações inespecíficas, sendo adicionados, por poço, 120 µl de solução PBS-Tween 0,05% acrescida de 2% caseína. O bloqueio ocorreu por 1 h a 37°C. Como anticorpo primário, foram utilizados os soros obtidos dos camundongos imunizados, sendo os mesmos diluídos seriadamente, iniciando-se com uma diluição de 1:800. A seguir, foi acrescido o anticorpo secundário conjugado (Anti-IgG murino conjugado a peroxidase - Sigma®) a uma diluição de 5000 vezes. Ambos foram diluídos no mesmo tampão utilizado para o bloqueio das placas, sendo a incubação de 1 h a 37°C. Como controles da reação foram utilizados, no lugar do soro dos camundongos imunizados, soro de camundongos pré-ímmunes, como controle negativo, e anticorpo anti-histidina produzido em camundongos, como controle positivo.

[043]. A revelação ocorreu com a adição de 100 µL de solução substrato-cromógeno orto-fenileno-diamina (OPD) (0,4% em solução tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%) por poço. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2,5 N. Por fim, procedeu-se a leitura da densidade óptica a 492 nm em leitor de microplacas.

## 1.12 Obtenção dos anticorpos monoclonais (mAb) utilizando a tecnologia de hibridomas

### 1.12.1 Fusão celular e seleção de híbridos

[044]. Dois camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c, previamente imunizados com a proteína ADAM33 recombinante e com confirmação da produção de anticorpos policlonais contra ADAM33,

que apresentaram os melhores resultados quanto ao título dos anticorpos e especificidade, foram utilizados para produção dos anticorpos monoclonais.

[045]. A fusão entre células de mieloma Ag8xP3653 e as células de baço dos animais selecionados utilizou PEG 50 % (polietilenoglicol) (Roche). A produção de anticorpos seguiu a metodologia descrita por Harlow & Lane (1988).

[046]. Antes da fusão, as células mielóides foram cultivadas em meio de manutenção (RPMI 1640 (Gibco), 2mM de L-glutamina, 20 % de soro fetal bovino (Gibco), 10 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B).

[047]. Três dias antes da fusão os animais selecionados foram imunizados via intravenosa com 20 µg da proteína ADAM33 recombinante. No dia da fusão, os animais foram sedados e anestesiados, o sangue total foi coletado por punção cardíaca, para que possamos ter um estoque de soro policlonal. Em seguida, o baço desses animais foi retirado assepticamente em fluxo laminar, sendo então macerado em meio de manutenção, sem soro fetal bovino, para liberação dos esplenócitos. Com auxílio de uma micropipeta, as células foram dissociadas, e o material foi então filtrado para permanecer apenas as células. Após sucessivas lavagens, os esplenócitos foram misturadas às células de mieloma, em uma proporção de 1 célula de mieloma para 5 de esplenócitos. À essa mistura de células foi gotejado PEG 50% (Roche).

[048]. As células foram ressuspendidas em volume suficiente de meio de manutenção e distribuídas em placas de 96 poços, a 100 µL/poço na razão de aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células por poço.

[049]. Os hibridomas foram selecionadas por meio da maquinaria celular e de meio de cultivo seletivo. A linhagem mielóide utilizada é deficiente para HPRT e a via de salvamento de produção de nucleotídeos é dependente de HPRT, uma vez que a aminopterina bloqueia a via de novo da síntese de nucleotídeos, as células deficientes em HPRT (mielomas não fusionados) morreram. Os esplenócitos que não se fundiram são inviáveis em cultivo e morreram em cerca de uma semana. Portanto, os hibridomas formados pela fusão entre a célula de mieloma e os esplenócitos possuem a

HPRT e tiveram a capacidade de sobreviver em meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). Os hibridomas, mesmo com a via de novo bloqueada, são capazes de sintetizar nucleotídeos pela via de salvamento (da qual a hipoxantina e a timidina são intermediários) e são, portanto, as únicas células que sobrevivem ao período de seleção.

[050]. A partir desse conceito, as células foram cultivadas durante 14 dias com meio HAT, em seguida, mais 14 dias em meio HT (hipoxantina e timidina). Esse procedimento mantém elevados os níveis dos intermediários da via de salvamento e vão diluindo a aminopterina. Dessa forma, os hibridomas foram mantidos pelos intermediários até que as diluições sucessivas em meio RPMI fossem suficientes para que a concentração da aminopterina não afeta-se mais as células.

[051]. Entre o vigésimo e vigésimo primeiro dia após a fusão, os híbridos foram testados para confirmação da produção de anticorpos específicos contra ADAM33 recombinante por ELISA.

#### 1.12.2 Manutenção dos hibridomas

[052]. As células foram mantidas em meio de manutenção com a mesma periodicidade de troca, cerca de 72 horas, até o fim do período da varredura dos hibridomas.

#### 1.12.3 Varredura dos hibridomas

[053]. A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra a proteína recombinante ADAM33 no sobrenadante do cultivo foi avaliada através de ensaio imunoenzimático ELISA. O ensaio foi feito utilizando 100 µL de sobrenadante do cultivo dos hibridomas como anticorpo primário, como secundário foi utilizado ECL anti-mouse IgG HRP- conjugated (GE) em diluição 1: 4000.

[054]. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultivo para os hibridomas e como controle positivo o soro policlonal do animal 3 na diluição 1:10000.

#### 1.12.4 Diluição Limitante

[055]. Após a varredura dos hibridomas, as células positivas para a secreção de anticorpos contra ADAM33 recombinante passam por um processo chamado de diluição limitante. Essa etapa tem por objetivo isolar apenas uma célula secretora de anticorpo, garantindo a produção de um anticorpo monoclonal.

[056]. Para essa diluição foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços por clone secretor de anticorpo. Na primeira linha da placa (linha A) foram plaqueadas 200 células do hibridoma em 200 µL de meio de cultivo, e as linhas restantes (linhas de B a H) receberam 100 µL do meio de cultivo. Da linha A foram removidos 100 µL que foram diluídos para linha B, e esse processo repetido até a linha H, onde os últimos 100 µL foram removidos e descartados. Desse modo, as células foram diluídas de 100 células/poço até 0,8 células/poço.

[057]. Após a diluição limitante, as células foram observadas em microscópio óptico invertido para se garantir o isolamento adequado dos clones. Após a confirmação da existência de clones isolados, esses, foram testados por ELISA, e os clones positivos sofreram nova diluição limitante, para garantir que apenas uma célula seja a que originou a colônia produtora de anticorpos.

#### 1.12.5 Produção de anticorpos monoclonais em larga escala

[058]. Para produção dos anticorpos monoclonais em volume maior, cada clone positivo foi expandido em cultura. E a partir dessas culturas, os clones foram congelados em meio contendo DMSO 10% e estocadas em nitrogênio líquido para perpetuar cada linhagem híbrida. Os sobrenadantes destas culturas, também, foram armazenados, para testes de especificidade dos anticorpos.

#### 1.12.6 Western Blot de linhagens tumorais de mama

[059]. Para testar a especificidade do anticorpo-monoclonal, realizamos o western blot do extrato total de proteínas de linhagens tumorais de mama. Para isso aproximadamente 100 µg de proteínas totais de cada linhagem foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE. As linhagens escolhidas para o experimento foram: controle positivo MCF7 e PMC42 que expressam a proteína ADAM33 e a linhagem MDA-MB-231 que não expressa ADAM33 como controle negativo (SENISKI *et al.*, 2009). Utilizando como anticorpo primário o anticorpo monoclonal SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 1.

[060]. Para obtenção dos extratos das linhagens, essas foram crescidas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino até  $\pm 10^6$  células/mL. As placas de cultivo foram lavadas com PBS 1X gelado, em seguida, foi adicionado 100 µL PBS 1X gelado contendo 1 µL de inibidor de protease (Kit Halt™ Thermo Scientific) e 1 µL de EDTA 0,5 M. Em seguida as células foram raspadas das placas com auxílio de *scrape* e transferidas para tubo tipo eppendorf. As células foram centrifugadas a 900 x g 10min a 4°C, o meio foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lise (SDS 1%, Tris 50 mM), contendo 3 µL de inibidor de protease (Kit Halt™ Thermo Scientific) e 3 µL de EDTA 0,5 M. Em seguida as células foram sonicadas em 6 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 30 segundos e sempre em banho de gelo.

[061]. Esses extratos foram submetidos à eletroforese desnaturante e western blot como já descrito anteriormente.

#### 1.12.7 Purificação do anticorpo monoclonal obtido

[062]. O anticorpo monoclonal foi purificado por meio de cromatografia por afinidade em Proteína A/G-Sepharose (Sigma). O meio de cultivo para purificação deve ser livre de imunoglobulinas, que estão presentes no meio tradicional, devido ao soro fetal bovino conter imunoglobulinas.

[063]. Para isso, o clone selecionado, que passará a ser denominado SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 1, foi cultivado em BD Cell™ MAb Medium Quantum Yield e BD Cell™ Serum Free antes da purificação. O cultivo acontece em diferentes frações de meio variando de 25% à 100% de cada em um volume total de 3 mL de meio, possibilitando, assim, a adaptação do clone até o cultivo final em 100% de BD Cell™ Serum Free.

#### 1.12.8 Isotipagem do anticorpo monoclonal selecionado

[064]. Para determinar o isotipo do anticorpo selecionado utilizamos o Kit IsoStrip (Roche, Alemanha) conforme orientações do fabricante.

#### 1.12.8 Titulação do Anticorpo purificado

[065]. O anticorpo purificado foi testado após diluições seriadas, por ELISA e Western Blotting para identificarmos até que concentração ele reconheceria a proteína ADAM33 recombinante, que foi utilizada em concentração de 10 µg/mL.

#### 1.12.9 Sequenciamento do hibridoma secretor

[066]. Para determinar a identidade do hibridoma secretor, realizamos o sequenciamento das regiões gênicas da imunoglobulina, hipervariáveis das cadeias leve e cadeia pesada, do hibridoma secretor selecionado. Para isso, usamos a metodologia empregada por Fields et al, 2013 (Fields et al.)

#### 1.12.10 Imunohistoquímica das Amostras de Tumores de mama

[067]. Os materiais tumorais empregados são provenientes amostras emblocadas em parafina do banco de tumores de pacientes do Hospital Nossa Senhora das Graças de Curitiba-PR. Foram selecionadas amostras de carcinomas ductais e lobulares guardados no período de 2002 à 2014. Os critérios de inclusão das amostras foram amostras de carcinoma do tipo

Lobular e Ductal. As amostras tumorais de mama (ductal e lobular) selecionadas foram dispostas utilizando-se a técnica de TMA (SCHULER *et al*, 2008).

[068]. As reações de imunohistoquímica foram realizadas nas secções dos tumores provenientes do bloco de TMA. As lâminas contendo os tumores foram desparafinizadas através de 2 lavagens em xilol por 10 minutos, 3 lavagens com etanol absoluto por 1 minuto e 1 vez com álcool etílico 80% por 1 minuto. O bloqueio da peroxidase endógena será realizada com o Kit Advance (Dako®), que apresenta solução de peróxido de hidrogênio 5% em metanol. Após retirar o excesso dos reagentes, foi realizada a recuperação antigênica no Imuno Retrifer (Dako®) em banho maria à 99°C por 40 minutos. Em seguida, as lâminas são lavadas com água destilada para remover o excesso dos reagentes. O anticorpo primário utilizado foi o SEQ ID Nº 2 e SEQ ID Nº 1 (anticorpo monoclonal anti-ADAM33 purificado). As lâminas foram incubadas em câmara úmida na geladeira por toda a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas e depois incubadas por 15 minutos com tampão TBS tris pH 7,3. A seguir, o anticorpo secundário: Advance link (Dako®) reage por 30 minutos. Seguido do reagente Advance enzyme (Dako®), por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi o DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Foram realizadas as lavagens em água por 5 minutos, 3 vezes com etanol absoluto por 1 minuto e a diafanização com 3 lavagens com xilol por 5 minutos. Por último, é adicionada a lamínula para proteção dos cortes. As amostras foram classificadas quanto à expressão da proteína ADAM33.

## 2. RESULTADOS

### 2.1 Seleção da região da proteína ADAM33 para clonagem

[069]. A região de interesse para clonagem foi escolhida pelo número de aminoácidos diferentes das demais proteínas da família ADAM e também pela análise do programa Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). O programa selecionou a região mais

apropriada de anelamento dos iniciadores para posterior produção do fragmento para clonagem. Foi feita, também, uma análise da sequência da proteína ADAM33 comparando-a com todas as proteínas da família ADAM. Esta análise é de extrema importância uma vez que nosso objetivo intuito é a produção de anticorpos monoclonais e quanto mais específica a sequência da proteína produzida melhor será a especificidade dos anticorpos produzidos.

[070]. As sequências de todas as proteínas ADAMs foram avaliadas quanto a similaridade através do programa de análise de similaridade ClustalW, disponível através do software ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). A partir desta etapa foi possível caracterizar as proteínas pertencentes a esta família quanto a sua sequência e delimitar as regiões que diferem entre si. Este programa fornece uma análise de similaridade entre as sequências analisadas, fornecendo um cladograma que pode ser visualizado na Figura 1.

[071]. Através deste cladograma, podemos perceber que as proteínas ADAM33, ADAM19 e ADAM12 estão próximas e portanto são as que mais se assemelham quanto a sua sequência. Entretanto a proteína ADAM19 não é expressa em tecido mamário normal ou tumoral, sendo expressa no endométrio (EDWARDS *et al.*, 2008). A partir desses resultados, avaliamos especificamente as duas proteínas mais próximas filogeneticamente que são a ADAM33 e ADAM12, as quais são expressas na mama (SENISKI *et al.*, 2009; IBE *et al.*, 1999). Esta análise de comparação de sequência de aminoácidos foi feita novamente através do programa ClustalW, (Figura 2). Nesta análise esta destacada o aminoácido inicial e final da região que foi escolhida para clonagem pelo programa Primer3.

[072]. A seguir está mostrada a sequência de nucleotídeos do gene ADAM33 e dos aminoácidos da proteína ADAM33 (Figura 3), com destaque na região de anelamento dos iniciadores. Observar que o primer universal planejado não tem o primeiro nucleotídeo do códon do primeiro aminoácido (Tyr). Este cuidado foi planejado sabendo que após a clonagem

no pGEMT®easy será inserido um nucleotídeo timina (T) nas pontas do fragmento clonado.

[073]. A figura 4, abaixo, está ilustrando a proteína ADAM33 com todos os seus domínios, em seguida, será demonstrado apenas os domínios envolvidos no presente trabalho.

[074]. Os domínios a serem clonados foram identificados pelo programa Conserved Domains, tratando-se da porção final do domínio disintegrina e o domínio rico em cisteínas, representados na figura 5.

## 2.2 Amplificação e clonagem do gene ADAM33

[075]. Após determinado a região do gene que codifica para a proteína ADAM33, foi realizada sua amplificação através da técnica de PCR utilizando cDNA de mama normal e o resultado pode ser visualizado na figura 6 abaixo mostrando o fragmento esperado de 611 pb.

[076]. Após a comprovação da banda esperada contendo 611 pb, o produto foi aplicado em gel de agarose purificado e quantificado. O fragmento purificado pode ser visualizado na figura 7.

[077]. Em seguida, aproximadamente 100 ng do produto de PCR foi ligado no vetor pGEMT®easy e o produto foi transformado em estirpe de *E. coli* DH10B por eletroporação como já descrito anteriormente. A presença do inserto foi verificada por amplificação de DNA das colônias utilizando os iniciadores específicos do fragmento clonado, que pode ser visualizado na figura 8 abaixo.

[078]. A partir desse resultado os clones que continham o inserto de 611 pb (clones: 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 e o 12) foram selecionados para a extração do DNA plasmidial.

## 2.3 Extração do dna plasmidial dos clones

[079]. As colônias contendo o inserto de tamanho adequado foram crescidas em meio LB e utilizadas para purificação dos plasmídeos utilizando o protocolo da Qiagen conforme especificações do fabricante, o resultado pode ser visualizado na Figura 9.

[080]. Após a purificação do pGEM®Teasy contendo o inserto, foi realizada a reação de sequenciamento de 4 clones para se verificar a fase de leitura da proteína e se ocorreu alguma mutação na reação de PCR. Todos os clones estavam adequados, e o clone 04 que passou a ser denominado pGM04 foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. A seguir, está o resultado do alinhamento entre a sequência do gene ADAM33 e o resultado do sequenciamento do clone pGM04 (Figura 10).

#### 2.4 Subclonagem de parte do gene ADAM33 no vetor de expressão pET28a

[081]. Após a escolha do clone correto, realizamos a purificação do DNA plasmidial (pGM04) em grande escala, utilizando o protocolo da Qiagen (Midiprep) conforme especificações do fabricante.

[082]. O plasmídeo pGM04 e o vetor de expressão de proteína pET28a foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI. Esta enzima faz parte do sítio de policlonagem do vetor pET28a e flanqueia o inserto no vetor pGEMTeasy.

[083]. O produto da digestão do plasmídeo pGM04 foi aplicado em gel de agarose e o fragmento contendo 631 pb foi purificado. Os fragmentos após digestão e depois da purificação do gel podem ser visualizados na figura 11.

[084]. Após a digestão e purificação descrita anteriormente, o inserto que passou a ter 631 pb, foi ligado ao vetor de expressão de proteínas pET28a. O produto desta reação de ligação foi usado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH10B de *E. coli*. As colônias que cresceram em meio LA contendo os antibióticos para seleção foram usadas para confirmação da clonagem através de PCR de colônia.

[085]. Nessa etapa fez-se a seleção do clone recombinante que tivesse o inserto posicionada corretamente com relação à inserção da cauda de 6 histinas na porção N-terminal do domínio da proteína ADAM33 (figura 12).

[086]. O plasmídeo pGM05 selecionado na orientação correta foi submetido a reação de sequenciamento como já descrito anteriormente. Foi verificado que o fragmento subclonado continha todos as bases, sem

mutações ou deleções, e encontrava-se em na fase de leitura correta para que então se pudesse iniciar a expressão da proteína alvo.

## 2.5 Indução e purificação da proteína recombinante

[087]. O vetor de expressão utilizado (pET28a) foi escolhido por possuir o promotor forte do bacteriófago T7, sendo possível obter uma alta taxa de expressão da proteína de interesse após indução, além de codificar para seis resíduos de histidina que ficam localizados na região N-terminal da proteína de interesse. Esta sequência, denominada de cauda de histidina (His-tag), possibilita a purificação da proteína expressa em apenas um passo cromatográfico, utilizando cromatografia de afinidade entre os grupamentos imidazol da cauda His-tag ao níquel quelado a um suporte sólido, permitindo, desta forma, aumento da eficiência e do rendimento do processo.

[088]. A expressão da proteína ADAM33 recombinante aconteceu em *E. coli* BL21 Ai. A estirpe de *E. coli* BL21 Ai contém uma inserção cromossomal do gene que codifica para RNA polimerase do fago T7 dentro do locus de *araB* do operon *araBAD*, sendo a regulação da T7 RNA polimerase controlada pelo promotor *araBAD*, e portanto induzida por L-arabinose e reprimida por glucose. Esta estirpe permite um maior controle de regulação da expressão da RNA polimerase, podendo contribuir com o aumento da solubilidade da proteína heteróloga ao permitir uma expressão homogênea.

[089]. Para identificar se a proteína de aproximadamente 27,7 kDa poderia ser a proteína recombinante ADAM33, foi realizado experimento de imunodeteção de proteínas (western blot) utilizando nesse momento o anticorpo anti His-Tag como anticorpo primário. A figura 13 mostra os extratos bacterianos da estirpe BL21 Ai (pGM05) não induzido e induzido. Pode-se observar a presença da banda de 27,7 kDa o que indica que a proteína observada anteriormente no extrato bruto de células foi confirmada como sendo a proteína ADAM33 recombinante.

[090]. Após estabelecidas as condições ideais de obtenção da proteína ADAM33 recombinante, partimos para a etapa de purificação

[091]. Como já descrito anteriormente, a proteína ADAM33 fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal foi purificada usando coluna HiTrap Chelating-Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare), acoplada ao cromatógrafo Äkta Basic (GE HealthCare). Para cada purificação induzimos um volume de 100 mL de cultura de BL21Ai transformadas. A purificação ocorreu com 1 coluna de 1 mL. O produto da purificação pode ser visualizado na figura 14.

[092]. A purificação partindo de um volume de 100 mL de cultura usando 1 coluna de 1 mL, a purificação ficou adequada, obtendo em poucas frações uma concentração alta de proteína ADAM33 recombinante que não estava precipitada.

[093]. Foram coletadas alíquotas de 1 mL e amostras de 10 µL das frações obtidas e correspondentes ao pico no cromatograma foram coletadas para análise em gel SDS-PAGE. As frações que apresentaram maior pureza e concentração foram reunidas e dialisadas contra 4 vezes de 1 L de solução de diálise contendo: 50 mmol/L de NaCl e 50 mmol/L de Tris-HCl e 10% glicerol pH 8,0. A diálise foi realizada a temperatura de 4°C por 48 horas.

[094]. Após as diálises, foi determinada a concentração proteica das amostras, utilizando o método de Bradford, o rendimento das proteínas purificadas obtido foi de 4,1 µg/µL.

## 2.6 Determinação da especificidade do anticorpo policlonal anti-ADAM33

[095]. Quatro camundongos Balb/c, denominados C0, C1, C2 e C3 foram imunizados com a proteína recombinante ADAM33. O soro dos animais imunizados foi coletado quatorze dias após a última imunização e a reatividade destes soros foi testada através de ensaios de ELISA e western blot. Os quatro soros policlonais tiveram igual reatividade quando analisados por ELISA e western blot.

[096]. Os soros policlonais foram testados por ELISA, utilizando placas sensibilizadas com a proteína ADAM33 recombinante purificada. Adotou-se como valor base para positividade do teste de ELISA o valor duas vezes

maior que o controle negativo, representado pelo título do soro do camundongo não imunizado ou pré-imune. Os títulos de anticorpos séricos anti-ADAM33 dos camundongos imunizados podem ser observados na Figura 15.

[097]. Os resultados mostram que o título de anticorpos apresentou absorvância próximo à 1, em 490 nm, na diluição de 1:25.600. Este título apresentou leitura de absorvância duas vezes acima do branco até 1:102.400.

[098]. A fim de se avaliar a especificidade do soro para a proteína ADAM33 foi realizado o experimento de western blot. Os soros dos camundongos foram capaz de reconhecer a proteína recombinante no extrato bacteriano e também a proteína purificada no western blot (Figura 16).

### 2.7 Identificação da proteína recombinante ADAM33

[099]. A identidade da proteína recombinante ADAM33 foi confirmada por espectrometria de massa (Figura 17), com 68% de homologia entre a proteína recombinante e o domínio rico em cisteínas da proteína ADAM33 humana, informações analisadas no banco de dados do Swiss-Prot. Assim, há um embasamento maior para afirmarmos que os camundongos foram imunizados com a proteína recombinante ADAM33 e que produziram anticorpos contra ela.

### 2.8 Clonagem dos hibridomas

[100]. Após ser comprovada a eficiência das imunizações, através de ensaios utilizando o soro policlonal produzido pelos camundongos Balb/c prosseguiu-se com o processo de produção de anticorpos monoclonais. Para isso, o baço de dois dos animais (animal número 0 e 3) foram fusionados com células mieloides para a obtenção dos hibridomas.

[101]. Após o sacrifício dos animais, o baço de cada camundongo foi retirado cirurgicamente, e foram triturados. Os esplenócitos foram misturados à células de mieloma na proporção 5:1. As células foram ressuspensas em

meio de cultivo e distribuídas em placas de 96 poços com 100 µL/poço na razão de aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células por poço, assim, as células fusionadas foram distribuídas em 10 placas, totalizando 960 poços para formação e crescimento dos hibridomas.

[102]. Obtidos os hibridomas, após o tempo de seleção, foi realizada a varredura para se determinar quais células secretavam anticorpos reativos à ADAM33 recombinante. Para isso, empregou-se a técnica de ELISA, com a qual foram testadas 184 colônias, utilizando como controle positivo da reação o soro policlonal do animal 3.

[103]. O resultado do ELISA demonstrou que 165 colônias produziam anticorpos anti ADAM33 recombinante. Das 165 colônias positivas, foram selecionadas 20 (Figura 18 com melhores resultados no ELISA, demonstrado pelo resultado da Absorbância (490 nm) próximo de 2,0 e sendo que foram selecionados clones de todas as placas.

[104]. Estas 20 colônias foram submetidas à diluição limitante, sendo assim, cada clone originou uma placa de 96 poços, que foi observada ao microscópio óptico invertido, e, após 14 dias, foram selecionados novos clones isolados. Esses foram testados por ELISA, então, 10 novos clones isolados foram escolhidos, sendo um de cada placa.

[105]. Esses 10 clones foram submetidos a uma nova diluição limitante, para garantir que esses fossem clones monoclonais. Então, após à terceira diluição, 10 clones bem isolados foram selecionados após serem testados por ELISA.

[106]. Desses, 6 clones se mostraram estáveis, quanto a expressão de anticorpos, após os testes de congelamento e descongelamento e a sucessíveis repiques em cultivo.

### 2.9 Ensaio de caracterização dos anticorpos monoclonais

[107]. Foram utilizadas duas linhagens com expressão da proteína como controle positivo MCF7 e PMC42 e como controle negativo MDA-MB-231. Para esse fim, as células foram cultivadas para se obter um extrato das proteínas totais das células, como já descrito. Como controle da reação foi

realizado em paralelo o western blot de uma proteína constitutiva celular ( $\beta$ -actina), ou seja, uma reação onde deve ser positiva para as três linhagens. Na figura 19 observa-se o resultado obtido.

[108]. A linhagem MDA-MB-231 que não expressa o gene ADAM33 não apresentou sinal com o soro policlonal anti ADAM33. Este resultado indica que o soro mesmo sendo policlonal possui boa especificidade. Além disso, esta linhagem expressa outras proteínas da família ADAM como as ADAM 9, 12, 15 e 17 (IBA *et al.*, 1999, O'SHEA *et al.* 2003, ZHENG *et al.*, 2009) e o fato de não ter sido detectado sinal, reforça a especificidade do soro policlonal que não apresentou reação cruzada para outras proteínas dessa família.

#### 2.10 Purificação e isotipagem do anticorpo SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 1

[109]. Após selecionarmos o hibridoma, ele foi cultivado em meio de cultivo livre de imunoglobulinas, para que fosse possível a purificação, a isotipagem, titulação, sequenciamento e, também, a realização das IHQ com o anticorpo puro.

[110]. Após o cultivo com o meio de cultura apropriado, o sobrenadante foi testado por ELISA, para confirmar a presença dos anticorpos e esses foram purificados. O produto da purificação rendeu várias frações de anticorpos com aproximadamente 0,28 g/L de anticorpos.

[111]. O anticorpo teve seu isotipo determinado: IgG<sub>1k</sub>.

#### 2.11 Titulação do Anticorpo Purificado

[112]. Após diluições seriadas do anticorpo, em ensaio de ELISA e Western Blotting, foi determinado as concentrações em que o anticorpo reconhecia a proteína. No ensaio de ELISA (Figura 20) pode-se observar que o anticorpo identifica a proteína até uma diluição de 0,21  $\mu$ g/mL e por Western Blotting (Figura 21) até 0.07  $\mu$ g/mL.

#### 2.12 Sequenciamento das cadeias de Imunoglobulinas

[113]. Após o sequenciamento das regiões variáveis das genes das cadeias pesada (VH) mostrada na SEQ ID NO 4 e leve (VL) SEQ ID NO 3 da

imunoglobulinas, usando o IMGT (site de informações imunogenéticas) identificamos as regiões de *framework* (FR) e os loops hipervariáveis (CDRs) H1, H2, H3, L1 L2, e L3 (Figura 22) essas regiões correspondem as SEQ ID NO 2 E SEQ ID NO 1 responsáveis pela interação do anticorpo com o antígeno.

### 2.13 Imunohistoquímica dos Tumores de Mama

[114]. A figura 23 é referente a duas amostras de tumores de mama, um carcinoma ductal invasor e carcinoma lobular invasor.

[115]. O resultado da imunohistoquímica demonstrou há uma diferença na expressão da proteína ADAM33 entre os CDIs e CLLs. Esse anticorpo monoclonal pode ser usado com kit de diagnóstico na prática clínica para auxiliar no diagnóstico de diferenciação do câncer de mama.

### **DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS**

[116]. SEQUENCIA 1 – SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA CADEIA LEVE DO ANTICORPO.

[117]. SEQUENCIA 2 - SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA CADEIA PESADA DO ANTICORPO

[118]. SEQUÊNCIA 3 – SEQUENCIA DO DNA DA REGIÃO DA CADEIA LEVE DO ANTICORPO

[119]. SEQUENCIA 4 – SEQUENCIA DO DNA DA REGIÃO DA CADEIA PESADO DO ANTICORPO

### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[119]. FIGURA 1 - CLADOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE DO PROGRAMA CLUSTALW DE SEQUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM. As sequências de todas as proteínas foram analisadas em conjunto neste programa e quanto mais semelhantes elas forem entre si, mais próximas estarão. FONTE: CLUSTALW.

[120]. FIGURA 2 - ANÁLISE DE SEMELHANÇA DAS PROTEÍNAS ADAM33 E ADAM12 PELO CLUSTALW. Na sequência está representado como "\*" os aminoácidos idênticos nas duas sequências. ":" os aminoácidos do mesmo

grupo (conservada substituição). "." (pontos) os aminoácidos pertencentes ao mesmo grupo (semi conservada substituição). Regiões onde não há - não condiz a similaridade entre os aminoácidos nas duas sequências. Os aminoácidos em destaque (rosa e amarelo) marcam o início e o fim da parte do gene ADAM33 utilizado nesse trabalho. FONTE: CLUSTALW.

[121]. FIGURA 3 - SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENE E DA PROTEÍNA ADAM33. Esta sequência destaca em verde a região do *primer* forward do fragmento a ser clonado e em amarelo a região do *primer* reverso. Em vermelho está destacada a metionina no início da proteína e em rosa o final da proteína traduzida, que contém 813 aminoácidos.

[122]. FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA ADAM33 COMPLETA. Está destacado em laranja o pré-domínio, em vermelho do domínio catalítico que contém zinco, em verde o domínio disintegrina e em azul o domínio rico em cisteínas. FONTE: Conserved Domains.

[124]. FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS CLONADOS DA PROTEÍNA ADAM33. Representação dos domínios que foram clonados e expressados. Em azul a porção final do domínio disintegrina e em rosa todo o domínio rico em cisteínas. FONTE: Conserved Domains.

[125] FIGURA 6 - PRODUTO DE PCR AMPLIFICADO DO GENE ADAM33. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. 1. Marcador de massa 100bp, 2. Controle negativo (PCR sem DNA). 3. Fragmento da reação de amplificação de DNA. FONTE: O autor.

[123]. FIGURA 7 - PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR. Na linha 1 está o marcador de massa 100bp, onde indica a posição da banda de 500 pb, na linha 2 o fragmento de 611 pb após a purificação.FONTE: O autor.

[124]. FIGURA 8 - PCR DAS COLÔNIAS A PARTIR DOS CLONES OBTIDOS. O marcador de massa usado 100bp, em seguida o controle negativo da reação, os clones obtidos : com o inserto da ADAM33 destacado pelo quadro vermelho (1, 2, 3, 4, 7, 9, 10 e 12) e sem o inserto (5, 6, 8,11 e 13). FONTE: O autor.

[125]. FIGURA 9 - EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DOS CLONES OBTIDOS. 1. MM pGEM ~100ng, 2-9. Clones positivos para o PCR de colônia e

o perfil eletroforético de extração de DNA. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. FONTE: O autor.

[129]. FIGURA 10 - ANÁLISE DE SEMELHANÇA PELO CLUSTALW DA SEQUÊNCIA DO GENE DA PROTEÍNA ADAM33 HUMANA (ADAM33) COM A SEQUÊNCIA RECOMBINANTE (AD33-CL04). O clone AD33\_CL04 obtido apresentou a sequência idêntica quando comparado à sequência de referência. FONTE: CLUSTALW.

[126]. FIGURA 11 - DIGESTÃO DO CLONE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO ECORI E O PRODUTO DA PURIFICAÇÃO. A) Pode-se ver o produto da digestão com *EcoRI*. B) O resultado do produto purificado do gel de agarose. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. FONTE: O autor.

[127]. FIGURA 12 - PRODUTO DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA E DNA PLASMIDIAL DO PLASMÍDEO pGM05 DIGERIDO COM *EcoRI*. Observa-se o produto de amplificação por PCR de colônia, MM, é o marcador de massa molecular e em seguida o produto da digestão com o fragmento esperado contendo 631 pb. FONTE: O autor.

[128]. FIGURA 13 - IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS COM O ANTICORPO ANTI HIS -TAG. O western blot foi realizado com os extratos bacterianos da estirpe BL21 Ai (pGM05) induzido e não induzido. Pode-se observar a presença da banda de 27,7 kDa como sendo a proteína ADAM33 recombinante fusionada a cauda His-Tag. FONTE: O autor.

[129]. FIGURA 14 – GRÁFICO DO PRODUTO DE PURIFICAÇÃO E PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS. **A** parte de cima mostra o gráfico obtido do software do Akta e abaixo o gel SDS-PAGE das frações de proteínas eluídas. Purificação de um volume total de 100 mL de cultura usando 1 coluna de 1mL, a purificação ficou adequada, em poucas frações e não precipitada. FONTE: O autor.

[130]. FIGURA 15 - TITULAÇÃO DOS SOROS DOS 4 ANIMAIS POR ELISA DE CAPTURA DE ANTICORPO. Uma alíquota de 0,1 µg de proteína recombinante ADAM33 foi adsorvida em cada poço. Após a adsorção, os

poços foram lavados e bloqueados com caseína. Então, o soro dos animais, assim como, seu respectivo soro pré-imune foi submetido à diluição seriada iniciando na diluição de 1: 800 até chegar em 1:102.400. Absorbância foi lida em 490 nm. Observa-se uma alta absorbância proveniente da reação dos anticorpos provenientes dos soros imunes. Reação não observada quando empregado os soros pré-imunes dos camundongos. Está representado apenas um soro pré-imune, pois, os 4 obtiveram valores próximos de absorbância.

[131]. FIGURA 16 - TESTE DO SORO DO ANIMAL C3 POR WESTERN BLOTTING. O western blot foi realizado com os extratos bacterianos da estirpe BL21 Ai (pGM05) induzido (1) e 25 ng de proteína recombinante purificada(2), pode-se observar a presença da banda de 27,7 kDa como sendo a proteína ADAM33 recombinante. A membrana foi incubada com o soro policlonal do animal imunizado (C3) na diluição de 1: 10.000.

[132]. FIGURA 17 - ESPECTRO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ADAM33: o resultado demonstrou que há 88 % de homologia entre a proteína recombinante e o domínio rico em cisteínas da proteína ADAM33.

[133]. FIGURA 18 - varredura de hibridomas secretores de anticorpos ANTI-ADAM33 recombinante por ELISA.

[134]. FIGURA 19 - WESTERN BLOT DA PROTEÍNA ADAM33 (ACIMA) E PROTEÍNA DE EXPRESSÃO CONSTITUTIVA  $\beta$ -ACTINA (ABAIXO) NAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. 1) MDA-MB-231, 2) MCF7, 3) PMC42, 4) marcador de massa molecular. O experimento foi repetido 3 vezes e sempre apresentou resultados semelhantes. SEQ ID NO 2 e SEQ ID NO 1 como anticorpo primário anti-ADAM33. FONTE: O autor.

[135]. FIGURA 20 – DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL POR ELISA.

[136]. FIGURA 21 – DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL POR WESTERN BLOTTING.

[137]. FIGURA 22 – IDENTIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33. Identificação das regiões de *framework* (FR) e os loops

hipervariáveis (CDRs) H1, H2, H3, L1 L2, e L3: responsáveis pela interação do anticorpo com o antígeno.

[138]. FIGURA 23 – IMUNOHISTOQUÍMICA DOS TUMORES DE MAMA UTILIZANDO O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ADAM33 SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 1: A) CDI: forte marcação positiva para membrana e citoplasma, demonstradas pela cor marrom dessas estruturas. B) CLI: fraca marcação para o anticorpo SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 1 nas regiões do carcinoma lobular invasor em agregados celulares (\*) e em fila indiana (seta).

## REFERÊNCIA

- Biglia, Nicoletta et al. "Increased Incidence of Lobular Breast Cancer in Women Treated with Hormone Replacement Therapy: Implications for Diagnosis, Surgical and Medical Treatment." *Endocrine-related cancer* 14.3 (2007): 549–67. Web. 2 Aug. 2012.
- Brouckaert, O et al. "Prognostic Implications of Lobular Breast Cancer Histology: New Insights from a Single Hospital Cross-Sectional Study and SEER Data." *Breast (Edinburgh, Scotland)* 23.4 (2014): 371–7. Web. 3 July 2014.
- Eroles, Pilar et al. "Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways." *Cancer treatment reviews* 38.6 (2011): 698–707. Web. 18 July 2012.
- Eswaran, Jeyanthi et al. "Transcriptomic Landscape of Breast Cancers through mRNA Sequencing." *Scientific reports* 2 (2012): 264. Web. 13 July 2012.
- Fields, Conor et al. "Creation of Recombinant Antigen-Binding Molecules Derived from Hybridomas Secreting Specific Antibodies." *Nature protocols* 8.6 (2013): 1125–48. Web.
- Gobbi, Helenice. "Classificação Dos Tumores Da Mama: Atualização Baseada Na Nova Classificação Da Organização Mundial Da Saúde de 2012." *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 48.6 (2012): 463–474. Web.
- Huang, Jing, Lance C Bridges, and Judith M White. "Selective Modulation of Integrin-Mediated Cell Migration by Distinct ADAM Family Members □." *Molecular Biology of the Cell* 16.October (2005): 4982–4991. Web.

- Iba, K et al. "Cysteine-Rich Domain of Human ADAM 12 (meltrin Alpha) Supports Tumor Cell Adhesion." *The American journal of pathology* 154.5 (1999): 1489–501. Web.
- Inca. *Estimativa 2012: Incidencia de Cancer No Brasil*. N.p., 2012. Print.
- Kristiansen, Glen, and Christian Pilarsky. "Molecular Pathology of Invasive Lobular Breast Carcinoma." *Breast disease* 30 (2008): 9–14. Web. 25 July 2012.
- Lee, Ju-Hyun et al. "Clinicopathological Features of Infiltrating Lobular Carcinomas Comparing with Infiltrating Ductal Carcinomas: A Case Control Study." *World journal of surgical oncology* 8.January 1984 (2010): 34. Web.
- Lopez-Garcia, Maria a et al. "Breast Cancer Precursors Revisited: Molecular Features and Progression Pathways." *Histopathology* 57.2 (2010): 171–92. Web. 17 July 2012.
- O'Shea, Caroline et al. "Expression of ADAM-9 mRNA and Protein in Human Breast Cancer." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 105.6 (2003): 754–61. Web. 21 Aug. 2012.
- Schuler SL, Gurmini J, Cecílio WA, Viola de Azevedo ML, Olandoski M, de Noronha L. "Hepatic and Thymic Alterations in Newborn Offspring of Malnourished Rat Dams." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 32 (2008): 184–189. Print.
- Seniski, Gerusa G et al. "ADAM33 Gene Silencing by Promoter Hypermethylation as a Molecular Marker in Breast Invasive Lobular Carcinoma." *BMC cancer* 9 (2009): 80. Web. 19 July 2012.
- Sethi, Nilay, and Yibin Kang. "Unravelling the Complexity of Metastasis - Molecular Understanding and Targeted Therapies." *Nature reviews. Cancer* 11.10 (2011): 735–48. Web.
- Simpson, Peter T et al. "Molecular Evolution of Breast Cancer." *The Journal of pathology* 205.2 (2005): 248–54. Web. 25 July 2012.
- Vallejos, Carlos S et al. "Breast Cancer Classification according to Immunohistochemistry Markers: Subtypes and Association with Clinicopathologic Variables in a Peruvian Hospital Database." *Clinical breast cancer* 10.4 (2010): 294–300. Web. 17 July 2012.
- Weigelt, Britta, Felipe C Geyer, and Jorge S Reis-Filho. "Histological Types of Breast Cancer: How Special Are They?" *Molecular oncology* 4.3 (2010):

192–208. Web. 26 July 2012.

Weigelt, Britta, Johannes L Peterse, and Laura J van 't Veer. "Breast Cancer Metastasis: Markers and Models." *Nature reviews. Cancer* 5.8 (2005): 591–602. Web. 19 July 2012.

Wells, Justin M, Jennifer Pipa, and Sandra J Shin. "Lobular Neoplasia of the Breast Revisited with Emphasis on the Role of E-Cadherin Immunohistochemistry." *The American journal of surgical pathology* 38.3 (2014): 434–5. Web.

Yoder, Brian J, Edward J Wilkinson, and Nicole a Massoll. "Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast." *The breast journal* 13.2 (2007): 172–9. Web.

Zheng, Xuguang et al. "ADAM17." *Cancer biol ther* 8.11 (2009): 1045–1054. Print.

## REIVINDICAÇÕES

1.**ANTICORPO MONOCLONAL** anti-ADAM33 **caracterizado por** compreender as sequências SEQ ID N° 01 e SEQ ID N° 02.

2.**ANTICORPO MONOCLONAL** anti-ADAM33: SEQ ID N° 01 e SEQ ID N° 02, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de se ligar especificamente na proteína ADAM33 em linhagens celulares de câncer de mama e em tecido tumoral de mama parafinizado.

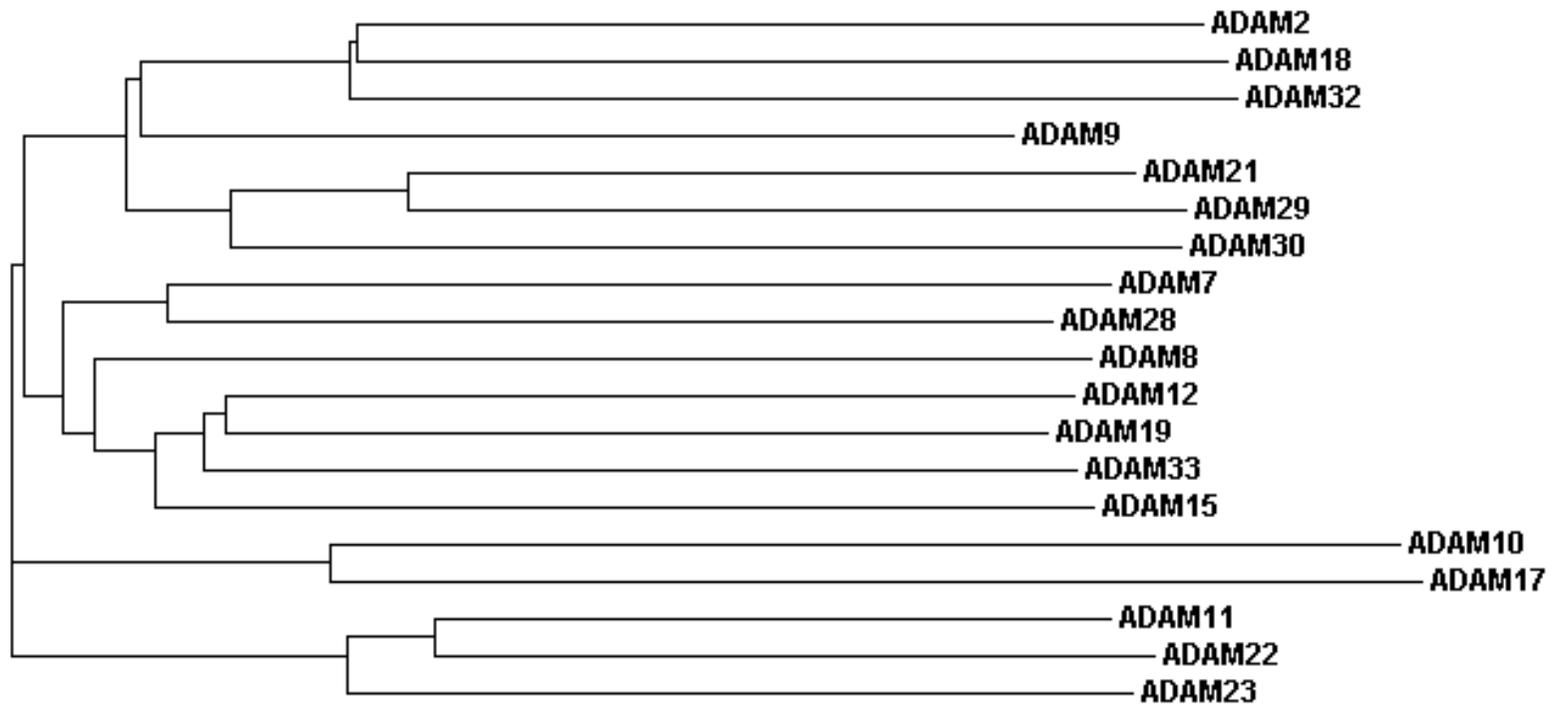
3.**ANTICORPO MONOCLONAL** anti-ADAM33: SEQ ID N° 01 e SEQ ID N° 02, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** western blott pelo fato de se ligar especificamente a proteína ADAM33 recombinante 27,7 KDa, que teve sua identidade confirmada por MALDI-TOF/MS.

4.**ANTICORPO MONOCLONAL** anti-ADAM33: SEQ ID N° 01 e SEQ ID N° 02, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizados pelo** fato de ser específico em linhagens celulares de câncer de mama, que expressam a proteína ADAM33 e não identificar nas linhagens que não expressam a proteína ADAM33.

DESENHOS

Figura 1

Phylogram



## Figura 2

```

ADAM33      MGWRPRRAR-GTPLLLLLLLLLLWVPGAGV-LQGHIPGQPVTPHWVLDGQFWRTVSLEE 58
ADAM12      MAARPLPVSPARALLLALAGALLAPCEARGVSLWNQGRADEVVSASVSGDLWIPVKSFD 60
            *. ** . . .*** * ** * . ** * .: .: *.. * .*: * .*. :

ADAM33      PVSKPDMGLVALEAEGQELLELEKHNRLAPGYIETHYGPDPVVLAPNHT--DHCH 115
ADAM12      SKNHPEVLNIRLQRESKELIINLERNEGLIASSFTETHYLQDGTDVSLARNYTVILGHCY 120
            . .:***: : *: *.:***:***:*. *.*:..: **** ** * ** *: * .** :

ADAM33      YQGRVGRGFPDSWVVLCTCSGMSGLITLSRNASYLRLPWPVPRGSKDFSTHEIFRMEQLLTW 175
ADAM12      YHGHVRYSDSAVSLSTCSGLRGLIVFE-NESYVLEPMKSATNR---YKLFPAKKLSV 175
            *:***:*. * *.***: *..: . * ** *. * . .: .: :*: :*: :

ADAM33      KGTCG-HRDPGNKAGMTSLPGGPQSRGR---REARRTRKYLELYIVADHTLFLTRHRNLN 231
ADAM12      RGSCGSHHNTPNLAAKNVFPFPSQTWARRHKRETLKATKYVELVIVADNREFQRQKDL 235
            :*:** *: .: * * . . :* .*: . * ** : : **:** *****: * : :*: :

ADAM33      HTKQRLLEVANYVDQLLRLTDIQVALTGLEVWTERDRSRVTQDANATLWAFQWRRG-LW 290
ADAM12      KVKQRLIEIANHVDFYRPLNIRIVLVGVEVWVNDMDKCSVSQDPFTSLHEFLDWRKMKLL 295
            . .*****:*.***:***: . * .*:..:*.***: .: . * .***. :*: ***:** : *

ADAM33      AQRPHDSAQLLTGRAFGATVGLAPVEGMCRAESSGGVSTDHSELPIGAAATMAHEIGHS 350
ADAM12      PRKSHDNAQLVSGVYFQGTIGMAPIMSMCTADQSGGIVMDHSDNPLGAAVTLAHELGHN 355
            .:..**.***:* * ***:***: .** *.:***: *****: *:* ***:** .

ADAM33      LGLSHD--PDGCCVEAAAESGGCVMAAATGHFFPRVFSACSRRLRAFFRKGGAACLSNA 408
ADAM12      FGMNHDTLDRGCSCQMAVEKGGCINASTGYFFPMVFSACSRKDLLETSLKGMGVCLFNL 415
            :*:..** ** . : * .*.***:* *:*:*:* ***:***:***: .: .** *.* *

ADAM33      PDPGLPVPPALCGNGFVEAGEECDGPGQECDLCCFAHNCSLRPGAQCAHGDCCVRCLL 468
ADAM12      PEVRESFGGQKCGNRFVEEGEECDGPEECMNRCCNATTCCLKPDAVCAHGLCCEDCQL 475
            *: . . *** ** * ***:** :*: : ** * .*:***: * ** * *

ADAM33      KPAGALCRQAMGDCDLPEFCTGTSSHCPDVYLLDGSPCARGSGYCWGACPTLEQQCQQ 528
ADAM12      KPAGTACRDSNSCDLPEFCTGASPHCPANVYLHDGHSCQDVGICYNGICQTHEQQCVT 535
            ****: ** : . .*****:*.***:***: ** * * . * .***: * * * ****

ADAM33      LWGPGSHPAPEACFQVNSAGDAHNGCGQDSEGHFLPCAGRDALCGKLQCGGKPSLLA 587
ADAM12      LWGPAGKAPAGICFERVNSAGDPYGNCGVSKSSFAKCEMRDAKCGKIQCQGGASRPVIG 595

```

```

*****:*** ** : *****.:****: *:. * * *** **:****** . .:..
ADAM33 PHMVPVDSTVHLD-GQEVTCRGALALPSAQLDLLGLGLVEPGTQCGPRMVCQSRRRCRKNA 646
ADAM12 TNAVSIETNIPLOQGGRIICRGTHVYLGD--DMPDPGLVLAGTKCADGKICLNRCQONIS 653
.: *.:...: * : * .: ***: . . * : . *** .**:* . : * .*:...: :

ADAM33 FQELQRCLTACHSHGVCNSNHCHCAPGWAPPFCDKPGFGGSMDSGPVQAENHDTFLLAM 706
ADAM12 VFGVHECAMQCHGRGVCNNRKNCHCEAHWAPPFCDKFPGFGSTDSGPIRQA----- 704
. :..* **.:****.:***** . ***** ***** ***:;

ADAM33 LLSVLLPLLPAGLAWCCYRLPGAHLQRCSWGCRDPACSGPKDGPDRDHPPLGGVHPMEL 766
ADAM12 -----EARQEAAESNRERG----- 718
. *:..* * . : *

ADAM33 GPTATGQPWPLDPENSHEPSSHPEKPLPAVSPDPQADQVQMPRSCLW 813
ADAM12 ----QGQ----EPVGSQEHAStASLTLI----- 738
** :* .*: * :* .. .*

```

### Figura 3

```

1 GCT GCA CCG GGC ACG GGT CGG CCG CAA TCC AGC CTG GGC GGA GCC 45
1 Ala Ala Pro Gly Thr Gly Arg Pro Gln Ser Ser Leu Gly Gly Ala 15

46 GGA GTT GCG AGC CGC TGC CTA GAG GCC GAG GAG CTC ACA GCT ATC 90
16 Gly Val Ala Ser Arg Cys Leu Glu Ala Glu Glu Leu Thr Ala Met 30

91 GGC TGG AGG CCC CGG AGA GCT CGG GGG ACC CCG TTG CTG CTG CTG 135
31 Gly Trp Arg Pro Arg Arg Ala Arg Gly Thr Pro Leu Leu Leu Leu 45

136 CTA CTA CTG CTG CTG CTC TGG CCA GTG CCA GGC GCC GGG GTG CTT 180
46 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp Pro Val Pro Gly Ala Gly Val Leu 60

181 CAA GGA CAT ATC CCT GGG CAG CCA GTC ACC CCG CAC TGG GTC CTG 225
61 Gln Gly His Ile Pro Gly Gln Pro Val Thr Pro His Trp Val Leu 75

226 GAT GGA CAA CCC TGG CGC ACC GTC AGC CTG GAG GAG CCG GTC TCG 270
76 Asp Gly Gln Pro Trp Arg Thr Val Ser Leu Glu Glu Pro Val Ser 90

271 AAG CCA GAC ATG GGG CTG GTG GCC CTG GAG GCT GAA GGC CAG GAG 315

```

91	Lys Pro Asp Met Gly Leu Val Ala Leu Glu Ala Glu Gly Gln Glu	105
316	CTC CTG CTT GAG CTG GAG AAG AAC CAC AGG CTG CTG GCC CCA GGA	360
106	Leu Leu Leu Glu Leu Glu Lys Asn His Arg Leu Leu Ala Pro Gly	120
361	TAC ATA GAA ACC CAC TAC GGC CCA GAT GGG CAG CCA GTG GTG CTG	405
121	Tyr Ile Glu Thr His Tyr Gly Pro Asp Gly Gln Pro Val Val Leu	135
406	GCC CCC AAC CAC ACG GAT CAT TGC CAC TAC CAA GGG CGA GTA AGG	450
136	Ala Pro Asn His Thr Asp His Cys His Tyr Gln Gly Arg Val Arg	150
451	GGC TTC CCC GAC TCC TGG GTA GTC CTC TGC ACC TGC TCT GGG ATG	495
151	Gly Phe Pro Asp Ser Trp Val Val Leu Cys Thr Cys Ser Gly Met	165
496	AGT GGC CTG ATC ACC CTC AGC AGG AAT GCC AGC TAT TAT CTG CGT	540
166	Ser Gly Leu Ile Thr Leu Ser Arg Asn Ala Ser Tyr Tyr Leu Arg	180
541	CCC TGG CCA CCC CGG GGC TCC AAG GAC TTC TCA ACC CAC GAG ATC	585
181	Pro Trp Pro Pro Arg Gly Ser Lys Asp Phe Ser Thr His Glu Ile	195
586	TTT CGG ATG GAG CAG CTG CTC ACC TGG AAA GGA ACC TGT GGC CAC	630
196	Phe Arg Met Glu Gln Leu Leu Thr Trp Lys Gly Thr Cys Gly His	210
631	AGG GAT CCT GGG AAC AAA GCG GGC ATG ACC AGC CTT CCT GGT GGT	675
211	Arg Asp Pro Gly Asn Lys Ala Gly Met Thr Ser Leu Pro Gly Gly	225
676	CCC CAG AGC AGG GGC AGG CGA GAA GCG CGC AGG ACC CGG AAG TAC	720
226	Pro Gln Ser Arg Gly Arg Arg Glu Ala Arg Arg Thr Arg Lys Tyr	240
721	CTG GAA CTG TAC ATT GTG GCA GAC CAC ACC CTG TTC TTG ACT CGG	765
241	Leu Glu Leu Tyr Ile Val Ala Asp His Thr Leu Phe Leu Thr Arg	255
766	CAC CGA AAC TTG AAC CAC ACC AAA CAG CGT CTC CTG GAA GTC GCC	810
256	His Arg Asn Leu Asn His Thr Lys Gln Arg Leu Leu Glu Val Ala	270
811	AAC TAC GTG GAC CAG CTT CTC AGG ACT CTG GAC ATT CAG GTG GCG	855
271	Asn Tyr Val Asp Gln Leu Leu Arg Thr Leu Asp Ile Gln Val Ala	285
856	CTG ACC GGC CTG GAG GTG TGG ACC GAG CGG GAC CGC AGC CGC GTC	900
286	Leu Thr Gly Leu Glu Val Trp Thr Glu Arg Asp Arg Ser Arg Val	300
901	ACG CAG GAC GCC AAC GCC ACG CTC TGG GCC TTC CTG CAG TGG CGC	945
301	Thr Gln Asp Ala Asn Ala Thr Leu Trp Ala Phe Leu Gln Trp Arg	315

946	CGG GGG CTG TGG GCG CAG CGG CCC CAC GAC TCC GCG CAG CTG CTC	990
316	Arg Gly Leu Trp Ala Gln Arg Pro His Asp Ser Ala Gln Leu Leu	330
991	ACG GGC CGC GCC TTC CAG GGC GCC ACA GTG GGC CTG GCG CCC GTC	1035
331	Thr Gly Arg Ala Phe Gln Gly Ala Thr Val Gly Leu Ala Pro Val	345
1036	GAG GGC ATG TGC CGC GCC GAG AGC TCG GGA GGC GTG AGC ACG GAC	1080
346	Glu Gly Met Cys Arg Ala Glu Ser Ser Gly Gly Val Ser Thr Asp	360
1081	CAC TCG GAG CTC CCC ATC GGC GCC GCA GCC ACC ATG GCC CAT GAG	1125
361	His Ser Glu Leu Pro Ile Gly Ala Ala Ala Thr Met Ala His Glu	375
1126	ATC GGC CAC AGC CTC GGC CTC AGC CAC GAC CCC GAC GGC TGC TGC	1170
376	Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Ser His Asp Pro Asp Gly Cys Cys	390
1171	GTG GAG GCT GCG GCC GAG TCC GGA GGC TGC GTC ATG GCT GCG GCC	1215
391	Val Glu Ala Ala Ala Glu Ser Gly Gly Cys Val Met Ala Ala Ala	405
1216	ACC GGG CAC CCG TTT CCG CGC GTG TTC AGC GCC TGC AGC CGC CGC	1260
406	Thr Gly His Pro Phe Pro Arg Val Phe Ser Ala Cys Ser Arg Arg	420
1261	CAG CTG CGC GCC TTC TTC CGC AAG GGG GGC GGC GCT TGC CTC TCC	1305
421	Gln Leu Arg Ala Phe Phe Arg Lys Gly Gly Gly Ala Cys Leu Ser	435
1306	AAT GCC CCG GAC CCC GGA CTC CCG GTG CCG CCG GCG CTC TGC GGG	1350
436	Asn Ala Pro Asp Pro Gly Leu Pro Val Pro Pro Ala Leu Cys Gly	450
1351	AAC GGC TTC GTG GAA GCG GGC GAG GAG TGT GAC TGC GGC CCT GGC	1395
451	Asn Gly Phe Val Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Pro Gly	465
1396	CAG GAG TGC CGC GAC CTC TGC TGC TTT GCT CAC AAC TGC TCG CTG	1440
466	Gln Glu Cys Arg Asp Leu Cys Cys Phe Ala His Asn Cys Ser Leu	480
1441	CGC CCG GGG GCC CAG TGC GCC CAC GGG GAC TGC TGC GTG CGC TGC	1485
481	Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala His Gly Asp Cys Cys Val Arg Cys	495
1486	CTG CTG AAG CCG GCT GGA GCG CTG TGC CGC CAG GCC ATG GGT GAC	1530
496	Leu Leu Lys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Gln Ala Met Gly Asp	510
1531	TGT GAC CTC CCT GAG TTT TGC ACG GGC ACC TCC TCC CAC TGT CCC	1575
511	Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr Gly Thr Ser Ser His Cys Pro	525

1576	CCA	GAC	GTT	TAC	CTA	CTG	GAC	GGC	TCA	CCC	TGT	GCC	AGG	GGC	AGT	1620
526	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	540
1621	GGC	TAC	TGC	TGG	GAT	GGC	GCA	TGT	CCC	ACG	CTG	GAG	CAG	CAG	TGC	1665
541	Gly	Tyr	Cys	Trp	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Thr	Leu	Glu	Gln	Gln	Cys	555
1666	CAG	CAG	CTC	TGG	GGG	CCT	GGC	TCC	CAC	CCA	GCT	CCC	GAG	GCC	TGT	1710
556	Gln	Gln	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Ser	His	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Cys	570
1711	TTC	CAG	GTG	GTG	AAC	TCT	GCG	GGA	GAT	GCT	CAT	GGA	AAC	TGC	GGC	1755
571	Phe	Gln	Val	Val	Asn	Ser	Ala	Gly	Asp	Ala	His	Gly	Asn	Cys	Gly	585
1756	CAG	GAC	AGC	GAG	GGC	CAC	TTC	CTG	CCC	TGT	GCA	GGG	AGG	GAT	GCC	1800
586	Gln	Asp	Ser	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Pro	Cys	Ala	Gly	Arg	Asp	Ala	600
1801	CTG	TGT	GGG	AAG	CTG	CAG	TGC	CAG	GGT	GGA	AAG	CCC	AGC	CTG	CTC	1845
601	Leu	Cys	Gly	Lys	Leu	Gln	Cys	Gln	Gly	Gly	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	615
1846	GCA	CCG	CAC	ATG	GTG	CCA	GTG	GAC	TCT	ACC	GTT	CAC	CTA	GAT	GGC	1890
616	Ala	Pro	His	Met	Val	Pro	Val	Asp	Ser	Thr	Val	His	Leu	Asp	Gly	630
1891	CAG	GAA	GTG	ACT	TGT	CGG	GGA	GCC	TTG	GCA	CTC	CCC	AGT	GCC	CAG	1935
631	Gln	Glu	Val	Thr	Cys	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Pro	Ser	Ala	Gln	645
1936	CTG	GAC	CTG	CTT	GGC	CTG	GGC	CTG	GTA	GAG	CCA	GGC	ACC	CAG	TGT	1980
646	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Thr	Gln	Cys	660
1981	GGA	CCT	AGA	ATG	GTG	TGC	CAG	AGC	AGG	CGC	TGC	AGG	AAG	AAT	GCC	2025
661	Gly	Pro	Arg	Met	Val	Cys	Gln	Ser	Arg	Arg	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	675
2026	TTC	CAG	GAG	CTT	CAG	CGC	TGC	CTG	ACT	GCC	TGC	CAC	AGC	CAC	GGG	2070
676	Phe	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Cys	Leu	Thr	Ala	Cys	His	Ser	His	Gly	690
2071	GTT	TGC	AAT	AGC	AAC	CAT	AAC	TGC	CAC	TGT	GCT	CCA	GGC	TGG	GCT	2115
691	Val	Cys	Asn	Ser	Asn	His	Asn	Cys	His	Cys	Ala	Pro	Gly	Trp	Ala	705
2116	CCA	CCC	TTC	TGT	GAC	AAG	CCA	GGC	TTT	GGT	GGC	AGC	ATG	GAC	AGT	2160
706	Pro	Pro	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro	Gly	Phe	Gly	Gly	Ser	Met	Asp	Ser	720
2161	GGC	CCT	GTG	CAG	GCT	GAA	AAC	CAT	GAC	ACC	TTC	CTG	CTG	GCC	ATG	2205
721	Gly	Pro	Val	Gln	Ala	Glu	Asn	His	Asp	Thr	Phe	Leu	Leu	Ala	Met	735

2206	CTC	CTC	AGC	GTC	CTG	CTG	CCT	CTG	CTC	CCA	GGG	GCC	GGC	CTG	GCC	2250
736	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	750
2251	TGG	TGT	TGC	TAC	CGA	CTC	CCA	GGA	GCC	CAT	CTG	CAG	CGA	TGC	AGC	2295
751	Trp	Cys	Cys	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Ala	His	Leu	Gln	Arg	Cys	Ser	765
2296	TGG	GGC	TGC	AGA	AGG	GAC	CCT	GCG	TGC	AGT	GGC	CCC	AAA	GAT	GGC	2340
766	Trp	Gly	Cys	Arg	Arg	Asp	Pro	Ala	Cys	Ser	Gly	Pro	Lys	Asp	Gly	780
2341	CCA	CAC	AGG	GAC	CAC	CCC	CTG	GGC	GGC	GTT	CAC	CCC	ATG	GAG	TTG	2385
781	Pro	His	Arg	Asp	His	Pro	Leu	Gly	Gly	Val	His	Pro	Met	Glu	Leu	795
2386	GGC	CCC	ACA	GCC	ACT	GGA	CAG	CCC	TGG	CCC	CTG	GAC	CCT	GAG	AAC	2430
796	Gly	Pro	Thr	Ala	Thr	Gly	Gln	Pro	Trp	Pro	Leu	Asp	Pro	Glu	Asn	810
2431	TCT	CAT	GAG	CCC	AGC	AGC	CAC	CCT	GAG	AAG	CCT	CTG	CCA	GCA	GTC	2475
811	Ser	His	Glu	Pro	Ser	Ser	His	Pro	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Ala	Val	825
2476	TCG	CCT	GAC	CCC	CAA	GCA	GAT	CAA	GTC	CAG	ATG	CCA	AGA	TCC	TGC	2520
826	Ser	Pro	Asp	Pro	Gln	Ala	Asp	Gln	Val	Gln	Met	Pro	Arg	Ser	Cys	840
2521	CTC	TGG	TGA													
841	Leu	Trp	End													

Figura 4

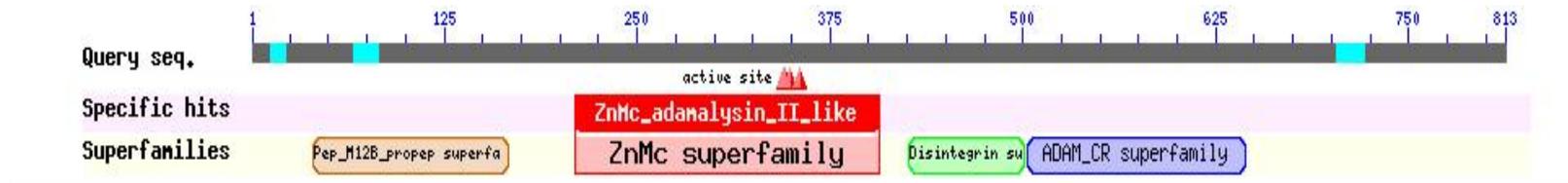


Figura 5

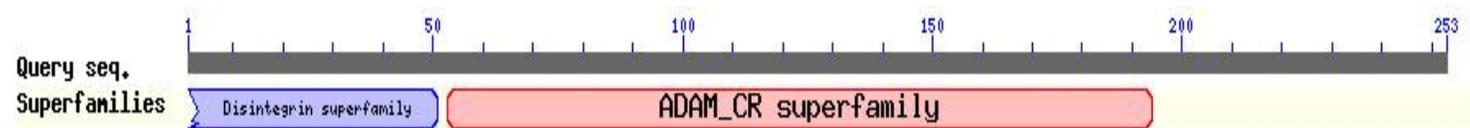


Figura 6

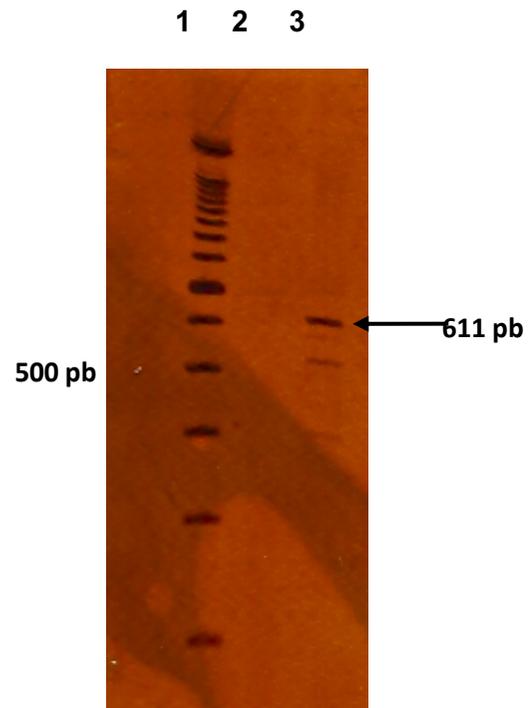


Figura 7

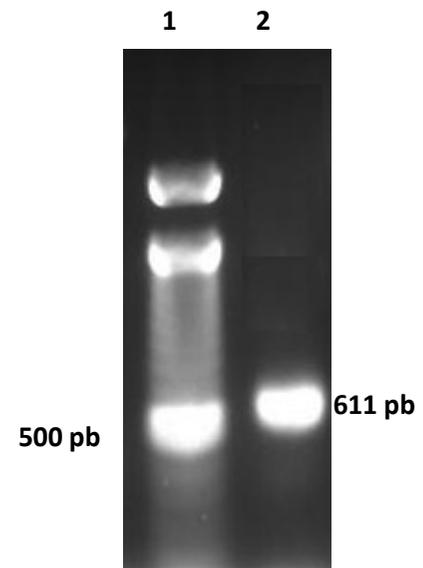


Figura 8

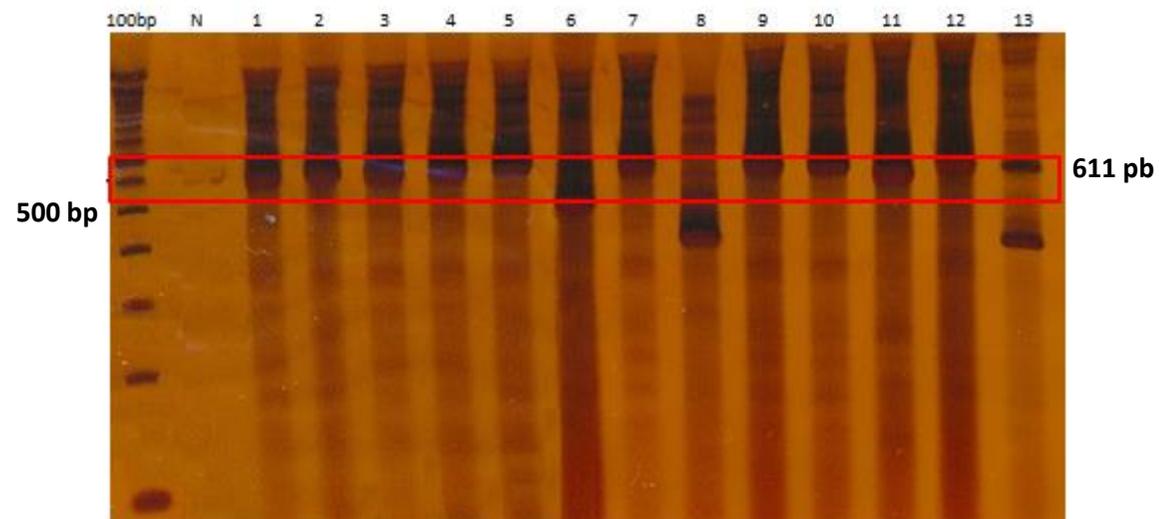


Figura 9

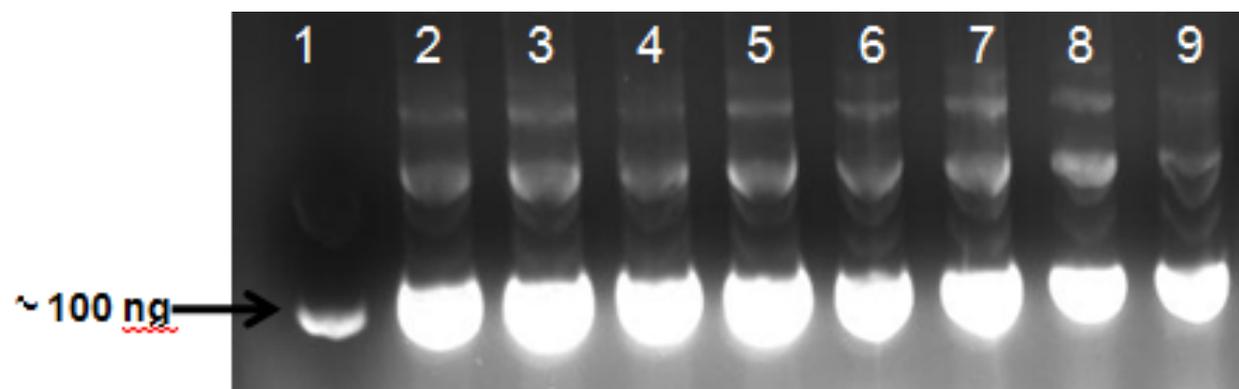


Figura 10

```

ADAM33 -----GATTACCTACTGGACGG 17
AD33_CL04 TCCGGGAATGCTCTGTCCGGCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTACCTACTGGACGG 60
          *****

ADAM33 CTCACCCTGTGCCAGGGGCAGTGGCTACTGCTGGGATGGCGCATGTCCCACGCTGGAGCA 77
AD33_CL04 CTCACCCTGTGCCAGGGGCAGTGGCTACTGCTGGGATGGCGCATGTCCCACGCTGGAGCA 120
          *****

ADAM33 GCAGTGCCAGCAGCTCTGGGGGCTGGCTCCCACCCAGCTCCCGAGGCCTGTTTCCAGGT 137
AD33_CL04 GCAGTGCCAGCAGCTCTGGGGGCTGGCTCCCACCCAGCTCCCGAGGCCTGTTTCCAGGT 180
          *****

ADAM33 GGTGAACTCTGCGGGAGATGCTCATGGAACTGCGGCCAGGACAGCGAGGGCCACTTCCT 197
AD33_CL04 GGTGAACTCTGCGGGAGATGCTCATGGAACTGCGGCCAGGACAGCGAGGGCCACTTCCT 240
          *****

ADAM33 GCCCTGTGCAGGGAGGGATGCCCTGTGTGGGAAGCTGCAGTGCCAGGGTGGAAAGCCCAG 257
AD33_CL04 GCCCTGTGCAGGGAGGGATGCCCTGTGTGGGAAGCTGCAGTGCCAGGGTGGAAAGCCCAG 300
          *****

ADAM33 CCTGCTCGCACCCGCACATGGTGCCAGTGGACTCTACCGTTCACCTAGATGGCCAGGAAGT 317
AD33_CL04 CCTGCTCGCACCCGCACATGGTGCCAGTGGACTCTACCGTTCACCTAGATGGCCAGGAAGT 360
          *****

ADAM33 GACTTGTCGGGGAGCCTTGGCACTCCCCAGTGCCAGCTGGACCTGCTTGGCCTGGGCCT 377
AD33_CL04 GACTTGTCGGGGAGCCTTGGCACTCCCCAGTGCCAGCTGGACCTGCTTGGCCTGGGCCT 420
          *****

ADAM33 GGTAGAGCCAGGCACCCAGTGTGGACCTAGAATGGTGTGCCAGAGCAGGCGCTGCAGGA 436
AD33_CL04 GGTAGAGCCAGGCACCCAGTGTGGACCTAGAATGGTGTGCCAGAGCAGGCGCTGCAGGA 480
          *****

ADAM33 AGAATGCC TTCCAGGAGCTTCAGCGCTGCCTGACTGCCTGCCACAGCCACGGGGTTTGCA 496
AD33_CL04 AGAATGCC TTCCAGGAGCTTCAGCGCTGCCTGACTGCCTGCCACAGCCACGGGGTTTGCA 540
          *****

ADAM33 ATAGCAACCATAACTGCCACTGTGCTCCAGGCTGGGCTCCACCCTTCTGTGACAAGCCAG 556
AD33_CL04 ATAGCAACCATAACTGCCACTGTGCTCCAGGCTGGGCTCCACCCTTCTGTGACAAGCCAG 599
    
```

```
*****  
ADAM33      GCTTTGGTGGCAGCATGGACAGTGGCCCTGTGCAGGCTGAAAACCATGACACCTTCCTGC 616  
AD33_CL04   GCTTTGGTGGCAGCATG----- 616  
*****  
  
ADAM        ATCACTAGTGAATTC 631  
AD33_CL04   -----
```

Figura 11

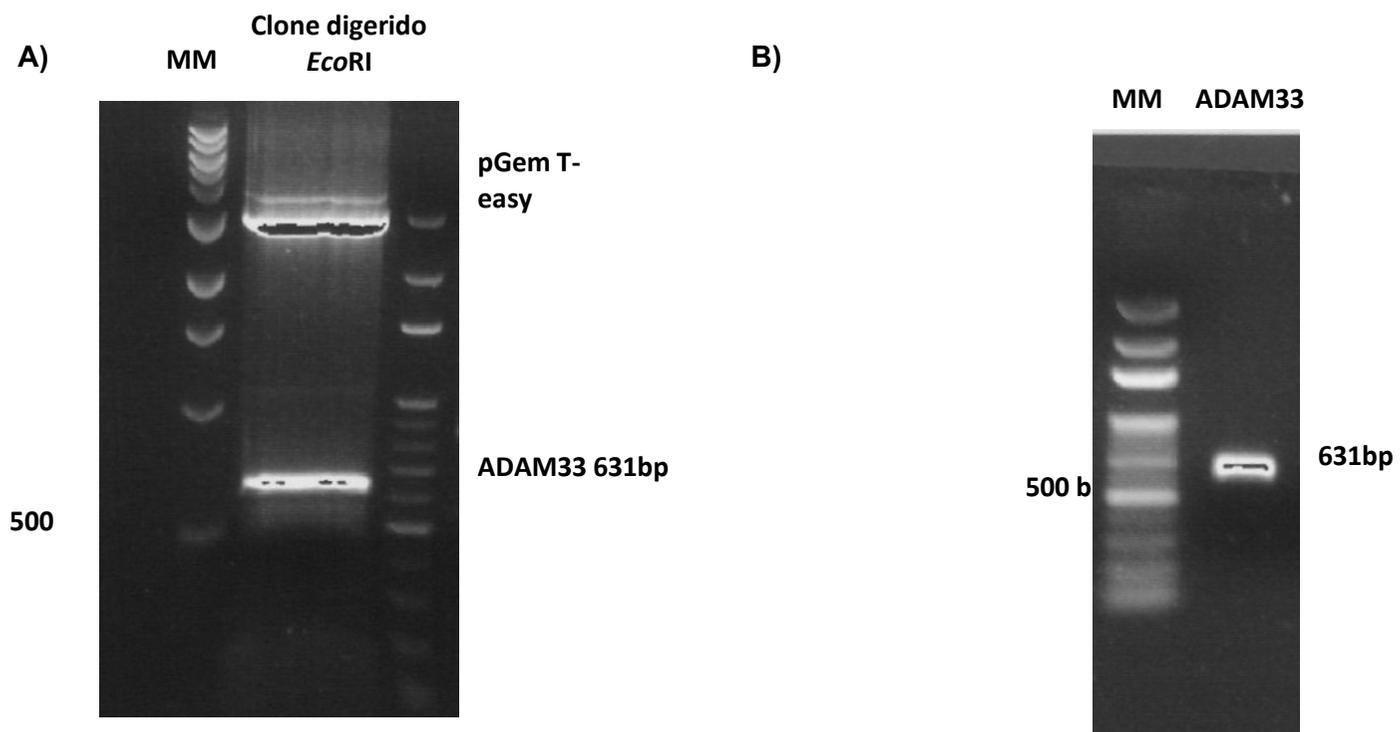


Figura 12

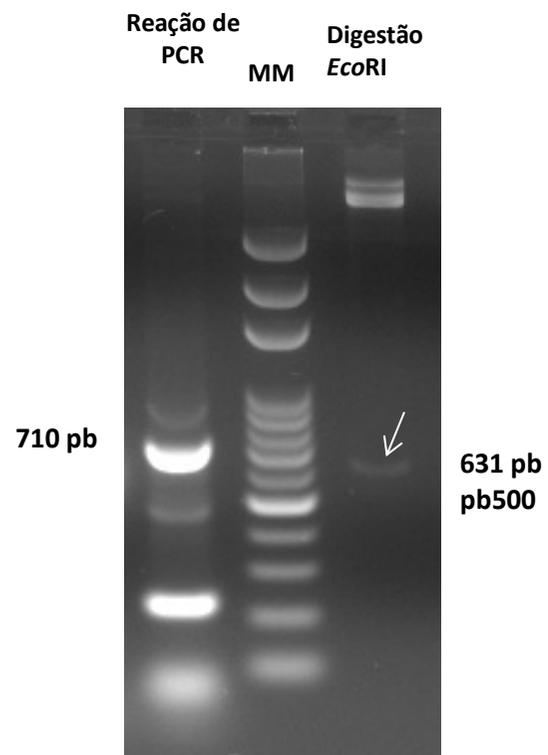


Figura 13

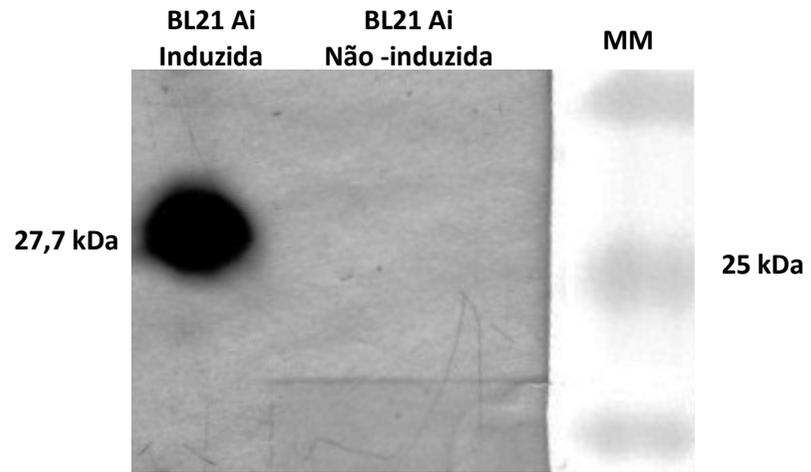


Figura 14

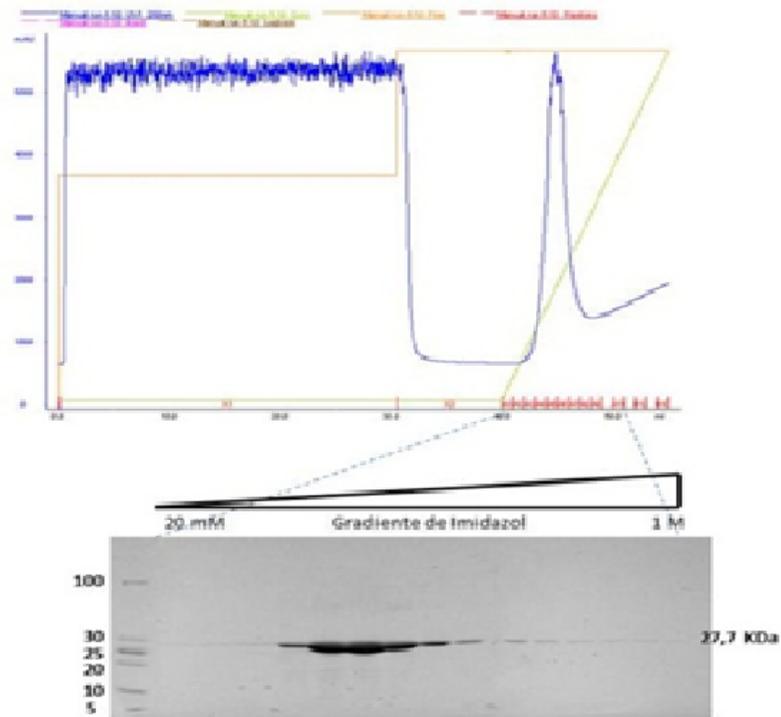


Figura 15

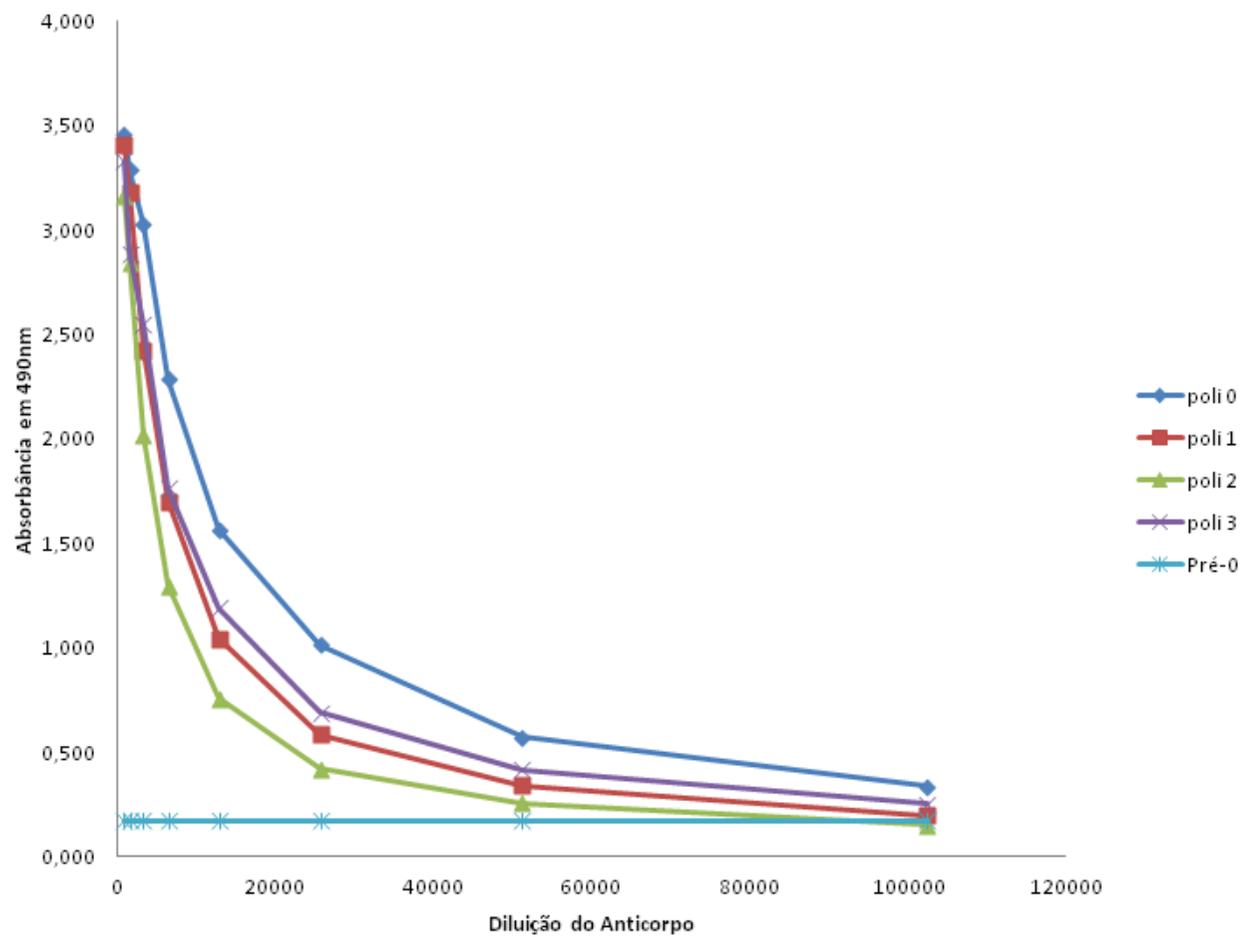


Figura 16

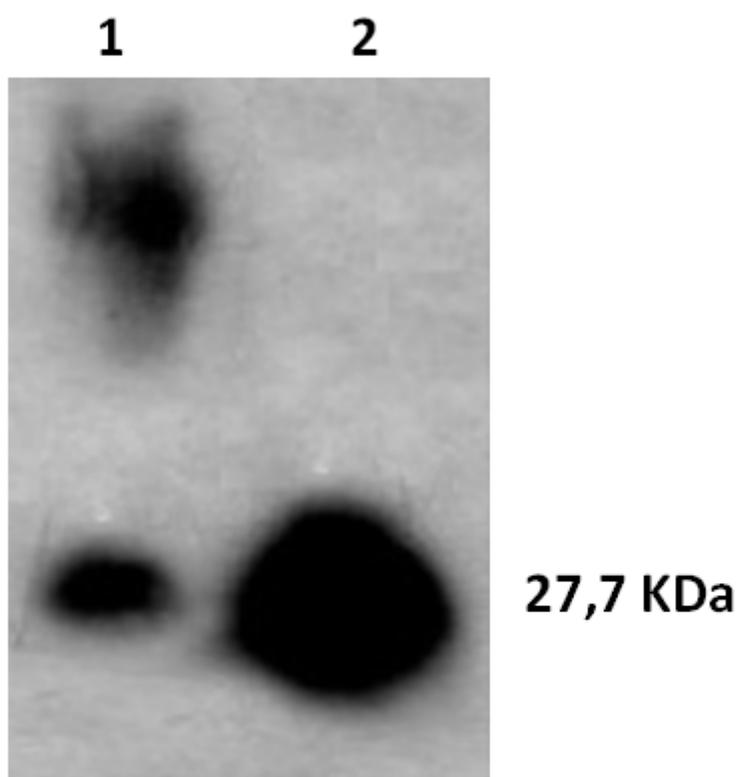


Figura 17

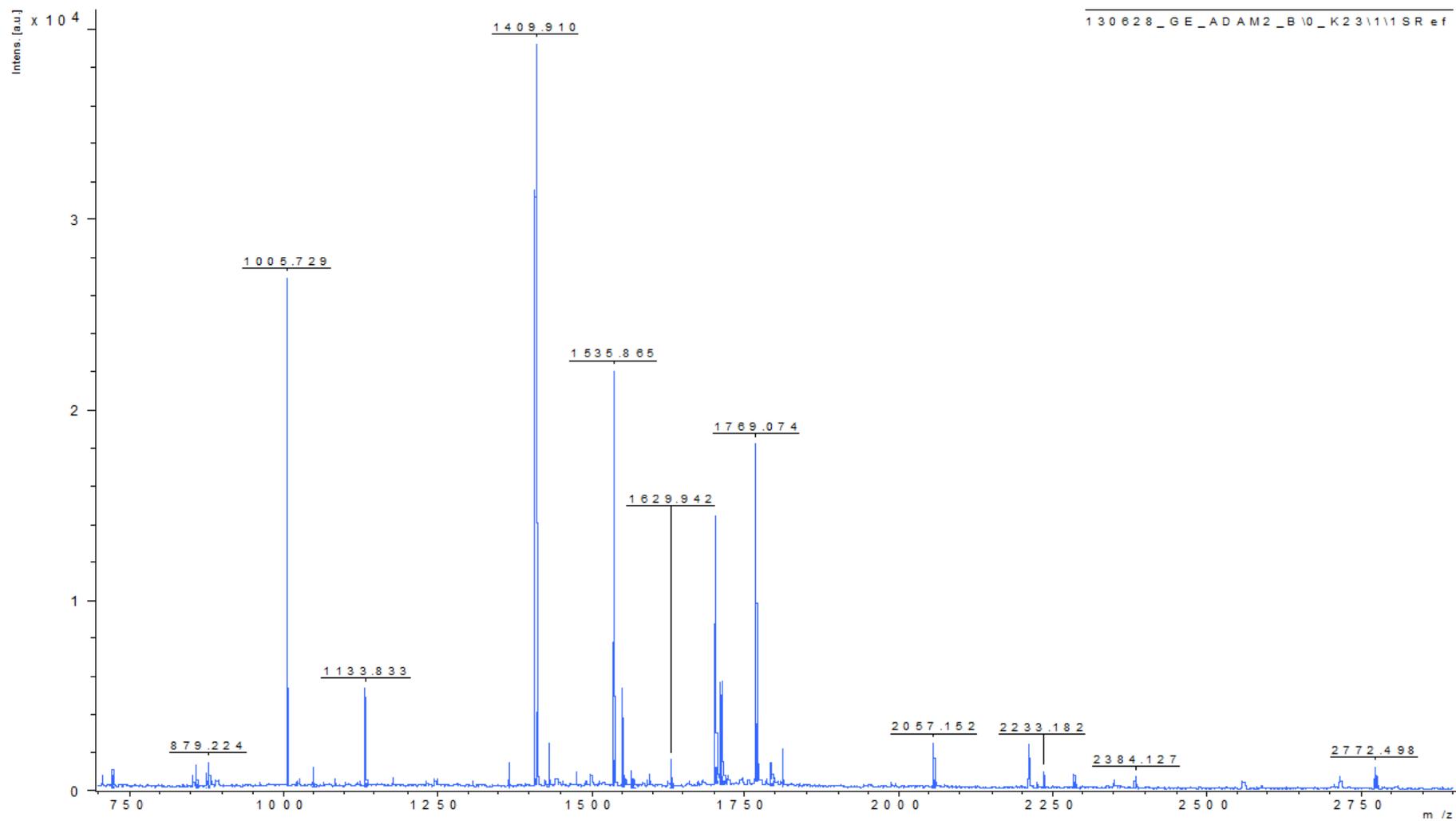


Figura 18

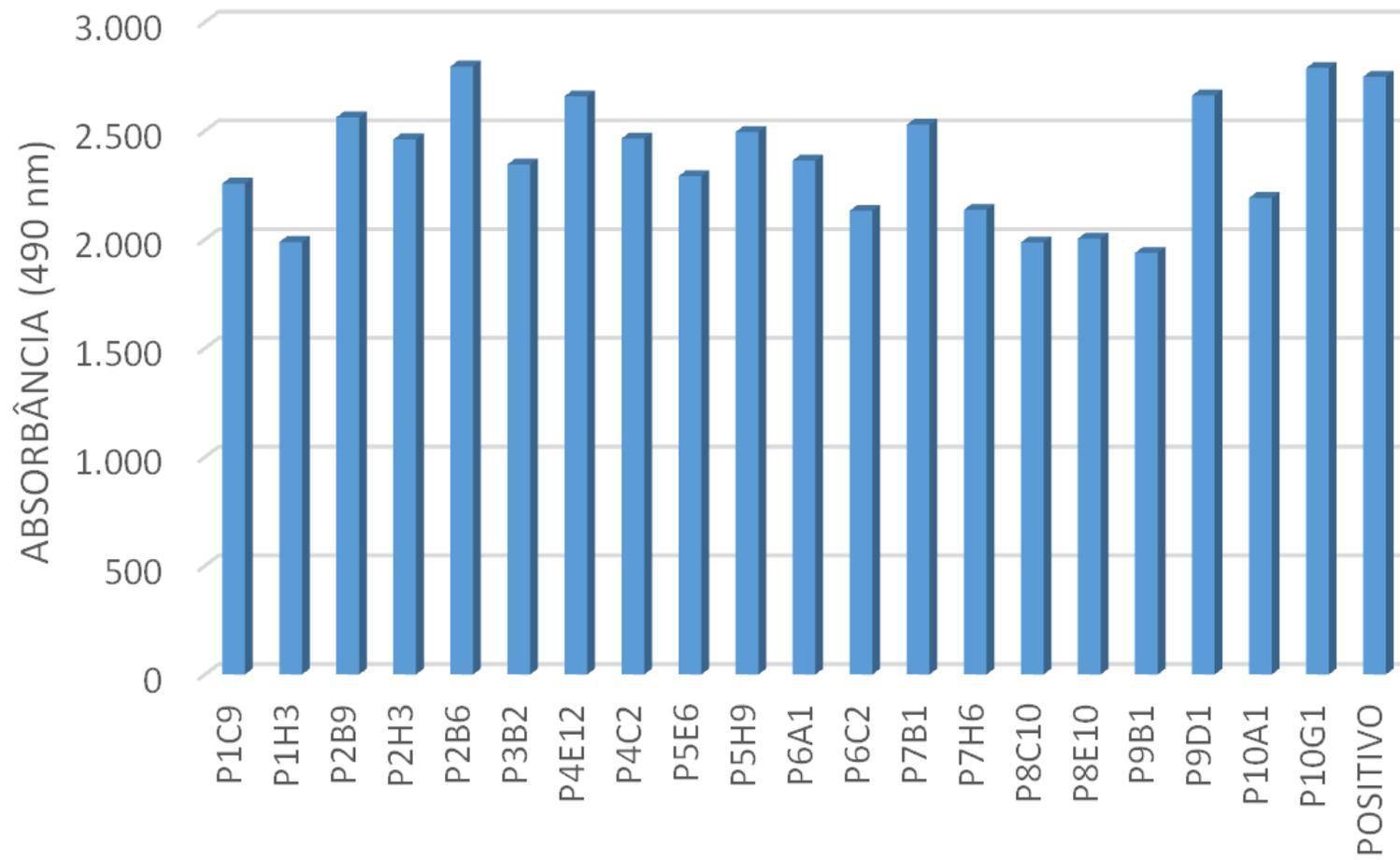


Figura 19

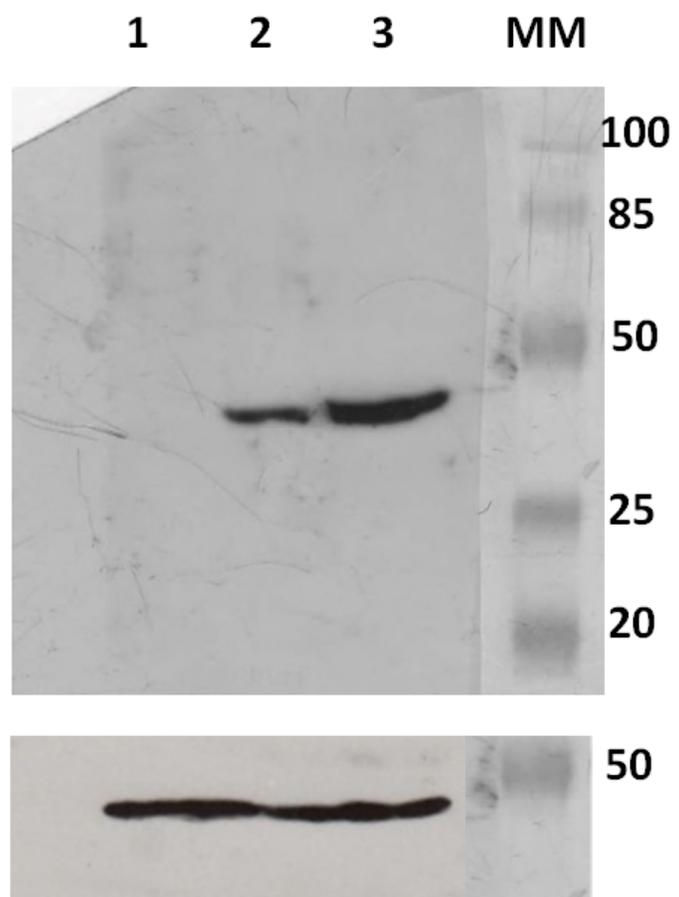


Figura 20

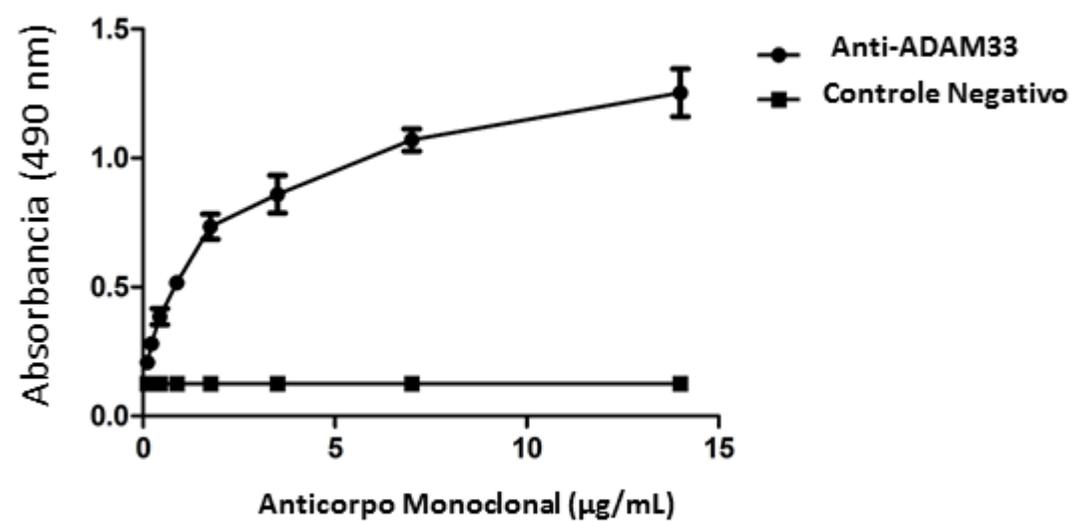


Figura 21

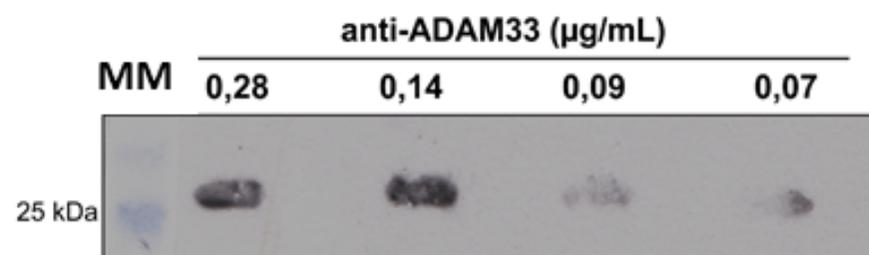


Figura 22

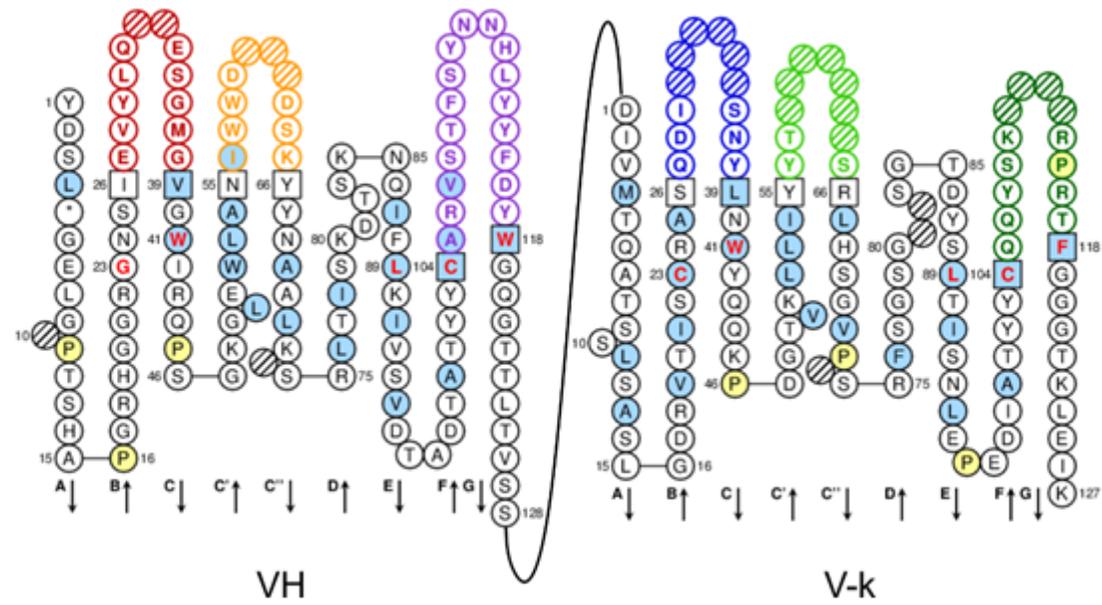


Figura 23

