



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
LÍVIA GUAPYASSÚ SIQUEIRA

**PRODUÇÃO DE SORO ANTI-INIBINA PARA ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM
CAMUNDONGOS**

Rio de Janeiro

2019

LÍVIA GUAPYASSÚ SIQUEIRA

**PRODUÇÃO DE SORO ANTI-INIBINA PARA ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão do Mestrado
Profissional do Programa de Pós-
Graduação em de Pesquisa Biomédica,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientador: Marcel Frajblat

Rio de Janeiro

2019

GS618p Guapyassú Siqueira, Livia
PRODUÇÃO DE SORO ANTI-INIBINA PARA ESTIMULAÇÃO
OVARIANA EM CAMUNDONGOS / Livia Guapyassú Siqueira.
-- Rio de Janeiro, 2019.
61 f.

Orientador: Marcel Frajblat.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Programa de Mestrado Profissional em Formação
para Pesquisa Biomédica, 2019.

1. Inibina. 2. Soro imune. 3. Hiperovulação. 4.
camundongo. 5. embriões. I. Frajblat, Marcel,
orient. II. Título.

CIP - Catalogação na Publicação

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

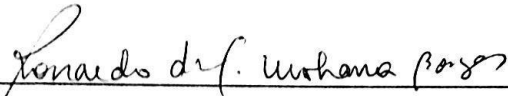
"PRODUÇÃO DE SORO ANTI-INIBINA PARA ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM CAMUNDONGOS".

LÍVIA GUAPYASSÚ SIQUEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

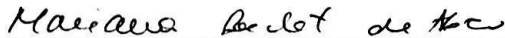
Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2019.



DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



DR. MARCEL FRAJBLAT (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTORA – UFRJ) – REVISORA



DR. MARCIUS DA SILVA ALMEIDA (DOUTOR – UFRJ)



DR. ROBSON COUTINHO SILVA (DOUTOR – UFRJ)



DRA. ROSSIANE CLAUDIA VOMMARO (DOUTORA – UFRJ)

Agradecimentos

Sou muito grata por mais essa conquista na minha vida, mais uma etapa vencida. Gratidão pela minha vida, pelas oportunidades e por todo apoio que recebi durante essa jornada.

Meu muito obrigada à Universidade Federal do Rio de Janeiro, que por muitos anos me acolheu. Ao seu corpo docente que, apesar de todas as dificuldades, demonstrou estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino. Todos de alguma forma ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje.

Agradeço ao Prof. Marcel pela sua orientação, apoio e paciência. Principalmente por acreditar no meu potencial mesmo quando eu duvidava.

Meu muito obrigada aos pesquisadores da PAB por se mostrarem sempre dispostos a ajudar e tirar minhas dúvidas. Em especial a Prof^a. Kátia que se dispôs a me ajudar de forma ativa e colaborar sempre de bom grado. Ao prof. Giovanni que mesmo a distância, me deu todo o suporte durante o projeto.

Obrigada aos colegas do LAT pelos momentos de descontração e companheirismo. Aos colegas Priscila, Carol, Jéssica e Luiz que acompanharam durante o meu projeto, me aconselharam e se dispuseram a ajudar sempre. Obrigada Isabel pelo suporte, conselhos e por me dar força pra seguir firme.

Agradeço às minhas colegas de trabalho que presenciaram os últimos meses do meu mestrado e deram todo o suporte. Obrigada Thelma por compreender o processo pelo qual eu estava passando. Obrigada Jéssica pelo suporte técnico e por estar sempre disponível para ajudar.

Minha gratidão eterna aos meus pais, que foram e sempre serão a minha base. À minha irmã e minhas tias, que mesmo estando a muitos quilômetros de distância sempre estiveram junto de mim e torcendo por cada passo meu.

Obrigada Bruno, por ser tão companheiro. Sua presença me acalma, faz eu me manter firme nos meus propósitos e acreditar que sou capaz.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita" **Mahatma Gandhi**

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de produzir um soro anti-inibina (IAS) para a hiperestimulação ovariana de camundongos. O IAS é capaz de aumentar a produção de oócitos e embriões por fêmea estimulada. Foi demonstrado que a utilização de um soro anti-inibina (IAS) promove o desenvolvimento folicular através do aumento do nível de hormônio folículo estimulante e aumento na produção de embriões. O trabalho foi desenvolvido em três etapas principais. A primeira etapa consistiu na escolha da sequência da proteína, utilizada como antígeno, e a produção do peptídeo. A segunda etapa consistiu na inoculação do peptídeo em coelhos para a produção de anticorpos contra a porção de interesse da proteína inibina. Durante a terceira etapa foram desenvolvidos testes para verificar a eficácia da produção do anticorpo. A primeira tentativa de produção própria do IAS não apresentou produção significativa de anticorpo. Uma adaptação do protocolo original permitiu uma produção satisfatória do anticorpo anti-inibina. O peptídeo desenvolvido na primeira etapa do processo foi enviado para uma empresa especializada na produção de anticorpo, conjugado a uma proteína carreadora e utilizado para a produção do anticorpo. O anticorpo produzido durante o presente trabalho será testado quanto a sua eficiência no bloqueio da inibina. E futuramente, será utilizado na produção de um produto próprio para estimulação ovariana de camundongos. O sucesso da aplicação desse novo protocolo é essencial para uma produção mais eficiente de embriões e óvulos, para redução de custos na compra de insumos semelhantes e, principalmente, para uma redução do número de animais utilizados nos protocolos tradicionais de produção de embriões.

Palavras- chave: Hiperovulação, Inibina, soro imune, camundongo, oócitos, produção de embriões, biotério de criação, linhagens de camundongo.

ABSTRACT

The present study was conducted to produce the inhibin antisera for ovarian hyperstimulation. The inhibin antisera produced will be capable of significantly improve oocyte and embryo production. The use of an anti-inhibin serum (IAS) has been shown to promote follicular development by increasing the level of follicle stimulating hormone and increasing embryo production. This work was developed in three main stages. The first step consisted in choosing the protein sequence used as an antigen and producing the peptide. The second step consisted of inoculating the peptide in rabbits to produce antibodies against the inhibin sequence. During the third stage tests were developed to verify the effectiveness of antibody production. The first attempt at IAS own production did not show significant antibody production. An adaptation of the original protocol allowed satisfactory production of the anti-inhibin antibody. The peptide developed in the first step of the process was sent to a company specializing in antibody production, conjugated to a carrier protein and used for antibody production. The antibody produced during this present work will be tested for its inhibin blocking efficiency. And in the future, it will be used to produce its own mouse ovarian stimulation product. The successful application of this new protocol is essential for more efficient embryo and egg production, cost reduction in the purchase of similar products, and especially for a reduction in the number of animals used in traditional embryo production protocols.

Keywords: Hyperovulation, Inhibin antiserum, mice, oocytes, embryo production, mouse strains, mouse repository.

Abreviações

Cas-9 - *CRISPR associated protein 9*

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*

eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

IAS- *Inhibin antiserum* (Soro Anti-inibina)

Ig – Imunoglobulina

KLH - *Keyhole limpet hemocyanin* (Hemocianina de molusco)

LAT – Laboratório de Animais Transgênicos

LH – Hormônio Luteinizante

PBS - Tampão fosfato com salina

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

SPF - Animais Livres de Patogênicos Específicos (Specific Pathogen Free)

TGF- β - *transforming growth factor beta*

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Áreas nas quais embriões e gametas de camundongo são utilizados.	5
Figura 2. O ciclo estral do roedor.....	11
Figura 3 Método tradicional de superovulação em camundongos.....	13
Figura 4. Esquema representando a ação da Inibina no organismo	18
Figura 5. Taxas de produção de oócitos e embriões nos diferentes protocolos	20
Figura 6. Resposta dos anticorpos após imunização.....	22
Figura 7. Sistema acoplado de seringas de vidro	27
Figura 8. Esquema representando o protocolo de imunização utilizado.....	28
Figura 9. Esquema representando o experimento de DotBlot	29
Figura 10. Comparação das sequencias de aminoácidos da inibina	33
Figura 11. Grau de pureza do peptídeo avaliado através de espectrometria de massas	34
Figura 12. Análise por DotBlot da presença do anticorpo anti-inibina.....	36

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Variação das linhagens quanto sua resposta à estimulação hormonal. Fonte 15

Tabela 2. Custo da aplicação do protocolo de hiperestimulação com soro anti-inibina 39

Sumário

Página

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Uso de animais na pesquisa científica	1
1.2	Modelagem animal.....	1
1.3	O camundongo como modelo animal	2
1.4	Biotérios de criação	3
1.5	Importância da manipulação de embriões e óvulos de camundongo	4
1.6	Banco de embriões e gametas.....	5
1.7	Produção de animais geneticamente modificados	6
1.8	Limpeza sanitária de linhagens	7
1.9	Fisiologia reprodutiva e o ciclo estral do camundongo	8
1.10	Método tradicional superovulação em camundongos.....	11
1.11	A inibina	15
1.12	Papel da Inibina na regulação hormonal	17
1.13	Neutralização da inibina como estratégia hiperovulatória	18
1.14	Produção de anticorpos policlonais	20
1.13	Considerações finais	22
2	OBJETIVO	24
2.1	Geral	24
2.2	Específicos	24
3	JUSTIFICATIVA.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26

4.1	Produção do peptídeo de inibina.....	26
4.2	Animais	26
4.3	Produção do soro anti-inibina.....	26
4.4	Análise do soro anti-inibina	29
4.5	Processamento de imagens	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
7	CONCLUSÃO	41
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	42
9	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de animais na pesquisa científica

Há séculos o homem utiliza animais em pesquisas científicas na busca do conhecimento e benefício para a saúde de ambos. Como consequência desse fenômeno surge a Ciência em Animais de Laboratório, cujo foco principal de estudo é o próprio animal que será utilizado na pesquisa e como este deve ser criado e manipulado (Quimby 1994). A Ciência em Animais de Laboratório engloba uma série de áreas e serve de base para todas as outras ciências que utilizam animais em seus trabalhos. Estas áreas incluem: sanidade, genética, manejo reprodutivo, bem-estar, edificação, ética educação e dentre outras (Monamy 2017).

1.2 Modelagem animal

A saúde humana e a animal estão diretamente relacionadas. Por muitos anos, animais têm sido utilizados como modelos de doenças humanas. A similaridade entre espécies animais e a espécie humana tem permitido a prática da modelagem animal. Na impossibilidade do uso do próprio ser humano em boa parte das pesquisas devido a questões éticas, a modelagem de condições humanas em animais tem sido utilizada.

A medicina veterinária utilizou com sucesso, por muitos anos medicamentos humanos em sua clínica de pequenos animais. Os mesmos princípios ativos funcionam na clínica médica humana e animal com algumas raras exceções devido à particularidade de algumas espécies animais. Mas de forma geral, essa semelhança fisiológica, patológica e farmacológica legitima a utilização de animais como modelos de doenças humanas.

Os animais de laboratório são essenciais para experimentos na área de pesquisa básica e aplicada. Existe uma gama de modelos que podem ser aplicados em diversas áreas de investigação existentes (Svendsten 1994). A escolha correta do modelo ideal para cada tipo de pesquisa é essencial para o sucesso do trabalho, bem como a qualidade genética e o estado sanitário do animal (Mann, Crouse et al. 1991, Botting and Morrison 1997)

1.3 O camundongo como modelo animal

O camundongo é o modelo animal mais utilizado nas pesquisas científicas, isso se deve principalmente às semelhanças genéticas com o ser humano. Cerca de 95% da sequência de codificação nos genomas humano e de camundongos é conservada (Schwartz, Kent et al. 2003). O genoma de camundongo foi o primeiro, dentre os mamíferos não humanos, a ser sequenciado na sua totalidade. O que permite o estudo em pesquisa básica e dos mecanismos envolvidos em desordens genéticas (Mouse Genome Sequencing, Waterston et al. 2002).

O sucesso do camundongo como animal de laboratório se deu graças às diversas vantagens deste modelo se comparado a outros modelos animais. Como por exemplo: seu tamanho pequeno; manutenção simples se comparada a diversos outros modelos; sua reprodução fácil; seu período de gestação e ciclo de vida curtos (Leon.LR. 2005). Além disso, o longo período de pesquisas utilizando camundongos resultaram em uma abundância de dados, painéis especializados para análises genéticas, tecnologias para manipular o genoma do camundongo e uma rica base de dados na literatura sobre genética e biologia de camundongos.

Os camundongos apresentam vinte pares de cromossomos e um grande número de mutantes com centenas de colônias geneticamente definidas. Atualmente

existem modelos murinos para inúmeras patologias ou disfunções, animais capazes de mimetizar os efeitos observados na espécie humana. Dentre esses pode-se citar animais modelos para doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (Elder, Gama Sosa et al. 2010), modelos para obesidade (Brockmann and Bevova 2002), diabetes (Van Belle, Taylor et al. 2009), dentre muitos outros. A criação e manutenção desses modelos animais só é possível graças aos estudos de tecnologias. Portanto, dominar as técnicas de produção de embriões e gametas traz benefícios diretos e indiretos para estudos de pesquisa básica e aplicada.

1.4 Biotérios de criação

Os biotérios e centros especializados na criação, preservação e distribuição de linhagens de camundongos são uma ferramenta essencial para melhorar o acesso da comunidade científica a esses animais (Eppig, Motenko et al. 2015). Por meio deles, pesquisadores e centros de pesquisa podem manter e obter linhagens de isogênicas ou mutantes. Os camundongos são amplamente utilizados para pesquisa biomédica e o número de modelos sendo gerado está aumentando rapidamente.

Os biotérios de criação são essenciais para a manutenção de linhagens valiosas de camundongo e para que as linhagens sejam preservadas com segurança e manejadas de modo adequado. Garantir a disponibilidade contínua dessas linhagens de camundongo preserva o investimento feito na criação e caracterização das mesmas e, também garante segurança para os ensaios realizados com esses animais.

Para os pesquisadores, os biotérios de criação protegem contra a perda de suas linhagens, permitem o gerenciamento eficiente de colônias, a redução dos

custos com a criação, a redução do número de animais utilizados na pesquisa e redução dos custos de criação. As atividades comuns dos biotérios de criação incluem preservação, curadoria e distribuição de linhagens de camundongos; desenvolvimento de programas de controle de qualidade para garantir a estabilidade genética (fundo genético), manutenção da mutação presente nos modelos, o estado de saúde do animal, o atendimento ao cliente e suporte técnico para pesquisadores.

As tecnologias reprodutivas são uma ferramenta poderosa para gerenciar eficientemente esses centros de criação e para o desenvolvimento de programas de criopreservação de linhagens.

1.5 Importância da manipulação de embriões e óvulos de camundongo

Experimentos realizados nos anos cinquenta foram pioneiros no estudo dos métodos de cultura *in vitro* de embriões de camundongo (Jun and Hammond 1949, Whitten 1956). Cada vez mais, ao longo dos anos, embriões murinos vêm sendo utilizados nos estudos dos processos embriológicos pré-implantação e no desenvolvimento de tecnologias reprodutivas (Illmensee, Kaskar et al. 2006, Cockburn and Rossant 2010, Shahbazi and Zernicka-Goetz 2018). Os embriões e oócitos produzidos por meio das aplicações de tecnologias produtivas são utilizados pra inúmeros fins. Como por exemplo, a manutenção de linhagens, limpeza sanitária de linhagens, produção de animais transgênicos e manejo de colônias.

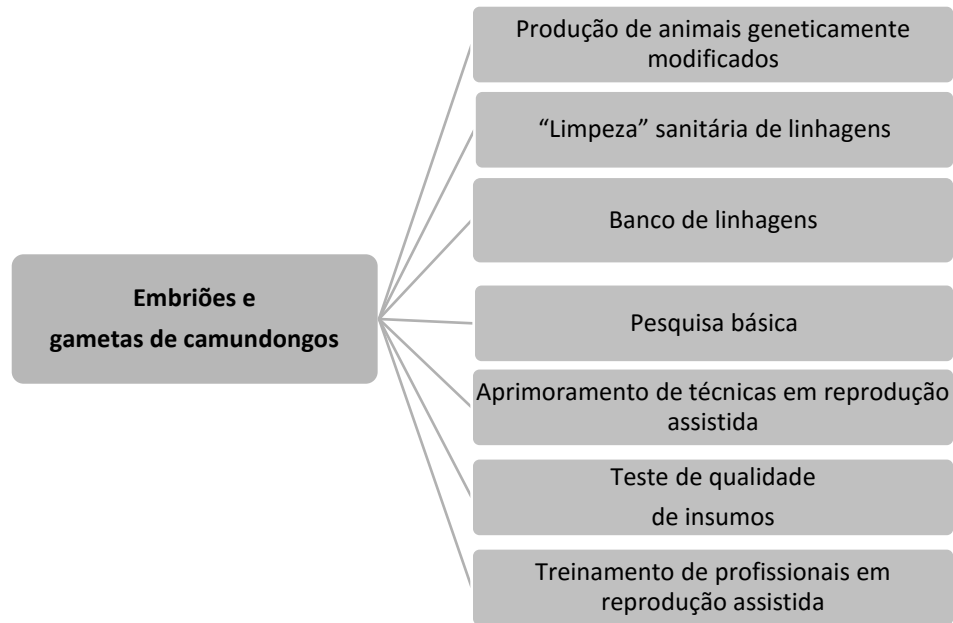


Figura 1. Relação de algumas áreas da ciência nas quais embriões e gametas de camundongo são utilizados.

1.6 Banco de embriões e gametas

As técnicas de reprodução assistida são fundamentais para o manejo de animais de laboratório. Atualmente existem cerca de 15.000 linhagens de camundongos disponíveis para pesquisa (Ostermeier, Wiles et al. 2008). No entanto, muitos destes modelos geneticamente modificados apresentam dificuldades na sua criação, relacionados à baixa taxa de natalidade ou outras desordens de fundo reprodutivo. Diferentes técnicas reprodutivas podem ser aplicadas em modelo murino, tais como fertilização *in vitro* (FIV), transferência embrionária e o congelamento de embriões e gametas para a preservação das linhagens. Atualmente não é mais recomendado uma instituição trabalhar com um grande número de linhagens sem ter um programa de criopreservação de embriões e gametas (Frajblat and Amaral 2009). Portanto, a produção de gametas e embriões de camundongos são essenciais na manutenção das linhagens já existentes através da criopreservação do material genético destes animais.

A criopreservação de embriões permite manter em um mesmo local um grande número de diferentes linhagens, o que não seria possível se eles estivessem em um estado adulto. As vantagens da presença de um programa de criopreservação de embriões em uma instituição, que utiliza um grande número de linhagens, podem ser resumidas em alguns pontos:

- Redução na demanda de espaço para manter os animais.
- Redução no número de pessoal envolvido na criação.
- Eliminação da susceptibilidade de linhagens valiosas com infecções por patógenos.
- Impede o cruzamento involuntário de linhagens.
- Impede a perda da linhagem por mutação espontânea.
- Simplifica o envio e importação de animais e a necessidade da quarentena e de tramites alfandegários.
- Permite manter um grande número de linhagens na instituição.

Portanto, a criopreservação e criação de um banco de linhagens é essencial para os programas de pesquisa que utilizam animais em seus projetos.

1.7 Produção de animais geneticamente modificados

O camundongo é o organismo modelo mais utilizado na pesquisa e estudo de doenças humanas (Rosenthal and Brown 2007). O sequenciamento do genoma do camundongo foi publicado no final de 2002 usando a cepa C57BL/6 (Mouse Genome Sequencing, Waterston et al. 2002). Aproximadamente 30% dos genes no genoma do camundongo podem ser descritos como necessários para a sobrevivência até a idade adulta em humanos (Ayadi, Birling et al. 2012).

O advento da tecnologia de animais geneticamente modificados possibilitou que pesquisadores projetassem animais de laboratório com características genéticas específicas de acordo com o alvo de sua pesquisa. Isto permite o desenvolvimento de modelos para muitas doenças humanas e estudo de pesquisa básica em diversas áreas da ciência.

Recentemente, uma nova tecnologia tem revolucionado a produção destes animais geneticamente modificados. A tecnologia de CRISPR-Cas 9 modificou a velocidade com que estes animais são produzidos (Yang et al. 2013). Desde os primeiros relatos bem sucedidos do uso da tecnologia de edição de genomas com CRISPR-Cas-9 em células de mamíferos no início de 2013, a edição de genes em camundongos e outras espécies ganhou grande destaque no meio científico (Cho, Kim et al. 2013, Cong, Ran et al. 2013, Hwang, Fu et al. 2013, Jinek, East et al. 2013, Mali, Yang et al. 2013, Ran, Hsu et al. 2013). Com ela a geração de camundongos geneticamente modificados se torna muito mais simples, precisa, eficiente e econômica. Essa tecnologia reduz o tempo necessário para a geração de camundongos mutantes e tornou a edição do genoma melhor e mais eficiente (Jinek, East et al. 2013).

1.8 Limpeza sanitária de linhagens

A limpeza sanitária de linhagens é um procedimento adotado para eliminar patógenos de camundongos para estabelecer colônias reprodutivas limpas e saudáveis. É um processo delicado e, em muitos casos, o mais fácil é eliminar a colônia contaminada e trazer novos animais limpos para o biotério. Porém, quando se trata de uma linhagem de animais geneticamente modificados ou de difícil obtenção, a realização de vazios sanitários não é uma opção. Nesses casos, uma

vez contaminados não é possível sua simples eliminação para o início de uma nova colônia (Morrell 1999).

A estratégia de rederivação surgiu para suprir essa demanda. A rederivação pode ser realizada usando técnicas de fertilização *in vitro* ou práticas de rederivação padrão. A mais eficiente delas é a transferência embrionária (Sztein 2011). Esta técnica tem como premissa impedir o contágio dos filhotes que ocorre durante o contato com o sangue materno na gestação e principalmente no parto (Taft, Davisson et al. 2006). Os embriões da linhagem contaminada são coletados e transferidos para fêmeas receptoras que possuem padrão sanitário SPF (livre de patógenos). Desta forma, os animais que vierem a nascer deste procedimento não terão a condição sanitária de sua linhagem genética pela ausência da contaminação durante o período gestacional ou durante o parto (Besselsen, Romero-Aleshire et al. 2008).

Esta técnica necessita de um laboratório preparado para a manipulação de embriões e para o procedimento de transferência embrionária. Em muitos casos, quando não houver fêmeas receptoras disponíveis ou quando o número de embriões obtidos for maior que o número de fêmeas disponíveis, a criopreservação destes embriões será necessária para uma transferência em outro momento.

1.9 Fisiologia reprodutiva e o ciclo estral do camundongo

Grande parte do controle das funções sexuais em ambos os sexos começa com a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Durante a maturação sexual, as secreções de todos os hormônios ovarianos e testiculares dependem das gonadotrofinas produzidas na hipófise. O processo se inicia quando a hipófise, estimulada pelo hipotálamo, é ativada e passa a produzir os

hormônios gonadotróficos: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Após a liberação, esses hormônios são transportados às gônadas (testículos e ovários). (Stamatiades and Kaiser 2018)

No caso dos machos o LH é levado até os testículos, estimulando a produção de testosterona; enquanto o FSH, juntamente com a testosterona, estimula a espermatogênese. Nas fêmeas o FSH estimula o desenvolvimento dos folículos ovarianos; enquanto o LH estimula a ovulação e a transformação do folículo em corpo lúteo. Por meio dos mecanismos de *feedback* negativo, o LH e FSH estimulam a atividade ovariana. O hormônio FSH estimula os ovários a produzirem e liberarem o estrógeno. O corpo lúteo, formado pelo estímulo do LH, secreta a progesterona. (Filatov, Khramova et al. 2017)

Nas fêmeas de roedores o ciclo reprodutivo é chamado de ciclo estral, possui duração média de quatro dias. As fases do cicloestral são proestro, estro, metaestro e diestro (figura 2). O **proestro** compreende a fase folicular do ovário, corresponde ao período pré-ovulatório, quando há um aumento de estradiol (Walmer, Wrona et al. 1992) e, conseqüentemente, algumas horas depois, durante a noite, ocorre o pico de LH (Parkening, Collins et al. 1982). Esta fase é caracterizada pela aceleração do crescimento folicular sob a influência do FSH. Há um aumento na produção de estradiol, que passa a suprir os níveis de progesterona do ciclo anterior em declínio.

No **estro** o estradiol permanece elevado durante a manhã e volta aos níveis basais no período da tarde (Walmer, Wrona et al. 1992), ocorre então uma queda dos níveis de estradiol em sincronia com a ovulação e formação do corpo lúteo. É durante a fase de estro que a fêmea fica receptiva ao macho. O **metaestro** e **diestro** correspondem à fase luteínica do ovário, sendo o metaestro um estágio

intermediário, onde a queda nos níveis de estradiol é compensada pelo aumento dos níveis de progesterona produzida pelos corpos lúteos formados (Walmer, Wrona et al. 1992).

O diestro é o período do ciclo onde há maior produção de progesterona de fase luteínica ativa e as glândulas do endométrio atingem seu pico da atividade secretora. Durante o estro, metaestro e diestro, as concentrações plasmáticas de LH e FSH circulantes são mais baixas (Parkening, Collins et al. 1982). Caso ocorra a fertilização e gravidez o período de diestro é prolongado. Ao contrário da espécie humana, em fêmeas de camundongo, não há fase luteal, ou seja, apenas quando há coito o hormônio prolactina é liberado e o corpo lúteo se mantém, na ausência do coito o corpo lúteo dura apenas três dias e o ciclo se reinicia.

Quando em grupo, as fêmeas de camundongo podem apresentar assincronia dos ciclos reprodutivos, que é revertida com a exposição das fêmeas ao macho. A partir daí o estro retorna e se torna sincronizado para todas as fêmeas do grupo em um período de quarenta e oito horas, esse fenômeno é denominado efeito de Whitten (Andrade et.al 2006).

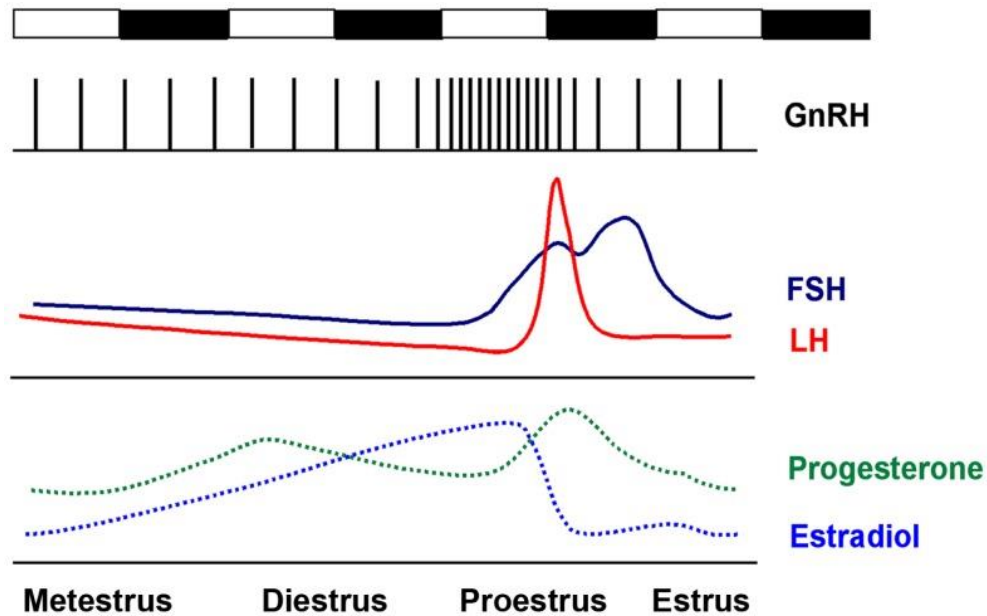


Figura 2. O ciclo estral do roedor. Em camundongos a ovulação ocorre a cada 4-5 dias. Metaestro e diestro são caracterizados por baixos níveis de estradiol, que aumentam gradativamente. No final da tarde do proestro, níveis elevados de estradiol induzem a liberação de GnRH do hipotálamo, o que induz o pico de LH e FSH do proestro aproximadamente no início do período ativo do animal (noite). A ovulação ocorre 12-14 h depois. Fonte: (Miller and Takahashi 2013)

1.10 Método tradicional superovulação em camundongos

A superovulação tem sido usada na produção de camundongos transgênicos desde o final da década de 1980 para induzir artificialmente a ovulação de um grande número de oócitos a partir de um número limitado de fêmeas de camundongo. A superovulação facilita a geração de camundongos geneticamente modificados e reduz o número de animais utilizados (GatesAH. 1971, Hogan 1986). O uso de superovulação para aumentar o rendimento de oócitos para propósitos experimentais foi descrito pela primeira vez em 1956 (Gates 1956) e subsequentemente expandido em 1971 (GatesAH. 1971).

Diversos trabalhos relataram que a resposta ovulatória aos protocolos de superestimulação varia de acordo com a linhagem da fêmea (GatesAH. 1971, Legge

and Sellens 1994, Suzuki, Asano et al. 1996, Vergara, Irwin et al. 1997, Auerbach, Norinsky et al. 2003, Nagy A 2003, Byers, Payson et al. 2006). Nos estudos citados são utilizadas fêmeas de idade semelhante que receberam quantidades iguais de gonadotrofinas. Posteriormente foram avaliadas as diferenças de produção de oócitos entre as linhagens. As linhagens foram classificadas de acordo com suas respostas ovulatórias como más respondedoras (ex. linhagem A/J com cerca de cinco oócitos por fêmea) e boas respondedoras (ex. linhagem 129S1 com mais de quarenta oócitos por fêmea) (Byers, Payson et al. 2006). Essas respostas variadas à superovulação resultam de diferenças genéticas, onde a resposta à ovulação induzida por hormônio depende de três a quatro grandes diferenças genéticas entre as diferentes linhagens de camundongo (Spearow 1988, Spearow, Nutson et al. 1999).

Em métodos laboratoriais, especialmente em camundongos, o protocolo clássico de superestimulação ovariana envolve a aplicação de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e a gonadotrofina crônica humana (hCG). Essa gonadotrofina atua diretamente na regulação dos hormônios ovarianos.

A aplicação de eCG em ratos aumenta a ovulação e previne a atresia de folículos periantrais e antrais (Braw and Tsafiriri 1980). Wang e colaboradores examinaram os efeitos de LH e FSH no crescimento de folículos ovarianos em camundongos que tiveram a remoção prévia da glândula pituitária. Eles descobriram que o FSH aumenta o número de folículos antrais e periantrais, enquanto o LH aumenta os folículos primários e secundários (Wang and Greenwald 1993). Em estudo utilizando ratos, Popova e colaboradores, verificaram que o eCG e o FSH tiveram efeitos similares na estimulação ovariana (Popova, Krivokharchenko et al. 2002).

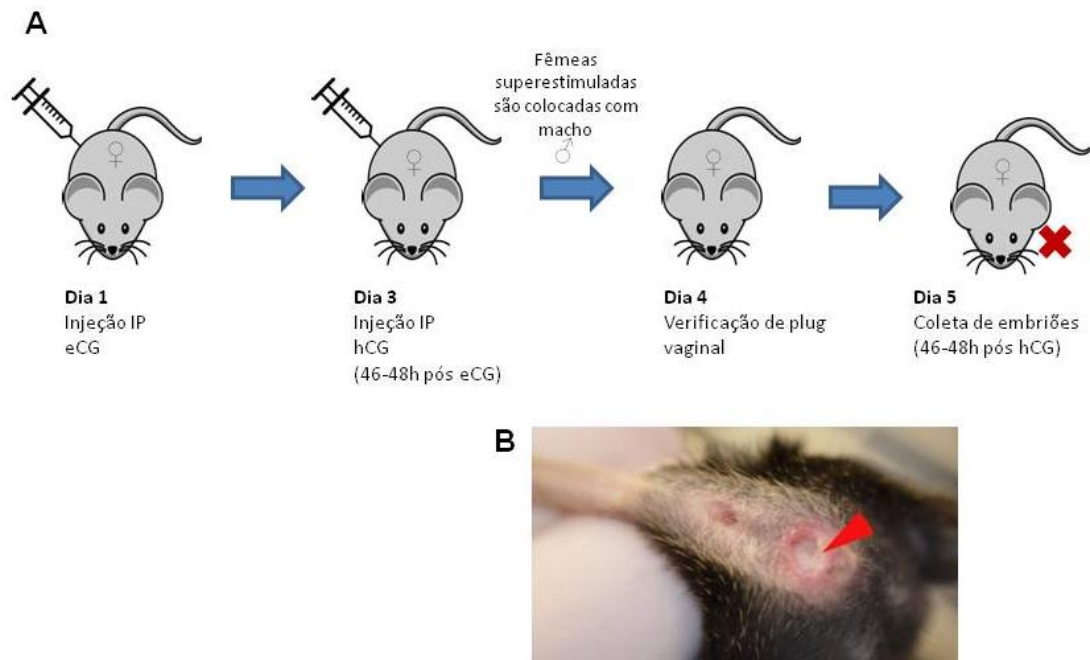


Figura 3 Método tradicional de superovulação em camundongos. No primeiro dia é aplicado o eCG e 48 horas depois é aplicado o hCG, as fêmeas são colocadas com machos reprodutores(A). Para a confirmação da cópula dos animais é verificado a presença do tampão mucoso, acúmulo de sêmen no orifício vaginal resultante da cópula (plug vaginal) (B-seta).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o hormônio luteinizante (LH) são componentes integrais do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que controlam a maturação e a funcionalidade sexual (Choi and Smitz 2014). Na ausência de sinalização através de seu receptor compartilhado, a diferenciação sexual fetal e o desenvolvimento pós-natal não podem prosseguir normalmente. Além de compartilharem o mesmo receptor, tanto o LH quanto o hCG são iso-hormônios que diferem apenas em relação à modificação pós-traducional (predominantemente glicosilação) e estado de degradação, que influencia sua atividade biológica e sua meia-vida em circulação (Bergendahl and Veldhuis 2001, Arey and Lopez 2011). O

hCG administrado durante os protocolos de superovulação é capaz de atuar como regulador chave da esteroidogênese gonadal e da ovulação.

Em resumo, nos protocolos de superestimulação ovariana, o eCG atua de modo análogo ao hormônio FSH, enquanto o hCG atua de modo análogo ao LH. Por sua vez o crescimento folicular e a ovulação estão sob o controle direto desses dois hormônios (FSH e LH), que são secretados diretamente da adeno-hipófise e estimulados pela liberação de hormônios (GnRH) do hipotálamo. Nos estágios iniciais do ciclo natural, a secreção de GnRH resulta em uma liberação maior de FSH e níveis mais baixos de LH da hipófise, o que incitará o crescimento folicular (Fritz MA 2011).

A estimulação hormonal pode ser iniciada em qualquer estágio do ciclo estral. Os resultados da superestimulação dependem de fatores como a idade das fêmeas, as doses de gonadotrofina, a linhagem do animal e fatores ambientais como estresse, luminosidade e alimentação dos animais. Apesar do avanço no campo da ciência, vários laboratórios relatam variações na produção de embriões mesmo quando todas as variáveis conhecidas estão controladas. Todos os fatores que podem afetar o bem-estar do animal têm o potencial de interferir no resultado da produção de embriões.

Tabela 1. Variação das linhagens quanto sua resposta à estimulação hormonal.
Fonte: Hogan, 1986

Boas respondedoras	Más respondedoras
C57BL/6J	A/J
BALB/cByJ	C3H/HeJ
129/SvJ	BALB/cJ
CBA/CaJ	129/J
CBA/H-T6J	129/ReJ
SJL/J	DBA/2J
C58/J	C57/L
BALB/cByJ x C57BL/6J F1	BALB/cJ x A/JF1
C57BL/6J x CBA/CaJ F1	C57BL/6J x CBA/CaJ F1

A estimulação ovariana com gonadotrofinas é capaz de produzir um número relativamente grande de oócitos e embriões que pode variar de acordo com a linhagem, Camundongos de diversas linhagens respondem diferentemente a estimulação hormonal (Hogan 1986). A tabela 1 classifica algumas linhagens de acordo com sua resposta a estimulação hormonal.

1.11 A inibina

A inibina é um membro da superfamília do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), é uma glicoproteína heterodimérica de origem gonadal (Miyazono, Kamiya et al. 2010). A inibina foi originalmente definida como uma substância que suprime seletivamente a secreção de FSH na hipófise (Knight, Satchell et al. 2012). Composta por subunidades α e β , onde o processamento pós-

traducional dá origem a inibinas A e B de tamanho diferentes (Knight, Satchell et al. 2012).

A inibina alfa, codificada pelo gene INHA humano, tem o efeito oposto da ativina. Inibe a biossíntese e secreção de FSH, atuando como antagonista da ativina (Gressner 2011). As inibições podem ser encontradas em uma ampla variedade de tecidos e, embora tenham sido originalmente encontradas em células da granulosa do ovário (Erickson and Hsueh 1978) e nas células de sertoli do testículo (Eddie, Baker et al. 1978). A inibina possui uma subunidade α comum que está ligada a uma subunidade β A ou β B por meio de uma ligação dissulfeto formando a inibina A ($\alpha\beta$ A) ou inibina B ($\alpha\beta$ B). A inibina é capaz de inibir a atividade da ativina competindo pelo local de ligação no receptor de ativina (ActRII) e deslocando a ativina do complexo ativina-receptor. No entanto, a afinidade da inibina pelo receptor ActRII é dez vezes menor que a ativina; portanto, ajuda adicional é fornecida à inibina por meio de um betaglicano com alta afinidade pela inibina, que atua como um co-receptor do ActRII para fortalecer sua inibição (Choi and Han 2011). A inibina alfa é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo o endométrio (Mylonas, Makovitzky et al. 2004), cérebro (Uccella, La Rosa et al. 2000, Mousa and Mousa 2003), glândula adrenal (Arola, Liu et al. 1998), testículo (Fujisawa 2006) e ovário (Yamoto, Minami et al. 1992).

O complexo sistema de regulação ativina-inibina, está envolvido em várias atividades biológicas importantes, como o desenvolvimento de tecidos e funções das células endócrinas pancreáticas (Watanabe 2011). Dependendo da composição da subunidade, eles também influenciam na indução de apoptose, metabolismo, endócrino, homeostase, crescimento ósseo, inflamação por fibrose, neurogênese, e

carcinogênese em vários órgãos (Chng, Vallier et al. 2011, Muenster, Korupolu et al. 2011).

1.12 Papel da Inibina na regulação hormonal

A inibina, juntamente com a ativina e a folistatina, são importantes reguladores da secreção de FSH pelos hormônios gonadotróficos hipofisários (Li, Phillips et al. 1995, Knight and Glister 2006). A ativina aumenta a secreção de FSH (Knight, Satchell et al. 2012), enquanto a inibina regula negativamente a secreção de FSH através de ligação competitiva contra a ativina ao seu receptor tipo II, impedindo assim, que a ativina forme complexos sinalizadores ativos com o receptor do tipo 1 (Phillips and Woodruff 2004). O equilíbrio entre a produção de ativina e inibina se altera ao longo do desenvolvimento folicular, com folículos primários a pré-antrais expressando principalmente subunidades beta para formar ativinas, e folículos maiores e mais desenvolvidos expressando mais a subunidade alfa, para formar inibina A ou B (Hillier 1991, Hillier 2009). Numerosos estudos já demonstraram que a neutralização da bioatividade da inibina endógena por imunização passiva ou ativa (Findlay, Doughton et al. 1989, Mann, Campbell et al. 1989, Mizumachi, Voglmayr et al. 1990, Wrathall, McLeod et al. 1992, Kaneko, Nakanishi et al. 1995, Akagi, Kaneko et al. 1997) ou eliminação dos folículos dominantes, que elimina as fontes de inibina (Ginther, Bergfelt et al. 2000, Ginther, Gastal et al. 2005), levou ao aumento da secreção hipofisária e da concentração plasmática de FSH, que estimula o crescimento de outros folículos.

A inibina é sintetizada predominantemente pelas células da granulosa de folículos em desenvolvimento, sendo a principal responsável pelo mecanismo de seleção do folículo dominante e posterior atresia dos folículos menores (Austin, Mihm et al. 2001, Lu, Yang et al. 2009). Em resumo o controle desse mecanismo de

seleção do folículo dominante pode ser feito por duas vias diferentes: a inibição direta da proliferação e função das células da granulosa (Ying, Becker et al. 1986, Jimenez-Krassel, Winn et al. 2003, Cai, Sun et al. 2015) ou a redução da secreção de FSH ocasionado por um aumento dos níveis séricos de inibina (Bleach, Glencross et al. 2001). Uma vez que a principal ação do hormônio folículo estimulante é estimular a formação e a funcionamento das células da granulosa, a inibina e o hormônio folículo estimulante apresentam uma relação de *feedback* negativo típico.

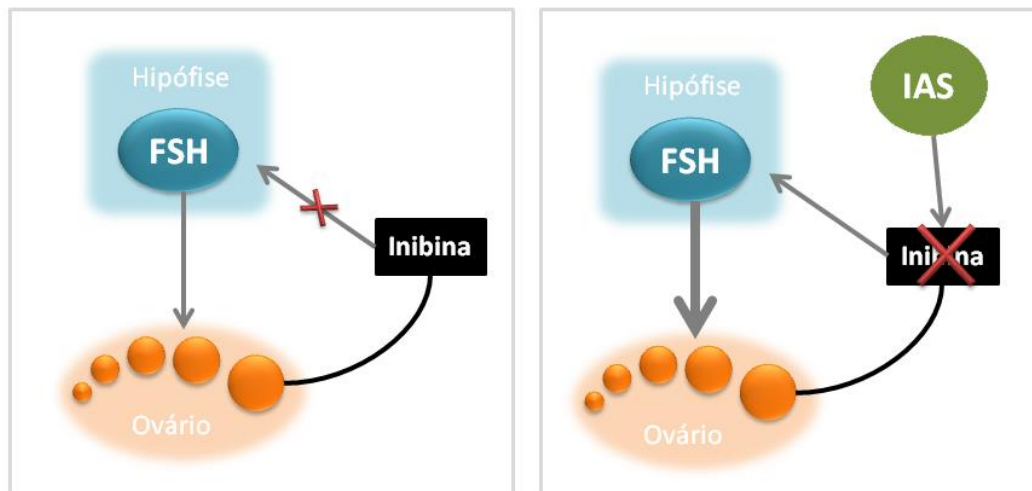


Figura 4. Esquema representando a ação da Inibina no organismo. Demonstra o efeito inibitório da inibina, produzida células da granulosa nos ovários, sobre a secreção do hormônio folículo estimulante pela hipófise. O esquema representa a ação do soro anti-inibina (IAS), bloqueando a função da inibina. (Figura autoral)

1.13 Neutralização da inibina como estratégia hiperovulatória

Devido à grande variação na resposta ovariana durante a estimulação com gonadotrofinas (eCG-hCG) e a necessidade cada vez maior de embriões para as mais diversas necessidades, buscas por melhores protocolos são constantes. A utilização de um inibidor da proteína inibina é um protocolo alternativo já descrito.

Esse protocolo é muito mais eficaz na produção de oócitos se comparado ao método tradicional de superovulação.

A imunização passiva contra inibina se mostrou eficaz na indução de ovulação múltipla em diversas espécies diferentes, tais como camundongos (Wang, Herath et al. 2001), ratos (Rivier and Vale 1989), hamsters (Kishi, Taya et al. 1995), vacas (Akagi, Kaneko et al. 1997), éguas (Nambo, Kaneko et al. 1998) e cabras (Medan, Watanabe et al. 2003). Além disso, a técnica de imunização contra inibina foi capaz de produzir oócitos de qualidade e capazes de serem fertilizados e se desenvolverem normalmente (Takedomi, Kaneko et al. 1997, D'Alessandro, Martemucci et al. 1999, Shi, Ozawa et al. 2000, Wang, Herath et al. 2001).

Em trabalho publicado em 2015, Nakagata e colaboradores mostraram que a administração combinada do soro contendo anticorpo anti-inibina (IAS- *Inhibin antiserum*) e eCG foi capaz de aumentar significativamente o número de oócitos ovulados em fêmeas de camundongo C57BL/6, se comparado aos protocolos que utilizam apenas o soro anti-inibina ou apenas as gonadotrofinas (figura 3). Neste estudo os pesquisadores obtiveram altas respostas de produção de oócitos e embriões, de um único ciclo de estimulação, eles obtiveram em média cento e sete óvulos produzidos, em contraste com os poucos mais de 8 óvulos prudozidos pelo tratamento convencional, utilizando apenas gonadotrofinas. Além das taxas de produção de óvulos e embriões, após a transferência dos embriões produzidos, um grupo de fêmeas receptoras foram capazes de gerar cerca de 50 filhotes provenientes de embriões de uma única superovulação. Estes resultados demonstram que, em camundongos, a combinação da administração do soro imune contra inibina juntamente com administração de gonadotrofina pode formar uma nova técnica de hiperovulação em camundongos. (Takeo and Nakagata 2015)

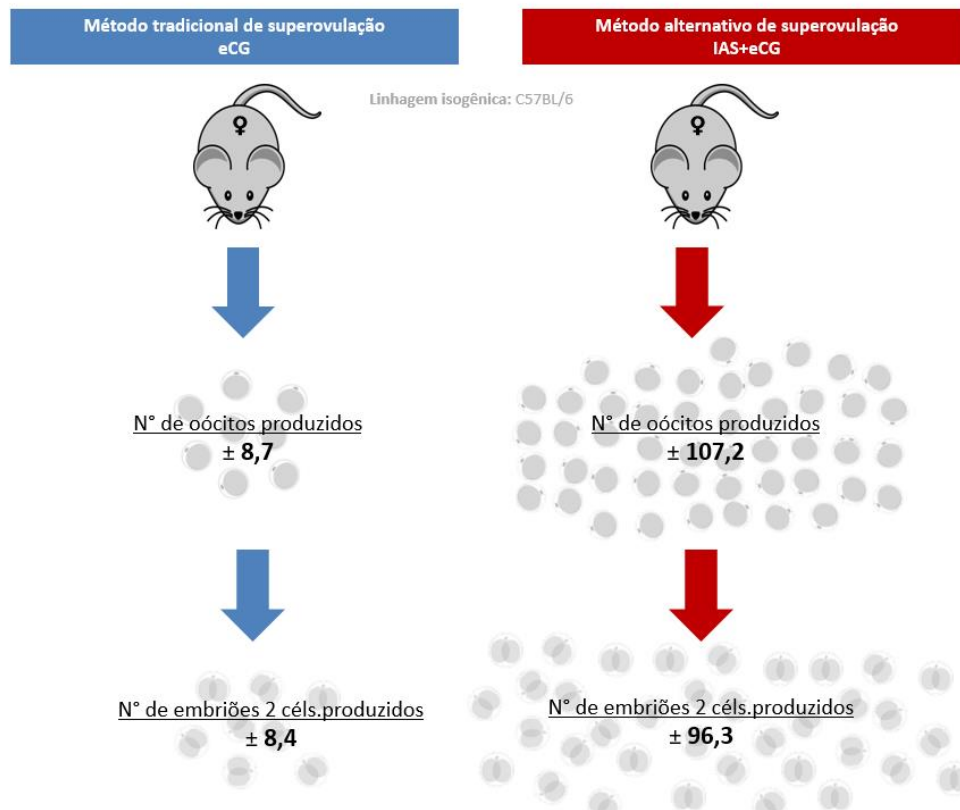


Figura 5. Esquema baseado nos dados obtidos no trabalho desenvolvido por Nakagata e colaboradores em 2015. A figura faz um comparativo entre as taxas de produção de oócitos e embriões de animais estimulados apenas com gonadotrfinas e animais estimulados pelo método de bloqueio de inibina. (Takeo and Nakagata 2015)

1.14 Produção de anticorpos policlonais

Anticorpos são gamaglobulinas, também denominadas de imunoglobulinas (Ig). São proteínas capazes de reconhecer um antígeno de forma específica e com alta afinidade. As imunoglobulinas são formadas por quatro unidades, duas de cadeia leve e duas de cadeia pesada, ligadas por pontes dissulfeto. Na porção onde se ligam as porções leve e pesada encontram-se os sítios de ligação ao antígeno (Wang, Singh et al. 2007, Hall 2015).

O método usual para a obtenção de anticorpos envolve a imunização com preparação de antígenos puros ou parcialmente purificados usando técnicas como cromatografia e eletroforese (Gagnon 1996). Pode-se utilizar o soro ou purifica-lo

com o intuito separar a fração das imunoglobulinas ou anticorpo específico (Gagnon 1996).

A produção de bons anti-soros depende em grande parte da qualidade, pureza e quantidade de antígeno disponível, além da especificidade e sensibilidade do ensaio empregado na análise do soro produzido. Após a imunização, primária com o antígeno, ativa-se um mecanismo denominado resposta humoral. Esse processo ativa as células B *naive*, que se diferenciam em células secretoras de anticorpos (Nutt, Hodgkin et al. 2015). Para a maioria dos antígenos proteicos solúveis, o anticorpo específico começa a aparecer no soro de cinco a sete dias após a injeção do animal. A concentração de anticorpos (título) continua a subir e atinge o pico em torno do décimo segundo dia, e depois tende a diminuir. As células B, ao serem estimuladas pelo antígeno, além de se diferenciarem em células formadoras de anticorpos, se proliferam para formar uma grande população de células B de memória, que rapidamente se ativam após a administração das injeções de reforço. Assim, o período de aparecimento do anticorpo específico é muito mais curto após uma injeção de reforço do que o observado na imunização inicial. Além disso, um título significativamente mais alto de anticorpo específico é alcançado e mantido por um longo período de tempo. O pico de produção de anticorpos ocorre de sete a quatorze dias após o reforço. Com a formação das células B de memória, é necessário menos antígeno para estimular uma forte resposta secundária. Essas células são de vida longa portanto, uma resposta específica de anticorpo pode ser obtida até um ano após o último reforço. (Hall 2015)

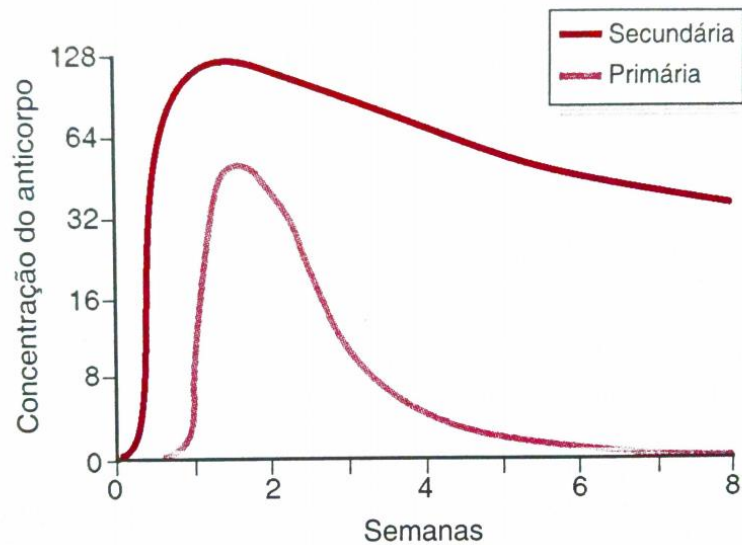


Figura 6. Tempo decorrido para a resposta dos anticorpos no sangue circulante à injeção primária e à injeção secundária, após vários meses. fonte:(Hall 2015)

Finalmente, a afinidade média e o grau de especificidade da população de anticorpos para o antígeno aumentam com imunizações repetidas (Klinman and Press 1975).

1.13 Considerações finais

A produção de animais geneticamente modificados é uma realidade que faz parte do futuro da pesquisa biomédica. Há um interesse crescente na produção de novos modelos geneticamente modificados com o objetivo de elucidar diversos aspectos associados a função de cada gene individualmente em conjunto. A produção constante de embriões é uma etapa fundamental desse processo e, melhorar a eficiência dessa produção é de interesse dos laboratórios envolvidos nessa área. A técnica de estimulação ovariana que envolve a imuno-neutralização da inibina endógena tem apresentado resultados excelentes com aumento do número de embriões produzidos e diminuição do número de animais utilizados.

A produção de um produto contendo anticorpo anti-inibina para a estimulação se mostra uma estratégia capaz de aumentar a eficiência da técnica. Além disso, reduz os custos de compra dessa substância (ou de produto semelhante) no exterior e facilita a logística de obtenção visto que não envolve os trâmites de importação do produto.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Estabelecer metodologias para a produção do soro imune anti-inibina que será introduzido no protocolo de hiperestimulação ovariana para a produção de oócitos e embriões em fêmeas de camundongo

2.2 Específicos

- Produzir do peptídeo de inibina
- Produzir o soro anti-inibina
- Analisar da eficácia do soro produzido

3 JUSTIFICATIVA

A produção própria do IAS reduz de maneira significativa os custos se comparado a compra de um produto equivalente no exterior. A empresa japonesa CosmoBio® possui em seu portfólio o produto CardHyperova®, um meio onde o soro anti-inibina é combinado com eCG (Gonadotrofina coriônica equina). O produto é vendido pronto para o uso, a aplicação de 0,2 mL desse composto juntamente com a aplicação do hCG (Gonadotrofina coriônica humana) reproduzem os resultados publicados por Nakagata e colaboradores (Takeo and Nakagata 2015).

O custo estimado para a produção do soro anti-inibina na UFRJ é aproximadamente duzentas vezes menor que o custo de importação do insumo equivalente. Ainda que não seja possível a produção do soro integralmente na UFRJ, a possibilidade de sintetizar o peptídeo na UFRJ e produzir o soro em uma empresa especializada, ainda é uma estratégia mais vantajosa do que a compra e importação do meio comercial.

As vantagens da produção deste soro imune, seja na UFRJ ou em uma empresa brasileira especializada em anticorpos é bastante significativa. Os custos envolvidos serão compensados produção mais eficiente de embriões e óvulos e principalmente pela redução do número de animais utilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção do peptídeo de inibina

O peptídeo de inibina utilizado como imunógeno para a produção do soro anti-inibina foi produzido pela Plataforma Avançada de Biomoléculas-Cenabio-UFRJ (PAB-UFRJ). Ela foi desenhada e produzida com a sequência da porção N-terminal da inibina alfa de camundongo, contendo 30 aminoácidos (mouse inhibin- α (1-30)-NH₂). A sequência foi produzida de maneira artificial, utilizando o Sintetizador automático de peptídeos Focus XI (AAPTEC); A síntese química do peptídeo foi realizada na presença de um suporte polimérico (síntese de peptídeos em fase sólida; SPFS). Após isolamento/liofilização, a amostra de peptídeo foi analisada por espectrometria de massas (TOF/TOF).

4.2 Animais

O presente trabalho utilizando coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foi conduzido de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRJ, sob o número de processo 01200.001568/2013-87.

Para a produção do soro anti-inibina foram utilizados dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (um macho e uma fêmea) com 6 meses de idade, pesando entre 3 e 5 kg. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, água e ração à vontade no Biotério de Coelhos do Instituto de Bioquímica da UFRJ.

4.3 Produção do soro anti-inibina

Primeiramente foram coletadas amostras de sangue dos dois animais utilizados no estudo. As amostras foram utilizadas para a produção do soro pré-imune, empregado como controle do experimento.

O soro anti-inibina foi obtido através da imunização de dois coelhos com o peptídeo (mouse inhibin- α (1-30)-NH₂) produzido pelo PAB-UFRJ. O peptídeo foi solubilizado em solução salina a uma concentração de 10mg/mL, separado em alíquotas de 50uL e mantido congelado a uma temperatura de – 20°C. No momento da imunização a alíquota foi descongelada, solubilizada em soro fisiológico estéril em um volume final de 1mL e misturado em partes iguais ao adjuvante MONTANIDE®.

As soluções foram homogeneizadas utilizando um sistema acoplado de seringas de vidro (figura 7). A solução aquosa (peptídeo em solução salina) foi carregada em uma das seringas e a solução oleosa (Adjuvante) em outra seringa. Após o acoplamento do sistema as soluções eram homogeneizadas através da transferência das soluções de uma seringa para outra.

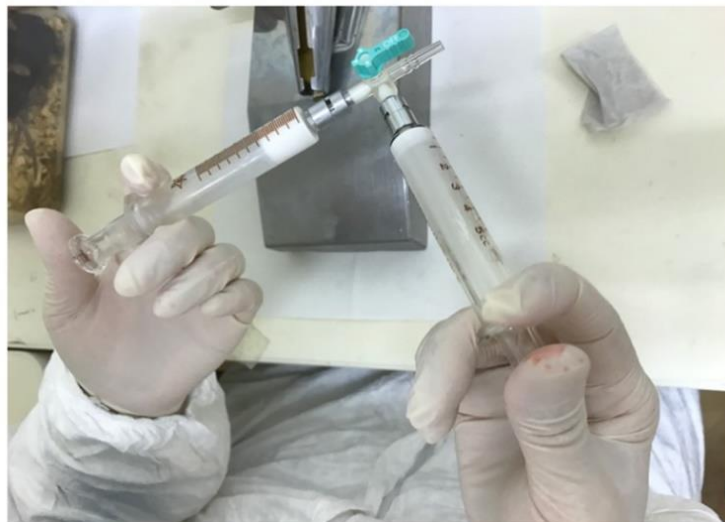


Figura 7. Sistema acoplado de seringas de vidro utilizado para homogeneizar o antígeno e o adjuvante. Fonte: (Tanaka, Arima et al. 2017).

O conjugado foi aplicado nos animais por via subcutânea (volume total 2 mL) em um intervalo de 14 dias, totalizando cinco inoculações. Em um dos coelhos foi aplicado um total de 100ug do peptídeo e no outro coelho 300ug por inoculação.

Amostras de sangue dos animais foram coletadas no intervalo de cada aplicação. Em cada coleta, foi utilizada uma seringa estéril com agulha 21G. Foram retirados 3mL de sangue com acesso pela veia marginal da orelha. O sangue coletado do animal foi mantido em temperatura ambiente para retração do coágulo. Depois, o soro foi obtido por meio da centrifugação do sangue a 2500 x g durante 10 minutos. O soro produzido foi dividido em alíquotas se mantido congelado a uma temperatura de -20°C.

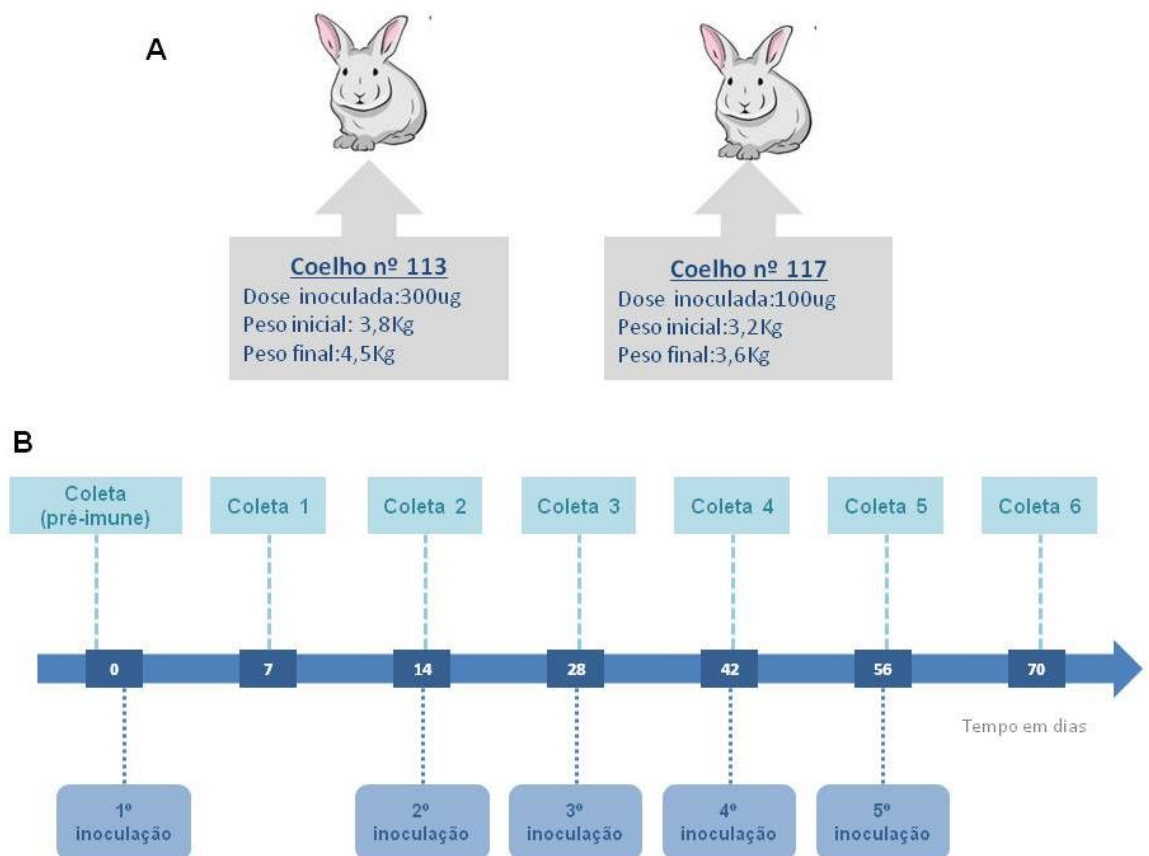


Figura 8. Esquema representando o protocolo de imunização utilizado. (A) Dados sobre os animais utilizados e dose de peptídeo inoculado. (B) Linha do tempo sinalizando os procedimentos efetuados em cada etapa da imunização.

4.4 Análise do soro anti-inibina

O soro obtido foi analisado quanto à presença de anticorpo anti-inibina por meio da técnica de dotblot. Para esta análise, amostras de 10ng do peptídeo de inibina e 50ng de albumina (controle) foram depositadas em uma membrana de PVDF previamente ativadas com metanol. As membranas de PVDF foram cortadas em pequenos discos e dispostos em uma placa de 24 poços. Os discos de membrana foram incubados com amostras de soro dos dois coelhos como mostra a figura 9. Após a aplicação do soro, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário Anti-rabbit IRDye®-800CW (LI-COR-USA). A leitura da emissão de fluorescência da membrana foi feita utilizando o equipamento *Odyssey® CLx Imager*. O aparecimento de um pequeno círculo de marcação no centro das membranas seria um indicativo da presença do anticorpo anti-inibina.

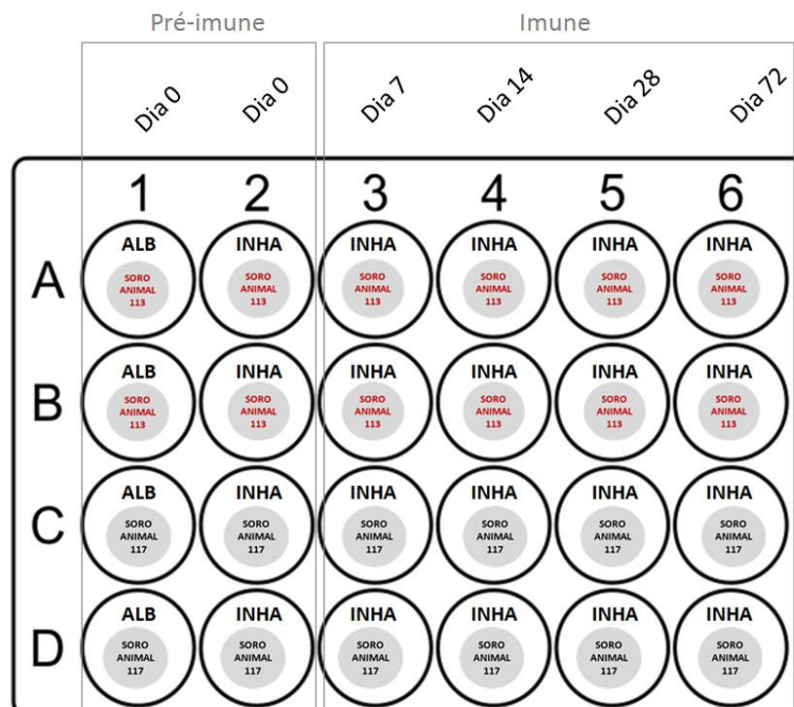


Figura 9. Esquema representando o experimento de DotBlot. (1) Coluna onde a proteína albumina foi fixada na membrana (2-6) Colunas onde o peptídeo de inibina foi fixado na membrana. Linhas A e B, membranas incubadas com o soro do coelho 113 em diferentes etapas da imunização. Linha C-D, membranas incubadas com o soro do coelho 117 em diferentes etapas da imunização.

4.5 Processamento de imagens

As imagens foram processadas utilizando o software NIH ImageJ, desenvolvido *no National Institute of Health*, EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho foi iniciado após um levantamento da literatura a respeito da produção do soro anti-inibina. Trabalhos que descrevem esse processo foram publicados desde o início dos anos 80 (O'Shea T 1982). Estes protocolos apresentavam diversos pontos em comum, como por exemplo, a sequência da inibina utilizada como antígeno.

A sequência "Inibina- α (1-30)-NH₂" foi escolhida baseada em protocolos descritos previamente (Wrathall, McLeod et al. 1990, Wang, Herath et al. 2001, Takeo and Nakagata 2015). Um ponto que diferiu nos trabalhos revisados foi à origem da inibina e o animal utilizado nas imunizações. O'shea e colaboradores foram um dos primeiros a relatar um aumento na taxa de ovulação em ovelhas após a imunização quando utilizado um preparado bruto de inibina, coletada do líquido folicular de vacas (O'Shea T 1982). Na mesma linha, os níveis séricos de FSH aumentaram significativamente durante os estágios inicial e final do ciclo estral de ovelhas imunizadas com soro anti-inibina (Al-Obaidi, Bindon et al. 1987). Foi verificado um aumento da taxa de ovulação não só utilizando inibina isolada diretamente do líquido folicular de outros animais, mas também utilizando peptídeos sintéticos baseados na porção N-terminal da cadeia de inibina (O'Shea, Andrews et al. 1991). Independente da fonte de inibina utilizada, desde as isoladas do líquido folicular de vacas (Forage, Brown et al. 1987), inibina de ovelha (Shi, Ozawa et al. 2000), de porco (Wang, Herath et al. 2001, Takedomi, Kishi et al. 2005), até os peptídeos sintetizados de maneira artificial (Medan, Wang et al. 2004, Ishigame, Medan et al. 2005), foi observado um aumento na taxa ovulatória.

A sequência da inibina é relativamente conservada em diferentes espécies (figura 10) no que se refere a região escolhida para ser sintetizada e aplicada neste trabalho. A síntese via tecnologia de DNA recombinante foi o método de síntese escolhido inicialmente. Isso porque muitas proteínas têm atividades biológicas somente após sofrerem modificações pós-traducionais. A produção do peptídeo via microorganismos modificados é o método mais fácil de preservar as modificações naturais que o peptídeo sofre *in vivo*. No entanto, a bactéria competente utilizada nos primeiros experimentos de síntese não foi capaz de produzir o peptídeo de modo eficaz. Por isso, a síntese artificial do peptídeo foi o método de produção escolhido para a produção do soro imune anti-inibina.

A figura 10 mostra um paralelo das sequências de aminoácidos da cadeia de inibina- α em diferentes espécies com uma grande homologia entre as cadeias. Estes resultados reforçam a observação dos trabalhos revisados nos quais peptídeos de inibina de diferentes espécies foram capazes de gerar resposta ovulatória semelhante, independentemente da espécie alvo da atuação do anti-soro.

Outro passo importante foi escolher o modelo animal utilizado para a produção do soro. A escolha deste animal para a produção de anticorpos depende da quantidade de soro desejado, a distância evolutiva entre as espécies das quais a proteína de interesse foi derivada e a espécie do animal a ser imunizado. O coelho é o animal frequentemente escolhido, pois são geneticamente diferentes das fontes proteicas geralmente estudadas (humanos, ratos e camundongos). Coelhos podem fornecer até 25 ml de soro em uma sangria do volume total de sangue, ou podem ser mantidos vivos para a produção constante de soro (Cooper and Paterson 2001). Manter o animal vivo e realizar coletas de sangue e reforços periódicos na imunização, para manter a titulação de anticorpos em taxas desejáveis, fornecendo

uma fonte de soro por longo período, sem as possíveis variações que podem ocorrer em imunizações feitas com coelhos diferentes.

```

SP|Q04997|INHA_MOUSE  LHLAASAFPLLTHPILVLLLRCLCSCSGRPETTPFLVAHTRARAPSAGERARRSTPSVP 239
SP|P05111|INHA_HUMAN  LHLATSALSLLTHPVLVLLLRCLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSSGGERARRSTPLMS 238
SP|P17490|INHA_RAT    LHLAASAFPLLTHPILVLLLRCLCSCSGRPETTPFLVAHTRARAPSAGERARRSAPSMF 239
SP|P07994|INHA_BOVIN  LHLATSAPLLTHPVLALLRCLCSCSTRPEATPFLVAHTRAKPPSSGGERARRSTPLP 232
SP|P04087|INHA_PIG    LHLAASALPLLTHPVLVLLLRCLCSCSARPEATPFLVAHTRARPPSSGGERARRSTAPLP 236
SP|P55101|INHA_HORSE  LHLAASALPLLTHPVLVLLLRCLCSCSARPEATPFLVAHTRARPPSSGGERTRRSTPLP 239
SP|P38440|INHA_SHEEP  LHLATSAPLLTHPVLALLRCLCSCSARPEATPFLVAHTRAKPPSSGGERARRSTPLP 137
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  LHLAASALPLLTHPVLALLRCLCTCSARPEATPFLVAHTRDRPPSAGERARRSTPSMP 239
TR|G1T154|G1T154_RABIT  LHLAASALPLLTHPVLVLLLRCLCVCSARPEATPFLVAHTKARPPGGGERTRRSAPMP 237
*****: ** : *****:*.***** ** ** : *****: : *.**:*:*: :

SP|Q04997|INHA_MOUSE  WPWSPAALRLLQRPPEEPAAHAFCHRAALNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGSCGMP 299
SP|P05111|INHA_HUMAN  WPWSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIFHYCHGGCGLH 298
SP|P17490|INHA_RAT    WPWSPAALRLLQRPPEEP SAHAFCHRAALNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGSCGMP 299
SP|P07994|INHA_BOVIN  WPWSPAALRLLQRPPEEPAAHADCHRAALNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGGCGLS 292
SP|P04087|INHA_PIG    WPWSPAALRLLQRPPEEPAVHADCHRASLNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGGCGLP 296
SP|P55101|INHA_HORSE  WPWSPAALRLLQRPPEEPAAHANCHRRAALNISFQELGWDRWIVHPRSFIFHYCHGGCGLS 299
SP|P38440|INHA_SHEEP  WPWSPAALRLLQRPPEEPAAHADCHRRAALNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGGCGLP 197
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  WPWSPAALRLLQRPPEEPAAHAYCHRRAALNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGSCGIP 299
TR|G1T154|G1T154_RABIT  WPWSPAALRLLQRPPEEPAAHAYCHRASLNISFQELGWDRWIVHPPSFIFHYCHGGCGLP 297
*****:*****:*.** ** ** : *****:*****:*.** ** ** :*****:*.** :

```

Figura 10. Comparação das sequências de aminoácidos da porção utilizada da inibina- α . A imagem representa um recorte de uma porção da proteína. Foram comparadas as sequências de camundongo, humano, rato, vaca, porco, cavalo, ovelha, hamster e coelho. Os aminoácidos comuns entre camundongos e as demais espécies foram selecionados em amarelo. Em rosa estão marcados os aminoácidos diferentes. Os dados apresentados e o alinhamento das sequências foram obtidos através da base de dados UniProt (UniProt Consortium). A sequência completa da inibina- α de diferentes espécies se encontra na sessão de anexos deste trabalho.

A produção de um bom soro imune depende, em grande parte, da qualidade, pureza e quantidade de antígeno disponível, bem como da especificidade e sensibilidade do ensaio (Cooper and Paterson 2001). Para antígenos proteicos, como no presente trabalho, o material deve ser bioquimicamente homogêneo e deve estar em uma conformação nativa para que o anticorpo seja capaz de reconhecer e bloquear a inibina endógena no camundongo (Benjamin, Berzofsky et al. 1984). O peptídeo de inibina, produzido pela PAB-UFRJ (Plataforma avançada de biomoléculas da UFRJ) utilizou a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS) e foi analisado através da técnica de espectrometria de massas

(TOF/TOF). O espectro obtido apresentou um pico claro e equivalente ao peso molecular esperado do peptídeo, confirmando o sucesso na síntese do peptídeo.

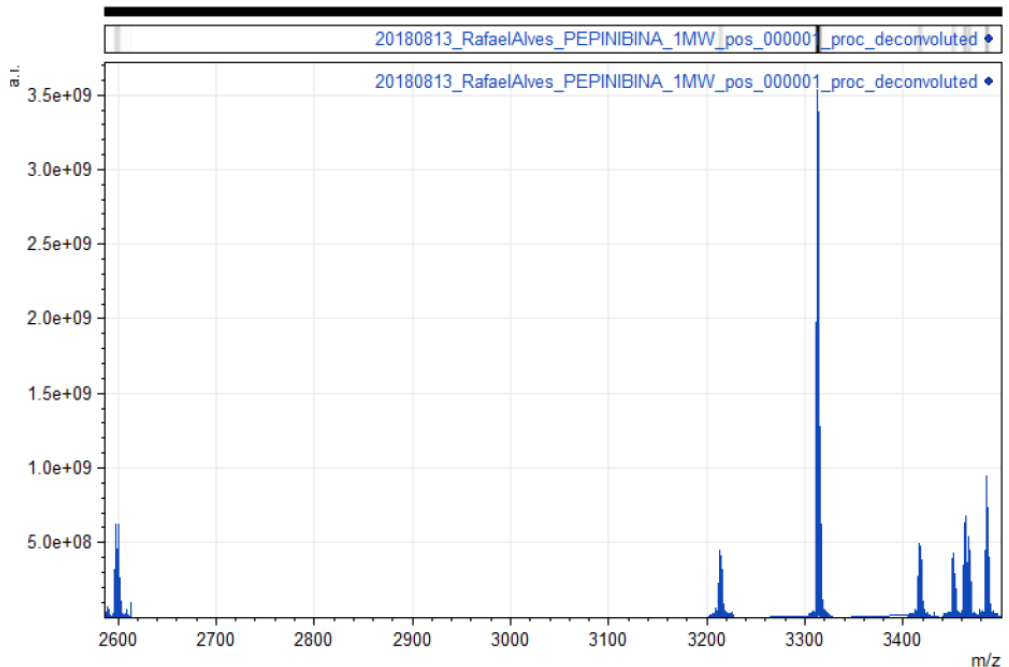


Figura 11. Grau de pureza do peptídeo avaliado através de espectrometria de massas: ESI-MS, "Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry" (FAB-MS; ionização via bombardeamento rápido de átomos)

A segunda etapa do projeto envolveu a produção do soro imune. Após a síntese do peptídeo inibina e a escolha do animal para a produção do soro (coelho) foi iniciado o protocolo de imunização. Os coelhos utilizados não apresentaram qualquer sinal de doença ou de perda de peso durante o experimento (figura 8A). Foram realizadas seis coletas de sangue e cinco imunizações com intervalo de 14 dias entre cada aplicação (figura 8B). O protocolo extenso de imunizações foi adotado com o intuito de aumentar a titulação de anticorpo no soro.

Após o término das inoculações as alíquotas de soro foram avaliadas quanto à presença de anticorpo anti-inibina. Para essa análise foi realizado um ensaio de DotBlot (figura 12). Na coluna 1 foi aplicado 50ug da proteína albumina,

como um controle negativo do experimento. Nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6 foram aplicadas 0 μ g do peptídeo solubilizado nas membranas. As linhas **A** e **B** representam as membranas incubadas utilizando o soro coelho 113 e do coelho 117 respectivamente, onde nas colunas 1 e 2 foi utilizado o soro pré-imune, atuando como um controle negativo do experimento. Nas colunas 3, 4, 5, e 6 o soro imune colhidos nos dias 7, 14, 28 e 72 do experimento. Na coluna 1 não foi observado nenhum sinal, isso porque o anticorpo contra inibina não é capaz reconhecer e se ligar a proteína albumina. Na coluna 2, onde a membrana, contendo o peptídeo de inibina, foi incubada com o soro pré-imune (sem a presença do anticorpo anti-inibina) também não foi observado sinal. Nas colunas 3, 4, 5 e 6 esperava-se uma marcação crescente, visto que a quantidade de anticorpo no soro tende a aumentar ao longo das inoculações até que atinjam um platô. No entanto, o sinal não foi claro. Este resultado pode indicar algumas situações como falha na produção do anticorpo ou uma possível baixa imunogenicidade do peptídeo.

Além da possível baixa imunogenicidade do peptídeo alguns outros pontos podem ser responsáveis pelo resultado observado. A baixa massa molecular do peptídeo, que está no limite do tamanho para uma proteína ser imunogênica, (Stanley 2002); uma possível mudança de conformação do peptídeo após solubilização; o estado de saúde dos animais utilizados; um possível viés técnico do protocolo (manipulação dos animais e processamento do soro) e por fim o adjuvante escolhido.

A conformação nativa é apenas uma das muitas conformações que esse de peptídeo pode assumir em solução (Sela 1969, Benjamin, Berzofsky et al. 1984). Uma possível mudança de conformação, quando em solução, é fator determinante da antigenicidade do peptídeo. Os determinantes antigênicos são topográficos, isto

é, compostos por estruturas na superfície da proteína. Os determinantes topográficos podem estar contidos em um único segmento da sequência de aminoácidos (mas não necessariamente envolvendo todos os resíduos contíguos no segmento) ou montados a partir de resíduos distantes na sequência de aminoácidos, mas reunidos na superfície pelo dobramento da proteína em sua conformação nativa (Benjamin, Berzofsky et al. 1984).

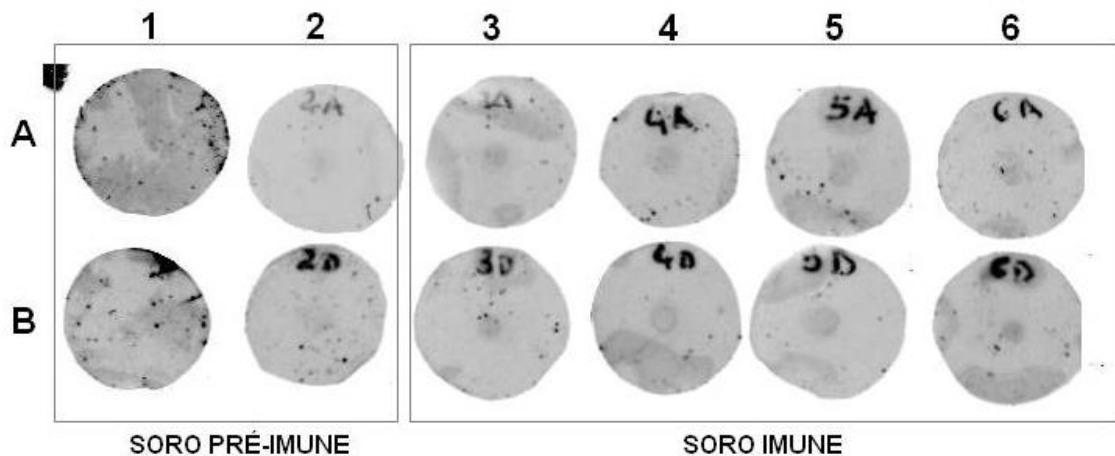


Figura 12. Análise por DotBlot da presença do anticorpo anti-inibina. Linhas A e B representando os soros coletados dos dois coelhos utilizados no procedimento. Colunas 1-6 representando a análise do soro em diferentes momentos do experimento.

A escolha do adjuvante para o uso em animais tornou-se problemática nos últimos anos. O adjuvante de Freund foi amplamente utilizado por mais de cinquenta anos (Opie and Freund 1937). As emulsões de Freund completo e incompleto não são mais permitidas para obtenção de anti-soros policlonais no Brasil. Sua composição a base de lanolina e parafina, bem como, na chamada formulação completa, é acrescida de células de *Micobacterium bovis* inativado pelo calor. Todas essas substâncias são extremamente inflamatórias e levam a reações doloridas, levando ao sofrimento do animal. (Concea RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 33, DE 18

DE NOVEMBRO DE 2016). Por esse motivo o adjuvante Montanide foi escolhido como um substituto para o adjuvante de Freund. Embora a grande maioria dos protocolos de produção do IAS utilizem o adjuvante de Freund, o Montanide se mostrou um substituto eficaz e com menos efeitos adversos que o adjuvante de Freund (Fodey 2008). Por tudo isso, a escolha de um adjuvante alternativo não parece ser a causa da falha na produção do anticorpo.

A fim de eliminar o máximo de variáveis possíveis que podem ter causado a resposta insuficiente na produção do anticorpo, o peptídeo sintetizado foi enviado para uma empresa especializada em produção de anticorpos. A Célula B é uma empresa vinculada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), especializada na produção de soro imune e anticorpos. Uma alíquota do peptídeo liofilizado foi enviada. Foram estabelecidos dois protocolos de imunização, um protocolo de imunização clássico e outro protocolo de imunização rápido. O protocolo curto foi desenvolvido com o intuito de obter uma resposta rápida e sua inclusão nesta dissertação. O relatório inicial emitido pela empresa se encontra na seção de anexos deste trabalho.

No resultado deste protocolo rápido, o coelho apresentou um soro com título abaixo de cem. Este valor indica uma baixa produção de anticorpos contra a proteína. Os resultados obtidos até agora pela empresa célula B corroboram com os obtidos em nossos experimentos. No entanto, é importante ressaltar que o baixo título do anticorpo pode ter sido causado: (1) tanto pelo curto tempo de imunização, que pode não ter sido o suficiente para uma resposta adequada, (2) quanto pela baixa imunogenicidade do peptídeo produzido. O primeiro argumento pode não explicar os resultados, visto que a mudança de classe do anticorpo já é observada após quinze dias, ou seja, se o composto é imunogênico o suficiente já é possível

observar produção de anticorpo com poucos dias de imunização (Birch and Racher 2006). A segunda explicação pode ser mais plausível. O baixo potencial imunogênico do peptídeo parece ser o principal motivo para a falha na produção do anticorpo.

A conjugação de pequenos peptídeos à proteínas carreadoras (como por exemplo o KLH), é uma estratégia para aumentar a resposta imune da proteína (Harris and Markl 1999). A associação do peptídeo com uma proteína carreadora aumenta seu potencial imunogênico (Del Campo, Arancibia et al. 2011). O KLH (Hemocianina de molusco) é uma proteína respiratória encontrada em muitas espécies de moluscos e artrópodes. Esta proteína de alto peso molecular (aproximadamente 8 MDa), é comumente utilizada na pesquisa e estudos clínicos. Dentre as principais características imunológicas oferecidas pelo KLH, está a ativação tanto da resposta imune celular quanto da resposta humoral (Hersh and Dyre 1974), sua composição rica em carboidratos faz com que essa proteína seja altamente imunogênica (Van Kuik 1990). Além disso, por ser evolutivamente distante das proteínas de mamíferos, é comumente escolhida como carreador para os peptídeos sintetizados (Harris and Markl 1999).

Sendo assim, uma próxima estratégia foi acoplar a proteína carreadora com o peptídeo de interesse. Como resultado desse procedimento, e após o término do processo completo de imunização, a empresa célula B foi capaz de produzir quantidades significativas de anticorpo contra essa fração da inibina (protocolo completo na seção de anexos). Ao final do experimento foram coletados 30mL de soro do coelho, desses, 5mL foram purificados utilizando a técnica de cromatografia de afinidade em resina de proteína G Sepharose. A concentração da IgG foi dosada por espectrometria (280 nm). Foram feitas alíquotas de 0,1 ml com IgG na

concentração de 1mg/ml. O anticorpo purificado produzido será avaliado futuramente em ensaios *in vivo* para a estimulação ovariana de camundongos. Após estabelecido o protocolo de imunização pela empresa especializada, o anticorpo produzido poderá ser utilizado como matéria prima na produção do soro anti-inibina.

Ao final do trabalho desenvolvido obtivemos o anticorpo anti-inibina purificado e pronto para ser testado nos protocolos e estimulação. Além disso, do ponto de vista financeiro a produção própria desse insumo se mostrou vantajosa. A tabela 2 apresenta uma comparação dos custos envolvidos em todas as etapas e traça um paralelo entre os gastos de uma produção do soro na UFRJ, na compra do soro produzido pela célula B e na compra do produto no exterior. O custo de produção do peptídeo liofilizado foi de R\$49,15 por mg. Levando em conta que em um protocolo de imunização utiliza-se cerca de 0,4mg de peptídeo por coelho, e cada coelho é capaz de produzir 25 mL de soro, o valor estimando por protocolo de imunização é de R\$19,61. Chegando a um valor de R\$ 0,78 por mililitro de soro. No caso da produção do soro feita pela empresa Célula B, o custo por mililitro de soro produzido é de R\$60,00, somando-se o custo do peptídeo enviado para a produção, temos um total de R\$99,22. O valor de compra do produto CardHyperova® é de U\$80,00 por mL, somando-se as taxas de importação e o valor da cotação do dólar, temos um custo de R\$387,90 por mL de soro.

	Custo IAS por mL		Custo IAS por camundongo	
UFRJ	R\$	1,96	R\$	0,39
UFRJ + CÉL.B	R\$	99,22	R\$	19,84
CARD HYPEROVA®	R\$	387,90	R\$	77,58

Tabela 2. Custo estimado da aplicação do protocolo de hiperestimulação com soro anti-inibina (IAS). Um levantamento do custo final utilizando diferentes estratégias de produção.

Mostrando que a estratégia proposta pelo presente trabalho tem um grande potencial para facilitar, reduzir custos e otimizar a produção de embriões e oócitos de camundongos.

7 CONCLUSÃO

- O peptídeo de Inibina foi produzido com sucesso;
- O protocolo de imunização de coelhos realizado na UFRJ não foi capaz de produzir anticorpos anti-inibina;
- O soro produzido pela empresa Célula B, em um protocolo curto de imunização, apresentou baixa produção de anticorpos anti-inibina;
- Após a conjugação do peptídeo à proteína carreadora, a empresa célula B foi capaz de produzir o anticorpo anti-inibina purificado.

A imunização de coelhos na UFRJ ou a terceirização deste serviço para a produção do soro anti-inibina, apesar dos custos envolvidos, ainda são estratégias financeiramente vantajosas se comparado ao custo da compra do produto equivalente no exterior.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar as melhores diluições do anticorpo produzido para a elaboração do preparado utilizado para o estímulo ovariano em camundongos
- Avaliar a eficácia do anti-soro puro ou combinado com o uso de gonadotrofinas.
- Analisar a taxa de produção de oócitos e embriões.
- Avaliar a viabilidade das estruturas produzidas (taxa de fertilização dos óvulos, taxa de clivagem dos embriões, taxa de formação de blastocisto e taxa de animais nascidos vivos)

9 REFERÊNCIAS

- Akagi, S., H. Kaneko, Y. Nakanishi, T. Takedomi, G. Watanabe and K. Taya (1997). "Ovarian response and FSH profile in cows following injection of various doses of inhibin antiserum." J Vet Med Sci **59**(12): 1129-1135.
- Akagi, S., H. Kaneko, Y. Nakanishi, T. Takedomi, G. Watanabe and K. Taya (1997). "Ovarian response and FSH profile in cows following injection of various doses of inhibin antiserum." Journal of veterinary medical science **59**(12): 1129-1135.
- Al-Obaidi, S. A., B. M. Bindon, M. A. Hillard and T. O'Shea (1987). "Reproductive characteristics of lambs actively immunized early in life with inhibin-enriched preparations from follicular fluid of cows." J Reprod Fertil **81**(2): 403-414.
- Arey, B. J. and F. J. Lopez (2011). "Are circulating gonadotropin isoforms naturally occurring biased agonists? Basic and therapeutic implications." Rev Endocr Metab Disord **12**(4): 275-288.
- Arola, J., J. Liu, P. Heikkila, R. Voutilainen and A. Kahri (1998). "Expression of inhibin alpha in the human adrenal gland and adrenocortical tumors." Endocr Res **24**(3-4): 865-867.
- Auerbach, A. B., R. Norinsky, W. Ho, K. Losos, Q. Guo, S. Chatterjee and A. L. Joyner (2003). "Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production." Transgenic Res **12**(1): 59-69.
- Austin, E. J., M. Mihm, A. C. Evans, P. G. Knight, J. L. Ireland, J. J. Ireland and J. F. Roche (2001). "Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle." Biol Reprod **64**(3): 839-848.
- Ayadi, A., M. C. Birling, J. Bottomley, J. Bussell, H. Fuchs, M. Fray, V. Gailus-Durner, S. Greenaway, R. Houghton, N. Karp, S. Leblanc, C. Lengger, H. Maier, A. M. Mallon, S. Marschall, D. Melvin, H. Morgan, G. Pavlovic, E. Ryder, W. C. Skarnes, M. Selloum, R. Ramirez-Solis, T. Sorg, L. Teboul, L. Vasseur, A. Walling, T. Weaver, S. Wells, J. K. White, A. Bradley, D. J. Adams, K. P. Steel, M. Hrabe de Angelis, S. D. Brown and Y. Herault (2012). "Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project." Mamm Genome **23**(9-10): 600-610.
- Benjamin, D. C., J. A. Berzofsky, I. J. East, F. R. Gurd, C. Hannum, S. J. Leach, E. Margoliash, J. G. Michael, A. Miller, E. M. Prager and et al. (1984). "The antigenic structure of proteins: a reappraisal." Annu Rev Immunol **2**: 67-101.
- Bergendahl, M. and J. D. Veldhuis (2001). "Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? III. Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist's perspective." Hum Reprod **16**(6): 1058-1064.
- Besselsen, D. G., M. J. Romero-Aleshire, S. J. Munger, E. C. Marcus, K. S. Henderson and A. M. Wagner (2008). "Embryo transfer rederivation of C.B-17/Icr-Prkdc(scid) mice experimentally infected with mouse parvovirus 1." Comp Med **58**(4): 353-359.
- Birch, J. R. and A. J. Racher (2006). "Antibody production." Adv Drug Deliv Rev **58**(5-6): 671-685.
- Bleach, E. C., R. G. Glencross, S. A. Feist, N. P. Groome and P. G. Knight (2001). "Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid." Biol Reprod **64**(3): 743-752.
- Botting, J. H. and A. R. Morrison (1997). "Animal research is vital to medicine." Sci Am **276**(2): 83-85.
- Braw, R. H. and A. Tsafirri (1980). "Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary." J Reprod Fertil **59**(2): 267-272.
- Brockmann, G. A. and M. R. Bevova (2002). "Using mouse models to dissect the genetics of obesity." TRENDS in Genetics **18**(7): 367-376.
- Byers, S. L., S. J. Payson and R. A. Taft (2006). "Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs)." Theriogenology **65**(9): 1716-1726.

- Cai, L., A. Sun, H. Li, A. Tsinkgou, J. Yu, S. Ying, Z. Chen and Z. Shi (2015). "Molecular mechanisms of enhancing porcine granulosa cell proliferation and function by treatment in vitro with anti-inhibin alpha subunit antibody." Reprod Biol Endocrinol **13**: 26.
- Chng, Z., L. Vallier and R. Pedersen (2011). "Activin/nodal signaling and pluripotency." Vitam Horm **85**: 39-58.
- Cho, S. W., S. Kim, J. M. Kim and J. S. Kim (2013). "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease." Nat Biotechnol **31**(3): 230-232.
- Choi, J. and J. Smits (2014). "Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles." Gynecol Endocrinol **30**(3): 174-181.
- Choi, S. C. and J. K. Han (2011). "Negative regulation of activin signal transduction." Vitam Horm **85**: 79-104.
- Cockburn, K. and J. Rossant (2010). "Making the blastocyst: lessons from the mouse." The Journal of clinical investigation **120**(4): 995-1003.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-823.
- Cooper, H. M. and Y. Paterson (2001). "Production of polyclonal antisera." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 16**: Unit 16 12.
- D'Alessandro, A., G. Martemucci and N. Iaffaldano (1999). "Active immunization with a synthetic fragment of pig inhibin alpha-subunit increases ovulation rate and embryo production in superovulated ewes but season affects its efficiency." J Reprod Fertil **115**(1): 185-191.
- Del Campo, M., S. Arancibia, E. Nova, F. Salazar, A. Gonzalez, B. Moltedo, P. De Ioannes, J. Ferreira, A. Manubens and M. I. Becker (2011). "[Hemocyanins as immunostimulants]." Rev Med Chil **139**(2): 236-246.
- Eddie, L. W., H. W. Baker, A. Dulmanis, R. E. Higginson and B. Hudson (1978). "Inhibin from cultures of rat seminiferous tubules." J Endocrinol **78**(2): 217-224.
- Elder, G. A., M. A. Gama Sosa and R. De Gasperi (2010). "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease." Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine **77**(1): 69-81.
- Eppig, J. T., H. Motenko, J. E. Richardson, B. Richards-Smith and C. L. Smith (2015). "The International Mouse Strain Resource (IMSR): cataloging worldwide mouse and ES cell line resources." Mamm Genome **26**(9-10): 448-455.
- Erickson, G. F. and A. J. Hsueh (1978). "Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro." Endocrinology **103**(5): 1960-1963.
- Filatov, M., Y. Khramova, E. Parshina, T. Bagaeva and M. Semenova (2017). "Influence of gonadotropins on ovarian follicle growth and development in vivo and in vitro." Zygote **25**(3): 235-243.
- Findlay, J. K., B. Doughton, D. M. Robertson and R. G. Forage (1989). "Effects of immunization against recombinant bovine inhibin alpha subunit on circulating concentrations of gonadotrophins in ewes." J Endocrinol **120**(1): 59-65.
- Fodey, T. L., et al. (2008). "Comparison of three adjuvants used to produce polyclonal antibodies to veterinary drugs. Veterinary immunology and immunopathology 122.1-2: 25-34.
- ."
- Forage, R. G., R. W. Brown, K. J. Oliver, B. T. Atrache, P. L. Devine, G. C. Hudson, N. H. Goss, K. C. Bertram, P. Tolstoshev, D. M. Robertson and et al. (1987). "Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep." J Endocrinol **114**(2): R1-4.
- Frajblat, M. and Amaral (2009). *Criopreservação de embriões. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. Editora Atheneu, 1° edição: cap.17-p.217.
- Fritz MA, S. L. (2011). "Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins."

- Fujisawa, M. (2006). "[Inhibin and testis]." Nihon Rinsho **64 Suppl 4**: 317-324.
- Gagnon, P. (1996). "Purification tools for monoclonal antibodies.: 1-150."
- Gates, A. H. (1956). "Viability and developmental capacity of eggs from immature mice treated with gonadotrophins. Nature 177:754-755."
- GatesAH. (1971). "Maximizing yield and developmental uniformity of eggs." p 64-75. In: Daniel JC, editor. Methods in mammalian embryology. San Francisco (CA): WH Freeman.
- Ginther, O. J., D. R. Bergfelt, L. J. Kulick and K. Kot (2000). "Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles." Biol Reprod **62**(4): 920-927.
- Ginther, O. J., E. L. Gastal, M. O. Gastal and M. A. Beg (2005). "Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares." Biol Reprod **73**(2): 315-323.
- Gressner, O. A. (2011). "Intracrine signaling mechanisms of activin A and TGF-beta." Vitam Horm **85**: 59-77.
- Hall, J. E. (2015). Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book, Elsevier Health Sciences.
- Harris, J. R. and J. Markl (1999). "Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review." Micron **30**(6): 597-623.
- Hersh, E. M. and S. E. Dyre (1974). "Cells binding the antigen keyhole limpet haemocyanin in the peripheral blood and in the lymphocyte cultures of non-immune and immunized human subjects." Clin Exp Immunol **17**(2): 299-309.
- Hillier, S. G. (1991). "Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries." J Endocrinol **131**(2): 171-175.
- Hillier, S. G. (2009). "Paracrine support of ovarian stimulation." Mol Hum Reprod **15**(12): 843-850.
- Hogan, B., Frank Costantini and Elizabeth Lacy (1986). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory. **34**.
- Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J. R. Yeh and J. K. Joung (2013). "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system." Nat Biotechnol **31**(3): 227-229.
- Illmensee, K., K. Kaskar and P. M. Zavos (2006). "In vitro blastocyst development from serially split mouse embryos and future implications for human assisted reproductive technologies." Fertility and sterility **86**(4): 1112-1120.
- Ishigame, H., M. S. Medan, M. Kawaguchi, J. Fukuda, G. Watanabe, K. Y. Arai and K. Taya (2005). "Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin in immature rats." Journal of Reproduction and Development: 0507190012-0507190012.
- Jimenez-Krassel, F., M. E. Winn, D. Burns, J. L. Ireland and J. J. Ireland (2003). "Evidence for a negative intrafollicular role for inhibin in regulation of estradiol production by granulosa cells." Endocrinology **144**(5): 1876-1886.
- Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma and J. Doudna (2013). "RNA-programmed genome editing in human cells." Elife **2**: e00471.
- Jun and J. Hammond (1949). "Recovery and culture of tubal mouse ova." Nature **163**(4131): 28.
- Kaneko, H., Y. Nakanishi, S. Akagi, K. Arai, K. Taya, G. Watanabe, S. Sasamoto and Y. Hasegawa (1995). "Immunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows." Biol Reprod **53**(4): 931-939.
- Kishi, H., K. Taya, G. Watanabe and S. Sasamoto (1995). "Follicular dynamics and secretion of inhibin and oestradiol-17 β during the oestrous cycle of the hamster." Journal of Endocrinology **146**(1): 169-176.
- Klinman, N. R. and J. L. Press (1975). "The B cell specificity repertoire: its relationship to definable subpopulations." Transplant Rev **24**: 41-83.
- Knight, P. G. and C. Glistler (2006). "TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development." Reproduction **132**(2): 191-206.

- Knight, P. G., L. Satchell and C. Glister (2012). "Intra-ovarian roles of activins and inhibins." Mol Cell Endocrinol **359**(1-2): 53-65.
- Legge, M. and M. H. Sellens (1994). "Optimization of superovulation in the reproductively mature mouse." J Assist Reprod Genet **11**(6): 312-318.
- Leon.LR. (2005). "The use of gene knockout mice in thermoregulation studies." J Therm Biol; 30: 273-88."
- Li, R., D. M. Phillips and J. P. Mather (1995). "Activin promotes ovarian follicle development in vitro." Endocrinology **136**(3): 849-856.
- Lu, C., W. Yang, M. Chen, T. Liu, J. Yang, P. Tan, L. Li, X. Hu, C. Fan, Z. Hu and Y. Liu (2009). "Inhibin A inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing its receptor expression in cultured rat granulosa cells." Mol Cell Endocrinol **298**(1-2): 48-56.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville and G. M. Church (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-826.
- Mann, G. E., B. K. Campbell, A. S. McNeilly and D. T. Baird (1989). "Passively immunizing ewes against inhibin during the luteal phase of the oestrous cycle raises the plasma concentration of FSH." J Endocrinol **123**(3): 383-391.
- Mann, M. D., D. A. Crouse and E. D. Prentice (1991). "Appropriate animal numbers in biomedical research in light of animal welfare considerations." Lab Anim Sci **41**(1): 6-14.
- Medan, M. S., H. Wang, G. Watanabe, A. K. Suzuki and K. Taya (2004). "Immunization against endogenous inhibin increases normal oocyte/embryo production in adult mice." Endocrine **24**(2): 115-119.
- Medan, M. S., G. Watanabe, K. Sasaki, Y. Nagura, H. Sakai, M. Fujita, S. Sharawy and K. Taya (2003). "Ovarian and hormonal response of female goats to active immunization against inhibin." J Endocrinol **177**(2): 287-294.
- Miller, B. H. and J. S. Takahashi (2013). "Central circadian control of female reproductive function." Front Endocrinol (Lausanne) **4**: 195.
- Miyazono, K., Y. Kamiya and M. Morikawa (2010). "Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction." J Biochem **147**(1): 35-51.
- Mizumachi, M., J. K. Voglmayr, D. W. Washington, C. L. Chen and C. W. Bardin (1990). "Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin alpha-subunit associated with increased pre- and postovulatory follicle-stimulating hormone levels." Endocrinology **126**(2): 1058-1063.
- Monamy, V. (2017). "Animal experimentation: A guide to the issues. Cambridge University Press."
- Morrell, J. M. (1999). "Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice." Lab Anim **33**(3): 201-206.
- Mousa, M. A. and S. A. Mousa (2003). "Immunohistochemical localization of inhibin and activin-like proteins in the brain, pituitary gland, and the ovary of thin-lipped grey mullet, *Liza ramada* (Risso)." Gen Comp Endocrinol **132**(3): 434-443.
- Mouse Genome Sequencing, C., R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyas, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M.

- Kamal, E. K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W. J. Kent, A. Kirby, D. L. Kolbe, I. Korf, R. S. Kucherlapati, E. J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J. P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D. R. Maglott, E. R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J. H. Mayer, M. McCarthy, W. R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J. D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J. P. Mesirov, W. Miller, T. L. Miner, E. Mongin, K. T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J. C. Mullikin, D. M. Muzny, W. E. Nash, J. O. Nelson, M. N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M. J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K. H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C. S. Pohl, A. Poliakov, T. C. Ponce, C. P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B. A. Roe, K. M. Roskin, E. M. Rubin, A. G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M. S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J. B. Singer, G. Slater, A. Smit, D. R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J. P. Vinson, A. C. Von Niederhausern, C. M. Wade, M. Wall, R. J. Weber, R. B. Weiss, M. C. Wendl, A. P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R. K. Wilson, E. Winter, K. C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S. P. Yang, E. M. Zdobnov, M. C. Zody and E. S. Lander (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-562.
- Muenster, U., R. Korupolu, R. Rastogi, J. Read and W. H. Fischer (2011). "Antagonism of activin by activin chimeras." *Vitam Horm* **85**: 105-128.
- Mylonas, I., J. Makovitzky, D. U. Richter, U. Jeschke, V. Briese and K. Friese (2004). "Expression of the inhibin-alpha subunit in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis." *Gynecol Oncol* **93**(1): 92-97.
- Nagy A, G. M., Vintersten K, Behringer R. (2003). "Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, p 148–149. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press."
- Nambo, Y., H. Kaneko, S. Nagata, M. Oikawa, T. Yoshihara, N. Nagamine, G. Watanabe and K. Taya (1998). "Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares." *Theriogenology* **50**(4): 545-557.
- Nutt, S. L., P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton and L. M. Corcoran (2015). "The generation of antibody-secreting plasma cells." *Nat Rev Immunol* **15**(3): 160-171.
- O'Shea, T., C. M. Andrews, B. M. Bindon, M. A. Hillard, K. Miyamoto and M. J. Sinosich (1991). "Immunization of merino ewes with a synthetic inhibin peptide or with preparations obtained from bovine and porcine follicular fluids by immunoaffinity chromatography result in different effects on ovulation rate and on plasma gonadotrophin concentrations." *Reprod Fertil Dev* **3**(6): 659-670.
- O'Shea T, C. L., Bindon BM and Findlay JK. (1982). "Increased ovulation rate in ewes vaccinated with an inhibin enriched fraction from bovine follicular fluid. (abstr.)." *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* **1982**; **14**:85.
- Opie, E. L. and J. Freund (1937). "An Experimental Study of Protective Inoculation with Heat Killed Tubercle Bacilli." *J Exp Med* **66**(6): 761-788.
- Ostermeier, G. C., M. V. Wiles, J. S. Farley and R. A. Taft (2008). "Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation." *PLoS One* **3**(7): e2792.
- Parkening, T. A., T. J. Collins and E. R. Smith (1982). "Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle." *Neurobiol Aging* **3**(1): 31-35.
- Phillips, D. J. and T. K. Woodruff (2004). "Inhibin: actions and signalling." *Growth Factors* **22**(1): 13-18.

- Popova, E., A. Krivokharchenko, D. Ganten and M. Bader (2002). "Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats." *Mol Reprod Dev* **63**(2): 177-182.
- Quimby, F. W. (1994). "Twenty-five years of progress in laboratory animal science." *Lab Anim* **28**(2): 158-171.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott and F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nat Protoc* **8**(11): 2281-2308.
- Rivier, C. and W. Vale (1989). "Immunoneutralization of endogenous inhibin modifies hormone secretion and ovulation rate in the rat." *Endocrinology* **125**(1): 152-157.
- Rosenthal, N. and S. Brown (2007). "The mouse ascending: perspectives for human-disease models." *Nat Cell Biol* **9**(9): 993-999.
- Schwartz, S., W. J. Kent, A. Smit, Z. Zhang, R. Baertsch, R. C. Hardison, D. Haussler and W. Miller (2003). "Human-mouse alignments with BLASTZ." *Genome Res* **13**(1): 103-107.
- Sela, M. (1969). "Antigenicity: some molecular aspects." *Science* **166**(3911): 1365-1374.
- Shahbazi, M. N. and M. Zernicka-Goetz (2018). "Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo." *Nature cell biology*: 1.
- Shi, F., M. Ozawa, H. Komura, G. Watanabe, C. G. Tsonis, A. K. Suzuki and K. Taya (2000). "Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs." *J Reprod Fertil* **118**(1): 1-7.
- Spearow, J. L. (1988). "Major genes control hormone-induced ovulation rate in mice." *J Reprod Fertil* **82**(2): 787-797.
- Spearow, J. L., P. A. Nutson, W. S. Mailliard, M. Porter and M. Barkley (1999). "Mapping genes that control hormone-induced ovulation rate in mice." *Biol Reprod* **61**(4): 857-872.
- Stamatiades, G. A. and U. B. Kaiser (2018). "Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression." *Mol Cell Endocrinol* **463**: 131-141.
- Stanley (2002). "Essentials of Immunology & Serology: Medical Lab Technician Series Cengage Learning."
- Suzuki, O., T. Asano, Y. Yamamoto, K. Takano and M. Koura (1996). "Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains." *Reprod Fertil Dev* **8**(6): 975-980.
- Svendsen, P., and Jann Hau (1994). "Handbook of laboratory animal science. No. Sirsi) i9780849343780. ."
- Sztejn, J. M. (2011). "Ovarian transplant for transgenic rescue." *Lab Anim (NY)* **40**(1): 9; author reply 9.
- Taft, R. A., M. Davisson and M. V. Wiles (2006). "Know thy mouse." *Trends Genet* **22**(12): 649-653.
- Takedomi, T., H. Kaneko, Y. Aoyagi, M. Konishi, H. Kishi, G. Watanabe and K. Taya (1997). "Effects of passive immunization against inhibin on ovulation rate and embryo recovery in holstein heifers." *Theriogenology* **47**(8): 1507-1518.
- Takedomi, T., H. Kishi, M. S. Medan, Y. Aoyagi, M. Konishi, T. Itoh, S. Yazawa, G. Watanabe and K. Taya (2005). "Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle." *Journal of Reproduction and Development*: 0503090018-0503090018.
- Takeo, T. and N. Nakagata (2015). "Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice." *PLoS One* **10**(5): e0128330.
- Tanaka, Y., Y. Arima, K. Higuchi, T. Ohki, M. Elfeky, M. Ota, D. Kamimura and M. Murakami (2017). "EAE Induction by Passive Transfer of MOG-specific CD4+ T Cells." *Bio-protocol* **7**(13): e2370.
- Uccella, S., S. La Rosa, A. Genasetti and C. Capella (2000). "Localization of inhibin/activin subunits in normal pituitary and in pituitary adenomas." *Pituitary* **3**(3): 131-139.
- Van Belle, T., P. Taylor and M. Von Herrath (2009). "Mouse models for type 1 diabetes." *Drug Discovery Today: Disease Models* **6**(2): 41-45.

- Van Kuik, J. A., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. (1990). "Carbohydrate analysis of hemocyanins. In: Preaux, G., Lontie, R. (Eds.). *Invertebrate Oxygen Carriers*, Leuven University Press, Leuven, pp. 157–163."
- Vergara, G. J., M. H. Irwin, R. J. Moffatt and C. A. Pinkert (1997). "In vitro fertilization in mice: Strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus cell removal." *Theriogenology* **47**(6): 1245-1252.
- Walmer, D. K., M. A. Wrona, C. L. Hughes and K. G. Nelson (1992). "Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone." *Endocrinology* **131**(3): 1458-1466.
- Wang, H., C. Herath, G. Xia, G. Watanabe and K. Taya (2001). "Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum." *REPRODUCTION-CAMBRIDGE* **122**(5): 809-816.
- Wang, W., S. Singh, D. L. Zeng, K. King and S. Nema (2007). "Antibody structure, instability, and formulation." *J Pharm Sci* **96**(1): 1-26.
- Wang, X. N. and G. S. Greenwald (1993). "Hypophysectomy of the cyclic mouse. II. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone on folliculogenesis, FSH and human chorionic gonadotropin receptors, and steroidogenesis." *Biol Reprod* **48**(3): 595-605.
- Watanabe, R. (2011). "Activin receptor-like kinase and the insulin gene." *Vitam Horm* **85**: 1-27.
- Whitten, W. K. (1956). "Culture of tubal mouse ova." *Nature* **177**(4498): 96.
- Wrathall, J. H., B. J. McLeod, R. G. Glencross, A. J. Beard and P. G. Knight (1990). "Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin alpha subunit: effects on gonadotrophin concentrations and ovulation rate in sheep." *J Endocrinol* **124**(1): 167-176.
- Wrathall, J. H., B. J. McLeod, R. G. Glencross and P. G. Knight (1992). "Effects of active immunization against a synthetic peptide sequence of the inhibin alpha-subunit on plasma gonadotrophin concentrations, ovulation rate and lambing rate in ewes." *J Reprod Fertil* **95**(1): 175-182.
- Yamoto, M., S. Minami, R. Nakano and M. Kobayashi (1992). "Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* **74**(5): 989-993.
- Ying, S. Y., A. Becker, N. Ling, N. Ueno and R. Guillemin (1986). "Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF beta) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells." *Biochem Biophys Res Commun* **136**(3): 969-975.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SP|Q04997|INHA_MOUSE  MVSQRSLLLLLLLTDRDVSQGGPELVRELVLAKVKALFLDALGPPAMDGEGGDPGIRRL 60
SP|P05111|INHA_HUMAN  --MVLHLLFLLLTPOGGHSCQGLELARELVLAKVRAFLDALGPPAVTREGGDPGVRRLL 58
SP|P17490|INHA_RAT    MVIQPSLLLLLLLTQDQVDSQGGPELVRELVLAKVKALFLDALGPPAMDGEGGDPGIRRL 60
SP|P07994|INHA_BOVIN  ---MWLQLLLLLLAPQGGHGCHGLELDRELVLAKVRAFLDALGPPVPTGEGGDPGVRRLL 57
SP|P04087|INHA_PIG    ---MWPQLLLLLLLAPRSGHGCGQPELDRELVLAKVRAFLDALGPPAVTREGGDPGVRRLL 57
SP|P55101|INHA_HORSE  MVPPLPLLLLLLLVPQGGHGCGSELDREIVLAKVRAFLDALGPPAVTREGGDPGVRRLL 60
SP|P38440|INHA_SHEEP  -----
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  MLTQPSLLLLLLTQGGDGCQGGPELVRELVLAKVKALILDALGPPVMAGEGGSPEIRRL 60
TR|G1T154|G1T154_RABIT  ---AMVPQLLLLLLLAQGGHGCLGPELDRELVLAKVVRTFLDALGPPAVSAGGAPGVRRLL 58

SP|Q04997|INHA_MOUSE  PRRHAVGGFMHRTSEPEE-EDVSQLILFPATGATCEDQPAARGLAQEAEEGLFTYVFRPS 119
SP|P05111|INHA_HUMAN  PRRHALGGFTHRSEPEEEEDVSQLILFPATDASCEDKSAARGLAQEAEEGLFRYMFRRPS 118
SP|P17490|INHA_RAT    PRRHALGGFMHRTSEPEE-EDVSQLILFPATGATCEDQAAAGGLAQEPPEGLFTYVFRPS 119
SP|P07994|INHA_BOVIN  HRRHAVGGFMRRGSEPED-QDVSQAILFPAAGASCDEPDAGE---AEEGLFTYVFQPS 112
SP|P04087|INHA_PIG    PRRHAVGGFMRRGSEPEE-EDVSQLILFPATGARCDEPAAGELAREAEGLFTYVFRPS 116
SP|P55101|INHA_HORSE  PRRHALGGFARRGSEPEE-EDVSQLILFPASGRCEDEPAAGELAQEAEGGLFTYVFRPS 119
SP|P38440|INHA_SHEEP  -----DAGE---AEEGLFTYVFQPS 17
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  PRRHALGGSMHRTSEPEE-EDVSQVILFPATGATCEDQPAAGGLAQEAEGGLFTYVFRPS 119
TR|G1T154|G1T154_RABIT  PRRHAPGGFLHRGSEPEE-EDVSQLILFPAAGACEDQPAAGGLAQEAEEGLFTYVFRPS 117
                                     *
                                     :*** *:*:*

SP|Q04997|INHA_MOUSE  QHIRSHQVTSACLWFHTGLGRKSTAAANSSAPLLDLLLLSSGGPMVAVPVSILGQPPRRWAV 179
SP|P05111|INHA_HUMAN  QHTRSQVTSACLWFHTGLDRQGTAAANSSEPLLGLLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAV 178
SP|P17490|INHA_RAT    QHIRSHQVTSACLWFHTGLDRKSTAAANSRPLDLLLLSSGGPMVAVPVSILGQSPRRWAV 179
SP|P07994|INHA_BOVIN  QHTRSQVTSACLWFHTGLDRQETAANSSSEPLLGLLVLTSGGMPVPMVSLGQAPRRWAV 172
SP|P04087|INHA_PIG    QHTRSQVTSACLWFHTGLDRQGMAAANSSGPLDLLLLSSRGPVAVPMSLQAPRRWAV 176
SP|P55101|INHA_HORSE  QHMRSRQVTSACLWFHTGLDRQGTAAANSSEPLLGLLLALSSGGPMVAVPVTLGQAPPWAV 179
SP|P38440|INHA_SHEEP  QHTRSQVTSACLWFHTGLDRQETAANSSSEPLLGLLVLTSGGMPVPMVSLGQAPRRWAV 77
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  QHMRSHQVTSACLWFHTGLDRKNTVLSNSGTLDLLLLSSGGPVAVPVSILGQPPRRWAV 179
TR|G1T154|G1T154_RABIT  RHIRSRKVTSAQLWFYTLGNRQGAANSSGPLDLLLLSSGGTAVPMSLGHAPPRWAV 177
:* **::***:***:***:* . :*** **:*:* * **
                                     *

SP|Q04997|INHA_MOUSE  LHLAASAPFLPTHPIVLVLLRCPLCSCSARPEATPFLVAHTRARAPSAGERARRSTPSVP 239
SP|P05111|INHA_HUMAN  LHLATSALSLLTHPIVLVLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRTRPPSGGERARRSTPLMS 238
SP|P17490|INHA_RAT    LHLAASAPFLPTHPIVLVLLRCPLCSCSARPEATPFLVAHTRARAPSAGERARRSTPSMP 239
SP|P07994|INHA_BOVIN  LHLATSAPFLPTHPIVLVLLRCPLCSCSARPEATPFLVAHTRAKPPSGGERARRSTPLPL 232
SP|P04087|INHA_PIG    LHLAASALPPLTHPIVLVLLRCPLCSCSARPEATPFLVAHTRARPPSGGERARRSTAPLP 236
SP|P55101|INHA_HORSE  LHLAASALPPLTHPIVLVLLRCPLCSCSARPEATPFLVAHTRARPPSGGERTRRSTPPLP 239
SP|P38440|INHA_SHEEP  LHLATSAPFLPTHPIVLVLLRCPLCSCSARPEATPFLVAHTRAKPPSGGERARRSTPPLP 137
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  LHLAASALPPLTHPIVLVLLRCPLCTCSARPEATPFLVAHTRDRPPSAGERARRSTPSMP 239
TR|G1T154|G1T154_RABIT  LHLAASALPPLTHPIVLVLLRCPLCVC SARPEATPFLVAHTRKARPPGGGERTRRSTAPME 237
*****: *****.****** ** ** : ***** : * .***:***:

SP|Q04997|INHA_MOUSE  WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHAFCHRAALNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGMP 299
SP|P05111|INHA_HUMAN  WPWSPALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWERWIVYPPSFIHYCHGCGGLH 298
SP|P17490|INHA_RAT    WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHAFCHRAALNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGMP 299
SP|P07994|INHA_BOVIN  WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHADCHRAALNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGLS 292
SP|P04087|INHA_PIG    WPWSPAAALRLLQRPPEEPAVHADCHRASLNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGLP 296
SP|P55101|INHA_HORSE  WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGLS 299
SP|P38440|INHA_SHEEP  WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHADCHRAALNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGLP 197
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHAYCHRVALNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGLP 299
TR|G1T154|G1T154_RABIT  WPWSPAAALRLLQRPPEEPAAHAYCHRASLNISFQELGWRWIVHPPSFIHYCHGCGGLP 297
*****:*****:*** ** * .*****:*****:***:***:***:***:

SP|Q04997|INHA_MOUSE  T-SDLPLVPVGPPTFPVQPLFLVPGAQPCCAALPGSMRSLRVRTTSDGGYSFKYEMVPNL 358
SP|P05111|INHA_HUMAN  IPPNLSLPVPGAPPTPAQFYSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNL 358
SP|P17490|INHA_RAT    T-SDLPLVPVGPAPTTPAQPLFLVPGAQPCCAALPGSMRSLRVRTTSDGGYSFKYEMVPNL 358
SP|P07994|INHA_BOVIN  PPQDLPLVPVGPPTFPVQPLSLVPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYEMVPNL 352
SP|P04087|INHA_PIG    TLPNPLSLVPGAPPTFPVQPLLVPGAQPCCAALPGTMRSLRVRTTSDGGYSFKYETVPNL 356
SP|P55101|INHA_HORSE  APPDLPLVPVGPPTFPVQPLSLVPGAQPCCAALPGTMRPLRVRTTSDGGYSFKYEVVNL 359
SP|P38440|INHA_SHEEP  TLQDLPLVPVGPPTFPVQPLSLVPGAQPCCAALPGTMRPLRVRTTSDGGYSFKYEMVPNL 257
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  T-TDLPLPAPVGPPTPAQPLFLVPGAQPCCAALPGSMRSLRVRTTSDGGYSFKYEMVPNL 358
TR|G1T154|G1T154_RABIT  TPADTLPVPGVPTPIPVLSLLPGAQPCCAAVPGTMRPLRVRTTSDGGYSFKYEMVPNL 357
: * . * .**** * :***: *****:*** * :*****:*****

SP|Q04997|INHA_MOUSE  ITQHCACI 366
SP|P05111|INHA_HUMAN  LTQHCACI 366
SP|P17490|INHA_RAT    ITQHCACI 366
SP|P07994|INHA_BOVIN  LTQHCACI 360
SP|P04087|INHA_PIG    LTQHCACI 364
SP|P55101|INHA_HORSE  LTQHCACI 367
SP|P38440|INHA_SHEEP  LTQHCACI 265
TR|Q589C9|Q589C9_MESAU  ITQHCACI 366
TR|G1T154|G1T154_RABIT  LTQHCACI 365
:*****

```

Serviço prestado para: Marcel Frajblat
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dados para faturamento: Fundação Educacional Ciência e Desenvolvimento
Av. Vinte e Quatro, s/n° CCS bloco L, Cidade Universitária - CEP 21941-902
CNPJ: 03.078.588/0001-10
Inscrição municipal: 0.248.945-7
Inscrição Estadual: 77.032.754
Tel.: 22905436

Data: 03/08/2018

Lista de serviços

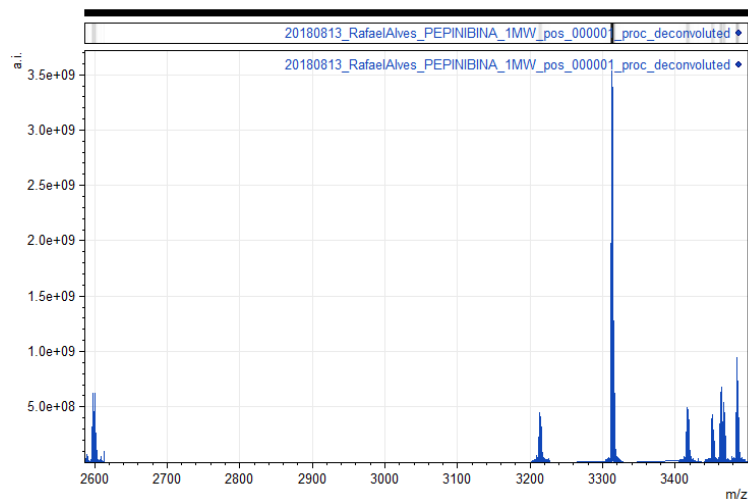
Código do Serviço	Código do item	Lote	Quantidade	Temperatura de estocagem
PAB01	SP18-001	----	117,3 mg	Abaixo de - 20 °C

Relatório dos serviços prestados

PAB01 – Síntese Química de Peptídeos
Sequência submetida: STPSVPWPWSPAALRLLQRPPEEPAAHAFc
Massa molecular predita: 3311,80 Da
Aspecto: Pó amarelado

Avaliação realizada: Espectrometria de massas (ESI) realizada em colaboração com o Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO / UFRJ).

Massa molecular determinada por espectrometria de massas: 3309 Da



OBS: A porção N-terminal do peptídeo encontra-se amidada devido ao processo de síntese utilizado.

A amostra pode conter traços de N,N dimetilformamida, acetona, ácido trifluoracético, etanoditiol, trisopropilsilano e tianisol.

PLATAFORMA AVANÇADA DE BIOMOLÉCULAS/CENABIO/UFRJ

Av. Carlos Chagas Filho, 373 - Prédio do CCS - Bloco M - ANEXO - Cidade Universitária - CEP: 21941-902

Telefone: +55 (21) 3938-0903

e-mail: protein@bioqmed.ufrj.br

Célula B

Desenvolvimento de Anticorpos

FAURGS

Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CGC 74.704.008/0001-75

Reg. nº 19.301 Livro A 11, Fls 200 Ofício de Registro Especial



SERVIÇO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E
POLICLONAIS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL – UFRGS

Porto Alegre, 15 de agosto de 2019.

A
Luiz Ricardo Berbert

Relatório de imunização de coelho com antígeno fornecido.

Soro policlonal: coelho anti-inibina

O Serviço consistiu na imunização de um coelho com a proteína Inibina fornecida na forma de peptídeo sintético liofilizado.

O coelho foi inoculado três vezes, com intervalo de 7 dias, com 100 microgramas da proteína na presença de adjuvante.

O resultado do teste de dot-blot (o protocolo é detalhado abaixo) após as imunizações com a proteína foi que o coelho apresentou um soro com título abaixo de 100. Este valor indica uma baixa produção de anticorpos contra a proteína.

Os motivos da baixa imunogenicidade podem ser: 1) o protocolo solicitado foi um protocolo com uma imunização rápida, com intervalos curtos; 2) a proteína tem massa molecular de 3000 Da, no limite do tamanho para uma proteína ser imunogênica (Stanley, 2002). Para aumentar a imunogenicidade da proteína sugerimos uma conjugação com KLH e repetir a imunização.

Stanley, J. Essentials of Immunology & Serology: Medical Lab Technician Series Cengage Learning, 2002.

Itabajara S Vaz Jr
professor
UFRGS

Laboratório de Imunologia
Centro de Biotecnologia- UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43421 CP. 15005
91501-970 Porto Alegre - RS
Fone: (51) 3308-6076
Fax: (51) 3308-7309
E-mail: Anticorpo@cbiot.ufrgs.br

Célula B

Desenvolvimento de Anticorpos

FAURGS

Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CGC 74.704.008/0001-75

Reg. nº 19.301 Livro A 11, Fls 200 Ofício de Registro Especial



SERVIÇO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E
POLICLONAIS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL – UFRGS

Protocolo Utilizado na imunização

O coelho recebeu por via subcutânea uma inoculação de 100 µg de antígeno emulsificado em igual volume de adjuvante oleoso. Em intervalos de sete dias foram administradas mais duas inoculações do antígeno emulsificado em adjuvante. Cinco dias após a última dose, o soro era coletado e testado por dot-blot para a detecção de anticorpos específicos contra o respectivo antígeno.

Dot-Blot

Para a imunodetecção e quantificação por *dot blot* do anticorpo, a proteína (aproximadamente 0,5 µg) foi aplicada em membrana de nitrocelulose 0,45 µm. Após secar por 30 minutos em temperatura ambiente, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio por 1 hora e incubada por 2 horas com diluições seriadas do soro diluído em blotto 5%. A seguir foram lavadas três vezes por 5 minutos com blotto 5% e incubadas com conjugado anti-IgG de camundongo-fosfatase diluído 1/ 5000 em blotto 5% por 90 minutos a temperatura ambiente, posteriormente lavadas três vezes com PBS por 10 minutos e reveladas

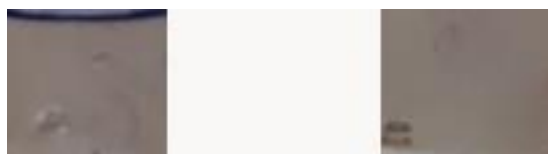


Figura: Resultado do dot-blot do soro do coelho imunizado com a Inibina A) soro diluído 1:100 B) soro diluído 1:500

Itabajara S Vaz Jr
professor
UFRGS

Laboratório de Imunologia
Centro de Biotecnologia- UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43421 CP. 15005
91501-970 Porto Alegre - RS
Fone: (51) 3308-6076
Fax: (51) 3308-7309
E-mail: Anticorpo@cbiot.ufrgs.br

Célula B

Desenvolvimento de Anticorpos

FAURGS

Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CGC 74.704.008/0001-75

Reg. nº 19.301 Livro A 11, Fls 200 Ofício de Registro Especial



SERVIÇO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E
POLICLONAIS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL – UFRGS

Porto Alegre, 23 de outubro de 2019.

A
Luiz Ricardo Berbert

Relatório de imunização de coelho com antígeno fornecido.

Soro policlonal: coelho anti-inibina

O Serviço consistiu na imunização de um coelho com a proteína Inibina fornecida na forma de peptídeo sintético liofilizado.

O peptídeo foi ressuscitado e conjugado com a proteína KLH com o uso de glutaraldeído foi baseado no protocolo descrito por Carter (1996) com modificações. Uma outra fração do peptídeo foi conjugado com a BSA.

O coelho foi inoculado três vezes, com intervalo de 10 dias, com 200 microgramas de inibina conjugada com KLH na presença de adjuvante.

Após o soro foi testado por dot-blot (o protocolo é detalhado abaixo) usando inibina conjugada com BSA como antígeno. O coelho apresentou um soro com título acima de 8000. Este valor indica uma produção de anticorpos contra a proteína.

Um volume de 5ml de soro foi utilizado para purificação de IgG total.

Itabajara S Vaz Jr
professor
UFRGS

Laboratório de Imunologia
Centro de Biotecnologia- UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43421 CP. 15005
91501-970 Porto Alegre - RS
Fone: (51) 3308-6076
Fax: (51) 3308-7309
E-mail: Anticorpo@cbiot.ufrgs.br

Célula B

Desenvolvimento de Anticorpos

FAURGS

Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CGC 74.704.008/0001-75

Reg. nº 19.301 Livro A 11, Fls 200 Ofício de Registro Especial



SERVIÇO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E
POLICLONAIS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL – UFRGS

Protocolo Utilizado na Conjugação

Conjugação peptídeo com KLH ou BSA com o uso de glutaraldeído foi baseada segundo protocolo descrito por Carter (1996) com modificações. Em uma solução de 5mg/ml do peptídeo foi adicionado o mesmo volume de uma solução de 5mg/ml de KLH (ou BSA). A seguir, sob agitação foi adicionado dois volumes de uma solução de glutaraldeído 0,2%. Foi mantida em agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado glicina 1M (mesmo volume da solução de peptídeo) e mantida em agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após a conjugação foi dialisada em PBS.

Carter, John. (1996). Conjugation of Peptides to Carrier Proteins via Glutaraldehyde. 10.1007/978-1-60327-259-9_117.

Protocolo Utilizado na imunização

O coelho recebeu por via subcutânea uma inoculação de 200 µg de antígeno conjugado com KLH emulsificado em igual volume de adjuvante oleoso. Em intervalos de dez dias foram administradas mais duas inoculações do antígeno emulsificado em adjuvante. Cinco dias após a última dose, o soro era coletado e testado por dot-blot para a detecção de anticorpos específicos contra o respectivo antígeno.

Protocolo Utilizado no Dot-Blot

Para a imunodeteção e quantificação por *dot blot* do anticorpo, a proteína conjugada com BSA (aproximadamente 0,5 µg) foi aplicada em membrana de nitrocelulose 0,45 µm. Após secar por 30 minutos em temperatura ambiente, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio por 1 hora e incubada por 2 horas com diluições seriadas do soro diluído em blotto 5%. A seguir foram lavadas três vezes por 5 minutos com blotto 5% e incubadas com conjugado anti-IgG de camundongo-fosfatase diluído 1/ 5000 em blotto 5% por 90 minutos a temperatura ambiente, posteriormente lavadas três vezes com PBS por 10 minutos e reveladas

Laboratório de Imunologia
Centro de Biotecnologia- UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43421 CP. 15005
91501-970 Porto Alegre - RS
Fone: (51) 3308-6076
Fax: (51) 3308-7309
E-mail: Anticorpo@cbiot.ufrgs.br

Célula B

Desenvolvimento de Anticorpos

FAURGS

Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
CGC 74.704.008/0001-75

Reg. nº 19.301 Livro A 11, Fls 200 Ofício de Registro Especial



SERVIÇO DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E
POLICLONAIS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL – UFRGS



Figura: Resultado do dot-blot do soro do coelho imunizado com a Inibina A) soro diluído 1:200 B) soro diluído 1:4000 e B) soro diluído 1:8000

Protocolo Utilizado na purificação de IgG

Para a purificação de IgG, o soro do coelho imunizado foi submetido à cromatografia de afinidade em resina de proteína G Sepharose, que foi equilibrada previamente com tampão fosfato de sódio 20mM/ pH 7,0. O material não adsorvido à resina foi removido com o mesmo tampão. A IgG purificada foi eluída com glicina-HCl 100mM/ pH 2,7, coletada em alíquotas de 1mL em microtubos contendo 70 µL de Tris-HCl 1 M/ pH 9,0. As amostras contendo IgG foram reunidas e dialisadas em PBS. A concentração da IgG foi dosada por espectrometria (280 nm). Foram feitas alíquotas de 0,1 ml com IgG na concentração de 1mg/ml.

Itabajara S Vaz Jr
professor
UFRGS

Laboratório de Imunologia
Centro de Biotecnologia- UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43421 CP. 15005
91501-970 Porto Alegre - RS
Fone: (51) 3308-6076
Fax: (51) 3308-7309
E-mail: Anticorpo@cbiot.ufrgs.br