Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Padronização, otimização e caracterização bioquímica/biofísica
da expressão de NPP1 e Anexina V”

Tatiane Aparecida Buzanello Janku

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências, Área
Química.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Padronização, otimização e caracterização bioquímica/biofísica
da expressão de NPP1 e Anexina V”

(Versão Corrigida)

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

Tatiane Aparecida Buzanello Janku

Orientador: Pietro Ciancaglini

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Janku, Tatiane Aparecida Buzanello.

Padronização, otimização e caracterização bioquímica/biofísica da expressão de NPP1 e Anexina V.

Ribeirão Preto, 2018.

115 páginas.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1. Biomineralização. 2. NPP1. 3. Anexina V.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Vandréia e Estéfano, por
todo carinho e apoio em cada momento
de minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço imensamente a Deus por ter guiado os meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini por ter me recebido em seu laboratório e como um excelente orientador, ensinado em diversos momentos com muita dedicação e por todo apoio.

Aos meus pais, Vandréia Bidinella Buzanello Janku e Estéfano Segóbia Janku, por todo amor e apoio, sendo alicerce de minha vida e à minha irmã, Taisy Buzanello Janku, amo vocês.

Aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada - Sistemas Miméticos de Biomembranas: Bruno, Marina, Maytê, Ana Maria, Heitor, Luiz, Camila, Cláudio, e Ekeveliny pelos momentos que trabalhamos juntos e pelo apoio.

Às amigas do curso técnico em Design de Interiores, Thelma, Marília, Marina e Marisol que sempre me apoiaram, pelas risadas e momentos juntos.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

***O destino não é uma questão de sorte, é
uma questão de escolha, não é algo a se
esperar, é algo a se conquistar.***

(Willian Jennings Bryan)

JANKU, Tatiane A. B. “Padronização, otimização e caracterização bioquímica/biofísica da expressão de NPP1 e Anexina V”. 2018. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

Palavras chaves: 1. Biomineralização óssea. 2. NPP1. 3. Anexina V.

O processo de biomineralização óssea é a deposição de cristais de fosfato de cálcio, na forma de hidroxiapatita formando o tecido ósseo. São mediados pelas vesículas da matriz (MVs) que são liberadas no local específico do início da biomineralização. As MVs contêm altas concentrações de íons Ca^{2+} e fosfato inorgânico (Pi), proporcionando um microambiente adequado para a formação inicial e propagação dos cristais de hidroxiapatita. Para que isso ocorra corretamente são necessárias diversas proteínas/enzimas, bem como microambientes com condições específicas. Neste trabalho uma atenção especial foi dada a duas proteínas presentes nas MVs: Anexina V (AnxA5) e a nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase-1 (NPP1). A Anexina V é responsável pela formação de um canal de cálcio por meio da associação desta proteína tanto com a face externa quanto interna da membrana das MVs. A NPP1 possui a função principal de hidrolisar adenosina trifosfato (ATP), formando adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato (PPi). Assim, experimentos de expressão de Anexina V e NPP1 foram realizados com o intuito de iniciar os estudos de interação entre as duas proteínas, por meio de reconstituição em lipossomos. A expressão de Anexina V foi realizada em células *E. coli* BL21(DE3) e induzida por isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG); para purificação, três procedimentos foram necessários, utilizando coluna de níquel, coluna *Desalting* e coluna de troca iônica (*Mono-Q*). Experimentos de dicroísmo circular foram realizados com amostras de Anexina V após purificação e mostraram que todas as amostras apresentavam estruturas em α -hélice. Pelo método da gota pendente foi estudada a interação de Anexina V com íons Ca^{2+} (10 mM) em monocamadas constituídas por dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e de uma mistura de composição lipídica 9:1 de DPPC e dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS). Os dados obtidos mostraram alta afinidade de Anexina V por monocamadas constituídas de (9:1) DPPC:DPPS na presença de íons Ca^{2+} . A expressão de NPP1 foi realizada com transfecção por meio de eletroporação do DNA recombinante em células COS-1, e seleção com antibiótico G418 após 24 horas de cultivo. Amostras de fração de membrana controle e NPP1 recombinante foram preparadas após 60 horas de cultivo celular e foi observada atividade catalítica na amostra de fração de membrana da NPP1. Todas as amostras de expressão, tanto de Anexina V e NPP1, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A padronização da Anexina V foi obtida com sucesso, porém com relação à NPP1, experimentos ainda devem ser realizados a fim de padronizar a obtenção desta proteína recombinante em quantidade suficiente para continuar os estudos.

JANKU, Tatiane A. B. "Standardization, optimization and biochemical / biophysical characterization of the expression of NPP1 and Annexin V". Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

ABSTRACT

Key words: 1. Bone biomineralization. 2. NPP1. 3. Annexin V.

The bone biomineralization process is the deposition of calcium phosphate crystals in the form of hydroxyapatite forming the bone tissue. They are mediated by matrix vesicles (MVs) that are released at the specific site of the onset of biomineralization. MVs contain high concentrations of Ca^{2+} ions and inorganic phosphate (Pi), providing a suitable microenvironment for the initial formation and propagation of hydroxyapatite crystals. To occur properly, several proteins/enzymes are needed, as well as microenvironments with very particular conditions. In this work, special attention should be given to two proteins present in the MVs: Annexin V (AnxA5) and nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP1). Annexin V is responsible for the formation of a calcium channel through the association of this protein with both the outer and the inner face of the MVs membrane. NPP1 has the main function of hydrolyzing adenosine triphosphate (ATP), adenosine monophosphate (AMP) and pyrophosphate (PPi). Thus, experiments of expression of Annexin V and NPP1 were performed with the aim of initiating the interaction studies between the two proteins, through reconstitution in liposomes. Annexin V expression was performed in *E.coli* BL21 (DE3) and the cells were induced by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG); for purification, three procedures were required using a nickel column, a *Desalting* column and an ion exchange column (*Mono-Q*). Circular dichroism experiments were performed with Annexin V samples after purification and showed that all samples contain α -helix structures. Using the pendant drop method, the interaction of Annexin V with (10 mM) Ca^{2+} ions was studied in monolayers composed of dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) and a mixture of lipid composition 9:1 DPPC and dipalmitoyl-phosphatidyl-serine (DPPS). Data showed high affinity of Annexin V by monolayers constituted of (9: 1) DPPC:DPPS in the presence of Ca^{2+} ions. NPP1 expression was performed with transfection by electroporation of the recombinant DNA into COS-1 cells and selection with G418 antibiotic after 24 hours of culture. Samples of the control membrane fraction and recombinant NPP1 were prepared and the activity of the membrane fraction of NPP1 was observed in the samples. All expression samples, both AnxA5 and NPP1, were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The standardization of Annexin V has been obtained with success, but regarding NPP1, experiments have yet to be performed to standardize the production of this recombinant protein and to obtain enough quantity to continue the study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação do processo de ossificação intramembranosa.....	18
Figura 2 -	Representação esquemática das moléculas envolvidas na calcificação mediada pelas vesículas da matriz incluindo as reações enzimáticas mais favorecidas dos substratos fisiológicos.....	20
Figura 3 -	Estrutura cristalina da Anexina V humana.....	22
Figura 4 -	Domínio estrutural da NPP1.....	23
Figura 5 -	Comparação de sequências de aminoácidos de NPP1 de organismos diferentes.....	24
Figura 6 -	Reação majoritária da NPP1.....	24
Figura 7 -	Esquema mostrando a atuação das enzimas de restrição que produzem extremidades retas ou coesivas.....	26
Figura 8 -	Espectro de dicroísmo circular de UV (ultra-violeta) distante de uma estrutura α -hélice (vermelho), β -folha (azul) e uma conformação desordenada (verde).....	29
Figura 9 -	Configuração experimental de um instrumento de gota pendente....	30
Figura 10 -	Mapa do vetor de expressão pCMV-Script.....	35
Figura 11 -	Formação do íon p-nitrofenolato no ensaio de atividade com Timidina 5'-monofosfato p-nitrofenil ester de sódio.....	43
Figura 12 -	Mapa do plasmídeo de expressão pPROEX-HTb.....	45
Figura 13 -	Gel de agarose das amostras de Maxiprep.....	51
Figura 14 -	Gel de Agarose 1% da Digestão das Amostras de Maxiprep.....	52
Figura 15 -	Culturas após adição de antibiótico do experimento 3.....	54
Figura 16 -	Culturas contaminadas do experimento 3.....	54
Figura 17 -	Culturas após adição de antibiótico do experimento 4.....	55
Figura 18 -	Contaminação das culturas sem antibiótico do experimento 4.....	56
Figura 19 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida da preparação da fração de membrana do experimento 6.....	59
Figura 20 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras concentradas da preparação da fração de membrana do experimento 6.....	60
Figura 21 -	Sequência de aminoácidos codificante do peptídeo de sinal da proteína PLAP, NPP1 e âncora de GPI da PLAP.....	61
Figura 22 -	Sequência de bases da NPP1 recombinante.....	62
Figura 23 -	Sequência da NPP1 recombinante com destaque para os <i>primers</i> desenhados.....	63
Figura 24 -	Sequência da NPP1 recombinante obtida após o sequenciamento.....	67

Figura 25 - Tradução da sequência obtida pelo sequenciamento.....	68
Figura 26 - Tradução da sequência esperada da NPP1 recombinante.....	68
Figura 27 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão e primeira etapa de purificação da Anexina V recombinante.....	70
Figura 28 - Cromatograma de purificação da Anexina V na coluna <i>Desalting</i>	71
Figura 29 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q.....	72
Figura 30 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da terceira etapa de purificação da Anexina V.....	73
Figura 31 - Gel de eletroforese em poliacrilamida da segunda expressão de Anexina V.....	76
Figura 32 - Cromatograma das duas etapas de purificação da Anexina V na coluna <i>Desalting</i>	77
Figura 33 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q.....	78
Figura 34 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q com destaque para as frações de 25 a 45.....	79
Figura 35 - Gel de eletroforese em poliacrilamida das frações eluídas a partir da purificação da segunda e terceira alíquotas.....	80
Figura 36 - Gel de eletroforese em poliacrilamida da etapa de purificação em coluna de níquel.....	83
Figura 37 - Cromatograma de purificação da amostra de Anexina V do terceiro experimento de expressão na coluna <i>Desalting</i>	84
Figura 38 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q.....	85
Figura 39 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q com destaque para as frações de 39 a 42.....	86
Figura 40 - Gel de eletroforese em poliacrilamida da terceira expressão de Anexina V.....	87
Figura 41 - Espectro de Dicroísmo Circular das Amostras Purificadas de Anexina V recombinante.....	89
Figura 42 - Variação da Tensão superficial em função do tempo para a composição DPPC na ausência de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V.....	91
Figura 43 - Variação da Tensão superficial em função do tempo para a composição DPPC na presença de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V.....	92
Figura 44 - Variação da Tensão superficial em função do tempo para a composição 9:1 DPPC:DPPS na ausência de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V.....	93
Figura 45 - Variação da Tensão superficial em função do tempo para a composição 9:1 DPPC:DPPS na presença de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes necessários e seus respectivos volumes para a reação de digestão.....	37
Tabela 2 -	Preparação das amostras aplicadas no gel de agarose 1% para análise.....	38
Tabela 3 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 1.....	40
Tabela 4 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 2.....	40
Tabela 5 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 3.....	40
Tabela 6 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 4.....	41
Tabela 7 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 5.....	41
Tabela 8 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 6.....	42
Tabela 9 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 7.....	42
Tabela 10 -	Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 8.....	42
Tabela 11 -	Concentração das amostras de DNA purificado após <i>Maxiprep</i> .	50
Tabela 12 -	Concentração das amostras de fração de membrana do Experimento 1.....	53
Tabela 13 -	Concentração das amostras de fração de membrana do Experimento 2.....	53
Tabela 14 -	Concentração das amostras obtidas no experimento 6.....	57
Tabela 15 -	Atividade catalítica das amostras do experimento 6.....	57
Tabela 16 -	Concentração das amostras final.....	58
Tabela 17 -	<i>Primers</i> externos desenhados.....	64
Tabela 18 -	<i>Primers</i> internos desenhados.....	65
Tabela 19 -	Concentração das amostras de Anexina V durante o processo de purificação (primeiro experimento de expressão)	74
Tabela 20 -	Concentração das amostras de Anexina V durante o processo de purificação (segundo experimento de expressão)	81
Tabela 21 -	Concentração das amostras de Anexina V após a purificação na coluna <i>Mono-Q</i> (terceiro experimento de expressão)	88
Tabela 22 -	Valores de pressão de exclusão (π_{exc}) obtidos para as composições DPPC e 9:1 DPPC:DPPS contendo 0,5 μ g of Anexina V.....	95

Tabela 23 -	Reagentes e quantidades para preparação de gel de poliacrilamida 7% e 10%	111
-------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	- Adenosina Difosfato
AMP	- Adenosina Monofosfato
AnxAS	- Anexinas
AnxA2	- Anexina A2
AnxA5	- Anexina A5; Anexina V
AnxA6	- Anexina A6
ATP	- Adenosina Trifosfato
cDNA	- DNA complementar
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPC	- Dipalmitoil fosfatidilcolina
DPPS	- Dipalmitoil fosfatidilserina
Pcho	- Fosfocolina
PEA	- Fosfoetanolamina
GPI	- Glicosil Fosfatidilinositol
γ	- Tensão Superficial
HEPES	- Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico de sódio
IPTG	- Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
MVs	- Vesículas da Matriz
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPP	- Nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
NPP1	- Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase-1
PBS	- <i>Phosphate Buffer Saline</i> – Tampão Fosfato Salino
Π	- Pressão Superficial
Π_{exc}	- Pressão Superficial de Exclusão
Pi	- Fosfato Inorgânico
pNF	- p-nitrofenolato
PPi	- Pirofosfato
RNA _m	- RNA mensageiro
TE	- Tampão de eluição
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina
Tris	- Tris(hidroximetil)aminometano
TNAP	- Fosfatase Alcalina Tecido Não- Específica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Tecido ósseo.....	17
1.2.	Biomíneralização óssea.....	18
1.3.	Anexina V e Nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase-1.....	21
1.3.1.	Anexina V.....	21
1.3.2.	NPP1 – Ectonucleotídeo Pirofosfatase/fosfodiesterase-1	22
1.4.	Tecnologia de DNA recombinante	25
1.4.1.	Conceitos básicos.....	25
1.5.	Técnicas de Caracterização Biofísica	28
1.5.1.	Dicroísmo Circular.....	28
1.5.2.	Gota Pendente	29
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1.	Objetivo Geral.....	33
2.2.	Objetivos Específicos	33
3.	METODOLOGIA	35
3.1.	Expressão de NPP1 em células COS-1	35
3.1.1.	Propagação de pCMV-Script e NPP1-pCMV-Script	35
3.1.2.	Digestão do plasmídeo recombinante NPP1-pCMV-Script	37
3.1.3.	Cultivo de células COS-1.....	38
3.1.4.	Tranfecção de NPP1-pCMV-Script e pCMV-Script em células COS-1	39
3.1.5.	Obtenção das frações de membrana	43
3.1.6.	Sequenciamento do plasmídeo NPP1-pCMV-Script.....	44
3.2.	Expressão e Purificação de Anexina V em <i>Escherichia coli</i> – BL21(DE3)	44
3.2.1.	Expressão de Anexina V	44
3.2.2.	Purificação da Anexina V	46
3.2.3.	Gota Pendente	47
3.2.4.	Dicroísmo Circular	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1.	Propagação de NPP1-pCMV-Script e pCMV-Script	50
4.2.	Digestão de NPP1-pCMV-Script-A, NPP1-pCMV-Script-B e pCMV-Script	51
4.3.	Tranfecção de NPP1-pCMV-Script e pCMV-Script em células COS-1	53
4.4.	Sequenciamento do plasmídeo NPP1-pCMV-Script-A	61
4.5.	Expressão e Purificação de Anexina V.....	69
4.5.1.	Primeira expressão de Anexina V	69

4.5.2. Segunda Expressão de Anexina V.....	75
4.5.3. Terceira expressão de Anexina V.....	81
4.6. Dicroísmo Circular	88
4.7. Gota Pendente	89
5. Conclusão	97
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE A	108
APÊNDICE B	109
APÊNDICE C	110
APÊNDICE D.....	112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo, formado por células e material extracelular calcificado, denominado matriz óssea. As células constituintes deste tecido são os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas no interior da matriz, os osteoblastos participam da síntese da parte orgânica da matriz óssea e os osteoclastos, reabsorvem o tecido ósseo, em processos de remodelação dos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A formação do tecido ósseo pode ocorrer por dois processos, a ossificação intramembranosa e endocondral (WUTHIER; LIPSCOMB, 2011). A ossificação intramembranosa ocorre no interior de membranas de tecido conjuntivo, quando as células do tecido mesenquimal (tecido com capacidade de gerar outros tipos de células) diferenciam em osteoblastos (Figura 1). A ossificação endocondral ocorre quando as células, também do tecido mesenquimal, diferenciam em condrócitos, e este processo tem início sobre um determinado molde de cartilagem (parecido com o osso que deverá ser formado, de menor tamanho), sendo aos poucos destruído e substituído por tecido ósseo formado a partir das células presentes no tecido conjuntivo adjacente (ORTEGA et al., 2004).

A matriz óssea contém majoritariamente íons fosfato e cálcio, além de pequenas quantidades de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. Além disso, a matriz óssea apresenta uma composição orgânica formada por fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno do tipo I e por pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os cristais que se formam por cálcio e fosfato, na matriz óssea, possuem estrutura de hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (BOSKEY, 2006).

A rigidez e a resistência do tecido ósseo são explicadas a partir da associação de hidroxiapatita a fibras colágenas. O tecido ósseo possui função de suporte para tecidos moles e proteção aos órgãos vitais e é o principal constituinte do esqueleto. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As vesículas da matriz apresentam diâmetro variando aproximadamente de 100 a 300 nm (ANDERSON, 2003; ANDERSON et al., 2010; CUI et al., 2016; GOLUB, 2009; WUTHIER, LIPSCOMB, 2011) e são membranas constituídas de uma bicamada lipídica, semelhante à estrutura de uma membrana plasmática celular (PERESS et al., 1974). Recentemente, Thouverey e colaboradores (2009) relataram valores aproximados de 36% de fosfatidiletanolamina (PE), 26,5% de fosfatidilcolina (PC), 3,5% de ácido fosfatídico (PA), 7% de fosfatidilinositol (PI), 16,5% de fosfatidilserina (PS) e 11% de esfingomielina (SM) para a composição de fosfolipídios das MVs.

A membrana das vesículas da matriz contém proteínas transportadoras associadas com a mineralização (BOLEAN et al., 2017), além de outros tipos de enzimas, como fosfatases e fosfodiesterases (TAGUE, 2005). Estas enzimas estão representadas esquematicamente na Figura 2. A PHOSPHO1 possui função de produzir fosfato inorgânico (Pi), a partir de fosfocolina (Pcho) e fosfoetanolamina (PEA) como substratos. As proteínas transportadoras de fosfato e cálcio para dentro das vesículas da matriz são PiT e Anexinas, respectivamente. A fosfatase alcalina tecido não-específica (TNAP) pode ter função como PPiase e ATPase/ADPase, produzindo pirofosfato e fosfato, e a enzima nucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase-1 (NPP1) pode atuar como uma PPiase e ATPase reserva, especialmente na ausência de TNAP (SIMÃO et al., 2010a). O balanço entre fosfato e pirofosfato é um fator fundamental na regulação da biomineralização óssea (CIANCAGLINI et al., 2010; HARMEY et al., 2004; HESSLE et al., 2002; JOHNSON et al., 2000).

No interior das MVs estão presentes altas concentrações de íons Ca^{2+} e fosfato inorgânico (Pi), o que propicia a deposição de complexos de mineral com característica amorfa, processo denominado nucleação, seguido da formação de cristais de hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dentro das vesículas da matriz (BALCERZAK et al., 2003; ANDERSON, 2003). Ao final do processo, o mineral formado rompe a vesícula, e começa a fase de crescimento dos cristais no meio extracelular. A degradação da membrana da vesícula é realizada por proteases e lipases (PIZAURO et al., 2002). Além disso, o processo de mineralização óssea é restrito a algumas áreas. Quando a mineralização ocorre em tecidos que não devem ser mineralizados, geralmente as consequências são graves. Por exemplo, a mineralização da cartilagem das articulações pode provocar a destruição da cartilagem por uma matriz metaloproteinase produzida nestas regiões e a mineralização de tecidos cardiovasculares pode levar à morte. Por isso,

os mecanismos de regulação no processo de biomineralização óssea são de grande importância (KIRSCH, 2005; MCCARTHY et al., 2001).

Figura 2 - Representação esquemática das moléculas envolvidas na calcificação mediada pelas vesículas da matriz incluindo as reações enzimáticas mais favorecidas dos substratos fisiológicos. Os primeiros cristais de hidroxipatita são formados no interior das vesículas da matriz pela capacidade da PHOSPHO1 em produzir fosfato inorgânico (P_i), a partir de fosfocolina (Pcho) e fosfoetanolamina (PEA) como substratos, bem como pela função de transportadores de fosfato (P_iT) e anexinas, que mediam o influxo de íons Ca^{2+} . A fosfatase alcalina tecida não-específica (TNAP) tem papel principal como PPiase e ATPase/ADPase e então participa do processo de calcificação por restrição da concentração de PP_i extracelular, enquanto também contribui para a formação de P_i para calcificação. A nucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase-1 (NPP1) pode atuar como uma PPiase e ATPase reserva, particularmente na ausência de TNAP. As linhas cheias indicam as reações mais favorecidas, enquanto que as linhas pontilhadas indicam reações enzimáticas de backup (reserva). Do lado de fora das vesículas da matriz, o colágeno atua como primeira estrutura para deposição dos cristais de hidroxipatita. Fonte: Adaptado de SIMÃO et al. (2010) a.

1.3. Anexina V e Nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase-1

Nas seções seguintes estão descritas informações a respeito da Anexina V e da Nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase-1, pois foram as duas proteínas alvo de estudo neste trabalho.

1.3.1. Anexina V

As anexinas (AnxAS) representam uma grande família de proteínas, cujos membros são ainda classificados em 27 subfamílias e são bastante encontrados em organismos eucarióticos (BRACHVOGEL et al., 2003; MORGAN et al., 1997a; MORGAN et al., 1997b.). Estas proteínas são altamente conservadas e apresentam habilidades de interagir com fosfolipídeos e com íons cálcio de forma dependente (BRACHVOGEL et al., 2003; LIEMANN, LEWIT-BENTLEY, 1995; MOSS et al., 1991).

As anexinas contêm um domínio central que consiste em quatro ou oito domínios homólogos (como dito anteriormente, são proteínas altamente conservadas), e cada um destes domínios contém um sítio de ligação de cálcio; além disso, os domínios variáveis no N-terminal são importantes pois determinam características individuais de cada anexina. (BRACHVOGEL et al., 2003; HUBER et al., 1990a; LIEMANN, HUBER, 1997).

As anexinas são proteínas que formam canais de íons Ca^{2+} dentro das membranas das vesículas da matriz e atuam na homeostase de íons Ca^{2+} tanto nas células esqueléticas quanto nas vesículas da matriz (BALCERZAK et al., 2003). A Anexina A2 (AnxA2), Anexina A5 (AnxA5) e Anexina 6 (AnxA6) são as principais anexinas componentes das vesículas da matriz (KIRSCH et al., 1997).

A Anexina V (AnxA5) é uma proteína de aproximadamente 33 kDa (WUTHIER et al., 2011), sua estrutura apresenta um cluster de alfa hélices, formando um poro hidrofílico no centro da proteína (HUBER et al., 1990a, 1990b). Este centro atua como um canal de Ca^{2+} na membrana nas vesículas da matriz (REVIKINE et al., 1998; SOPKOVA, et al., 1999; REVIKINE, et al., 2000; OLING, et al., 2000, 2001). A AnxA5 humana foi a primeira a ter sua estrutura tridimensional caracterizada (HUBER et al., 1990; LIEMANN; HUBER, 1997), apresentando quatro repetições homólogas

constituídas por aproximadamente 70 aminoácidos, formando 4 domínios de 5 α -hélices (Figura 2) (LIEMANN; HUBER, 1997).

Figura 3 - Estrutura cristalina da Anexina V humana. Os 4 domínios estão representados por cores diferentes e os íons cálcio estão representados por esferas amarelas. Domínio I: verde, Domínio II: azul escuro, Domínio III: azul e rosa e Domínio IV: vermelho. Fonte: LIEMANN; HUBER (1997).

A Anexina V está envolvida na formação de mineral por aceleração da atividade de nucleação dos complexos de fosfolipídios ácidos- Ca^{2+} -Pi, os quais são responsáveis pela iniciação da formação de mineral fosfato nas vesículas da matriz. A Anexina V também atua na apoptose celular e tem sido usada para monitoramento de morte celular programada (GENGE et al., 2008; WU et al, 2008; GENGE et al., 2007).

1.3.2. NPP1 – Ectonucleotídeo Pirofosfatase/fosfodiesterase-1

As enzimas nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPP) tipo ectofosfodiesterases possuem a capacidade de atuar na hidrólise de pirofosfato ou ligações fosfodiéster em diversos compostos extracelulares, como nucleotídeos, (liso)fosfolipídeos e ésteres de fosfato colina. A atuação das NPPs interfere na proliferação celular e mobilidade, angiogênese, mineralização óssea e digestão. Ainda assim, já foram reportadas evidências de funções não-catalíticas das NPPs na sinalização

celular e as NPPs são consideradas promessas de alvos terapêuticos (STEFAN et al., 2005).

A enzima nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase-1 (do inglês, *Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1*, NPP1; EC 3.6.1.9) é uma glicoproteína transmembrana do tipo II, também conhecida como PC-1 (do inglês, *plasma cell membrane glycoprotein-1*) ou Enpp1 (do inglês, *ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*) envolvida no processo de regulação da biomineralização óssea e está localizada nas superfícies de osteoblastos, condrócitos e nas membranas das vesículas da matriz (JOHNSON et al., 1999). Sua estrutura apresenta dois domínios somatomedinos-B-like (SMB) na extremidade N-terminal e um domínio central catalítico (PDE) na extremidade C-terminal que está ligado a um domínio nuclease-like (NUC) (Figura 3) (JANSEN et al., 2012).

Figura 4- Domínio estrutural da NPP1. PDE corresponde ao domínio catalítico fosfodiesterase.

Fonte: JANSEN et al. (2012).

O domínio transmembrana da NPP1 apresenta três resíduos de cisteína que estão envolvidos na dimerização de duas subunidades idênticas ligadas por ponte dissulfeto e estes resíduos são filogeneticamente conservados, como pode ser observado na Figura 4 (JANSEN et al., 2012).

		V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	
<i>Mm</i>	59	V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	86
<i>Hs</i>	76	V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	104
<i>Bt</i>	76	V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	104
<i>Pa</i>	76	V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	104
<i>Dn</i>	61	V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	89
<i>Hg</i>	5	L	V	Q	V	L	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	32
<i>La</i>	78	V	L	S	L	V	S	C	V	L	T	T	I	L	G	C	I	F	G	L	K	P	S	C	A	K	E	106

Figura 5 - Comparação de seqüências de aminoácidos de NPP1 de organismos diferentes. Em negrito e sob as setas são destacados os resíduos de cisteína envolvidos na dimerização. *Mm*: *Mus musculus*; *Hs*: *Homo sapiens*; *Bt*: *Bos taurus*; *Pa*: *Papio anubis*; *Dn*: *Dasypus novemcinctus*; *Hg*: *Heterocephalus glaber*; *La*: *Loxodonta africana*.

Fonte: JANSEN et al. (2012).

A NPP1 hidrolisa majoritariamente trifosfato de adenosina (do inglês, *adenosine triphosphate*, ATP) para produzir pirofosfato inorgânico (PPi) e monofosfato de adenosina (do inglês, *adenosine monophosphate*, AMP) (TERKELTAUB, 2001). A molécula de pirofosfato inorgânico (ou PPi) possui dois fosfatos ligados por uma ligação éster hidrolisável, e seu nome advém da sua preparação original, que foi sob aquecimento (*pyro* tem origem grega e significa “fogo”) (ORRISIS et al., 2016).

Figura 6 - Reação majoritária da NPP1. Hidrólise de ATP com formação de PPi e AMP. Fonte: Autoria própria.

A NPP1 age como um regulador da mineralização, pois a molécula de pirofosfato produzida é um potente inibidor da formação do cristal de hidroxiapatita, devido a sua ligação aos cristais nascentes, fato que impede o crescimento desses cristais (JANSEN et al., 2012; ADDISON, 2007). Esta hipótese tem sido confirmada por estudos *in vitro*, a partir de experimentos de células transfectadas com o cDNA da NPP1 que demonstraram altos níveis de PPi em MVs derivadas de osteoblastos, acompanhados pela diminuição da mineralização da matriz (TERKELTAUB et al., 1994; JOHNSON et al., 1999).

A disfunção de NPP1 causa doenças caracterizadas pela calcificação ectópica, ou seja, a calcificação fora do tecido ósseo (KATOA et al., 2012). A expressão desregulada de NPP1 pode levar à formação de cristais de diidrato de pirofosfato de cálcio (CPPD, do inglês, *calcium pyrophosphate dihydrate*), a acumulação destes cristais nas juntas de pessoas idosas é uma desordem chamada condrocalcinose (SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2007).

1.4.Tecnologia de DNA recombinante

As técnicas de DNA recombinante permitiram o estudo do DNA de qualquer organismo e a produção de proteínas recombinantes. Com as diversas técnicas, um gene específico pode ser isolado, clonado e sequenciado; e posteriormente pode ser inserido em células para expressão da proteína correspondente (WATSON et al., 2009). Na maioria das vezes, o interesse principal destes procedimentos é a proteína, especialmente se ela tiver um valor comercial ou terapêutico (NELSON; COX, 2014).

1.4.1. Conceitos básicos

1.4.1.1.Endonucleases de restrição

Uma das principais barreiras em relação à análise molecular do DNA genômico é tamanho. Após a descoberta de um grupo de enzimas bacterianas, as chamadas endonucleases de restrição (conhecidas também como enzimas de restrição), foi possível desenvolver estudos envolvendo a análise do DNA (CHAMPE et al., 2007). Estas enzimas são bastante utilizadas na análise da estrutura dos cromossomos, no isolamento de genes e na criação de moléculas novas de DNA que serão clonadas. (ZAHA et al., 2012).

As enzimas de restrição são encontradas em diversos organismos procarióticos, e possuem a função de clivar moléculas de DNA exógenas. As enzimas de restrição reconhecem uma sequência de bases que é específica (geralmente de 4 a 8 nucleotídeos) e cliva as duas fitas da hélice por hidrólise de uma ligação fosfodiéster. Não há possibilidade de o DNA da célula (endógeno) ser degradado pois os sítios de reconhecimento de cada enzima de restrição são alterados por um processo denominado metilação (ZAHA et al., 2012).

As endonucleases de restrição podem produzir fragmentos com pontas coesivas, quando as terminações são complementares umas às outras; e podem produzir terminações retas, neste caso a enzima de restrição cliva no meio do sítio de reconhecimento (ZAHA et al., 2012). A Figura 7 ilustra estes dois mecanismos.

Figura 7 - Esquema mostrando a atuação das enzimas de restrição que produzem extremidades (a) retas ou (b) coesivas. Fonte: USERS.

1.4.1.2. Vetores de clonagem

Os vetores de clonagem são moléculas de DNA utilizadas na construção de DNA recombinante. Para clonagem de uma sequência de nucleotídeos específica, o fragmento de DNA de interesse e o vetor são clivados com uma ou duas enzimas de restrição, são purificados e unidos por ação de uma enzima denominada DNA ligase, que é responsável por catalisar a formação de uma ligação fosfodiéster entre as duas moléculas produzindo assim, o DNA recombinante de interesse (CHAMPE et al., 2007; ZAHA et al., 2012).

Para que seja possível a clonagem, o vetor escolhido deve apresentar algumas propriedades: a) capacidade de replicação autônoma em uma célula hospedeira; b) conter pelo menos uma sequência específica de nucleotídeos reconhecível por uma endonuclease de restrição; c) precisa ser relativamente pequeno, em forma ideal com menos que 10 kb de tamanho; d) e conter pelo menos um gene que lhe confere a capacidade de ser selecionado, como um gene de resistência a antibiótico (CHAMPE et al., 2007; ZAHA et al., 2012).

Os plasmídeos são os vetores mais utilizados. No entanto, além dos plasmídeos, o bacteriófago lambda (λ), cromossomo artificial de levedura e alguns vírus de mamíferos (retrovírus, por exemplo) podem ser utilizados como vetores de clonagem (CHAMPE et al., 2007).

1.4.1.3. Vetores de expressão procarióticos

Os plasmídeos são bastante utilizados como vetores de expressão para hospedeiros procarióticos, como *Escherichia coli*. São moléculas de DNA circular, de fita dupla, extracromossômicas e que possuem capacidade de replicação autônoma. Para inserção do plasmídeo recombinante na célula procariótica, um dos métodos mais utilizados é o processo de transformação por choque térmico. Vários dos vetores de expressão procarióticos possuem promotores induzíveis. Por exemplo, genes sob o controle do promotor *lac* são induzidos por adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Para facilitar a purificação da proteína de interesse, as proteínas expressas podem ser fusionadas a uma proteína carreadora ou uma sequência de histidinas, e serem purificadas de acordo com as propriedades da parte fusionada em questão (ZAHA et al., 2012).

1.4.1.4. Vetores de expressão eucarióticos

Frequentemente, não é possível expressar uma proteína de um organismo eucariótico em um organismo procariótico. Muitas proteínas eucarióticas sofrem algum tipo de modificação pós-traducional (por exemplo, glicosilação) para serem funcionais e as células procarióticas não são capazes de realizar este processo. Portanto, são utilizados vetores de expressão eucarióticos para a produção de proteínas recombinantes em células eucarióticas. Estes vetores recombinantes podem ser inseridos dentro da célula hospedeira por meio da transfecção mediada por eletroporação, que utiliza um campo elétrico para abrir poros na célula, e o DNA, difunde para dentro da célula por meio desses poros. Em células de mamíferos, por exemplo, a transcrição de um vetor recombinante pode ser analisada no período de um a quatro dias após a introdução do DNA, sendo denominada de transfecção transiente. Porém, existem casos em que a transfecção é denominada estável ou permanente, pois depende da formação de linhagens celulares que possuam o plasmídeo recombinante integrado ao DNA cromossômico.

1.5. Técnicas de Caracterização Biofísica

1.5.1. Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (em *inglês*, *circular dichroism*, *CD*) é um método utilizado para avaliar estrutura secundária, enovelamento e propriedades de interação de proteínas (GREENFIELD, 2006), sob diversas condições como temperatura, força iônica e em presença de solutos ou pequenas moléculas (CORRÊA, RAMOS, 2009).

Os princípios da técnica estão delineados pela absorção da luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita de forma desigual; portanto, é uma técnica espectroscópica. Um feixe de luz possui campos elétrico e magnéticos oscilantes, ou seja, dependentes do tempo. A luz pode ser polarizada quando atravessar por prismas adequados, filtrando seu campo elétrico, que oscilará em um único plano (de forma sinusoidal). Esta onda, quando vista de frente, é uma resultante de dois vetores de comprimento igual, um que vai girar no sentido horário e outro que gira no sentido anti-horário (VELLUZ et al., 1965; GREENFIELD, 2006). Quando há interação com a luz, as moléculas podem absorver a luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda em diferentes extensões, isso significa que os dois vetores serão adicionados, e o vetor resultante será um vetor que traçará uma elipse, e que após esse evento, a luz deixará de ser polarizada circularmente para ser polarizada elipticamente. As medidas de CD são em unidades de ΔE , ou seja, da diferença de absorbância dos dois vetores por uma molécula assimétrica, ou em graus de elipsidade, que é definida como o ângulo cuja tangente é o raio do menor ao maior eixo da elipse $[\theta]$. A expressão que relaciona a elipsidade molar e a concentração é dada por:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$$

Onde $[\theta]$ é a elipsidade em graus, l é o caminho óptico em cm, C é a concentração em mg/mL, M é a massa molecular e n é o número de resíduos da proteína (CORRÊA, RAMOS, 2009). A elipsidade molar é dada em unidades de $\text{deg. cm}^2/\text{dmol} = 3298 \Delta E$ (BEYCHOK, 1966; GREENFIELD, 2006). Quando os cromóforos das amidas da cadeia polipeptídica das proteínas estão alinhados em arranjos, as transições ópticas são deslocadas ou divididas em transições múltiplas devido às interações da excitação, isto

permite que diferentes elementos estruturais tenham espectros de CD característicos. Por exemplo, as proteínas α -helicoidais apresentam bandas negativas em 222 nm e em 208 nm, e uma banda positiva em 193 nm (HOLZWARTH et al., 1965; GREENFIELD, 2006); as proteínas com folhas β -antiparalelas pregueadas mostram bandas negativas em 218 nm e bandas positivas em 195 nm (GREENFIELD, FASMAN, 1969; GREENFIELD, 2006); ao passo que proteínas desordenadas, bandas negativas próximas a 195 nm (Figura 8) (VENYAMINOV, 1993; GREENFIELD, 2006).

Figura 8 - Espectro de dicroísmo circular de UV (ultra-violeta) distante de uma estrutura α -hélice (vermelho), β -folha (azul) e uma conformação desordenada (verde).

Fonte: Adaptado de NEPTTEL (2017)

1.5.2. Gota Pendente

A tensão superficial é resultado da diferença de energia entre moléculas em uma interface fluida e o bulk equivalente, ou seja, é uma medida da quantidade de energia que é necessária para obter uma unidade de área de interface entre dois líquidos que não são miscíveis, e é dada em unidades de J/m^2 ou N/m (EGGERS, 1997; EGGERS, VILLERMAUX, 2008; BERRY et al., 2015).

A tensão de superfície (γ) de líquidos puros ou soluções pode ser medida por muitas abordagens experimentais (ANDRADE et al., 2017). Os métodos mais utilizados na caracterização físico-química de misturas interfaciais são baseados na técnica que utiliza a cuba de Langmuir. Nesta cuba, a monocamada pode ser espalhada e uma nova solução pode ser injetada através da monocamada (DYNAROWICZ-LATKA et al., 2001; GIRARD-EGROT et al., 2005; STEFANIU et al., 2014; TOCA-HERRERA et al., 2014; GINER-CASARES et al., 2014, MALDONADO-VALDERRAMA et al., 2015). Porém estes estudos são limitados pois são necessários grandes volumes de amostra (MALDONADO-VALDERRAMA et al., 2015). O método da gota pendente denominado de análise da forma da gota assimétrica (*axisymmetric drop shape analysis* - ADSA) mede a tensão de superfície na interface líquido-ar ou líquido-líquido. Esta técnica utiliza pequeno volume de amostra, na faixa de microlitros, o que é considerado vantagem, quando pequenas quantidades de amostra-alvo estão disponíveis (ROTENBERG et al., 1983; BERRY et al., 2015; ANDRADE et al., 2017). Além disso, ela permite um controle de condições experimentais como temperatura e pressão (FERRI et al., 2010; WEGE et al., 2002; MALDONADO-VALDERRAMA et al., 2015).

A instrumentação da técnica de gota pendente consiste de 5 subsistemas fundamentais: luz, aquisição de imagem, controle ambiental, controle de fluxo de líquido e subsistemas antivibração (Figura 9) (MALDONADO-VALDERRAMA et al., 2015).

Figura 9 - Configuração experimental de um instrumento de gota pendente. Fonte: Adaptado de MALDONADO-VALDERRAMA et al. (2015).

A determinação da tensão de superfície é baseada na equação de Laplace de capilaridade, que relaciona a pressão através da interface (ΔP) com a tensão de superfície e o principal raio de curvatura (R_1 e R_2) (MILLER et al., 1993; ANDRADE et al., 2017):

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

Ainda, a tensão superficial depende da quantidade de surfactante que é adsorvida na área superficial da gota, portanto, valores diferentes de tensão superficial e pressão superficial serão encontrados para concentrações diferentes de surfactante. A pressão superficial (π) corresponde à diminuição da γ da solução aquosa pura (γ_0) na presença do surfactante (WEGE et al., 1999):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

A técnica de tensiometria da gota pendente é considerada uma solução simples para determinar a tensão de superfície e tensão interfacial de muitos sistemas coloidais, incluindo emulsões e espumas (BERRY et al., 2015).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

O processo de biomineralização óssea envolve complexos mecanismos moleculares que ainda são pouco elucidados. Devido à essa complexidade, faz-se necessário alternativas que facilitem o estudo tanto das vesículas da matriz, quanto das proteínas envolvidas no processo. Os sistemas de proteolipossomos padronizados em nosso laboratório (BOLEAN et al., 2010, 2011, 2015, 2017; SIMÃO et al., 2010a, 2010b, 2013; CIANCAGLINI et al., 2012; FAVARIN et al., 2017) são uma ótima escolha de trabalho para entender a interação de uma ou mais proteínas em um microambiente que mimetize a membrana das vesículas da matriz.

Já foram estudados proteolipossomos contendo as seguintes combinações de proteínas: Fosfatase alcalina tecido não-específica e Nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase-1 (SIMÃO et al., 2010b) e Fosfatase alcalina tecido não- específica e Anexina V (BOLEAN et al., 2015). A partir dos resultados interessantes obtidos pertinentes à interação das proteínas inseridas nos proteolipossomos, uma outra combinação possível de proteínas é Nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase-1 e Anexina V, com o intuito de compreender como ambas se comportam uma na presença da outra, além de mecanismos de regulação, atividade catalítica, etc.

Para que seja possível o estudo de incorporação de Nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase-1 e Anexina V em proteolipossomos e a partir disso, desvendar mecanismos de interação, etapas de obtenção das duas proteínas são o primeiro passo para iniciar estes estudos.

2.2.Objetivos Específicos

Para iniciar este trabalho, a obtenção da proteína Anexina V e da enzima NPP1 são etapas fundamentais. Portanto os objetivos específicos deste projeto de mestrado foram:

- Obtenção, padronização e otimização da expressão de NPP1 recombinante;
- Obtenção, padronização e otimização da expressão da Anexina V recombinante;
- Caracterização biofísica de NPP1 e Anexina V recombinantes.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Expressão de NPP1 em células COS-1

3.1.1. Propagação de pCMV-Script e NPP1-pCMV-Script

As amostras de vetor pCMV-Script e de DNA recombinante NPP1-pCMV-Script (material de partida) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Luis Millán (*Sanford Children's Health Research Center, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California*).

O plasmídeo recombinante NPP1-pCMV-Script contém além do cDNA da NPP1, duas sequências da proteína Fosfatase Alcalina Placental (PLAP), uma que codifica uma âncora de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e outra, responsável por codificar o peptídeo de sinal da PLAP (SIMÃO et al., 2010a, 2010b), e estão localizadas nas posições C-terminal e N-terminal, respectivamente; estas sequências estão clonadas no sítio de EcoRI. O vetor pCMV-Script possui tamanho de 4,3 kb, e seu mapa é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Mapa do vetor de expressão pCMV-Script. Fonte: SNAPGENE.

A transformação da primeira amostra de DNA recombinante NPP1-pCMV-Script foi realizada na linhagem de célula de propagação *Escherichia coli* (*E.coli*) JM109 (SAMBROOK et al., 2001). Inicialmente, 1 µL de DNA recombinante foi adicionado em 50 µL de células competentes e deixado no gelo durante 30 minutos. Em seguida, deixou-se 2 minutos a 42°C e voltou-se ao gelo por 2 minutos, adicionou-se 200 µL de meio LB e a amostra foi deixada sob agitação de 250 rpm a 37°C. Após uma hora, em placa de Petri contendo 25 mL de meio LB ágar e antibiótico, adicionou-se 80 µL e plaqueou-se com auxílio de uma alça de Drigalski, a placa foi colocada na estufa a 37°C *overnight*. Com relação ao antibiótico, foi adicionado canamicina na concentração final de 0,05 mg/mL. A partir de colônias crescidas na placa, foram realizados pré-inóculos de 5 mL de meio LB líquido, contendo canamicina na concentração final de 0,05 mg/mL, deixados sob agitação de 220 rpm a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foram realizados 4 inóculos, sendo que 0,5 mL dos pré-inóculos foram adicionados a cada erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB líquido e antibiótico canamicina na concentração final de 0,05 mg/mL, logo após foram deixados sob agitação de 220 rpm a 37°C *overnight*. Posteriormente, o conteúdo dos erlenmeyers foi purificado em uma coluna para purificação de DNA, utilizando o kit de purificação da *Invitrogen – PureLink® HiPure Plasmid Filter DNA Purification Kit - Maxiprep*. O DNA recombinante NPP1-pCMV-Script foi então purificado e eluído no tampão de eluição (TE).

Para análise em eletroforese em gel de agarose 1%, 1 µL do conteúdo total do DNA purificado deste experimento foi diluído em 99 µL de tampão de eluição e 5 µL desta solução foram misturados com 1 µL de tampão 6X *Loaded Dye-Blue/Orange* 6X *Promega* e aplicados no gel. As condições da corrida foram 120 V, 153 mA e 18 W, durante 30 minutos e o marcador de pares de bases, de 1 kb da *Ladder Sinapse*.

O experimento de propagação de DNA com a primeira amostra de NPP1-pCMV-Script foi repetido uma segunda vez, e as amostras finais das *Maxipreps* realizadas foram denominadas de NPP1-pCMV-Script-A e NPP1-pCMV-Script-B.

Outra amostra de NPP1-pCMV-Script foi gentilmente cedida por José Luís Millán e denominada aqui de segunda amostra de NPP1-pCMV-Script. Para propagação deste DNA, o procedimento acima descrito foi realizado com a mudança na linhagem da célula, sendo utilizada a *E. coli* DH5α, e a amostra final da *Maxiprep* realizada está denominada por NPP1-pCMV-Script-C.

Para obtenção de DNA plasmidial pCMV-Script purificado, foi realizado também o procedimento de propagação acima descrito, a partir da transformação do plasmídeo

fechado, denominado pCMV-Script-Material de partida, na linhagem de célula *E. coli* DH5 α .

A concentração dos DNAs purificados sempre foi medida no equipamento *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer Thermo Scientific*, utilizando 2 μ L de amostra e o tampão de eluição como branco.

3.1.2. Digestão do plasmídeo recombinante NPP1-pCMV-Script

A reação de digestão dos plasmídeos NPP1-pCMVScript e pCMV-Script foi realizada utilizando a enzima de restrição *BamHI Fast Digest Fermentas* e o tampão 10X *Loading Buffer Fast Digest*. Os reagentes e as quantidades necessários estão mostrados na Tabela 1. A reação foi feita a 37° C durante 1 hora. Após a preparação, as amostras foram colocadas em um termociclador *My Cyclor - Thermal Cyclor Biorad* na temperatura de 80° C durante 10 minutos para a desnaturação da enzima e em seguida a 8° C para esfriar a reação.

Tabela 1 - Reagentes necessários e seus respectivos volumes para a reação de digestão.

Reação de Digestão	
Reagentes	Volume (μ L)
Água deionizada	2,5
Tampão <i>Fast Digest</i>	1,5
DNA	10
BamHI	1
Total	15

Fonte: Autoria própria.

A análise das reações de digestão foi por eletroforese em gel de agarose 1%. A corrida foi realizada a 56mA no equipamento *Thermo Electron Corporation Model 105ECA 115V* e a cuba da *Biorad*. O gel foi corado com brometo de etídio, e o marcador de peso molecular utilizado foi *Fermentas Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*.

Nesta etapa, foram digeridas as amostras de *Maxiprep* NPP1-pCMV-Script-A, NPP1-pCMV-Script-B e do plasmídeo pCMV-Script, com preparação de soluções diluídas (1 μ L de *Maxiprep* em 99 μ L de tampão TE) por causa da alta concentração de DNA, e a amostra de plasmídeo fechado denominado de material de partida. As amostras que estão denominadas por material de partida foram utilizadas na seção 3.1 para

propagação (primeira amostra de NPP1-pCMV-Script e a amostra inicial de plasmídeo vazio). Os volumes de amostra e tampão misturados para aplicação no gel de agarose são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Preparação das amostras aplicadas no gel de agarose 1% para análise. As amostras digeridas estão em negrito.

Fonte: Autoria própria.

Amostra		Preparação
M	Marcador de pares de bases 1kb	5 μ L
A	Amostra de Maxiprep de pCMV-Script	0,5 μ L de amostra + 3 μ L de tampão
B	Amostra de pCMV-Script- Material de partida	2 μ L de amostra + 3 μ L de tampão
C	Amostra de Maxiprep de pCMV-Script (diluída)	2 μ L de amostra + 3 μ L de tampão
D	Digestão da Amostra de pCMV-Script- Material de partida	15 μL de amostra + 6 μL de tampão
E	Digestão da amostra de Maxiprep de pCMV-Script (diluída)	15 μL de amostra + 6 μL de tampão
F	Digestão da Amostra de Maxiprep de pCMV-Script-NPP1-A	15 μL de amostra + 6 μL de tampão
G	Digestão da amostra de Maxiprep de pCMV-Script-NPP1-B	15 μL de amostra + 6 μL de tampão
H	Amostra de Maxiprep de pCMV-Script-NPP1-A	2 μ L de amostra + 3 μ L de tampão
I	Amostra de Maxiprep de pCMV-Script-NPP1-B	2 μ L de amostra + 3 μ L de tampão
J	Amostra de pCMV-Script-NPP1 - Material de partida	2 μ L de amostra + 3 μ L de tampão

3.1.3. Cultivo de células COS-1

As células COS-1, linhagem celular semelhante a fibroblastos de rim de macaco verde africano (THERMO FISHER SCIENTIFIC, s.d.), foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio DMEM (10% de Soro Fetal Bovino – vide apêndice A) e antibiótico penicilina/estreptomicina na concentração de 10 μ L/mL,

durante aproximadamente 10 dias, na estufa a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂ para propagação das células. As células COS-1 foram tripsinizadas e congeladas em meio DMEM de congelamento (10% de DMSO, 25% de Soro Fetal Bovino) (SIMÃO et al., 2010a, 2010b). O procedimento de tripsinização foi realizado quando as células estavam confluentes nas garrafas de cultura, retirando o meio de cultura, lavando duas vezes as células com tampão PBS (vide apêndice B), adicionando tripsina, ressuspensando as células em tripsina, adicionando meio de cultura DMEM 10% e centrifugando as células. Em seguida, o *pellet* contendo as células foi ressuspensão em meio DMEM de congelamento.

3.1.4. Transfecção de NPP1-pCMV-Script e pCMV-Script em células COS-1

Vários procedimentos de transfecção com condições diferentes (voltagem de eletroporação e uso de antibiótico) foram realizados e estão denominados neste trabalho como Experimento 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Em todos estes experimentos, inicialmente foram cultivadas as células COS-1 para propagação e, após a confluência, foram realizados os procedimentos de tripsinização e contagem das células. Em seguida, $1,0 \times 10^7$ células COS-1 foram ressuspensas em 800 µl de tampão Hepes salino (vide apêndice B). Em uma cubeta de eletroporação de 4 mm (*Biorad*) foram adicionados 10 µg do plasmídeo (recombinante ou controle) e a suspensão das células, e em seguida foram eletroporados utilizando o equipamento *Gene Pulser (Bio-Rad)* com diferentes voltagens, porém todos a 950µF. Após a eletroporação, o conteúdo da cubeta foi incubado no gelo durante 20 minutos e depois transferido para garrafas de cultura contendo meio DMEM 10% e deixados na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de cultura, o meio foi totalmente descartado e adicionou-se novo meio DMEM 10% às garrafas de cultura; neste momento, em algumas culturas foi adicionado o antibiótico G418 na concentração final de 0,8 mg/mL.

Experimento 1

Neste primeiro experimento, a transfecção (por eletroporação) foi realizada com o plasmídeo pCMV-Script (controle) e o recombinante NPP1-pCMV-Script-A (NPP1). As condições deste experimento são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 1.

Amostra	Voltagem	Antibiótico G418
NPP1	220 V	SIM
Controle	220 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 2

No experimento 2, duas amostras de cada, pCMV-Script (controle 1 e 2) e o recombinante NPP1-pCMV-Script-A (NPP1-1 e NPP1-2) foram transfectadas variando a voltagem e o uso ou não de antibiótico após a troca do meio de cultura com relação ao experimento 1 (Tabela 4).

Tabela 4 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 2.

Amostra	Voltagem	AntibióticoG418
Controle-1	10 V	NÃO
Controle-2	10 V	SIM
NPP1-1	10 V	NÃO
NPP1-2	10 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 3

A transfecção e cultivo foram realizados de forma análoga ao experimento 2, com duas amostras de cada plasmídeo. A Tabela 5 mostra as condições deste experimento.

Tabela 5 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 3.

Amostra	Voltagem	Antibiótico G418
Controle-1	220 V	NÃO
Controle-2	220 V	SIM
NPP1-1	220 V	NÃO
NPP1-2	220 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 4

Neste experimento, em que foram mantidas as mesmas condições do experimento 3 (Tabela 6), a modificação realizada foi em relação ao volume de meio adicionado à garrafa para crescimento da cultura celular. Nos experimentos 1, 2 e 3, a quantidade de meio adicionada às garrafas era de 48 mL (garrafas grandes - 175 cm²). No experimento 4, utilizou-se apenas 20 mL de meio DMEM 10% que foi adicionado a garrafas menores (75 cm²).

Tabela 6 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 4.

Amostra	Voltagem	Antibiótico G418
Controle-1	220 V	NÃO
Controle-2	220 V	SIM
NPP1-1	220 V	NÃO
NPP1-2	220 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 5

O experimento 5 foi realizado em condições semelhantes ao experimento 4, apenas com variação na adição do antibiótico penicilina/estreptomicina ao meio de cultura antes de adicionar o conteúdo eletroporado. As condições estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 5.

Amostras	Voltagem	Antibiótico G418	Antibiótico Penicilina/estreptomicina
Controle 1	220 V	NÃO	SIM
Controle 2	220 V	SIM	SIM
NPP1-1	220 V	NÃO	SIM
NPP1-2	220 V	SIM	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 6

No experimento 6, foi realizada a transfecção de uma amostra de *Maxiprep* do pCMV-Script e triplicata com a amostra NPP1-pCMV-Script-C. As células COS-1 utilizadas foram cultivadas a partir de um novo estoque de células que foram adquiridas

do Banco de Células do Rio de Janeiro. As condições do experimento estão mostradas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 6.

Amostras	Voltagem	AntibióticoG418
Controle	220 V	SIM
NPP1-1	220 V	SIM
NPP1-2	220 V	SIM
NPP1-3	220 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 7

O experimento 7 foi realizado em condições semelhantes ao experimento 6, porém com duplicata na amostra controle (pCMV-Script) e duplicata para a amostra NPP1-pCMV-Script-C; e cultivo em garrafas menores. Também foram utilizadas as células do novo estoque adquirido.

Tabela 9 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 7.

Amostras	Voltagem	AntibióticoG418
Controle 1	220 V	SIM
Controle 2	220 V	SIM
NPP1-1	220 V	SIM
NPP1-2	220 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

Experimento 8

No experimento 8, a eletroporação foi realizada apenas com o plasmídeo pCMV-Script (controle) e o recombinante NPP1-pCMV-Script-C. Também foram mantidas as condições do experimento 7: células do estoque novo e garrafas menores (Tabela 10).

Tabela 10 - Condições de eletroporação e cultivo das amostras do experimento 8.

Amostra	Voltagem	Antibiótico G418
NPP1	220 V	SIM
Controle	220 V	SIM

Fonte: Autoria própria.

3.1.5. Obtenção das frações de membrana

Após 60 horas de crescimento celular, o meio de cultura foi descartado, cada garrafa de cultura foi lavada 2 vezes com 40 mL de tampão estoque (vide apêndice B) e foi adicionado 9 mL de tampão choque osmótico (vide apêndice B), deixou-se incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram retiradas (desgrudadas da garrafa) com auxílio de um espalhador de células e transferidas para um *potter* e homogeneizadas. As células foram ultracentrifugadas a 100.000g durante 1 hora a 4°C e o *pellet* (fração de membrana) foi ressuspendido em tampão estoque. (SIMÃO et al., 2010a, 2010b). Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (vide apêndice C e D). A concentração de proteínas totais das amostras de fração de membrana foi determinada pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão. As determinações foram feitas em duplicatas e a concentração das proteínas foi estimada por uma curva padrão feita para cada dosagem. A atividade enzimática de NPP1 foi determinada pela formação do íon p-nitrofenolato (PNF⁻), em 410 nm. A reação foi preparada em tampão Tris 50 mM pH 7,4 contendo MgCl₂ 2 mM e timidina 5'-monofosfato p-nitrofenil ester de sódio (p-NP-TMP) 10 mM, em um volume final de 0,5 mL e iniciada pela adição da enzima (amostra de fração de membrana), interrompida com 0,5 mL de NaOH 1M em intervalos de tempo apropriados e para cada ensaio, prepara-se uma amostra controle, no qual não há adição de enzima (CAMOLEZI et al., 2002).

Figura 11 - Formação do íon p-nitrofenolato no ensaio de atividade com Timidina 5'-monofosfato p-nitrofenil ester de sódio. Fonte: Autoria própria.

3.1.6. Sequenciamento do plasmídeo NPP1-pCMV-Script

Para confirmar a integridade da primeira amostra de plasmídeo recombinante NPP1-pCMV-Script foi realizado o sequenciamento da amostra de *Maxiprep* NPP1-pCMV-Script-A. Esta parte do trabalho foi realizada em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Sérgio Akira, no Departamento de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Inicialmente, foi necessário analisar a sequência deste construto de expressão para desenho dos *primers*; para isso, a sequência de aminoácidos, também cedida pelo Prof. Dr. José Luis Millán, foi analisada a partir do código fornecido da NPP1 (NM_006208.2) e busca pela sequência de RNA mensageiro (RNAm) da proteína PLAP no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* - NCBI e a partir destas sequências de RNAm, foram encontradas as sequências de DNA, utilizando a ferramenta *Translate Tools*, disponível no site *Expasy Bioinformatics Resource Portal* (<https://www.expasy.org>). Após identificar a sequência de bases, foram desenhados os *primers* e estes foram avaliados pela ferramenta *OligoAnalyzer 3.1*, disponível no site *Integrated DNA Technologies* (<https://www.idtdna.com/site>). Os *primers* desenhados foram adquiridos pela ‘*Síntese Biotecnologia – Integrated DNA Technologies*’ e utilizados nas reações para sequenciamento.

3.2. Expressão e Purificação de Anexina V em *Escherichia coli* – BL21(DE3)

3.2.1. Expressão de Anexina V

O plasmídeo recombinante AnexinaV-pProExHTb foi gentilmente cedido pelo Prof. Seamus J. Martin de Dublin, Irlanda. O cDNA da Anexina V humana (NM_001154) foi amplificado de uma biblioteca de cDNA de Jurkat pela técnica de PCR e clonada no vetor de expressão nos sítios de restrição BamHI e EcoRI (BOLEAN et al., 2015). O mapa do vetor pProExHTb é mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Mapa do plasmídeo de expressão pPROEX-HTb. Fonte: ADDGENE.

A transformação de AnexinaV-pProExHTb foi realizada na linhagem de expressão *E.coli* BL21(DE3) (BOLEAN, 2014; BOLEAN et al., 2015). O procedimento de transformação utilizado foi semelhante ao descrito anteriormente para a propagação de NPP1-pCMV-Script (Seção 3.1.1); mudando o volume inicial de DNA recombinante adicionado nas células, que foi de 0,5 μ L (concentração do DNA plasmidial: 180 ng/ μ L) e com relação ao antibiótico, foi adicionado ampicilina na concentração final de 0,1 mg/mL.

A partir das colônias transformantes que cresceram na placa de Petri, foram preparados 4 inóculos, cada um contendo 5 mL de meio LB e ampicilina na concentração final de 0,1 mg/mL, deixados sob agitação a 220 rpm, 37°C e *overnight*. Cada inóculo, no dia seguinte, foi adicionado em um erlenmeyer contendo 500 mL de meio LB e

ampicilina também na concentração final de 0,1 mg/mL, e deixado sob agitação de 220 rpm, a 37°C até atingir a DO₆₀₀ de 0,6. Neste momento, retirou-se uma alíquota da amostra 1 para ser analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida, como amostra antes da indução, denominada de T0, e em seguida, induziu-se a expressão da proteína, com a adição de 0,5 M de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na concentração final de 1 mM.

Após a indução, os erlenmeyers foram colocados sob agitação a 220 rpm por 5 horas, a 37°C. Posteriormente, foi retirada uma alíquota da amostra 1 para ser analisada por eletroforese, como amostra final após indução, denominada de TF; o conteúdo da cultura de células foi centrifugado a 7000 g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em tampão de lise (*Binding Buffer* - Tris 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0) na proporção de 10 mL de tampão de lise para cada 500 mL de meio de cultura. As células ressuspensas no tampão de lise foram sonicadas (Potência 10%, 7 minutos, 30'' pulso *on* e 30'' pulso *off*), centrifugadas a 12000 g durante 20 minutos a 4°C, alíquotas do *pellet* e do sobrenadante foram reservadas para análise por eletroforese, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi utilizado na etapa seguinte, de purificação.

3.2.2. Purificação da Anexina V

A purificação da Anexina V foi realizada em três etapas (BOLEAN, 2014; BOLEAN et al., 2015), cada uma utilizando uma coluna de cromatografia: coluna de níquel (*Ni – NTA Agarose Qiagen Tm*), coluna *Hiprep 26/10 Desalting* e *Mono Q HR 5/50 (GE HealthCare)*.

A primeira etapa de purificação foi por cromatografia de afinidade de resina de níquel, pois a proteína expressa apresenta uma cauda de seis histidinas na porção N-terminal, o que auxilia na purificação. Inicialmente, a coluna de níquel (2,5 mL de volume) foi lavada com bastante água deionizada (aproximadamente 100 mL), equilibrada com tampão *Binding Buffer* (10x volume de coluna); em seguida, o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas de 20 mL cada, e uma das alíquotas foi adicionada à coluna, incubou-se durante 30 minutos a 8°C sob agitação de 30 rpm, e deixou-se a coluna empacotar novamente na bancada, o sobrenadante passou pela coluna e foi recolhido em um tubo *falcon*, esta amostra foi denominada S, e após, adicionou-se 10 volumes de tampão *Binding Buffer*, sendo eluída em um tubo *falcon* e denominada de E. As próximas etapas determinaram a eluição da proteína por adição de um gradiente de

imidazol, adicionando 50 mL de 5 mM; após, 50 mL de 30 mM e por fim, 10 mL de 300 mM de *Binding Buffer* contendo imidazol. A coluna foi lavada com solução de imidazol 1M, denominada I e por último, foi lavada com água deionizada.

A segunda etapa de purificação utilizou o sistema *ÄKTA Protein Purification Systems GE HealthCare Life Sciences*, e uma coluna do tipo *Desalting*. A coluna foi lavada com água deionizada e tampão *Desalting Buffer* (Tris 20 mM, NaCl 10 mM e pH 8,0), antes da amostra eluída com *Binding Buffer* 300 mM de imidazol ser adicionada e este tampão foi o único utilizado durante o processo. A fração eluída desta etapa de purificação foi concentrada, e o filtrado seguiu para a terceira etapa de purificação, que também utilizou o sistema *ÄKTA Protein Purification Systems GE HealthCare Life Sciences*, porém uma coluna do tipo Troca Iônica. Foi realizado um gradiente salino, com o uso de tampão A (Tris 20 mM pH 8,0) e tampão B (Tris 20 mM, 1 M NaCl e pH 8,0). Todos os tampões utilizados na segunda e terceira etapa de purificação foram filtrados e deaerados. De acordo com os cromatogramas apresentados pelo *software* do *Akta*, os volumes eluídos com absorção em 280 nm foram separados dos demais e retiradas as alíquotas das frações para posterior análise em eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. As condições da corrida foram 20 V até o final do gel de cima (*stacking*) e quando começou o gel de baixo, mudou-se para 40 V. Os géis foram preparados segundo o protocolo de Laemmli (1970). A concentração das amostras de Anexina V durante o processo de purificação foram determinadas pelo método descrito por Hartree mencionado na seção 3.1.5.

3.2.3. Gota Pendente

Para estudar a interação da Anexina V recombinante com monocamadas de lipídeos e íons Ca^{2+} , foi utilizada a técnica de gota pendente. O experimento foi realizado no Laboratório de Físico-Química de Coloides e Superfícies, no Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP), coordenado pela Prof. Dr.^a Ana Paula Ramos, utilizando o equipamento DataPhysics Modelo Oca20.

Para este ensaio, gotas de água deionizada ou gotas de solução de cloreto de cálcio 10 mM foram formadas, contendo de 10 a 12 μL de volume. Em seguida, os lipídeos foram adicionados à gota com auxílio da seringa *gastight #1701 – Hamilton* (previamente lavada com clorofórmio), e esperou-se aproximadamente 2 minutos para formação da

monocamada e estabilização da tensão superficial. Os lipídeos escolhidos para este experimento foram dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) puro e uma mistura de razão molar de 9:1 de DPPC e dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS), ambos dissolvidos em clorofórmio.

Após esse período, adicionou-se 0,5 µg de Anexina V recombinante, também com o auxílio da seringa *gastight #1701 – Hamilton* (previamente lavada com clorofórmio) e verificou-se as mudanças ocorridas na tensão superficial. Depois de obtidos os dados, os mesmos foram tratados para determinação de valores de pressão de exclusão.

3.2.4. Dicroísmo Circular

Para verificar a estrutura da Anexina V recombinante, amostras purificadas pela Mono-Q (final da purificação) foram diluídas em água na concentração final de 5 µM. As amostras foram medidas no equipamento J-810 Spectropolarimeter JASCO.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Propagação de NPP1-pCMV-Script e pCMV-Script

A amostra NPP1-pCMV-Script-A apresentou um aspecto gelatinoso e por isso foi realizada outra *Maxiprep*, produzindo o NPP1-pCMV-Script-B. As concentrações após o procedimento de purificação tanto da *Maxiprep* do plasmídeo fechado e dos recombinantes estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração das amostras de DNA purificado após *Maxiprep*

Amostra	Concentração Inicial (ng/ μ L)
NPP1-pCMV-Script-A	11.206,2
NPP1-pCMV-Script-B	5.804,0
NPP1-pCMV-Script-C	9683,1
pCMV-Script	3.316,9

Fonte: Autoria própria.

Para análise das amostras de *Maxiprep* NPP1-pCMV-Script-A e pCMV-Script foi realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1%. O resultado é apresentado na Figura 13. É possível verificar que as raias correspondentes às amostras A e B apresentam bandas com arraste e em tamanhos diferentes, devido à alta concentração de DNA e pelo fato de que podem estar na forma circular, ou não linearizada. O vetor pCMV-Script possui tamanho de 4,3 kb e o construto de expressão apresenta o tamanho total de 7,3 kb, pois contém além do cDNA da NPP1, uma sequência que codifica uma âncora de GPI para que a proteína, ao ser expressa com a âncora, possa ser incorporada mais facilmente pelos lipossomos (SIMÃO et al., 2010a,2010b).

Figura 13- Gel de agarose das amostras de Maxiprep. 1%. M: marcador de pares de bases 1 kb; A: amostra de *Maxiprep* de plasmídeo pCMV-Script; B: amostra de *Maxiprep* de NPP1-pCMV-Script-A. Fonte: Autoria própria.

4.2. Digestão de NPP1-pCMV-Script-A, NPP1-pCMV-Script-B e pCMV-Script

Como o gel de eletroforese apresentado na Figura 11 apresentou difícil visualização das bandas (arraste, principalmente), foi realizada a digestão das amostras de *Maxiprep* de NPP1-pCMV-Script-A, NPP1-pCMV-Script-B e pCMV-Script para confirmação do inserto estar presente no plasmídeo recombinante. O resultado é apresentado na Figura 14. As bandas destacadas no retângulo de cor vermelha são correspondentes às amostras digeridas da *Maxiprep* dos plasmídeos recombinantes e comparadas ao tamanho das amostras digeridas do plasmídeo, destacadas no retângulo de cor amarela, pode-se afirmar que o inserto está presente no plasmídeo recombinante.

Figura 14 - Gel de Agarose 1% da Digestão das Amostras de Maxiprep. M: Marcador de pares de bases 1kb. A: Amostra de Maxiprep do plasmídeo pCMV-Script; B: Amostra de pCMV-Script -Material de partida; C: Amostra de Maxiprep de pCMV-Script diluída; D: Digestão da Amostra em B; E: Digestão da amostra em C; F: Digestão da Amostra em H; G: Digestão da amostra em I; H: Amostra de Maxiprep de pCMV-Script-NPP1-A; I: Amostra de Maxiprep de pCMV-Script-NPP1-B, J: Amostra de pCMV-Script-NPP1-Material de partida (Primeira amostra); K: raia vazia. Fonte: Autoria própria.

4.3. Tranfecção de NPP1-pCMV-Script e pCMV-Script em células COS-1

Como mencionado na seção 3.1.4., vários procedimentos de transfecção com condições diferentes foram realizados, e os resultados de cada um serão detalhados logo abaixo.

Experimento 1 e 2

No experimento 1, havia pequena quantidade de células aderidas na garrafa. A variação de utilizar antibiótico ou não nas culturas (Experimento 2) foi para verificar se haveria mudança tanto no crescimento celular da cultura quanto da expressão de NPP1. Porém, não foi observado nenhuma mudança. As concentrações das amostras das frações de membrana foram medidas e estão descritas nas Tabelas 12 e 13. Foram realizados os testes de atividade, tanto do experimento 1 como do experimento 2, porém não foi observada mudança de coloração nas amostras, o que demonstra que não houve atividade (SIMÃO et al., 2010a, 2010b). Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com coloração por prata, porém o gel ficou totalmente escuro, sem possibilidade de visualização. Outra eletroforese foi realizada, porém não foi observada nenhuma banda de expressão (dados não mostrados).

Tabela 12 - Concentração das amostras de fração de membrana do Experimento 1.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Controle	1,17
NPP1	0,56

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 - Concentração das amostras de fração de membrana do Experimento 2.

Amostras	Concentração (mg/mL)
Controle-1	2,10
Controle-2	1,86
NPP1-1	3,50
NPP1-2	0,84

Fonte: Autoria própria.

Experimento 3

No experimento 3, as células estavam na forma de agregados em suspensão (não aderidas) em todas as culturas e sofreram contaminação após 24 horas da troca dos meios e adição de antibiótico G418. A Figura 15 mostra o momento após a adição de antibiótico G418 ao meio de cultura nas garrafas 1 e 3 (NPP1-2 e Controle-2, respectivamente), o meio muda de cor, tornando-se alaranjado. As garrafas 2 e 4 não receberam o antibiótico (NPP1-1 e Controle-1, respectivamente). Na Figura 16 é possível observar as contaminações pela variação de cor dos meios de cultura e turbidez.

Figura 15 - Culturas após adição de antibiótico. As garrafas de cultura 1 e 3 correspondem às amostras de cultura de NPP1-2 e Controle-2, enquanto que as garrafas 2 e 4 correspondem às amostras NPP1-1 e Controle-1, respectivamente. Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Culturas contaminadas. Todas as garrafas (1, 2, 3 e 4) apresentaram contaminação. Fonte: Autoria própria.

Experimento 4

Neste experimento, a mudança foi em relação ao volume e ao tamanho da garrafa de cultura a ser utilizada para cultivo das células após a transfecção. Essa alternativa foi pensada devido ao fato de as culturas no experimento 1 e 2 apresentarem poucas células aderidas, e se diminuísse o tamanho da garrafa para que as células pudessem ficar mais próximas, poderia ser uma possibilidade de aumento no número de células aderidas na cultura celular. Porém, este experimento também não deu certo, pois as culturas apresentaram células agregadas e sofreram contaminação. A Figura 17 mostra o momento de troca e adição de antibiótico G418 nas culturas 2 e 4 (NPP1-2 e Controle 2) e a Figura 18 apresenta a contaminação das culturas sem adição de antibiótico, após 24 horas de cultivo nas culturas 2 e 4 (NPP1-1 e Controle-1) respectivamente.

Figura 17 - Culturas após adição de antibiótico. As garrafas de cultura 1 e 3 representam as amostras NPP1-1 e Controle 1 (sem adição de antibiótico) e as garrafas 2 e 4, as amostras NPP1-2 e Controle 2 (adição de antibiótico). Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Contaminação das culturas sem antibiótico. As garrafas de cultura 1 e 3 correspondem às amostras NPP1-2 e Controle 2 (adição de antibiótico G418) e as garrafas 2 e 4 correspondem às amostras NPP1-1 e Controle 1 (sem adição de antibiótico). Fonte: Autoria própria.

Experimento 5

No experimento 5, notou-se que ao transferir o conteúdo da cubeta de eletroporação para as garrafas de cultura contendo meio DMEM 10% e antibiótico penicilina/estreptomicina, as células estavam agregadas assim como no experimento 3 e 4. Apesar disso, ainda tentou-se colocar na estufa para crescimento, porém nenhuma garrafa apresentou células aderidas e somente agregados celulares.

Experimento 6

O experimento 6 foi realizado com novo estoque de células para evitar a contaminação e também com a amostra de *Maxiprep* NPP1-pCMV-Script-C. Não foi observada contaminação e pôde-se proceder os experimentos até a obtenção da fração de membrana. Os valores de concentração das amostras de *pellet* (fração de membrana) e sobrenadante são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Concentração das amostras obtidas no experimento 6.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Fração de membrana – Plasmídeo	0,04
Fração de membrana – NPP1-1	0,04
Fração de membrana – NPP1-2	0,03
Fração de membrana – NPP1-3	0,04
Sobrenadante – Plasmídeo	0,03
Sobrenadante – NPP1-1	0,04
Sobrenadante – NPP1-2	0,03
Sobrenadante – NPP1-3	0,04

Fonte: Autoria própria.

Os valores de atividade das amostras de fração de membrana obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Atividade catalítica das amostras.

Amostra	Atividade (U/mg)
Fração de membrana – Plasmídeo	0,3
Fração de membrana – NPP1-1	7,1
Fração de membrana – NPP1-2	3,0
Fração de membrana – NPP1-3	6,1

Fonte: Autoria própria.

Devido aos resultados de atividade apresentados, verificou-se que as amostras que foram transfectadas com o NPP1-pCMV-Script-C apresentaram atividade, de valores muito pequenos, porém isso pode ser justificado pelos valores baixos de concentração obtidos.

Para confirmar a expressão de NPP1 recombinante, além do experimento de atividade, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilimida 7%, com coloração em prata (vide apêndice D) das amostras de fração de membrana e sobrenadante, com padronização de 0,90 μg de proteína para cada amostra. O resultado é apresentado na Figura 19. A NPP1 recombinante possui tamanho de 125 kDa, porém não foi observada

nenhuma banda de proteína, no gel como um todo, acima de 70-80 kDa. Isso pode ser explicado também pela baixa concentração das amostras; a quantidade padronizada provavelmente não foi suficiente para que a sensibilidade (interação entre prata e proteína) pela prata fosse eficiente. Portanto, as amostras de fração de membrana das triplicatas (NPP1-1, NPP1-2 e NPP1-3) apresentaram atividade, porém não foram observadas bandas no gel. Na tentativa de conseguir verificar a presença da banda da NPP1 recombinante em gel de poliacrilamida, as amostras de fração de membrana foram concentradas (Tabela 16) e a partir dos novos valores de concentração obtidos, uma nova eletroforese em gel de poliacrilamida 7% foi realizada com padronização das amostras de 2 µg. O resultado é apresentado na Figura 20, onde é possível observar que não aparecem as bandas esperadas para a NPP1 recombinante.

Tabela 16 - Concentração das amostras final.

Amostra	Concentração(µg/µL)
Fração de membrana – Plasmídeo	0,07
Fração de membrana – NPP1-1	0,14
Fração de membrana – NPP1-2	0,12
Fração de membrana – NPP1-3	0,14

Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da preparação da fração de membrana do experimento 6. M: Padrão de alto peso molecular; A: Fração de Membrana do plasmídeo; B: Sobrenadante do Plasmídeo; C: Fração de Membrana-NPP1-1; D: Sobrenadante-NPP1-1; E: Fração de Membrana-NPP1-2; F: Sobrenadante-NPP1-2; G: Fração de Membrana-NPP1-3; H: Sobrenadante-NPP1-3; M: Padrão de alto peso molecular. Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras concentradas da preparação da fração de membrana do experimento 6. M: Padrão de alto peso molecular; P: Fração de Membrana do plasmídeo; N1: Fração de Membrana-NPP1-1; N2: Fração de Membrana-NPP1-2; N3: Fração de Membrana NPP1-3. Fonte: Autoria própria.

Experimento 7 e 8

No experimento 7 e 8 foram observadas contaminações por turbidez no meio, no dia seguinte após as transfecções. Portanto, não foram obtidos resultados para verificar se o uso de garrafas menores propiciaria o maior crescimento celular, consequentemente, aumentando a expressão de NPP1.

4.4. Sequenciamento do plasmídeo NPP1-pCMV-Script-A

Devido às tentativas de expressão sem sucesso nos Experimentos 1 e 2, que foram realmente os experimentos em que foram possíveis obter as frações de membrana (os Experimentos 3 e 4 tiveram problemas de contaminação e o Experimento 5, agregado/morte celular), buscou-se compreender o porquê do insucesso na obtenção da NPP1 recombinante, para isso, a amostra de *Maxiprep* NPP1-pCMV-Script-A foi sequenciada. A sequência de aminoácidos da NPP1 recombinante fornecida pelo Prof. Dr. José Luis Millán é apresentada na Figura 21.

N-
(peptídeo de sinal da PLAP) MLGPCMLLLLLLLGLRLQLSLGIIPV-
MDVGEEPLEKAAARTAKDPNTYKVLSTVLSVCLTTILGCIFGLKPSCAKEVKSCCKGR
CFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDC
KDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWG
GLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASF
SLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPF
ERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDG
LKELNLRCLNLILISDHGMEQGCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDK
YYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNP
SERKYCGSGFGHGSNDVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAP
NNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQC PFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQF
NLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRND
SFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTT
NIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSENLRQKRRV
IRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV
EELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED
-LAPPAGTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP (âncora de GPI da PLAP)
-C

Figura 21 - Sequência de aminoácidos codificante do peptídeo de sinal da proteína PLAP, NPP1 e âncora de GPI da PLAP. N e C, em amarelo representam as porções N e C terminal. Fonte: Autoria própria.

A partir desta sequência, com a utilização das ferramentas de Bioinformática, descritas na seção 3.1.6., foi obtida a sequência completa de DNA do inserto, que está apresentada na Figura 22.

ATGCTGGGGCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCCAG
 TTATGGACGTGGGGGAGGAGCCGCTGGAGAAGGCGGCGCGCGCCGCACTGCCAAGGACCCCAACACCTAT
 AAAGTACTCTCGCTGGTATTGTTCAGTATGTGTGTTAAACAACAATACTTGGTTGTATATTTGGGTTGAAAC
 CAAGCTGTGCCAAAGAAGTTAAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAAGTGTGCTG
 TGATGCTGCCTGTGTTGAGCTTGGAAACTGCTGTTTAGATTACCAGGAGACGTGCATAGAACCAGAACAT
 ATATGGACTTGCACAAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAGGTTGACCAGAAGCCTCTGTGCCTGTTTCAGATG
 ACTGCAAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTCTGTGTGTCAAGGTGAGAAAAGTTGGGTAGA
 AGAACCATGTGAGAGCATTAAATGAGCCACAGTGCCAGCAGGTTTGAACGCCTCCTACCCTCTTATTT
 TCTTTGGATGGATTCAGGGCAGAATATTTACACACTTGGGGTGGACTTCTTCCTGTTATTAGCAAACATAA
 AAAAATGTGGAACATATACTAAAAACATGAGACCGGTATATCCAACAAAAAATTTCCCAATCACTACAG
 CATTGTACCCGATTGTATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAAATGTATGATCCCAAAATGAAT
 GCTTCCTTTTCACTTAAAGTAAAGAGAAATTTAATCCTGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTCA
 CAGCTAAGTATCAAGGCCTCAAGTCTGGCACATTTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAATTAACGGAAT
 TTTCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGTTCAGTACCATTGAAGAAAGGATTTTAGCTGTTCTTCAG
 TGGCTACAGCTTCTTAAAGATGAAAGACCACACTTTTACACTCTGTATTTAGAAGAACCAGATTCTTCAG
 GTCATTTCATATGGACCAGTCAGCAGTGAAGTCATCAAAGCCTTGACAGAGGTTGATGGTATGGTTGGTAT
 GCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTTGCACAGATGCCTGAACCTCATCCTTATTTTCAGATCATGGC
 ATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATAAATATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAAG
 TTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCCTGATGTCCAGATAAAATACTATTCAATTTAACTATGA
 AGGCATTGCCCCGAAATCTTTCTTGCCGGGAACCAACCAGCACTTCAAACCTTACCTGAAACATTTCTTA
 CCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTGGACCCCTCAGTGGC
 AACTTGCATTGAATCCCTCAGAAAGGAAATATTTGTGGAAGTGGATTTTCATGGCTCTGACAATGTATTTTC
 AAATATGCAAGCCCTCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAA
 AACATTGAAGTCTATAACTTAATGTGTGATTTACTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACATCATG
 GAAGTCTTAACACCTTCTAAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGCACCCCTGGT
 ACAGTGCCCTTCAAGAAACCCAGAGATAACCTTGGCTGCTCATGTAACCTTTCGATTTTGCCGATT
 GAGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACTGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTACCCT
 ATGGAAGACCTAGAGTTCTCCAGAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGG
 ATACAGCCAAGACATCTTAATGCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACG
 GAAGACTTCTCCAAGTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCTGTCCATAAATGTTCAATTTT
 ATAAAAATAACACCAAAGTGAGTTACGGGTTTCTCTCCCCACCACAACATAAATAAAATTTCAAGTGAAT
 ATATTCTGAAGCTTTGCTTACTACAAATATAGTGCCAATGTACCAGAGTTTTCAAGTTATATGGCGCTAC
 TTTTCATGACACCCTACTGCGAAAGTATGCTGAAGAAAGAAATGGTGTCAATGTCGTCAGTGGTCTGTGT
 TTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCCTTAGAGAATCTGAGGCAAAAAAGAAGATCATCCGTAA
 CCAAGAAATTTTGATTCCAACCTCACTTCTTTATTTGTGCTAACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCT
 TTGCACTGTGAAAACCTAGACACCTTAGCTTTCAATTTGCCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTG
 TGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTAATGTTACACAGAGCACGGATCACAGATGT
 TGAGCACATCACTGGACTCAGCTTCTATCAACAAAGAAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTAAAGTTGAAA
 ACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGACCTGGCGCCCCCGCCGGCACCAACCGACGCCGCGCACCCGGGGC
 GGTCCGTGGTCCCCGCGTTGCTTCTCTGCTGGCCGGGACCCTGCTGCTGCTGGAGACGGCCACTGCTCCC

Figura 22 - Sequência de bases da NPP1 recombinante. Em verde, a sequência correspondente ao peptídeo de sinal PLAP e em azul, a sequência da GPI. Em cinza, a sequência da NPP1. Fonte: Autoria própria.

Baseada nesta sequência, os *primers* internos para as reações do sequenciamento foram desenhados e são mostrados na Figura 23.

ATGCTGGGGCCCTGCGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAG
 TTATGGACGTGGGGGAGGAGCCGCTGGAGAAGGCGGCGCGCGCCGCACTGCCAAGGACCCCAACACCTAT
 AAAGTAC **TCTCGCTGGTATTGTCAGT** ATGTGTGTTAACAACAATACTTGGTTGTATATTTGGGTTGAAAC
 CAAGCTGTGCCAAAGAAGTTAAAAAGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAAGTGTGCGT **TG**
TGATGCTGCCTGTGTTGA GCTTGAAAAGTGTGTTTAGATTACCAGGAGACGTGCATAGAACCAGAACAT
 ATATGGACTTGCAACAAATTCAGGTGTGGTGAGAAAAAGGTTGACCAGAAGCCTCTGTGCCTGTTTCTAGATG
 ACTGCAAGGACAAGGGCGACTGCTGCATCAACTACAGTTCTGTGTGTCAAGGTGAGAAAAGTTGGGTAGA
 AGAACCATGTGAGAGCATTAATGAGCCACAGTGCCAGCAGGGTT **TGAAACGCCTCCTACCCCTCT** TATTT
 TCTTTGGATGGATTACAGGCAGAAATATTTACACACTTGGGGTGGACTTCTTCCTGTTATTAGCAAACATAA
 AAAAATGTGGAACATATACTAAAAACATGAGACCGGTATATCCAACAAAA **CTTTCCCAATCACTACAG**
CA TTGTCACCGGATTGTATCCAGAATCTCATGGCATAATCGACAATAAAATGTATGATCCCAAAATGAAT
 GCTTCCTTTTCACTTAAAAAGTAAAGAGAAATTTAATCCTGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTCA
 CAGCTAAGTATCAAGGCCTCA **AGTCTGGCACATTTTCTGGC** CAGGATCAGATGTGGAATTAACGGAAT
 TTTCCAGACATCTATAAAATGTATAATGGTTCAGTACCATTGGAAGAAAGGATTTTAGCTGTTCTTCAG
 TGGCTACAGCTTCTTAAAGATGAAAGACCACACTTTTACACTCTGTATTTAGAAGAACCAGATTCTTCAG
 GTCATTATCATATGG **ACCAGTCAGCAGTGAAGTCA** TCAAAGCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGGTTGGTAT
 GCTGATGGATGGTCTGAAAGAGCTGAACTTGACACAGATGCCCTGAACCTCATCCTTATTTTCTAGATCATGGC
 ATGGAACAAGGCAGTTGTAAGAAATACATATATCTGAATAAAATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAAG
 TTATCTATGGACCTGCAGCTCGATTGAGACCCCTGATGTCCAGATAAAATACTATTCAATTTAACTATGA
 AGGCATTGCCCCGAAATCTTTCTTGCCGGGA **ACCAAACCAGCACTTCAAACCT** TACCTGAAACATTTCTTA
 CCTAAGCGTTTGCACTTTGCTAAGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTGGACCCCTCAGTGGC
 AACTTGCAATTGAATCCCTCAGAAAAGGAAATAT **TGTGGAAGTGGATTTCATGGCT** CTGACAATGTATTTTC
 AAATATGCAAGCCCTCTTTGTTGGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAA
 AACATTGAAGTCTATACTTAATGTGTGATTTACTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACATCATG
 GAAGTCTTAACACCTTCTAAAGAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGCACCCCTGGT
 ACAGTGCCCTTCAACAAGAAACCCAGAGATAACCT **TGGCTGCTCATGTAACCCCT** CGATTTTGCCGATT
 GAGGATTTTCAAACACAGTTCAATCTGACTGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTACCCCT
 ATGGAAGACCTAGAGT **TCTCCAGAAGGAAAACACCATC** TGTCTTCTTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGG
 ATACAGCCAAGACATCTTAATGCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACG
 GAAGACTTCTCAACTGTCTGTACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCCTGTCCATAAATGTTTCAATTT
 ATAAAAATAACACCAAAGTGAGTTACGGGT **TCCTCTCCCCACCACAATA** AATAAAAAATCAAGTGGAAT
 ATATTCTGAAGCTTTGCTTACTACAAATATAGTGCCAAATGTACCAGAGTTTCAAGTTATATGGCGCTAC
 TTTTCATGACACCCCTACTGCGAAAAGTATGCTGAAGAAAGAAATGGT **GTCAATGTCGTCAGTGGTCT** GTGT
 TTGACTTTGATTATGATGGACGTTGTGATTCCTTAGAGAATCTGAGGCAAAAAAGAAGATCATCCGTAA
 CCAAGAAATTTTGAATTCCAACCTCACTTCTTTATTTGTGCTAACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCCT
 TTGCACTGTGAAAACCTAGACACCTTAGCTTTTCAATTTGCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTG
 TGCATGGGAAGCATGACTCCTCATGGGTTGAAGAATTGTTAATG **TTACACAGAGCACGGATCACA** GATGT
 TGAGCACATCACTGGACTCAGCTTCTATCAACAAAAGAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTAAAGTTGAAA
 ACACATTTGCCAACCTTTAGCCAAGAAGAC **CTGGCGCCCCCGCCGGCACCACCGACGCCGCGCACCCGGGGC**
GGTCCGTGGTCCCCGCGTTGCTTCTCTGCTGGCCGGGACCCTGCTGCTGCTGGAGACGGCCACTGCTCCC

Figura 23 - Sequência da NPP1 recombinante com destaque para os *primers* desenhados. Em amarelo, os *primers Reverse*, em rosa, os *primers Forward*. Em verde, a sequência correspondente ao peptídeo de sinal PLAP e em azul, a sequência da GPI. Em cinza, a sequência da NPP1. Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 17 é descrito a sequência dos *primers* externos T3 Forward e T7 Reverse, baseados na sequência do vetor pCMV-Script. Na Tabela 18 são listadas as sequências dos *primers* internos *Forward* e *Reverse* desenhados.

Tabela 17 - *Primers* externos desenhados.

<i>Primers Externos</i>	
T3 Forward	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7 Reverse	TAATACGACTCACTATAGGG

Fonte: Autoria própria.

Tabela 18 - *Primers* internos desenhados.

<i>Primers Internos</i>	
P1F	TGTGATGCTGCCTGTGTTGA
P2F	CTTTCCCAATCACTACAGCA
P3F	ACCAGTCAGCAGTGAAGTCA
P4F	TGTGGAAGTGGATTTTCATGGCT
P5F	TCTCCAGAAGGAAAACACCATC
P6F	GTCAATGTCGTCAGTGGTCCT
P1R	TGTGATCCGTGCTCTGTGTAA
P2R	TAGTTGTGGTGGGGAGAGGA
P3R	AAGGGTTACATGAGCAGCCA
P4R	AGGTTTGAAGTGCTGGTTTGGT
P5R	GCCAGAAAAATGTGCCAGACT
P6R	AGAGGGTAGGAGGCGTTTCA
P7R	ACTGACAATACCAGCGAGA

Fonte: Autoria própria.

Foram realizadas 15 reações de sequenciamento, 1 para cada *primer*. Ao final, apenas uma das reações não amplificou o segmento de DNA, que foi a reação com o primer P7R.

A reação com o primer P6R conseguiu estender bastante a fita de DNA e foi observado que o vetor pCMV-Script está correto, pois conseguimos encontrar a sequência que tem identidade com o vetor quando usada a ferramenta *BLAST* (disponível no site do

NCBI). Esta sequência que foi amplificada correspondente ao vetor pode ser vista na Figura 24, sob o destaque de cor amarela.

Ainda nesta sequência obtida pela análise das reações do sequenciamento (Figura 24), foi possível observar que o peptídeo de sinal da PLAP está presente, porém existem alguns pares de bases anteriores à ligação com o vetor pCMV-Script, “CTGCCTCGCCACTGTCCTGCTGCCCTCCAGAC” que não são esperados nesta região na sequência original estudada, e alguns pares de bases posteriores à região do peptídeo de sinal da PLAP, “CCGCGC”, que também não fazem parte da sequência original. Além disso, há uma deleção de bases no início da sequência da proteína NPP1. A região destacada em verde corresponde à sequência de bases da proteína NPP1, porém é notável que as duas sequências (Figura 23 comparada à Figura 24) não iniciam iguais após o término da sequência do peptídeo de sinal da proteína PLAP. Com relação à âncora de GPI da proteína PLAP, a sequência obtida pelo sequenciamento alinha perfeitamente com a sequência original estudada. As Figuras 25 e 26 são comparativas, pois mostram a tradução da sequência de bases para a sequência de aminoácidos, da sequência obtida pelo sequenciamento e a original, e pode-se notar diferenças no início das sequências e na Figura 26, a região que não está presente na amostra sequenciada está sob a forma riscada.

A partir desta análise, as *Maxipreps* NPP1-pCMV-Script-A e NPP1-pCMV-Script-B foram descartadas e foi solicitado ao Prof. Dr. José Luis Millán, uma nova amostra de DNA recombinante NPP1-pCMV-Script. Esta amostra foi então utilizada para amplificação, e a amostra final purificada foi denominada de NPP1-pCMV-Script-C.

GACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAAC
 GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA
 GGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGATTACGCCAAGCTCGAAATTAA
 CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGCCCCGGGCGGATCCCCC
 GGGCTGCAGGAATTCTGCTCGCCACTGTCTGCTGCCCTCCAGACATGCTGGGGCCCTGCATGCTGCT
 GCTGCTGCTGCTGCTGGGCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAGTCCGCGCGAAGTTAA
 AGTTGCAAAGGTCGCTGTTTCGAGAGAACATTTGGGAACTGTCGCTGTGATGCTGCCCTGTGTTGAGCTTG
 GAAACTGCTGTTTAGATTACAGGAGACGTGCATAGAACAGAACATATATGGACTTGCAACAAATTCAG
 GTGTGGTGAGAAAAAGTTGACCAGAAGCCTCTGTGCCCTGTTTTCAGATGACTGCAAGGACAAGGGCGACTGC
 TGCATCAACTACAGTTCTGTGTGTCAAGGTGAGAAAAAGTTGGGTAGAAGAACCATGTGAGAGCATTAATG
 AGCCACAGTGCCACGAGGGTTTGAAACGCCTCCTACCCTCTTATTTTCTTTGGATGGATTTCAGGGCAGA
 ATATTTACACACTTTGGGGTGGACTTCTTCTCTGTTATTAGCAAACATAAAAAATGTGGAACATATACTAAA
 AACATGAGACCGGTATATCCAAACAAAAAATTTCCCAATCACTACAGCATTGTCACCGGATTGTATCCA
 GAATCTCATGGCATAATCGACAATAAAATGTATGATCCCAAAATGAATGCTTCCTTTTCACTTAAAGTA
 AAGAGAAATTTAATCCTGAGTGGTACAAAGGAGAACCAATTTGGGTACAGCTAAGTATCAAGGCCTCAA
 GTCTGGCACATTTTCTGGCCAGGATCAGATGTGGAAATTAACGGAATTTTCCAGACATCTATAAAATG
 TATAATGGTTCAGTACCATTGAGAAAGGATTTAGCTGTTCTTCAGTGGCTACAGCTTCCTAAAGATG
 AAAGACCACACTTTTACACTCTGTATTTAGAAGAACCAGATTCTTCAGGTCATTTCATATGGACCAGTCAG
 CAGTGAAGTCATCAAAGCCTTGACAGAGGGTTGATGGTATGGTTGGTATGCTGATGGATGGTCTGAAAGAG
 CTGAACCTGCACAGATGCCTGAACCTCATCCTTATTTTCAGATCATGGCATGGAACAAGGCAGTTGTAAGA
 AATACATATATCTGAATAAATATTTGGGGGATGTTAAAAATATTAAAGTTATCTATGGACCTGCAGCTCG
 ATTGAGACCCCTCTGATGTCCAGATAAAATACTATTCATTTAACTATGAAGGCATTGCCCGAAATCTTTCT
 TGCCGGGAACCAAAACCAGCACTTCAAACCTTACCTGAAACATTTCTTACCTAAGCGTTTGCACCTTTGCTA
 AGAGTGATAGAATTGAGCCCTTGACATTCTATTTGGACCCCTCAGTGGCAACTTGCAATTGAATCCCTCAGA
 AAGGAAATATTGTGGAAGTGATTTTCATGGCTCTGACAATGTATTTTCAAATATGCAAGCCCTCTTTGTT
 GGCTATGGACCTGGATTCAAGCATGGCATTGAGGCTGACACCTTTGAAAACATTGAAGTCTATAACTTAA
 TGTGTGATTTACTGAATTTGACACCGGCTCCTAATAACGGAACCATGGAAGTCTTAACCACCTTCTAAA
 GAATCCTGTTTATACGCCAAAGCATCCCAAAGAAGTGACCCCTGGTACAGTGCCCTTCACAAGAAAC
 CCCAGAGATAACCTTGCTGCTCATGTAACCTTCGATTTTGCCGATTGAGGATTTTCAAACACAGTTCA
 ATCTGACTGTGGCAGAAGAGAAGATTATTAAGCATGAACTTTACCCTATGGAAGACCTAGAGTTCTCCA
 GAAGGAAAACACCATCTGTCTTCTTCCAGCACCAGTTTATGAGTGGATACAGCCAAGACATCTTAATG
 CCCCTTTGGACATCCTATACCGTGGACAGAAATGACAGTTTCTCTACGGAAGACTTCTCCAACCTGTCTGT
 ACCAGGACTTTAGAATTCCTCTTAGTCTGTCCATAAATGTTTCATTTTATAAAAAATAACACCAAAGTGAG
 TTACGGGTTTCTCTCCCCACCACAACTAAATAAAAAATTCAGTGGAATATATTTCTGAAGCTTTGCTTACT
 ACAAATATAGTGCCAAATGTACCAGAGTTTTCAGTTATATGGCGCTACTTTTCATGACACCCTACTGCGAA
 AGTATGCTGAAGAAAAGAAATGGTGTCAATGTGCTCAGTGGTCCGTGTGTTTGAAGTTTATGATGGACG
 TTGTGATTCCTTAGAGAATCTGAGGCAAAAAAGAGTCAATCCGTAACCAAGAAATTTTGATTCCAAC
 CACTTCTTTATTGTGCTAACAAGCTGTAAAGATACATCTCAGACGCCCTTGCACGTGTGAAAACCTAGACA
 CCTTAGCTTTTCATTTTGCCTCACAGGACTGATAACAGCGAGAGCTGTGTGCATGGGAAGCATGACTCCTC
 ATGGGTTGAAGAATTGTTAATGTTACACAGAGCAGGATCACAGATGTTGAGCACATCACTGGACTCAGC
 TTCTATCAACAAAGAAAAGAGCCAGTTTCAGACATTTTAAAGTTGAAAACACATTTGCCAACCTTTAGCC
 AAGAAGACCTGGCGCCCCCGCCGGCACCAACCGACGCCGCGCACCCGGGGCGGTCCGTGGTCCCCGCTGCTTC
 CTCTGCTGGCCGGGACCCTGCTGCTGCTGGAGACGGCCACTGCTCCG

Figura 24 - Sequência da NPP1 recombinante obtida após o sequenciamento. Em amarelo, a sequência do vetor pCMV-Script. Em rosa, a sequência do peptídeo de sinal da proteína PLAP. Em verde, a sequência da NPP1 encontrada e em vermelho, a sequência da âncora de GPI da proteína PLAP. Fonte: Autoria própria.

ASPLSCCPD**MLGPCMLLLLLLLGLRLQLSLGIIPV**PREVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLD
 YQETCIEPEHIWTCNKFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPA
 GFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKN**MR**PVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII
 DNK**MY**DPK**M**NASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYK**MY**NGSV
 FEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVD**GMVGM**MDGLKELNLHRC
 LNLILISDHG**ME**QGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQ
 HFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSN**MQ**ALFVGYPGPF
 KHGIEADTFENIEVYN**LM**CDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLG
 CSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQ**F**MSGYSQDI**LM**PLWTSY
 TVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVP**M**
 YQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVL
 TSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEEL**ML**HRARITDVEHITGLSFYQQRK
 EPVSDILKLKTHLPTFSQED**LAPPAGTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP**

Figura 25 - Tradução da sequência obtida pelo sequenciamento. Em verde, é destacado o peptídeo de sinal da PLAP, em azul, a âncora de GPI da proteína PLAP e em cinza, a sequência obtida da NPP1. Os aminoácidos PR (em amarelo) e os aminoácidos não destacados não fazem parte da sequência original. Em negrito, estão destacados os aminoácidos metionina. Fonte: Autoria própria.

MLGPCMLLLLLLLGLRLQLSLGIIPVMDVCEELEKAARARTAKDPNTYKVLISVLVSVCLVTLTILGCIFFG
 LKPSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCEKRLTRSLCAC
 SDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVIS
 KLKCGTYTKN**MR**PVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNK**MY**DPK**M**NASFSLKSKEKFNPEWYKGEPI
 WVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYK**MY**NGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPD
 SSGHSYGPVSSEVIKALQRVD**GMVGM**MDGLKELNLHRCNLILISDHG**ME**QGSCKKYIYLNKYLGDVKN
 IKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDP
 QWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSN**MQ**ALFVGYPGPGFKHGIEADTFENIEVYN**LM**CDLLNLTPAPNNG
 THGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHET
 LPYGRPRVLQKENTICLLSQHQ**F**MSGYSQDI**LM**PLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKC
 SFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVP**MY**QSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSG
 PVFDFDYDGRCDSENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSE
 SCVHGKHDSSWVEEL**ML**HRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED**LAPPAGTTDAA**
HPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP

Figura 26 - Tradução da sequência esperada da NPP1 recombinante, contendo o peptídeo de sinal da PLAP, a sequência da NPP1 e a âncora de GPI da proteína PLAP, com destaque para a região deletada. Em negrito, estão destacados os aminoácidos metionina. A parte riscada refere-se a uma sequência que não foi encontrada na análise do sequenciamento. Fonte: Autoria própria.

4.5.Expressão e Purificação de Anexina V

As etapas de propagação do DNA recombinante já foram realizadas pelo nosso grupo de pesquisa e no presente trabalho foram realizados três experimentos completos de expressão e a purificação da proteína Anexina V recombinante (BOLEAN, 2014; BOLEAN et al., 2015). Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A Anexina V recombinante possui tamanho de 35 kDa.

4.5.1. Primeira expressão de Anexina V

Na Figura 27, é possível observar que a proteína Anexina V recombinante foi expressa; a amostra após 5 h de indução (TF) comparada à amostra antes da indução (T0) apresenta uma banda escura, que está circulada em vermelho, correspondente à Anexina V. A primeira etapa de purificação também é apresentada nesta figura, sendo que as raias 5, 30 e 300 exibem bandas na mesma altura da banda circulada em vermelho e a banda mais intensa aparece em 300, ou seja, a proteína recombinante é bastante eluída na concentração de *Binding Buffer* com 300 mM de imidazol. Esta amostra foi utilizada na segunda etapa de purificação e o cromatograma da etapa de *Desalting* é mostrado na Figura 28.

Figura 27 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão e primeira etapa de purificação da Anexina V recombinante. M: Marcador de baixo peso molecular; T0: Antes da indução; TF: Após 5 horas de indução; S: Não ligado sem tampão; E: Não ligado com tampão; 5, 30 e 300: Frações eluídas com 5, 30 e 300 mM de imidazol, respectivamente. I: Lavagem com 1M de imidazol e L: Lavagem com água. Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Cromatograma de purificação da Anexina V na coluna *Desalting*. Fonte: Autoria própria.

O cromatograma apresenta bandas de absorção intensas nas frações 3 e 4. Estas frações foram misturadas e concentradas, pois a coluna Mono Q comporta no máximo 5 mL de volume de amostra. O filtrado foi utilizado na terceira etapa de purificação, cujo cromatograma é apresentado na Figura 29.

Figura 29 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q. Fonte: Autoria própria.

Neste cromatograma, as bandas de absorção estão nas frações 20 a 26, 27 e 28, 38 e 39, 40, 41 e 42. Estas frações foram recolhidas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. O resultado é apresentado na Figura 30. O resto do filtrado da etapa de *Desalting* apresenta uma banda muito fraca, isto sugere que praticamente todo o conteúdo de proteínas purificadas na etapa de *Desalting* permaneceu no filtrado. A raia F1 apresenta uma banda mais intensa (em ~35kDa) devido à alta concentração, pois corresponde as frações recolhidas de 20 a 26 misturadas. Todas as outras raia, denominadas de F2, F3, F4 e F5, correspondentes às frações recolhidas 27 e 28, 38 e 39, 40, 41 e 42, respectivamente, apresentam bandas em torno de 35 kDa, na mesma altura que a raia F1.

Figura 30 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da terceira etapa de purificação da Anexina V. A seta indica a região de tamanho aproximado de 35 kDa. M: Marcador de massa molecular. R: Resto do filtrado da etapa de *Desalting*. F1: Frações 20 a 26 misturadas; F2: Frações 27 e 28; F3: Frações 38 e 39; F4: Fração 40; F5: Frações 41 e 42. Fonte: Autoria própria.

A Tabela 19 apresenta dados de concentração das amostras de Anexina V recombinante, durante o processo de purificação. É interessante observar que o maior valor de concentração de proteínas aparece na amostra S, ou seja, são relativas as diversas proteínas expressas pela *E.coli* além da Anexina V. Não foi possível realizar a medida de concentração da amostra 300 (300 mM de imidazol), pois todo o conteúdo foi utilizado na etapa de purificação pela coluna *Desalting*. Entretanto, nota-se que nas amostras relativas à segunda etapa de purificação (F1 a F5), a amostra F1 (Frações 20 a 26 misturadas) apresenta o maior valor dentre os listados, condizendo com o fato de ter maior quantidade de proteínas devido ao volume maior recolhido. Os valores de concentração das amostras I e L são baixos, o que também condiz com o esperado, grande quantidade de proteína não é perdida durante a purificação na coluna de níquel e principalmente na etapa de lavagem com água, garantimos que praticamente todo o conteúdo proteico

adicionado à coluna foi recolhido e a coluna está limpa. A amostra R (Resto do concentrado do *Desalting*) também apresenta concentração baixa (0,06 mg/mL), sugerindo que não há grande perda de proteína, no decorrer do processo de centrifugação a fim de concentrar a amostra 300 (300 mM de imidazol) que é recolhida na etapa de purificação na coluna de níquel para posterior passagem na coluna de *Desalting*. A amostra F1 foi utilizada em outros projetos do nosso laboratório de pesquisa, por exemplo, experimentos de incorporação em lipossomos e ensaios de mineralização.

Tabela 19 - Concentração das amostras de Anexina V durante o processo de purificação (primeiro experimento de expressão). As amostras estão nomeadas de acordo com as denominações das raia dos géis apresentadas nas Figuras 20 e 23.

Amostras	Concentração (mg/mL)
S (não ligado sem tampão)	6,50
E (eluído com tampão)	1,47
5 (5 mM de imizadol)	0,63
30 (30 mM de imizadol)	2,85
I (Imidazol 1 M)	0,69
L (Lavagem)	0,09
R (Resto do filtrado da etapa de <i>Desalting</i>)	0,06
F1 (Frações 20 a 26 misturadas)	2,62
F2 (Frações 27 e 28)	0,42
F3 (Frações 38 e 39)	0,26
F4 (Fração 40)	0,68
F5 (Frações 41 e 42)	0,68

Fonte: Autoria própria.

4.5.2. Segunda Expressão de Anexina V

O protocolo de expressão foi repetido e na Figura 31 é possível observar as bandas relativas à Anexina V, em 35 kDa. As amostras aplicadas neste gel foram padronizadas na concentração de 5 µg. As amostras A e B são relativas à eluição com 5mM de imidazol, as Amostras C e D se referem à eluição com 30mM de imidazol. Neste gel não foi aplicada a amostra eluída com 300mM de imidazol, esta amostra seguiu para a segunda etapa de purificação (*Desalting*). O volume total obtido foi de 20 mL, que foi dividido em duas alíquotas de 10 mL (Alíquota 1 e Alíquota 2) que passaram pela coluna *Desalting*. Os cromatogramas das duas purificações com a coluna *Desalting* estão apresentados na Figura 32. É importante notar que as amostras contendo Anexina V foram eluídas nas mesmas frações nas duas purificações (Frações 3 e 4). As frações recolhidas nesta etapa foram misturadas resultando em 15 mL no total, e foram divididas em 3 alíquotas de 5 mL cada (Alíquota 1, 2 e 3) que passaram pela coluna *Mono-Q*. Ainda na Figura 31, as raias F, G, e H são referentes às frações eluídas a partir da purificação da Alíquota 1 na coluna *Mono-Q*, 40, 41 e 42, respectivamente. Os cromatogramas das três purificações na coluna *Mono-Q* estão apresentados na Figura 33. Para melhor visualização, a Figura 34 é um aumento da Figura 33 (zoom), e tem destaque para as frações eluídas de 25 a 45. A purificação na coluna *Mono-Q* apresenta um padrão de eluição, que é observado entre as frações 25-45, ou seja, as três alíquotas são eluídas nesta faixa de frações.

Somente as raias M e Q (Figura 35) não apresentaram bandas visíveis próximo à 35kDa. Estas raias são referentes às frações 44 e 45 misturadas retiradas da purificação da Alíquota 2 e Alíquota 3 na coluna *Mono-Q*. Pelo cromatograma, é possível ver que a absorbância em 280nm é de intensidade muito baixa, portanto, não há quantidade considerável de Anexina V nestas frações. Ao final, foram misturadas as frações 25, 26, 27 e 28 referentes à purificação das Alíquotas 2 e 3 na coluna *Mono-Q*, e esta amostra final contendo Anexina V purificada foi utilizada em alguns projetos do nosso laboratório de pesquisa.

A Tabela 20 apresenta os valores de concentração das amostras após o processo de purificação de Anexina V recombinante.

Figura 31 - Gel de eletroforese em poliacrilamida da segunda expressão de Anexina V.

M: Marcador de massa molecular. A: 5 mM de Imidazol; B: 5 mM de imidazol; C: 30 mM de Imidazol; 30 mM de imidazol; E: Após *Desalting*; F: Fração 40; G: Fração 41; H: Fração 42. Fonte: Autoria própria.

Figura 32 – Cromatograma das duas etapas de purificação da Anexina V na coluna *Desalting*. Fonte: Autoria própria.

Figura 33 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q. Fonte: Autoria própria.

Figura 34 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q com destaque para as frações de 25 a 45. Fonte: Autoria própria.

Figura 35 - Gel de eletroforese em poliacrilamida das frações eluídas a partir da purificação da segunda e terceira alíquotas. M': Marcador de massa molecular; (Segunda Alíquota) I: Frações 25, 26, 27 e 28; J: Fração 29; K: Frações 35, 36 e 37; L: Frações 40, 41 e 42, M: Frações 44 e 45; (Terceira Alíquota) N: Frações 25, 26, 27 e 28; O: Frações 35, 36 e 37; P: Frações 41 e 42; Q: Frações 44 e 45. Fonte: Autoria própria.

Tabela 20 - Concentração das amostras de Anexina V durante o processo de purificação (segundo experimento de expressão). As amostras estão nomeadas de acordo com as denominações das raías dos géis apresentadas nas Figuras 31 e 34.

Amostra		Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
A	5 mM Imidazol – A	0,312
B	5 mM Imidazol – B	0,312
C	30 mM Imidazol – A	0,433
D	30 mM Imidazol – A	0,458
E	Após Desalting – AD	0,815
F	Fração 40	0,930
G	Fração 41	1,395
H	Fração 42	0,465
I	Frações 25, 26, 27 e 28	0,547
J	Fração 29	0,242
K	Frações 35, 36 e 37	0,439
L	Frações 40, 41 e 42	0,293
M	Frações 44 e 45	0,159
N	Frações 25, 26, 27 e 28	0,579
O	Frações 35, 36 e 37	0,420
P	Frações 41 e 42	0,076
Q	Frações 44 e 45	0,306

Fonte: Autoria própria.

4.5.3. Terceira expressão de Anexina V

Foi realizada uma terceira repetição do experimento de expressão de Anexina V. A Figura 36 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras da etapa de purificação na coluna de níquel. As amostras analisadas neste gel não foram preparadas de acordo com uma concentração padrão, como descrito nas Figuras 31 e 35, cuja concentração foi de $5\mu\text{g}$. Durante o procedimento de centrifugação para separar o extrato bruto lisado do *pellet* após a etapa de lise (sonicação), um dos tubos *falcon* estourou, e parte da amostra foi perdida no suporte, onde é colocado o tubo *falcon* na centrífuga. Antes de ser descartada a amostra perdida, uma alíquota foi retirada e analisada por eletroforese, e foi possível observar bandas de Anexina V nesta amostra, porém ela foi

descartada pois deveria estar contaminada e isso poderia danificar as colunas. A amostra SL é referente à amostra de sobrenadante após a lise do *pellet* de células, e nesta raia é possível notar banda intensa em torno de 35 kDa. As raias 5, 30 e 300 indicam as eluições com 5, 30 e 300mM de imidazol, respectivamente. A banda mais intensa aparece em 300mM de imidazol, é interessante observar que em todos os três experimentos de expressão de Anexina V neste trabalho, na etapa de purificação em coluna de níquel, a proteína é bastante eluída na presença de 300mM de imidazol. A raia 1 é referente à amostra de lavagem da coluna com 1M de imidazol e não foi observado a eluição de Anexina V nesta solução.

A amostra eluída em 300mM de imidazol foi utilizada para purificação na coluna *Desalting* em apenas uma única etapa. O cromatograma é apresentado na Figura 37. A partir do resultado obtido pelo cromatograma, as frações 3 e 4 foram misturadas e depois divididas em duas alíquotas de 5 mL cada, para purificação na coluna *Mono-Q*. O cromatograma das purificações das Alíquotas 1 e 2 é exibido na Figura 38. As duas alíquotas tiveram o mesmo perfil de eluição, sendo recolhidas as frações 39, 40, 41 e 42 tanto para a purificação da Alíquota 1 quanto da Alíquota 2. Para melhor visualização, a Figura 39 apresenta o gráfico expandido, com destaque nas frações 39 a 42. Isso é importante, visto que caracteriza um padrão de purificação. As amostras não foram misturadas, e uma alíquota de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. O resultado é apresentado na Figura 40. A raia AD, referente às frações 3 e 4 misturadas após a etapa de purificação na coluna *Desalting*, apresenta uma banda intensa em 35 kDa. As raias A, B, C e D são as análises das frações recolhidas após a purificação da Alíquota 1 na coluna *Mono-Q*: 39, 40, 41 e 42, respectivamente. Enquanto que as raias E, F, G e H correspondem às frações recolhidas após a purificação da Alíquota 2 na coluna *Mono-Q*: 39, 40, 41 e 42. Todas as raias apresentam bandas intensas na região de 35kDa, o que confirma a presença de Anexina V em todas as frações recolhidas. No Tabela 21 são mostrados os valores de concentração obtidos para cada uma das frações recolhidas.

Figura 36 - Gel de eletroforese em poliacrilamida da etapa de purificação em coluna de níquel.

S: Sobrenadante do lisado perdido; M: Marcador de massa molecular; S: Sobrenadante do lisado perdido; SL: Extrato Bruto Lisado (sobrenadante após lise); NL: Não ligado; NLT: Não ligado com tampão; 5, 30 e 300: 5,30,300 mM de Imidazol; 1: Lavagem com 1M Imidazol. Fonte: Autoria própria.

Figura 37 – Cromatograma de purificação da amostra de Anexina V do terceiro experimento de expressão na coluna *Desalting*. Fonte: Autoria própria.

Figura 38 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q. Fonte: Autoria própria.

Figura 39 - Cromatograma de Purificação da Anexina V na coluna Mono-Q com destaque para as frações de 39 a 42. Fonte: Autoria própria.

Figura 40 - Gel de eletroforese em poliacrilamida da terceira expressão de Anexina V.

AD: Após *Desalting*; M: Marcador de massa molecular; (Primeira Alíquota) A: Amostra 39; B: Amostra 40; C: Amostra 41; D: Amostra 42; (Segunda Alíquota) E: Amostra 39; F: Amostra 40; G: Amostra 41; H: Amostra 42. Fonte: Autoria própria.

Tabela 21 - Concentração das amostras de Anexina V após a purificação na coluna *Mono-Q* (terceiro experimento de expressão). As amostras estão nomeadas de acordo com as denominações das raías dos géis apresentadas nas Figuras 35 e 39.

Amostra		Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
A	39	0,739
B	40	3,067
C	41	1,608
D	42	0,586
E	39	0,166
F	40	3,032
G	41	1,802
H	42	0,691

Fonte: Autoria própria.

4.6.Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular é fundamental para caracterização de proteínas. A fim de verificar a estrutura secundária da Anexina V recombinante e comprovar que o procedimento de expressão foi eficiente e padronizado, amostras de Anexina V após a purificação foram analisadas pela técnica de dicroísmo circular. A Figura 41 apresenta todas as amostras analisadas em um único espectro. Foram avaliadas as amostras das frações recolhidas a partir da purificação das Alíquotas 1 e 2 do terceiro experimento de expressão, a amostra final da purificação do segundo experimento de expressão e uma amostra denominada de padrão, que é referente à uma amostra de Anexina V recombinante purificada que foi obtida a partir de um experimento de expressão realizado por um grupo de pesquisa internacional que é parceiro do nosso laboratório de pesquisa (BOLEAN, 2014; BOLEAN et al., 2015). No espectro, é possível observar que todas as amostras possuem estrutura em α -hélices. Como já descrito na literatura, a Anexina V possui em sua estrutura 4 domínios de 5 α -hélices (LIEMANN; HUBER, 1997). Portanto, as amostras de Anexina V recombinante purificadas contêm proteínas na estrutura esperada para a Anexina V.

Figura 41 - Espectro de Dicroísmo Circular das Amostras Purificadas de Anexina V recombinante. As amostras estão descritas como pico_39 a pico_42 e são referentes às amostras recolhidas na última etapa do terceiro experimento de expressão, sendo que 1a e 2a são denominações para a purificação da Alíquota 1 e Alíquota 2. Fonte: Autoria própria.

4.7.Gota Pendente

Apesar da Anexina V ser uma proteína solúvel, em determinadas condições ela pode agregar e, especialmente na presença de interfaces lipídicas, leva a redução de sua característica hidrofílica e aumento da característica hidrofóbica (KIRSCH et al., 1997; BOTTINI et al., 2017). Nosso laboratório de pesquisa tem desenvolvido trabalhos com reconstituição de Anexina V em lipossomos constituídos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS). Os dados obtidos por estes trabalhos mostraram que lipossomos constituídos de 9:1 DPPC:DPPS conseguem incorporar

Anexina V de forma mais eficiente que os lipossomos constituídos apenas por DPPC (BOLEAN et al., 2015, 2017) Estes dados foram obtidos para lipossomos, que são bicamadas lipídicas. Então, neste trabalho foi estudada a interação da Anexina V com monocamadas lipídicas constituídas pelos lipídeos DPPC e DPPS e o efeito da presença do íon Ca^{2+} , pelo método da gota pendente.

As Figuras 42, 43, 44 e 45 mostram os dados da variação da tensão superficial após a adição da proteína Anexina V, em função do tempo. Não é mostrado nos gráficos a variação da tensão superficial ao adicionar a composição lipídica à gota. Esta variação está indicada na legenda, em que cada linha representa uma variação de tensão superficial após a adição da composição lipídica à gota (DPPC ou 9:1 DPPC:DPPS).

O gráfico inserido em cada uma das figuras representa a variação de pressão superficial em função da pressão e a partir destes dados, os valores de pressão de exclusão (π_{exc}) para cada um dos experimentos foram calculados e estão resumidos na Tabela 22. A análise destes resultados permite observar que a Anexina V interagiu com todas as monocamadas. No entanto, valores altos de pressão de exclusão indicam maior afinidade da proteína pela camada lipídica; portanto, a interação de Anexina V foi maior em monocamadas constituídas de 9:1 DPPC:DPPS na presença de íons Ca^{2+} . A carga negativa do lipídeo DPPS influencia fortemente no comportamento da inserção da Anexina V na monocamada, além disso, os íons cálcio tem uma significativa contribuição no aumento da afinidade da Anexina V em ambas as composições lipídicas das monocamadas. Estes resultados são inéditos e ainda precisam ser explorados, são dados iniciais e portanto, estes experimentos devem ser repetidos novamente com uma análise mais criteriosa (dados estatísticos) afim de se obter uma perfeita compreensão do mecanismo de interação da Anexina com monocamadas constituídas por estas composições lipídicas estudadas.

Figura 42 – Variação da tensão superficial em função do tempo para a composição DPPC na ausência de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V. Linha Vermelha: 13 mN. Linha Azul: 16 mN. Linha Preta: 15 mN. Inseto: Variação da Pressão Superficial em função da pressão. Fonte: Autoria própria.

Figura 43 – Variação da tensão superficial em função do tempo para a composição DPPC na presença de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V. Linha Vermelha: 21 mN. Linha Azul: 15 mN. Linha Preta: 12 mN. Inserto: Variação da Pressão Superficial em função da pressão. Fonte: Autoria própria.

Figura 44 – Variação da tensão superficial em função do tempo para a composição 9:1 DPPC:DPPS na ausência de íons Ca^{2+} , após a adição de 0,5 μg de Anexina V. Linha Vermelha: 16 mN. Linha Azul: 24 mN. Linha Preta: 8 mN. Inserto: Variação da Pressão Superficial em função da pressão. Fonte: Autoria própria.

Figura 45 – Variação da tensão superficial em função do tempo para a composição 9:1 DPPC:DPPS na presença de íons Ca^{2+} após a adição de 0,5 μg de Anexina V. Linha Vermelha: 17 mN. Linha Azul: 24 mN. Linha Preta: 29 mN. Inserto: Variação da Pressão Superficial em função da pressão. Fonte: Autoria própria.

Tabela 22 - Valores de pressão de exclusão (π_{exc}) obtidos para as composições DPPC e 9:1 DPPC:DPPS contendo 0,5 μg of Anexina V. Os sinais negativos e positivos indicam ausência e presença de íons Ca^{2+} , respectivamente.

Composição Lipídica da Monocamada	Ca^{2+} (10mM)	π_{exc}
DPPC	-	21 mN/m
DPPC	+	25 mN/m
DPPC:DPPS	-	29 mN/m
DPPC:DPPS	+	33 mN/m

Fonte: Autoria própria.

Conclusão

5. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de duas proteínas recombinantes, a Anexina V e a NPP1, para que em uma próxima etapa possam ser usadas na incorporação em lipossomos, ensaios cinéticos e de biomineralização. Com relação à obtenção da NPP1, foram realizadas várias tentativas de expressão da proteína. As tentativas iniciais não foram satisfatórias, pois não obtivemos a referida proteína. Devido a isso, buscou-se conferir a sequência do recombinante obtido pela *Maxiprep*. A partir do resultado obtido, que mostrou que a sequência estava incorreta, buscou-se uma nova alternativa para que fosse desenvolvido este trabalho; desta forma, uma nova amostra de DNA recombinante foi amplificada e transfectada nas células COS-1. Apesar das amostras terem apresentado atividade, não foi possível padronizar até o momento a obtenção da NPP1 recombinante. Portanto, outros experimentos ainda devem ser realizados a fim de padronizar a obtenção desta proteína recombinante em quantidade que seja suficiente para dar continuidade aos estudos.

Por outro lado, os três experimentos de expressão de Anexina V mostraram um padrão, tanto na expressão quanto na purificação. As amostras de Anexina V recombinante obtidas apresentaram dados característicos de estrutura em α -hélice, por dicroísmo circular, que é condizente com a estrutura da Anexina V humana definida pela literatura. Portanto, o procedimento de expressão de Anexina V foi padronizado com sucesso.

Os experimentos de interação de Anexina V recombinante com monocamadas de lipídeos, pelo método da gota pendente, apresentaram resultados interessantes, sugerindo que a Anexina V possui maior interação com monocamadas constituídas de 9:1 (DPPC:DPPS) comparado a monocamadas constituídas apenas por DPPC; além disso, os íons Ca^{2+} interferem na afinidade da proteína pelas monocamadas. As frações purificadas de Anexina V obtidas neste trabalho serão utilizadas em projetos desenvolvidos pelo nosso laboratório em estudos posteriores de incorporação em lipossomos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

- ADDGENE. **Plasmid:** pPROEX HTb. Disponível em: <<https://www.addgene.org/vector-database/3835/>>. Acesso em: 17/03/2018.
- ADDISON, W.N.; AZARI, F.; SORENSEN, E.S.; KAARTINEN, M.T.; MCKEE, M.D. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15872 - 15883, 2007.
- ANDERSON, H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. **Journal of Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 59 - 72, 1969.
- ANDERSON, H. C. Matrix vesicles and calcification. **Current Rheumatology Reports.**; v. 5, n.3, p. 222 - 226, 2003.
- ANDERSON, H. C.; GARIMELLA, R.; TAGUE, S. E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. **Frontiers in Bioscience**, v.10, p. 822-837, 2005.
- ANDERSON, H.C.; MULHALI, D.; GARIMELLA, R. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. **Laboratory Investigation**, v.90, p.1549–1557, 2010.
- ANDRADE, M.A.R.; FAVARIN, B.; DERRADI, R.; BOLEAN, M.; SIMÃO, A.M.S.; MILLÁN, J.L.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A.P. Pendant-drop method coupled to ultraviolet-visible spectroscopy: A useful tool to investigate interfacial phenomena. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.**, v. 504, p. 305–311, 2017.
- BALCERZAK, M.; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. **Acta Bioquímica Polonica**. v. 50 n.4, p. 1019 - 1038, 2003.
- BERRY, J.D.; NEESON, M.J.; DAGASTINE, R.R.; CHAN, D. Y.C.; TABOR, R.F. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. **Journal of Colloid and Interface Science.**, v. 434. p. 226-237, 2015.
- BEYCHOK, S. Circular dichroism of biological macromolecules. **Science**, v. 154, p. 1288 - 1299, 1966.
- BLANDFORD, N.R.; SAUER, G.R.; GENGE, B.R.; WU, L.N.Y.; WUTHIER, R.E. Modeling of matrix vesicle biomineralization using large unilamellar vesicles. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 94, p. 14 - 27, 2003.
- BOLEAN, M.; SIMÃO, A.M.S.; FAVARIN, B.Z.; MILLÁN, J.L.; CIANCAGLINI, P. The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes **Biophysical Chemistry** v.152, n. 1 - 3, p. 74 - 79, 2010.

BOLEAN, M.; SIMÃO, A.M.; FAVARIN, B.Z.; MILLÁN, J.L.; CIANCAGLINI, P. Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase. **Biophysical Chemistry**, v.158, n. 2 - 3, p. 111 - 118, 2011.

BOLEAN, M. **Reconstituição da Anexina V em sistemas de lipossomos: associação com a Fosfatase Alcalina e correlação com estudos de biomineralização**. 2014. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências – Área Química) - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

BOLEAN, M.; SIMÃO, A.M.; KIFFER-MOREIRA, T.; HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L.; ITRI, R. CIANCAGLINI, P. Proteoliposomes with the ability to transport Ca (2+) into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 584, p. 79 - 89, 2015.

BOLEAN, M.; SIMÃO, A.M.S.; BARIONI, M.B.; FAVARIN, B.Z.; SEBINELLI, H.G.; VESCHI, E.A.; JANKU, T.A.B.; BOTTINI, M.; HOYLAERTS, M.F.; ITRI, R. MILLÁN, J.L. CIANCAGLINI, P. Biophysical aspects of biomineralization. **Biophysical Reviews**, v. 9, 747–760, 2017.

BONUCCI, E. Fine Structure of Early Cartilage Calcification. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 20, n.1, p. 33 - 50, 1967.

BONUCCI, E. Fine Structure and Histochemistry of "Calcifying Globules" in Epiphyseal Cartilage. **Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie**, v. 103, n.2, p. 192 - 217, 1970.

BOSKEY, A. in Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Seibel, M. J., Robins, S. P., and Biezikian, J. P., eds) New York: Academic Press, Inc., 2006, pp. 201–212.

BOTTINI, M.; MEBAREK, S.; ANDERSON, K. L.; STRZELECKA-KILISZEK, A.; BOZYCKI, L.; SIMÃO, A. M. S.; BOLEAN; M.; CIANCAGLINI, P.; PIKULA, J. B. PIKULA, S.; MAGNE, D.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; MILLÁN, J. L.; BUCHET, R. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. DOI:10.1016/j.bbagen.2017.11.005, 2017.

BOYAN, B.D.; SCHWARTZ, Z.; SWAIN, L.D.; KHARE, A. Role of lipids in calcification of cartilage. **Anatomical Records**, v. 224, p. 211 - 219, 1989.

BRACHVOGEL, B; DIKSCHAS, J; MOCH, H; WELZEL, H.; VON DER MARK, K. HOFMANN, C.; PÖSCHL, E. Annexin A5 Is Not Essential for Skeletal Development. **Molecular And Cellular Biology**, v. 23, n.8, p. 2907–2913, 2003.

CAMOLEZI, F.L.; DAGHASTANLI, K.P.R.; MAGALHÃES, P.P.; PIZAURO, J.M.; CIANCAGLINI, P. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 9, p. 1091 - 1101, 2002.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007. 544 p.

CIANCAGLINI, P.; SIMÃO, A.M.S.; CAMOLEZI, F.L.; MILLÁN, J.L.; PIZAURO, J.M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 603 - 610, 2006.

CIANCAGLINI, P.; YADAV, M.C.; SIMÃO, A.M.S.; NARISAWA, S.; PIZAURO, J.M.; FARQUHARSON, C.; HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 716 - 723, 2010.

CIANCAGLINI, P., SIMÃO, A.M.S., BOLEAN, M., MILLÁN, J.L., RIGOS, C.F., YONEDA, J.S., COLHONE, M.C., STABELI, R.G. Proteoliposomes in nanobiotechnology. **Biophysical Reviews**, v. 4, n. 1, p. 67 - 81, 2012.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research** v.3, n.5, p. 164-173, 2009.

CUI, L; HOUSTON, D.A.; FARQUHARSON, C.; MACRAE, V.E. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. **Bone**. v.87, p.147–158, 2016.

DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA JR., O.N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 221-293, 2001.

EANES, E.D.; HAILER, A.W. Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. **Calcified Tissue International**, v. 37, p. 390 - 394, 1987.

EGGERS, J. Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flow. **Reviews of Modern Physics**, v. 69, n. 3, p. 865–929, 1997.

EGGERS, J.; VILLERMAUX, E. Physics of liquid jets, **Reports on Progress in Physics**, v. 71, 2008.

FAVARIN, B.Z., ANDRADE, M.A.R., BOLEAN, M., SIMÃO, A.M.S., RAMOS, A.P., HOYLAERTS, M.F., MILLÁN, J.L., CIANCAGLINI, P. Effect of the Presence of Cholesterol in the Interfacial Microenvironment on the Modulation of the Alkaline Phosphatase Activity during In Vitro Mineralization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 466-476, 2017.

FERRI, J.K.; KOTSMAR, C.; MILLER, R. From surfactant adsorption kinetics to asymmetric nanomembrane mechanics: pendant drop experiments with subphase exchange. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.161, p. 29–47, 2010;

GARCIA, A.F.; SIMÃO, A.M.; BOLEAN, M.; HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L.; CIANCAGLINI, P.; COSTA-FILHO, A.J. Effects of GPI-anchored TNAP on the dynamic structure of model membranes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.17, p. 26295 - 26301, 2015.

GENGE, B. R.; WU, L. N.; WUTHIER, R. E. In vitro modeling of matrix vesicle nucleation: synergistic stimulation of mineral formation by annexin A5 and phosphatidylserine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n.36, p. 26035 - 26045, 2007.

GENGE, B. R.; WU, L. N.; WUTHIER, R. E. Mineralization of annexin-5-containing lipid-calcium-phosphate complexes: modulation by varying lipid composition and incubation with cartilage collagens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 15, p. 9737 - 9748, 2008.

GINER-CASARES J.J.; BREZESINSKI G.; MÖHWALD H. Langmuir monolayers as unique physical models. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.19, p. 176 - 82, 2014.

GIRARD-EGROT, A.P.; GODOY, S.; BLUM, L.J. Enzyme association with lipidic Langmuir–Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid and Interface Science**, n.116, p. 205 - 25, 2005.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108 - 4116, 1969.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876 - 2890, 2006.

GOLUB, E.E. Role of matrix vesicles in biomineralization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, n. 12, p. 1592 - 1598, 2009.

GRSKOVIC, I.; KUTSCH, A.; FRIE, C.; GROMA, G.; STERMANN, J.; SCHLÖTZER-SCHREHARDT, U.; NIEHOFF, A.; MOSS, S.E.; ROSENBAUM, S.; PÖSCHL, E.; CHMIELEWSKI, M.; RAPPL, G.; ABKEN, H.; BATEMAN, J.F.; CHEAH, K.S.; PAULSSON, M.; BRACHVOGEL, B. Depletion of Annexin A5, Annexin A6, and Collagen X Causes No Gross Changes in Matrix Vesicle–Mediated Mineralization, but Lack of Collagen X Affects Hematopoiesis and the Th1/Th2 Response. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 11, p. 2399 - 2412, 2012.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422 - 427, 1972.

HOLZWARTH G.; DOTY P. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 218 - 228, 1965.

HUBER, R.; ROMISCH, J.; PAQUES, E. P. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 12, p. 3867 - 3874, 1990a.

HUBER, R.; SCHNEIDER, M.; MAYR, I.; ROMISCH, J.; PAQUES, E. P. The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. **FEBS Letters**, v. 275, p. 15 - 21, 1990b.

IERARDI, D.F.; PIZAURO, J.M.; CIANCAGLINI, P. Erythrocyte ghost cell-alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1567, n. 1 - 2, p.183 - 192, 2002.

JANSEN, S.; PERRAKIS, A.; ULENS, C.; WINKLER, C.; ANDRIES, M.; JOOSTEN, R. P.; ACKER, M. V.; LUYTEN, F. P.; MOOLENAAR, W. H.; BOLLEN, M.. Structure of NPP1, an Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Involved in Tissue Calcification. **Structure**, v. 20, n.11, p. 1948 - 1959, 2012.

JOHNSON, K.; MOFFA, A.; CHEN, Y.; PRITZKER, K.; GODING, J.; TERKELTAUB, R. Matrix vesicle plasma membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, p. 883 - 892, 1999.

JOHNSON, K.A.; HESSLE, L.; VAINGANKAR, S.; WENNBURG, C.; MAURO, S.; NARISAWA, S.; GODING, J.W.; SANO, K.; MILLAN, J.L.; TERKELTAUB, R. Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. R1365 - R1377, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 132 - 139.

KATO, K.; NISHIMASU, H.; OKUDAIRA, S.; MIHARAC, E.; ISHITANIA, R.; TAKAGI, J.; AOKI, J.; NUREKI, O. Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 16876 - 16881, 2012.

KIRSCH, T., NAH, H.D., SHAPIRO, I.M., PACIFICI, M. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 5, p. 1149 - 1160, 1997.

KIRSCH, T. Annexins: Their role in cartilage mineralization. **Frontiers in Bioscience**, v.10, p. 576 - 581, 2005.

KWOK D.Y.; VOLLHARDT, D.; MILLER, R.; LI, D.; NEUMANN, A.W. Axisymmetric drop shape analysis as a film balance. **Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**; v.88, p.51–58, 1994.

LIEMANN, S.; HUBER, R. Three-dimensional structure of annexins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 516 - 521, 1997.

LIEMANN, S.; LEWIT-BENTLEY, A. Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. **Structure**, v. 3, p. 233 - 237, 1995.

MCCOMB, R. B.; BOWERS, G. N. JR.; POSEN, S. **Alkaline Phosphatase**. New York: Plenum, 1979. 76 p.

MCCARTHY, G.M.; WESTFALL, P. R.; MASUDA, I.; CHRISTOPHERSON, P. A.; CHEUNG, H. S.; MITCHELL, P. G. Basic calcium phosphate crystals activate human osteoarthritic synovial fibroblasts and induce matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in adult porcine articular chondrocytes. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, p. 399 - 406, 2001.

MCKEE, M.D.; YADAV, M.C.; FOSTER, B.L.; SOMERMAN, J.; FARQUHARSON, C.; MILLÁN, J.L. Compounded PHOSPHO1/ALPL Deficiencies Reduce Dentin Mineralization. **Journal of Dental Research**, v. 92, n.8. p. 721 - 727, 2013.

MCMILLAN, N.D.; SMITH, S.R.P.; BERTHO, A.C.; MORRIN, D.; O'NEILL, M.; TIERNAN, K.; HAMMOND, J.; BARNETT, N.; PRINGUET, P.; O'MONGAIN, E. Quantitative drop spectroscopy using the drop analyser: theoretical and experimental approach for microvolume applications of non-turbid solutions. **Measurement Science and Technology**. v.19, n.5, p.1–18, 2008.

MILLÁN, J. L. **Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology**. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2006. p.1 - 322.

MILLER, R.; SEDEV, R.; SCHANO, K.H.; NG, C.; NEUMANN, A.W. Relaxation of adsorption layers at solution/air interfaces using axisymmetric drop-shape analysis. **Colloids Surface**, v. 69, p.209–216, 1993.

MORGAN, R. O.; FERNANDEZ, M. P. Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 508 - 515, 1997a.

MORGAN, R. O.; FERNANDEZ, M. P. Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, p. 178–188, 1997b.

MOSS, S.; EDWARDS, H. C.; CRUMPTON, M. J. Diversity in the annexin family, p. 535–566. In C. W. Heizmann (ed.), **Novel calcium-binding proteins**. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, 1991.

MURSHED, M.; HARMEY, D.; MILLÁN, J.L.; MCKEE, M. D.; KARSENTY, G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of EMC mineralization to bone. **Genes & Development**, v. 19, n.9, p. 1093 - 1104, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEPTTEL. **Module 2: Spectroscopic Techniques**. Disponível em <<http://nptel.ac.in/courses/102103044/module2/lec9/2.html>>. Acesso em: 07/11/2017.

OLING, F.; SANTOS, J. S.; GOVORUKHIN, N.; MAZERES- DUBUT, C.; BERGSMAS-SCHUTTER, W.; OOSTERGETEL, G.; KEEGSTRA, W.; LAMBERT, O.; LEWIT-BENTLEY, A.; BRISSON, A. Structure of membrane-bound annexin A5

trimers: a hybrid cryo-EM – X-ray crystallography study. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, n. 4, p. 561 - 573, 2000.

OLING, F.; BERGSMA-SCHUTTER, W.; BRISSON, A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin A5 two-dimensional crystals. **Journal of Structural Biology**, v. 133, n. 1, p. 55 - 63, 2001.

ORRISIS, I. R.; ARNETT, T. R.; RUSSELL, G. G. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 28, p. 57 - 68, 2016.

ORTEGA, N.; BEHONICK, D. J.; WERB, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 86 - 93, 2004.

PERESS, N. S.; ANDERSON, H. C.; SAJDERA, S. W. The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. **Calcified Tissue Research**, v. 14, n. 4, p. 275 - 281, 1974.

PIZAURO, J.M.J.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M.; Discondroplasia Tibial: Mecanismos de Lesão e Controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n.3, p. 169-185, 2002.

REVIKINE, I.; BERGSMA-SCHUTTE, W.; BRISSON, A. Growth of protein 2-D crystals on supported planar lipid bilayers imaged in situ by AFM. **Journal of Structural Biology**, v. 121, p. 356 - 361, 1998.

REVIKINE, I.; BERGSMA-SCHUTTER, W.; MAZERES-DUBUT, C.; GOVORUKHINA, N.; BRISSON, A. Surface topography of the p3 and p6 annexin V crystal forms determined by atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 131, p. 234 - 239, 2000.

ROTENBERG, Y.; BORUVKA, L.; NEWMANN, A.W. Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. **Journal Colloid Interface Science**, v. 93, p.169–183, 1983.

SAMBROOK, J.; GREEN, M.R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, Protocol 25, 2001. p.1.116 - 1.118.

SIMÃO, A.M.S.; YADAV, M.C.; CIANCAGLINI, P.; MILLÁN, J.L. Proteoliposomes as matrix vesicles biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 234 - 241, 2010a.

SIMÃO, A. M. S.; YADAV, C. M.; NARISAWA, S.; BOLEAN, M. PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M.F; CIANCAGLINI, P.; MILLÁN, J.L Proteoliposomes Harboring Alkaline Phosphatase and Nucleotide Pyrophosphatase as Matrix Vesicle Biomimetics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n.10, p. 7598 - 7609, 2010b.

SIMÃO, A.M.S.; BOLEAN, M.; HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L.; CIANCAGLINI, P. Effects of pH on the Production of Phosphate and Pyrophosphate by Matrix Vesicles' Biomimetics. **Calcified Tissue International**, v. 93, n. 3, p. 222 -232, 2013.

SNAPGENE. **pCMV-Script**: Vector for high-level expression of proteins in mammalian cells. Disponível em: <http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/mammalian_expression_vectors/pCMV-Script/> Acesso em: 01/05/2017.

SOPKOVA, J.; VINCENT, M.; TAKAHASHI, M.; LEWIT-BENTLEY, A.; GALLAY, J. Conformational flexibility of domain III of annexin V at membrane/water interfaces. **Biochemistry**, v. 38, n. 17, p. 5447 - 5458, 1999.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Biochemical Sciences**, v. 30, n. 10, 2005.

STEFANIU, C.; BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 208, p. 197 - 213, 2014.

SUN, Y.; MAUERHAN, D.R.; HONEYCUTT, P.R.; KNEISL, J.S.; NORTON, H.J.; ZINCHENKO, N.; HANLEY, E.N. JR.; GRUBER, H.E. Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture. **Arthritis Research & Therapy**, v.12, n. 2, R56, 2010.

TAGUE, S. E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. **Frontiers in Bioscience**. v. 10, p. 822 - 837, 2005.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cos-1 Cells**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/cell-lines/c/cell-lines-detail-13.htm>. Acesso em: 30/04/2017.

TERKELTAUB, R.A.; ROSENBAACH, M.; FONG, F.; GODING, J. The mortality of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**. v. 37, n. 4, p. 934 - 941, 1994.

TERKELTAUB, R.A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. **The American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 281, n. 1, p. C1 - C11, 2001.

THOUVEREY, C.; STRZELECKA-KILISZEK, A.; BELCERZAK, M.; BUCHET, R.; PIKULA, S. Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 106, n.1, p. 127 - 138, 2009.

TOCA-HERRERA, J.L.; KRASTEVA, N.; MÜLLER H-J.; KRASTEV, R. Interactions in lipid stabilised foam films. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 207, p.93-106, 2014.

USERS. Digestão com enzimas de restrição. Disponível em <http://users.med.up.pt/~med05009/bcm/digestao_frame_files/image004.gif> Acesso: 17/03/2018.

VELLUZ, L.; LEGRAND, M.; GROSJEAN, M. **Optical Circular Dichroism: Principles, Measurements, and Applications**. New York and London: Verlag Chemie Academic Press Inc; 1965.

VENYAMINOV, S.; BAIKALOV, I.A.; SHEN, Z.M.; WU, C.S.; YANG, J.T. Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 214, p.17-24, 1993.

WATSON, J.D.; MYERS, R.M.; CAUDY, A.A.; WITKOWSKI, J.A. DNA Recombinante: Genes e Genomas. 3 edição, Porto Alegre: Artmed, 2009. 496 p.

WEGE, H.A.; HOLGADO-TERRIZA, J.A.; CABRERIZO-VILCHEZ, M.A. Development of a constant surface pressure penetration Langmuir balance based on axisymmetric drop shape analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 263-273, 2002.

WEGE, H.A.; HOLGADO-TERRIZA, J.A.; GÁLVEZ-RUIZ, M.J.; CABRERIZO-VÍLCHEZ, M.A. Development of a new langmuir-type pendant-drop film balance. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.12, p.339–349, 1999.

WHYTE, M.P. Hypophosphatasia//Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D et al. eds. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 5313 - 5329.

WHYTE, M.P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 4, p. 439 - 461, 1994.

WU, L. N.; GENGE, B. R.; WUTHIER, R. E. Analysis and molecular modeling of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-phosphate complex associated with biomineralization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 7, p. 3827 - 2838, 2008.

WUTHIER, R.E.; CHIN, J.E.; HOLE, J.E.; REGISTER, T.C.; LAURA, Y.H.; ISHIKAWA, Y. Isolation and characterization of calcium accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. **Journal of Biological Chemistry** v. 260: p. 15972 - 15979, 1985.

WUTHIER, R. E.; LIPSCOMB, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, p. 2812 - 2902, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**. 4ª edição. Artmed: Porto Alegre, 2012. 403 p.

ZHANG, Y.; BROWN, M.A.; PEACH, C.; RUSSELL, G.; WORDSWORTH, B.P. Investigation of the role of ENPP1 and TNAP genes in chondrocalcinosis. **Rheumatology (Oxford)**, n. 46, v.4, p. 586 - 589, 2007.

APÊNDICE A

Meios de Cultura

Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 10 %

500 mL de meio DMEM

5 mL de Aminoácidos Não- Essenciais

53 mL de Soro Fetal Bovino

MEIO DMEM (para congelamento)

10% DMSO

25% Soro Fetal Bovino

65% de Meio DMEM

Esterilizar a mistura em um filtro de 0,2 μ m, aliquotar e estocar a 4°C.

MEIO DE CULTURA LB (LURIA BERTANI)

O meio de cultura LB foi preparado adicionando-se 20g de meio LB e 1 litro de água deionizada. Deixou-se sob agitação e o meio foi autoclavado. Os componentes do meio são triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio.

APÊNDICE B

Tampões utilizados durante o cultivo celular e transfecção

Tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4

8g de NaCl

0,2g de KCl

1,15g de Na₂HPO₄

0,2g de KH₂PO₄

Água destilada para completar 1 L

Tampão HBS (Hepes Buffer Saline) pH 7,05

16,4g de NaCl

11,9g de HEPES (ver o nome do ácido)

0,21g de Na₂HPO₄

Completar o volume com água até 1 Litro. Filtrar em filtro de 0,45µm. (verificar)

Solução 2X

Tampão Estoque

50mM de Tris HCl pH 7,5

2mM de MgCl₂

Tampão de choque osmótico

50 mM de Tris HCl pH 7,5

10 mM de MgSO₄

0,8M de NaCl

APÊNDICE C

Soluções e Tampões utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida

Solução de Acrilamida

28g de Acrilamida

735 mg de Bis Acrilamida

Completar o volume com água deionizada até 100 mL

Tampão do Gel de baixo

3,0 M Tris HCl pH 8,9

Tampão do Gel de cima*

1,5 M Tris HCl pH 6,8

Tampão da Cuba (Corrida) de Eletroforese

0,05M Tris HCl pH 8,3

0,384M de Glicina

0,2% de SDS (dodecil sulfato de sódio)

Diluir 2x ao usar

Tampão de Desnaturação de Amostra para eletroforese

Dissolver 1,51g de Tris e 15g de Sacarose em água deionizada. Ajustar o pH para 6,8 e adicionar 4g de SDS. Completar com água, até 100 mL. No momento do uso, adicionar 55µL de 2-Mercaptoetanol para 500µL de Tampão de desnaturação.

Solução de Persulfato de Amônio

10 mg de Persulfato de Amônio em 1 mL de água deionizada

Solução de SDS

1% de SDS

Solução descorante

250 mL de metanol

75 mL de Ácido Acético Glacial

Água deionizada até completar o volume de 1L

Solução de Comassie (Coloração do gel)

Dissolver 1,25g de Comassie Brilliant Blue R (0,25%) em 227mL de metanol (45%) e 46 mL de Ácido Acético Glacial (9,2%). Completar com água deionizada até 500mL. Filtrar e armazenar.

Tabela 23 - Reagentes e quantidades para preparação de gel de poliacrilamida 7% e 10%.

Componentes	Gel de Baixo 7%	Gel de Baixo 10%	Gel de Cima
Acrilamida	2,5 mL	3,6 mL	1,8 mL
Tampão do Gel	1,25 mL	1,25	0,8 mL*
Persulfato de Amônio 10 mg/mL	0,5 mL	0,5	0,5 mL
N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina (TEMED)	20 µL	20 µL	20 µL
Dodecil-Sulfato de sódio (SDS) 1%	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Água Deionizada	4,75 mL	3,65 mL	5,9 mL

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE D

Protocolo de coloração em gel de poliacrilamida com prata

1 – Fixar o gel durante 1 hora e sob agitação com 100 mL de solução de metanol 50%, ácido acético 12% e 50 μ L de formaldeído (independente do volume final da solução) (pode deixar nesta solução *overnight*)

50 mL de metanol

12 mL de ácido acético

38 mL de água destilada

50 μ L de formaldeído

(volume total: 100 mL cada lavagem)

2 – Remover a solução e lavar 3X com etanol 50% durante 20 minutos, sob agitação constante. (Cada lavagem 20 minutos)

100 mL de Solução X 3 Lavagens = 300 mL

150 mL de etanol + 150 mL de água

(Para apenas um gel)

3 – Remover o etanol e tratar o gel com tiosulfato de sódio 0,02g/100mL durante 1 minuto sob agitação. Essa solução deve ser preparada no momento do uso.

4 – Lavar o gel 3x com água destilada (100 mL cada lavagem), durante 20 segundos com agitação.

5 – Impregnar o gel com 100 mL de AgNO_3 (0,1g/100mL) durante 20 minutos, sob agitação e no escuro. Essa solução deve ser preparada no momento do uso, deve ser bem homogeneizada para não manchar o gel e guardada no escuro até o momento do uso.

6 – Remover a solução e enxaguar o gel 2x (100 mL cada lavagem) com água destilada, durante 20 segundos.

7 – Revelar o gel com 100 mL de Na_2CO_3 (3g), formaldeído (25 μ L) e 1mL da solução de tiosulfato preparada acima no passo 3, sob agitação constante. Essa solução deve ser preparada no momento do uso.

8 – Lavar o gel 2X durante 20 segundos com água destilada.

9 – Bloquear a reação tratando o gel com 100 mL de uma solução de metanol 40% e ácido acético 12%, durante 10 minutos sob agitação.

40 mL de metanol

12 mL de ácido acético

48 mL de água destilada

10 – Lavar o gel durante 20 minutos com metanol 40% e conservá-lo a 4°C.

40 mL de metanol

60 mL de água destilada