UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de
cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose
experimental

Marcela Frota Cavalcante

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de
cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose
experimental

Marcela Frota Cavalcante

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cavalcante, Marcela Frota
C376e Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia
única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental /
Marcela Frota Cavalcante. -- São Paulo, 2012.
220p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

1. Aterosclerose 2. Lipoproteína de baixa densidade : Bioquímica
3. Nanotecnologia I. T. II. Abdalla, Dulcinéia Saes Parra,
orientador.

616.136 CDD

Marcela Frota Cavalcante

Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única
anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
1º. Examinador

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres
2º. Examinador

São Paulo, 04 de outubro de 2012.

*Dedico este trabalho aos meu pais **Francisco e Frieda**, ao meu irmão **Paulo André**, aos meus avós **Paulo e Frieda**, ao meu companheiro **Igor** e ao **Toquinho** simplesmente por sua existência e participação em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e a **Nossa Senhora de Fátima** por todas as bênçãos durante essa jornada, pelas pedras encontradas e recolhidas, pela luz constante em meus caminhos e por manterem o sossego em meu coração.

À minha orientadora Profa. **Dulcinéia Saes Parra Abdalla** pela confiança, pela oportunidade de aprendizado e crescimento, pela paciência com minhas deficiências, pela dedicação aos meus textos e pela delicadeza de me manter afastada de energias negativas.

À **FAPESP** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro a este projeto e pelo auxílio mensal por meio de bolsas e reserva técnica.

Aos meus pais **Francisco** e **Frieda**, meus maiores exemplos de caráter e inspiração de amor, pelo amor incondicional e por acreditarem em mim todos os dias, me apoiando a cada passo dado.

Ao **Paulo André**, meu irmãozinho amado, pelos sorrisos, pelas caretas e por ter sempre a certeza de que eu posso ir mais adiante.

Aos meus avós **Paulo** e **Frieda**, que teriam muito orgulho de ver onde cheguei, pelo incentivo ao estudo, pelo carinho e pelos momentos únicos na infância.

Ao **Igor**, meu companheiro e amigo de todas as horas, pelo amor, pelo zelo, pelas lições diárias, pelo amadurecimento moral e espiritual e por não me deixar desistir quando tudo parece escuro, trazendo sempre luz para minha vida.

Ao **Toquinho** por ter me acompanhado em um período tão importante da minha vida e pela oportunidade de despedida.

À **Tetê** por cuidar tão bem da minha família e me deixar tão segura.

Às minhas irmãs de coração **Larissa**, **Nayanne** e **Patrícia**, pela amizade tão presente, pela fé e pelo incentivo desse passo.

Aos amigos **Débora Renata**, **Rodrigo Uchoa** e **Leonardo Augusto** pelas gargalhadas constantes e conversas sem fim nos momentos de lazer.

Aos meus tios **Margarida** e **Enrique** pela recepção em São Paulo e pelo acolhimento de todos os dias. À amiga **Cícera**, que uniu forças à tia Margarida, pelo capricho na arrumação do meu novo lar.

À **D. Selma**, ao **seu Vladimir**, ao **Leo**, à **Mari** e ao **Logan** por me acolherem em sua família e cuidarem tão bem de mim.

Aos amigos conquistados no laboratório de Bioquímica pela amizade e compreensão. À **Alda** pelas excelentes instruções sobre experimentos e pela disponibilidade a todo momento e sob qualquer circunstância. Ao **Alejandro** pela doçura dos momentos e por me ensinar pacientemente conceitos estatísticos. À **Cristiane Akemi** pela tranquilidade das palavras e pela gentileza dos gestos. Ao **Daniel** pela ajuda e assistência quando precisei e pelos momentos agradáveis no ambiente de trabalho. À **Elaine** pela ajuda nos experimentos, pelas correções necessárias e por sempre dividir seu doce de leite. À **Fernanda César** pela ajuda constante, na leitura de lâminas na análise morfológica e na imunohistoquímica desse trabalho, pela dedicação conjunta à padronização de protocolos e pelo sorriso doce mesmo nos momentos mais duros. À **Fernanda Sierra** pelo carinho e companheirismo desde o primeiro dia e pela amizade que continua crescendo com os anos. À **Jacque** pelo carinho, pelas conversas, pelas caronas ao metrô e pelo início de uma grande amizade. À **Martina** pela ajuda com minhas dúvidas e por me fazer enxergar adiante, pela amizade, atenção, preocupação e carinho, por sempre saber quando algo está errado e se dedicar completamente em sua resolução. Ao **Nicolás** pelo apoio e por tentar me fazer pensar em meus resultados e entender como questioná-los. À **Soraya** e à **Tanize** por terem iniciado minha aprendizagem no laboratório de Bioquímica, pelas dicas de experimentos, pelos toques pessoais, pela paciência nos cálculos químicos e pela doçura no olhar. À **Renila** por suas conversas maduras, pela companhia na volta pra casa e por me mostrar a importância de continuar lutando pelas pessoas e pela vida. Ao **Vitor** pelos papos filosóficos e por me mostrar outras visões e aspectos da Ciência.

Aos amigos conquistados pelos corredores, durante almoços na copa, na organização de eventos, em disciplinas e por quem tenho muito carinho: **Pandora, Paty, Mayne, Kátia, Ju, Luciene, Nath, Juliano, Fran, Luzy, Renee, Edson, Graziela, Dalila, Jacqueline, Karina, Amanda, Karla e Suellen.**

Ao amigo **Renato Massaro** por dividir reagentes, protocolos, bolos, chocolates e muitas experiências.

À amiga **Gisele Medeiros**, que aumentou minha paixão pela pesquisa, por ter me aceitado como sua IC em Fortaleza, por ter me acolhido em sua casa durante minha primeira visita à São Paulo, por ter me estimulado a seguir meus sonhos.

Aos **colaboradores voluntários** que doaram sangue para o procedimento desse trabalho.

Aos colaboradores involuntários, os 150 **camundongos** utilizados nesse projeto, porque sem eles o meu objetivo não seria cumprido.

À **Profa. Andrea Maranhão**, da Universidade de Brasília, pela parceria indispensável, pelas reuniões agradáveis e pelo acolhimento ao seu laboratório. À colega **Kelly Simi** pela dedicação ao trabalho durante a estadia em Brasília.

Às **Profas. Adriana Pohlmann e Silvia Guterres**, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela colaboração neste projeto e todo o auxílio durante o delineamento experimental. Aos colegas **Eduardo Bender e Márcia Adorne** pela dedicação no desenvolvimento das nanoformulações e pela constante troca de informações.

Ao **Prof. Adalberto Pessoa Junior** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao colega **César Diaz** pela colaboração na expressão do scFv.

Ao **Prof. Paulo Saldiva** e à pesquisadora **Dra. Mariana Veras**, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela dedicação à parte histopatológica desse trabalho e pelas conversas descontraídas.

Às funcionárias **Claudinha, Rose e Gi** por manterem nosso ambiente de trabalho sempre limpo e caprichado.

À solicitude dos técnicos de laboratório **Camila, Edson, Fabi, Kátia, Mariana, Maurício, Patrícia, Silene e Soninha** e à amizade da técnica **Renatinha** durante as várias tardes de experimentos.

Às funcionárias do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas **Renata, Flávia, Silvania, Livia e Fátima** pelas instruções fornecidas e pelo cuidado com os animais.

À atenção dos funcionários da secretaria **Dora, Edna, Suely, Elaine e Jorge**, e especialmente à **Ana Dantas** por resolverem todos os nossos problemas prontamente.

Ao poeta Gilberto Gil pela lembrança de sempre andar com fé, “que a fé não costuma faia”.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais retorna ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Resumo

CAVALCANTE, M.F. **Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental.** 2012. 220 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A aterosclerose é uma doença crônico-inflamatória multifatorial com o envolvimento do sistema imunológico, sendo o resultado da interação de diferentes elementos celulares. A lipoproteína de baixa densidade eletronegativa [LDL(-)], capaz de induzir o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos e a subsequente formação de células espumosas, desempenha um papel-chave na doença. Anticorpos recombinantes têm sido gerados nas últimas décadas, como o scFv (*single chain fragment variable*), com o intuito de serem utilizados como uma novas alternativas de prevenção para o surgimento da lesão. Diante do papel da LDL(-) na aterosclerose, este projeto avaliou o efeito da imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-} com scFv anti-LDL(-) em solução e scFv anti-LDL(-) conjugado a nanocápsulas, em relação ao desenvolvimento e à progressão da aterosclerose. Após obtenção do scFv e sua conjugação à nanocápsulas (NC-scFv), ensaios *in vitro* determinaram a diminuição da captação de LDL(-) em macrófagos tratados com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução. No entanto, o tratamento com NC-scFv promoveu o aumento da internalização de LDL(-) em relação ao controle, possivelmente por um mecanismo de endocitose mediada por receptor específico. Estudos *in vivo* determinaram que camundongos LDLR^{-/-} com idade entre 2 e 3 meses tratados com o scFv em solução apresentaram menor área de lesão aterosclerótica ($p < 0,05$) quando comparados ao controle e que animais com 3 a 4 meses de idade tratados com NC-scFv demonstraram uma tendência à diminuição do mesmo parâmetro. Na análise da expressão de proteínas por imunohistoquímica, ambos os grupos tratados com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv demonstraram redução significativa da expressão dos receptores CD14 e TLR-4 no local da lesão. Esse achado tem grande importância, uma vez que dados da literatura apresentam ambos os receptores como possíveis candidatos ao reconhecimento da LDL(-). Diante dos dados obtidos, o estudo evidenciou a eficácia do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv no contexto da aterosclerose, possibilitando a sua utilização como estratégias terapêuticas na intervenção precoce para prevenir o desenvolvimento e a progressão da doença.

Palavras-chave: Aterosclerose; Lipoproteína de baixa densidade; Nanotecnologia.

Abstract

CAVALCANTE, M.F. **Passive immunization effect with anti-electronegative LDL single chain fragments variable in experimental atherosclerosis.** 2012. 220 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory multifactorial disease related to the immune system and being the result of interaction of different cellular elements. The electronegative LDL, since the changes undergone by this particle are able to induce the accumulation of cholesterol esters in macrophages and the subsequent formation of foam cells, plays a key role in atherosclerosis. Recombinant antibodies have been generated in recent decades, such as scFv, (single chain fragment variable), and they may be used as a new alternative treatment for atherosclerosis treatment or prevention. Considering the role of LDL(-) in atherosclerosis, this project evaluated the effects of the treatment with anti-LDL(-) scFv 2C7 solution and anti-LDL(-) scFv conjugated to nanocapsules as a passive immunization strategy on atherosclerosis induced in LDL receptor *knockout* mice. After obtaining the anti-LDL(-) scFv 2C7 solution and its conjugation to nanocapsules (NC-scFv), *in vitro* tests led to the decrease in LDL(-) uptake in macrophages treated with anti-LDL(-) scFv 2C7. However, the treatment of macrophages with NC-scFv promoted increased internalization of LDL(-) as compared to control, possibly due to a mechanism of specific receptor-mediated endocytosis. *In vivo* studies have determined that LDLR^{-/-} mice aged 2 and 3 months treated with anti-LDL(-) scFv 2C7 solution showed less atherosclerotic lesion area ($p < 0.05$) compared to control and animals aged 3 to 4 months treated with NC-scFv showed a decreasing tendency of the same parameter. In the analysis of protein expression by immunohistochemistry, both groups treated with anti-LDL(-) scFv 2C7 solution and NC-scFv showed significant reduction of CD14 receptor expression and TLR-4 at the lesion site. This finding is of great importance, since the literature has both receptors as candidates for recognition of the LDL(-). From the data obtained, the study demonstrated the efficacy of treatments anti-LDL(-) scFv 2C7 in solution and NC-scFv in the context of atherosclerosis, enabling their use as therapeutic strategies in the early intervention to prevent the development and progression of the disease.

Keywords: Atherosclerosis; Low-density lipoprotein; Nanotechnology.

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição das principais causas de mortalidade no mundo	33
Figura 2 – Representação da lesão aterosclerótica	34
Figura 3 - Início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica	36
Figura 4 - Atuação das respostas das imunidades inata (A) e adaptativa (B) na aterosclerose.....	37
Figura 5 - Representação esquemática do anticorpo IgG e de diferentes fragmentos de anticorpos (A) e do scFv em maior escala (B)	47
Figura 6 - Representação esquemática dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: a) e b) Nanocápsulas e c) e d) Nanoesferas.....	49
Figura 7 - Representação esquemática das nanocápsulas MCMN	70
Figura 8 - Representação esquemática do complexo NC-scFv formado pela ligação entre as nanocápsulas MCMN e o scFv 2C7 anti-LDL(-)	71
Figura 9 - Cromatograma obtido pelo fracionamento da LDL por FPLC (A) e eletroforese em gel de agarose 0,5% (B).....	89
Figura 10 - Análise da purificação do scFv 2C7 anti-LDL(-) em gel de poliacrilamida 13% corado com prata	90
Figura 11 - Análise da purificação do scFv 2C7 anti-LDL (-) em membrana de nitrocelulose por <i>Western Blot</i>	91
Figura 12 - Análise do padrão de glicosilação do scFv anti-LDL(-) em gel de poliacrilamida 13% por SDS-PAGE corado com prata.....	92
Figura 13 - Afinidade de ligação do scFv 2C7 anti-LDL(-) à LDL(-) por imunoenensaio de <i>Dot Blot</i>	92
Figura 14 - Afinidade de ligação do scFv 2C7 anti-LDL(-) à LDL(-) por imunoenensaio de ELISA	93
Figura 15 - Perfis granulométricos de nanocápsulas MN e MCMN obtidos por difração a laser	94

Figura 16 - Efeito dos tratamentos com nanocápsulas MN (A) e MCMN (B) sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7	97
Figura 17 - Efeito dos tratamentos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e da formulação NC-scFv (B) sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7.....	98
Figura 18 - Efeito dos tratamentos com nanocápsulas MN (A) e MCMN (B) sobre a viabilidade celular de células da linhagem HUVEC.	99
Figura 19 - Efeito dos tratamentos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e da formulação NC-scFv (B) sobre a viabilidade celular de células da linhagem HUVEC	100
Figura 20 - Avaliação da morte celular por apoptose e necrose em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, em solução e a formulação NC-scFv	101
Figura 21 - Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com nanocápsulas MN.....	102
Figura 22 - Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com nanocápsulas MCMN	103
Figura 23 - Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução	104
Figura 24 - Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com a formulação NC-scFv	105
Figura 25 - Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) de macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução	106
Figura 26 - Avaliação da autofagia em macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv	107

Figura 27 - Avaliação da autofagia em macrófagos RAW 264.7 tratados 24 horas com nanocápsulas MN (A) e nanocápsulas MCMN (B)	109
Figura 28 - Avaliação da autofagia em macrófagos RAW 264.7 tratados 24 horas com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e formulação NC-scFv (B)	109
Figura 29 - Avaliação da autofagia em células da linhagem HUVEC tratadas 24 horas com nanocápsulas MN (A) e nanocápsulas MCMN (B)	110
Figura 30 - Avaliação da autofagia em células da linhagem HUVEC tratadas 24 horas com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e formulação NC-scFv (B)	111
Figura 31 - Avaliação do ciclo celular em macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv	112
Figura 32 - Avaliação do ciclo celular em células da linhagem HUVEC após 24 horas de tratamento com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv	113
Figura 33 - Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com LDLn e LDL(-)	115
Figura 34 - Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com nanocápsulas MCMN e scfv 2C7 anti-LDL(-) em solução	116
Figura 35 - Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com a formulação NC-scFv.....	117
Figura 36 - Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS, LDL(-), nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv.	118
Figura 37 - Ensaio de fagocitose por captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com Citocalasina D, LDLn e LDL(-).....	120
Figura 38 - Ensaio de fagocitose por captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com Citocalasina D, LDL(-), nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv.	121
Figura 39 - Determinação de ALT após administração da 1ª e da 4ª dose de concentrações variadas de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv	122

Figura 40 - Determinação de AST após administração da 1ª e da 4ª dose de concentrações variadas de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv	123
Figura 41 - Análise histopatológica de cortes hepáticos obtidos em ensaio de toxicidade animal	124
Figura 42 - Imagens obtidas a partir da análise morfométrica da área da lesão inicial (μm^2) de camundongos <i>knockout</i> para o gene do receptor de LDL	130
Figura 43 - Análise morfométrica da área da lesão inicial $\times 10^4$ (μm^2) de camundongos LDLR ^{-/-}	131
Figura 44 - Análise morfométrica da área da lesão inicial $\times 10^4$ (μm^2) de camundongos LDLR ^{-/-} (subgrupo de camundongos com idade entre 3 e 4 meses)	133
Figura 45 - Análise morfométrica da área da lesão inicial $\times 10^4$ (μm^2) de camundongos LDLR ^{-/-} (subgrupo de camundongos com idade entre 2 meses e meio e 3 meses).	134
Figura 46 - Análise morfométrica da área da lesão inicial $\times 10^4$ (μm^2) de camundongos LDLR ^{-/-} do grupo NC-scFv em relação ao controle (subgrupo de camundongos com idade entre 2 meses e meio a 3 meses)	135
Figura 47 - Análise morfométrica da área da lesão inicial $\times 10^4$ (μm^2) de camundongos LDLR ^{-/-} do grupo NC-scFv em relação ao controle (subgrupo de camundongos com idade entre 3 meses e 4 meses)	136
Figura 48 - Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses).....	138
Figura 49 - Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses).....	139
Figura 50 - Avaliação da expressão gênica relativa de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses)	140

Figura 51 - Avaliação da expressão gênica relativa de metaloproteinases e seus inibidores teciduais envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses)	141
Figura 52 - Avaliação da expressão gênica relativa de moléculas de adesão envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses)	142
Figura 53 - Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses)	143
Figura 54 - Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses)	144
Figura 55 - Avaliação da expressão gênica relativa de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses)	145
Figura 56 - Avaliação da expressão gênica relativa de metaloproteinases e seus inibidores teciduais envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses)	146
Figura 57 - Avaliação da expressão gênica relativa de moléculas de adesão envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses).....	147
Figura 58 - Análise da expressão proteica de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 3 e 4 meses).....	148
Figura 59 - Análise da expressão proteica de moléculas de adesão envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 3 e 4 meses).....	149
Figura 60 - Análise da expressão proteica de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 2 meses e meio a 3 meses)	151

Figura 61 - Análise da expressão proteica de moléculas de adesão envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 2 meses e meio e 3 meses)	152
--	-----

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição da dieta hipercolesterolêmica oferecida aos animais.....	60
Tabela 2 - Programação para o tratamento dos camundongos LDLR ^{-/-} em protocolo de lesão inicial.....	80
Tabela 3 - Sequências de primers utilizados para quantificação dos níveis de expressão da mRNA por PCR em tempo real	84
Tabela 4 - Avaliação do tamanho médio das partículas (Z-average) e o índice de polidispersão (PDI) através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as partículas formadas pela interação entre nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-), LDLn e LDL(-)	96
Tabela 5 - Descrição da análise histopatológica do fígado de animais submetidos ao protocolo de toxicidade animal	125
Tabela 6 - Controle de peso médio dos camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial ao início e ao fim dos 28 dias, divididos por grupos de tratamento	127
Tabela 7 - Controle do consumo médio semanal de ração pelos camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento	127
Tabela 8 - Determinação bioquímica do perfil lipídico de camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento	128
Tabela 9 - Determinação bioquímica do perfil hepático de camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento	128
Tabela 10 - Relação entre área da lesão e idade dos camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento	132

Lista de Siglas e Abreviaturas

Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato transaminase
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BHT	Hidroxitolueno butilado
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Complex Methanol Medium</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CT	Colesterol total
DAB	Diaminobenzeno
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DLS	Difração a laser
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzimaimunoensaio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
Fcγ	Receptor Fc para gama globulina
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fv	Fragmento variável

HAMA	<i>Human anti-murine antibodies</i>
HC	Hipercolesterolêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
ICAM	Molécula de adesão intercelular-1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
Ig	Imunoglobulina
IFN-γ	Interferon gama
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL(-)	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LDLm	Lipoproteína de baixa densidade modificada
LDLn	Lipoproteína de baixa densidade nativa
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLR^{-/-}	<i>knockout</i> para o gene do receptor de LDL
LI	Lesão inicial
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL	Interleucina
LNC	Nanocápsulas de núcleo lipídico
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Receptor de LDL oxidada semelhante à lecitina
MAb	Anticorpo monoclonal
MCMN	<i>Metal Complex Multiwalled Nanocapsules</i>
MCP-1	Proteína-1 quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
MN	Nanocápsulas multiparede
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NC-scFv	Complexo formado por nanocápsulas MCMN e scFv
NF-κB	<i>Nuclear fator kappa B</i>

OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCL	Policaprolactona
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGF-B	Fator de crescimento B derivado de plaquetas
PDI	Índice de polidispersão
PECAM	Molécula de adesão plaquetária
PEG	Poli etileno glicol
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RT-qPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
scFv	Fragmento variável de anticorpo de cadeia única (<i>Single-chain fragment variable</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SPAN	Monoesterato de sorbitano
SR	Receptor <i>scavenger</i>
TG	Triglicérides
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	Tetrametil Benzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM	Molécula de adesão vascular
VL	Cadeia variável leve de anticorpo
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VH	Cadeia variável pesada de anticorpo
WHO	<i>World Health Organisation</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	31
1.1 Doenças Cardiovasculares e Aterosclerose	33
1.2 O papel do sistema imune na aterosclerose	36
1.3 Lipoproteínas de baixa densidade e suas modificações	41
1.4 LDL eletronegativa e sua contribuição no processo aterosclerótico	43
1.5 Engenharia de anticorpos	45
1.6 scFv	46
1.7 Nanotecnologia	48
2. Objetivos	53
2.1 Objetivo Geral	55
2.2 Objetivos Específicos	55
3. Materiais e Métodos	57
3.1 Materiais	59
3.2 Células	59
3.2.1 Levedura <i>Pichia pastoris</i>	59
3.2.2 Macrófagos	59
3.2.3 Células endoteliais	59
3.3 Animais	59
3.3.1 Dieta	60
3.4 LDL eletronegativa	61

3.4.1 Casuística	61
3.4.2 Coleta de sangue	61
3.4.3 Isolamento de LDL	61
3.4.4 Purificação das frações nativa e eletronegativa de LDL	62
3.5 Expressão do scFv 2C7 anti-LDL(-)	63
3.6 Processamento do sobrenadante e purificação do scFv 2C7 anti-LDL(-)	63
3.7 Remoção da glicosilação do scFv 2C7 anti-LDL(-)	64
3.7.1 Tratamento enzimático da proteína com Endo H	64
3.7.2 Purificação com resina de Concanavalina A	64
3.8 Confirmação da expressão de scFv 2C7 anti-LDL(-)	65
3.8.1 Análise das proteínas em SDS-PAGE	65
3.8.2 Coloração do gel de SDS por prata	66
3.8.3 Análise de scFv 2C7 anti-LDL(-) por <i>Western Blot</i>	66
3.8.4 Afinidade do scFv 2C7 anti-LDL(-) pelo método de <i>Dot Blot</i>	67
3.8.5 Afinidade do scFv 2C7 anti-LDL(-) pelo método ELISA	67
3.8.6 Quantificação de proteínas pelo método <i>Lowry</i> modificado	68
3.9 Produção de Nanocápsulas	69
3.9.1 Preparação do complexo metálico de nanocápsulas multiparede (MCMN)	69
3.10 Conjugação do scFv 2C7 anti-LDL(-) às nanocápsulas MCMN	71
3.11 Ensaios celulares	72
3.11.1 Condições de cultura celular	72
3.11.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT	73
3.11.3 Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo	73
3.11.3.1 Apoptose e Necrose	74

3.11.3.2 Autofagia	75
3.11.3.3 Ciclo celular	76
3.11.4 Ensaio de captação de LDL(-)	76
3.11.5 Estudos de fagocitose <i>in vitro</i> com Citocalasina D	77
3.12 Ensaio de toxicidade em animais	78
3.13 Imunização passiva de camundongos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e com a formulação NC-scFv	79
3.13.1 Delineamento experimental	79
3.13.2 Grupos experimentais	80
3.13.3 Análise bioquímica do perfil lipídico sérico	80
3.13.4 Preparação dos tecidos para processamento	81
3.14 Preparação dos cortes histológicos	81
3.15 Análise Morfométrica	82
3.16 Avaliação da expressão de RNA mensageiro por RT-qPCR (Reação em cadeia em polimerase) em tempo real	82
3.16.1 Extração de RNAm e proteínas	82
3.16.2 Construção e síntese do DNA complementar (cDNA)	83
3.16.3 Desenho de primers	83
3.16.4 Quantificação dos níveis de expressão gênica	84
3.17 Expressão de moléculas de adesão e receptores celulares por imunohistoquímica	85
3.18 Análise estatística	86
4. Resultados	87
4.1 Obtenção das subfrações de LDL	89

4.2 Expressão e caracterização do scFv 2C7 anti-LDL(-) em <i>Pichia pastoris</i>	89
4.3 Produção das Nanocápsulas e Conjugação ao scFv 2C7 anti-LDL(-)	93
4.4 Ensaios celulares	97
4.4.1 Ensaio de viabilidade celular por MTT	97
4.4.2 Ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo	101
4.4.2.1 Apoptose e Necrose	101
4.4.2.2 Autofagia	106
4.4.2.3 Ciclo celular	111
4.4.3 Avaliação da captação de LDL(-) e da formação de células espumosas	113
4.4.4 Avaliação da fagocitose <i>in vitro</i> com Citocalasina D	119
4.5 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	122
4.6 Análise do efeito da imunização passiva de camundongos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e com NC-scFv 2C7 anti-LDL(-)	126
4.6.1 Controle de peso e consumo de ração	126
4.6.2 Determinação bioquímica do perfil lipídico e hepático	128
4.6.3 Análise morfológica e quantificação de lesões ateroscleróticas iniciais	129
4.6.4 Avaliação da expressão de RNA mensageiro por RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase) em tempo real	136
4.6.5 Quantificação por Imunohistoquímica da expressão proteica de moléculas de adesão e receptores celulares presentes na lesão aterosclerótica inicial de camundongos LDLR ^{-/-}	147
5. Discussão	155
6. Conclusão	169

7. Referências Bibliográficas	173
--------------------------------------	------------

Anexos	197
---------------	------------

Anexo 1 – Soluções e Tampões Utilizados	199
---	-----

Anexo 2 - Certificado de Qualidade em Biossegurança	207
---	-----

Anexo 3 – Aprovação da Comissão de Biossegurança	209
--	-----

Anexo 4 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	211
--	-----

Anexo 5 – Aprovação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	213
--	-----

Anexo 6 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	215
--	-----

Anexo 7 – Patente de Invenção Nº 0161100055575	219
--	-----

Anexo 8 – Patente de Invenção Nº BR 10 2012 025132-9	225
--	-----

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Doenças Cardiovasculares e a Aterosclerose

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo (Samnegard et al., 2008), sendo responsáveis por mais de 17,3 milhões (31%) de mortes ao ano em todo o mundo (Figura 1) e por mais de 500 mil no Brasil (WHO, 2011). A aterosclerose encontra-se no topo dessas doenças, estando relacionada à doença arterial coronariana, à doença vascular-cerebral e à doença vascular periférica (WHO, 2011) e responsável por mais vítimas fatais do que todos os tipos de Câncer combinados (Stocker et al., 2004).

Figura 1: Representação gráfica da distribuição das principais causas de mortalidade no mundo. As doenças cardiovasculares lideram as causas de mortalidade no mundo, representando 31% das mortes por ano, o que corresponde a mais de 17 milhões de pessoas (Adaptada de WHO, 2011).

A aterosclerose é uma doença crônico-inflamatória multifatorial da parede arterial com o envolvimento do sistema imunológico (Leeuwen et al., 2008), tendo atuação de ambas as imunidades inata e adaptativa (Wanrooij et al., 2006) e sendo o resultado da interação de diferentes elementos celulares (Figura 2) como linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas (George et al., 2000). O acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade modificadas (LDLm), radicais livres, microrganismos infecciosos, estresse de cisalhamento, hipertensão, toxinas provenientes do tabaco ou a combinação desses, ou de outros fatores que levam a uma resposta inflamatória compensatória, induzem a ocorrência de uma complexa disfunção endotelial, que caracteriza o processo aterogênico (Stoll et al., 2006).

Figura 2: Representação da lesão aterosclerótica. Envolvimento de diversos elementos celulares como linfócitos, monócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas, e sua interação com lipoproteínas de baixa densidade modificadas (LDLm) no desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Adaptada de Hansson & Libby, 2006).

A aterosclerose é uma doença que pode ter início na infância, mas, geralmente, só se manifesta clinicamente em uma etapa posterior da vida (Doria et al., 2005). Concentrações séricas elevadas de colesterol total (WHO, 2008) e lipídios oxidados (revisado por Loscalzo, 2005), histórico familiar, idade avançada (≥ 55 anos, em média), hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, tabagismo e

sedentarismo (Lusis, 2000) são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Dentre os fatores de risco conhecidos, as concentrações elevadas de colesterol total são atribuídas a um terço do total de casos de aterosclerose (WHO, 2007).

A formação da lesão aterosclerótica (Figura 3) inicia-se pelo recrutamento de células inflamatórias, como monócitos e células T, à superfície do endotélio, proporcionado pelo acúmulo de LDL modificada na camada íntima das artérias (McMahon et al., 2007). Esse acúmulo é facilitado na ocasião em que os níveis de LDL circulante encontram-se elevados, assim como o transporte e a retenção da lipoproteína nos locais preferenciais para o desenvolvimento da lesão (Lusis, 2000). A LDL é transportada para a camada íntima arterial por um mecanismo de difusão passiva dependente da interação entre a apolipoproteína B e proteoglicanos da matriz extracelular (Saha et al., 2009). Ao chegar ao local indicado, os monócitos atingem a íntima da artéria, através de migração pela camada endotelial, onde proliferam, se diferenciam em macrófagos e capturam as lipoproteínas modificadas, via endocitose mediada por receptor, formando as chamadas células espumosas (Lusis, 2000).

A captura das lipoproteínas modificadas é proporcionada pela presença de receptores *scavenger* expressos pelos macrófagos (Shashkin et al., 2005). A expressão desses receptores, diferentemente da expressão dos receptores B/E, que reconhecem um domínio N-terminal da apo B-100 (revisado por Glass; Witztum, 2001) na LDL nativa (LDL_n), não é regulada pelo nível de colesterol intracelular, favorecendo a internalização contínua de LDL_m e a consequente formação das células espumosas e, assim, de estrias gordurosas (Steinberg et al., 1997). Essas células espumosas são suscetíveis à apoptose, propiciando a liberação de colesterol e debris celulares, contribuindo para o aumento do conteúdo lipídico no centro necrótico da lesão (Lusis, 2000).

Em uma etapa posterior, ocorre a proliferação de células musculares lisas, provenientes da camada média da artéria, que, uma vez na camada íntima, passam a secretar elementos da matriz extracelular, formando uma capa fibrosa, que recobre a lesão, e favorecendo o desenvolvimento das placas e o aumento do seu tamanho. A lesão continua a crescer pela migração de novas células mononucleares e seu ponto crítico é caracterizado quando a lesão atinge a camada adventícia e, em seguida, se expande em direção ao lúmen (Lusis, 2000). Em alguns casos, pode ocorrer a ruptura

da placa formada, por enfraquecimento da capa fibrosa, por ação de metaloproteínases de matriz, ocasionando a exposição do conteúdo lipídico e do infiltrado inflamatório presentes na placa aos componentes sanguíneos. Esse processo tende a promover a ativação da cascata de coagulação, a agregação plaquetária e possíveis eventos trombóticos (Lusis, 2000).

Figura 3: Início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica. As lipoproteínas modificadas, acumuladas na íntima arterial, recrutam monócitos circulantes que se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos internalizam a LDLm, que causa injúria e disfunção endotelial, e se transformam em células espumosas. Essas células são suscetíveis à apoptose e contribuem para o aumento do conteúdo lipídico no centro necrótico da lesão (Adaptado de Andersson et al., 2009).

1.2 – O papel do sistema imune na aterosclerose

O envolvimento do sistema imune na aterosclerose tem sido esclarecido nas últimas décadas. Sabe-se que ambas as imunidades inata (Figura 4A) e adaptativa (Figura 4B) influenciam o desenvolvimento da doença (Binder et al., 2002). A imunidade inata, presente ao nascer, é a principal defesa de primeira linha do organismo, sendo responsável por uma resposta rápida a antígenos exógenos e algumas vezes a antígenos endógenos modificados. Essa imunidade age através da

detecção de antígenos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) existentes em macrófagos e células dendríticas (Gordon, 2002).

Na imunidade adaptativa, por sua vez, são identificadas características fundamentais de especificidade, memória e intensidade variável, consistindo em um processo mais lento, que envolve células B e T e a geração de imunoglobulinas.

Figura 4: Atuação das respostas das imunidades inata (A) e adaptativa (B) na aterosclerose. A: Resposta imune inata ao acúmulo de lipoproteínas modificadas na íntima arterial com secreção de moléculas de adesão e recrutamento de monócitos e linfócitos T. Ocorre diferenciação de monócitos a macrófagos e expressão aumentada de receptores *scavenger* e *toll like*, resultando na remoção do

conteúdo lipídico e liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, promovendo o recrutamento de novos leucócitos. B: Resposta imune adaptativa, onde antígenos são apresentados por macrófagos, através do reconhecimento de MHC de classe II, a células T CD4⁺. Uma vez ativadas, essas células podem se diferenciar em células Th1 pró-inflamatórias ou Th2 promotoras da produção de anticorpos. (Adaptada de Nilsson; Hansson; Shah, 2005).

O endotélio da parede arterial atua como uma barreira entre o sangue e as proteínas da matriz subendotelial e tem grande importância na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose. Pode ocorrer, no entanto, uma disfunção endotelial devido ao estresse oxidativo proporcionado por diversos fatores de risco para doença cardiovascular, o que facilita o desenvolvimento de processos inflamatórios no local (Blanco et al., 2010).

A LDLm pode interferir na integridade do endotélio, uma vez que seu acúmulo na camada íntima arterial estimula o aumento da expressão das moléculas de adesão VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) por células endoteliais, que proporciona a sua ligação a monócitos circulantes e a células T e sua consequente transmigração ao tecido arterial (Gu et al., 1998). As células endoteliais e células musculares lisas atuam na secreção do fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês, M-CSF) que induz a diferenciação de monócitos em macrófagos, como descrito anteriormente. Simultaneamente ocorre o aumento da expressão de PRRs (revisado por Andersson; Libby; Hansson, 2009), que interagem com padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, PAMPs) e permitem o reconhecimento de antígenos, como a LDLm. No caso da aterosclerose, os receptores mais importantes são os *scavenger* (do inglês, SRs) e os *Toll-like*.

Os receptores *scavenger* são divididos em 8 classes (A-H), estando grande parte delas relacionadas ao desenvolvimento da aterosclerose por contribuição direta à formação de células espumosas pela interação com LDLm (revisado por Kzhyshkowska; Neyen; Gordon, 2012). Dentre os receptores *scavenger* que merecem destaque no reconhecimento e internalização da LDLm podem ser citados: os de classe A (SR-AI e SR-AII), classe B (CD36 e SR-BI) e classe E (LOX1 – receptor de LDL oxidada semelhante à lecitina 1) (revisado por Moore; Freeman, 2006). O CD36 é encontrado em diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, adipócitos, células endoteliais e plaquetas e possui diversos ligantes comuns ao SR-A, diferindo,

no entanto, em relação a sua baixa afinidade de ligação a LDL extensivamente oxidada (Endeman et al., 1993).

Os receptores *scavenger* podem variar quanto à habilidade de endocitar e degradar LDLm. Receptores SR-BI e CD36, por exemplo, demonstram alta eficiência no reconhecimento e internalização de LDL oxidada. No entanto, a degradação da partícula é realizada de forma adequada apenas pelo último (Sun et al., 2007). Diversos estudos têm demonstrado o papel crítico dos SRs sobre a formação de células espumosas. Kunjathoor et al. (2002) evidenciaram que ambos os SR-A e CD36 são responsáveis por 75 a 90% da degradação de LDL modificada por acetilação ou oxidação em estudo envolvendo o uso de macrófagos peritoneais isolados de camundongos *knockout* para os três receptores. Moore e Freeman (2006) determinaram que o CD36 é responsável por 60 a 70% do acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos expostos a LDL oxidada. Em 2010, um estudo realizado por nosso grupo (Pedrosa et al.) demonstrou o aumento da expressão de CD36 e da formação de células espumosas em macrófagos murinos na presença de LDL eletronegativa.

Os receptores *toll-like* (TLRs) desempenham um papel importante na regulação da resposta imune inata através do reconhecimento de organismos patogênicos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Akira et al., 2006; Medzhitov, 2001) associados a PAMPs. Atualmente, são conhecidos mais de dez tipos de TLRs em humanos e 13 em camundongos (Lundberg; Hansson, 2010), que podem ser expressos tanto na superfície das células quanto em compartimentos intracelulares (Honghui et al., 2012). Os TLRs reconhecem os PAMPs e ativam NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*), que proporciona um aumento da expressão de diversos genes inflamatórios, ativando, assim, o sistema imune e intensificando a resposta inflamatória (Aderem; Ulevitch, 2000). A implicação dos TLRs na aterosclerose foi sugerida, inicialmente, a partir da observação da expressão de TLR-4 por macrófagos presentes em lesões ateroscleróticas (Xu et al., 2001), sendo encontrados também em células endoteliais e musculares lisas (Edfeldt; Swedenborg; Hansson, 2002; Otsui, et al., 2007). Dados de estudo realizado por Edfeldt et al. (2002) demonstraram altos níveis de expressão de TLR-1, TLR-2 e TLR-4 por células endoteliais e macrófagos infiltrados provenientes de lesões ateroscleróticas, o que não foi evidenciado em artérias normais. Adicionalmente, foi determinado o aumento da expressão de TLR4 em monócitos circulantes de pacientes com doença arterial

coronariana (Methe et al., 2005). Curiosamente, TLR-4 é o receptor para LPS (lipopolissacarídeo, componente encontrado na parede celular de bactérias gram-negativas) e a interação entre eles depende de um co-receptor, o CD14 (expresso em monócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos), que reconhece a LDL minimamente modificada e a internaliza, favorecendo a formação de células espumosas (Miller et al., 2003).

As citocinas são proteínas mensageiras solúveis produzidas por diversas células que atuam dentro de um só ambiente ou de modo sistêmico no intuito de modificar ou modular a resposta imuno-inflamatória. Elas interagem entre si de diferentes formas, podendo ter efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. As pró-inflamatórias, por exemplo, induzem a inflamação, mas podem ter sua ação inibida através da atuação de citocinas antiinflamatórias (Tedgui et al., 2006). Em condições normais, podem ser normalmente encontradas em baixas concentrações ou ainda estarem presentes de forma a não serem detectáveis nos fluidos corporais ou tecidos. Em algumas patologias, no entanto, esses níveis se elevam de forma considerável, como é o caso da insuficiência renal crônica, onde há maior produção e menor depuração renal dessas proteínas (Caglar et al., 2002), e da aterosclerose, onde existe uma intensa atuação do sistema imunológico. Por esta razão, Stenvinkel et al. (2008) propuseram que as citocinas fossem estudadas como biomarcadores no prognóstico de doenças inflamatórias.

Na aterosclerose, ocorre proliferação de macrófagos, que secretam interleucina 1 β (IL-1 β), que estimula a ativação de linfócitos, e fator de necrose tumoral α (TNF α), que inicia a cascata de citocinas e aumenta a permeabilidade vascular e o recrutamento de macrófagos, ambos atuando na amplificação da inflamação (Libby, 2002). Diversas quimiocinas geradas por macrófagos, como MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) colaboram com o recrutamento de leucócitos ao local da lesão, estimulando sua migração através do endotélio arterial (Reape; Groot, 1999).

Os linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) também são recrutados para a íntima arterial, conforme descrito, no entanto, a sua ativação é dependente do reconhecimento de antígenos, que devem ser apresentados por proteínas do Complexo de histocompatibilidade principal (MHC) presentes nos macrófagos. (Kumar; Abbas; Fausto, 2005). Após esse reconhecimento, a resposta imune adaptativa é iniciada e as células T passam a produzir citocinas inflamatórias, como IFN- γ (Interferon gama)

e IL-4, variando com o tipo de célula T ativada. É descrito que células T CD4⁺ são encontradas predominantemente em relação a células T CD8⁺ em placas ateroscleróticas humanas (revisado por Hansson; Robertson; Söderberg-Nauclér, 2006). Células T CD4⁺ podem ser distinguidas em dois tipos: Th1 e Th2. As células Th1 secretam IFN- γ e TNF- α , as células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10; ambas regulam negativamente uma a outra através da secreção de suas citocinas específicas. Em termos gerais, Th1 promove a ativação de macrófagos, enquanto Th2 promove a produção de anticorpos anti-LDLm por linfócitos B (Nilsson; Hansson; Shah, 2005).

Além das citocinas e dos receptores celulares envolvidos no processo aterogênico, outro fator deve ser destacado: as metaloproteinases (MMPs), endopeptidases capazes de degradar a matriz extracelular, atuando sobre componentes como o colágeno e a elastina (Seabra et al., 2006), e, assim, participar do remodelamento dos tecidos envolvidos no processo de desenvolvimento da aterosclerose (Alberts et al., 1997).

As MMPs são produzidas por células endoteliais e macrófagos e sua transcrição pode ser induzida por sinais como citocinas e fatores de crescimento. A atividade das MMPs é regulada pela ativação ou inibição dos Inibidores teciduais de metaloproteinases, os TIMPs, que são expressos na lesão aterosclerótica. Estudos já evidenciaram a relação das MMPs com lesões ateroscleróticas e sua ruptura. Em 2006, Tai et al. demonstraram que a expressão de MMP-9 e de seu TIMP eram moduladas pela presença de frações modificadas da LDL. Sua presença também foi descrita em regiões de ruptura de placa aterosclerótica a partir da secreção por macrófagos (Galis et al., 1994). Levando em consideração essas evidências, a avaliação da expressão e atividade destas enzimas torna-se importante no acompanhamento da progressão da aterosclerose e no monitoramento de um tratamento eficaz para a diminuição de uma lesão, sugerindo ainda sua utilização como marcador de instabilidade das mesmas.

1.3 - Lipoproteínas de baixa densidade e suas modificações

A LDL ou lipoproteína de baixa densidade faz parte do grupo de lipoproteínas plasmáticas, ou seja, partículas formadas por uma parte central de lipídios hidrofóbicos, uma monocamada anfipática de fosfolípidos e apolipoproteínas que circundam os primeiros (revisado por Siqueira; Abdalla; Ferreira, 2006). Sua síntese

é obtida a partir da hidrólise da VLDL, produzida e secretada pelo fígado, em uma etapa posterior à formação da IDL (lipoproteína de densidade intermediária) (Itabe, 2008). É uma partícula esférica com um diâmetro médio de, aproximadamente, 22 nm. Sua principal apolipoproteína é a apo B-100 (peptídeo de cadeia única com 500 kDa), possuindo ainda traços de apo-E (apolipoproteína E), e possui meia-vida plasmática de aproximadamente dois a três dias (revisado por Siqueira, Abdalla & Ferreira, 2006). É a principal responsável pelo transporte do colesterol sérico, possibilitado por sua ligação a receptores de LDL presentes na membrana plasmática, e pelo seu fornecimento a tecidos periféricos, regulando sua síntese nesses locais (Braunwald, 1999).

A LDL tem importante atuação nas doenças cardiovasculares, sendo considerada o principal fator de risco para o seu desenvolvimento, quando em níveis elevados. A lipoproteína encontra-se ainda diretamente envolvida na aterogênese através da indução da formação de um fenótipo inflamatório, que atua na parede arterial (De Castellarnau et al., 2006), a partir de modificações espontâneas que podem ocorrer na íntima arterial ou na circulação sanguínea (Kovanen & Pentikäinen, 2003). Essas modificações na LDL nativa têm a capacidade de induzir a agregação das partículas de LDLm, o que pode propiciar o acúmulo de lipídios na íntima arterial e o início de um processo aterogênico (Jayaraman; Gantz; Gursky, 2007; Molavi; Metha, 2004).

A LDL nativa pode sofrer diferentes tipos de modificações, podendo variar quanto ao tamanho, à carga elétrica, à estrutura e à composição (Hevonoja et al., 2000). *In vivo*, a LDLn pode ser modificada através de reações de oxidação, gerando a LDL oxidada (LDLox), glicação, nitração e carbamilação (revisado por Faulin, Cavalcante & Abdalla, 2009) e *in vitro* gerando LDL acetilada (Tao et al., 2009). O grau dessas modificações pode variar de extensas oxidações à modificações mínimas, como a LDL eletronegativa [LDL(-)].

A LDLox é a mais estudada dentro do contexto das lipoproteínas modificadas na aterosclerose, podendo ser formada por diferentes produtos de oxidação e em diversos graus de modificação e tendo sido encontrada em placas ateroscleróticas tanto em modelos animais como em humanos (Yla Herttuala, 1989), especialmente em pacientes com doença arterial coronariana (Suzuki et al., 2002). Pode também ser gerada *in vitro*, por exposição a íons de Cobre (Stocker; Keaney, 2004), e tanto modificações oxidativas *in vitro* quanto *in vivo* podem induzir a fragmentação da apo

B-100 (Matsuura; Hughes; Khamashta, 2008). Quando comparada à LDLn, se destacam sua ávida captação por receptores *scavenger*, promovendo o aumento do acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas (Stocker; Keaney, 2004), a citotoxicidade aumentada e a atividade quimiotática para monócitos circulantes (Steinberg, 1989) e linfócitos T (McMurray; Parthasarathy; Steinberg, 1993), ocasionando a constante oxidação de LDL, por contínuo recrutamento de células inflamatórias (Stocker; Keaney, 2004). Foi ainda evidenciada, há quase duas décadas, por Stiko-Rahm et al. (1992) uma ação favorecedora à progressão da aterosclerose, uma vez que a LDLox estimula a proliferação de células musculares lisas, além de apresentar imunogenicidade através da produção de autoanticorpos (Salonen et al., 1992).

Um outro exemplo de LDLm é a LDL glicada que pode ser obtida a partir de reações de glicação envolvendo a adição de um grupo aldeído, a partir da glicose por exemplo, a uma amina reativa na apoB-100 e está presente em altas concentrações em indivíduos diabéticos em relação a indivíduos sem o distúrbio metabólico (revisado por Faulin; Cavalcante; Abdalla, 2009).

A atenção deste trabalho é voltada para a LDL(-), que foi identificada através de cromatografia de troca iônica de plasma humano em estudo promovido por Avogaro et al., em 1988.

1.4 – LDL eletronegativa e sua contribuição no processo aterosclerótico

A LDL(-) é uma fração da LDL que possui uma carga mais negativa - que pode ser proporcionada por sua diferença de composição - do que a LDL não modificada, a LDL nativa. A LDL(-) contém maior quantidade de óxidos de colesterol e dienos conjugados e níveis diminuídos de α -tocoferol em comparação à LDLn (Chang et al., 1997), além de possuir um conteúdo aumentado de apolipoproteínas C-III e E, ácido siálico e ácidos graxos não-esterificados, de acordo com Sánchez-Quesada et al. (2003) e maior susceptibilidade à oxidação (Cazzolato et al., 1991). Outra característica importante, é que a apo B-100 da LDL(-) possui uma modificação conformacional (Parasassi et al., 2001), dificultando seu reconhecimento pelo receptor B/E, por diminuição da sua afinidade de ligação ao receptor de LDL. Isso implica na possibilidade de aumento do tempo de circulação dessa lipoproteína, tornando-a mais prejudicial em relação a outras formas modificadas.

Essa LDL pode ser formada endogenamente através de diversos processos, tais como: oxidação, acetilação, glicação não-enzimática, enriquecimento em ácidos graxos não-esterificados, modificações enzimáticas por fosfolipases, reações cruzadas com hemoglobina e outros mecanismos ainda em estudo (Sánchez-Quesada et al., 2004). A LDL(-) pode ser determinada em eletroforese em gel de agarose, uma vez que possui uma migração eletroforética aumentada em relação à LDLn e diminuída em relação à LDLox (De Castellarnau et al., 2000).

Evidências acumuladas ao longo dos últimos 20 anos têm estabelecido que essa LDL eletronegativa desempenha um papel-chave na aterosclerose (Sánchez-Quesada et al., 2004), uma vez que as modificações sofridas por esta partícula são capazes de induzir o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos e a subsequente formação de células espumosas (Sánchez-Quesada et al., 2002) conforme descrito no item 1.1 desta seção. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram a presença de LDL(-) no plasma de camundongos (Grosso et al., 2008), coelhos (Damasceno, 2001) e humanos (Sevanian et al., 1997) com lesões ateroscleróticas. Dentro desse contexto, diversos estudos demonstraram que as concentrações plasmáticas da LDL(-) em indivíduos normolipêmicos representam apenas cerca de 1 a 10% da concentração de LDL total, mas encontram-se aumentadas em indivíduos com doenças como diabetes tipo 1 e 2 (Sánchez-Quesada et al., 1996 e 2001), na hipercolesterolemia familiar (Sánchez-Quesada et al., 1999) e em pacientes renais crônicos sob tratamento de hemodiálise (Lobo et al., 2008).

Estudos realizados por De Castellarnau et al. (2006) em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) determinaram que a LDL(-) apresenta citotoxicidade para células endoteliais, induz a expressão de citocinas (Sánchez-Quesada et al., 2002), como IL-1 (Arman et al., 2008), IL-8 (De Castellarnau et al., 2000) e a proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1) (Sánchez-Quesada et al., 2003), assim como, moléculas de adesão como a VCAM-1, induzida pela ação TNF α , e ICAM-1 (Hansson, 2001). A LDL(-) induz ainda a liberação do fator estimulador de colônias de macrófagos e do fator de crescimento B derivado de plaquetas (PDGF-B) (De Castellarnau et al., 2006) e inibe a síntese de óxido nítrico pela eNOS (Óxido nítrico sintase endotelial) (Berliner et al., 1995).

A LDL(-), portanto, está envolvida na formação de células espumosas e exerce um efeito inflamatório múltiplo em células endoteliais, uma vez que estimula a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que desempenham

importantes papéis em vários estágios do desenvolvimento da aterosclerose, como o recrutamento leucocitário e a proliferação celular (Pedrosa et al., 2010). Nesse sentido, o estudo da LDL(-) é fundamental para uma compreensão completa e eficaz do processo aterosclerótico.

1.5 - Engenharia de anticorpos

No intuito de modular a ação do sistema imunológico, podem ser empregadas duas alternativas: (i) a utilização de fármacos imunossupressores, ou (ii) a utilização de imunização passiva ou ativa. Na imunização ativa, antígenos são administrados para induzir uma resposta imune protetora, enquanto na imunização passiva, anticorpos pré-formados são diretamente administrados no organismo (Nilsson et al., 2005). Nesse tipo de imunização, podem ser utilizados ainda anticorpos recombinantes, que têm sido bastante utilizados na terapia e no diagnóstico clínico-laboratorial.

Um anticorpo tem sua molécula normalmente comparada de forma didática à letra Y. Se pensarmos no Y, teremos os braços da letra representando as duas porções Fab (fração ligante ao antígeno), enquanto a sua base representa a porção Fc do anticorpo. Cada porção Fab é constituída em parte por cadeia leve (V_L) e em parte por cadeia pesada (V_H). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada e as cadeias pesadas são ligadas entre si por ligações não covalentes e pontes dissulfeto. Os Fabs são encontrados na extremidade N-terminal e apresentam uma variabilidade capaz de interagir com moléculas dos mais variados tipos, o que determina a especificidade para o antígeno; enquanto o Fc é encontrado na outra extremidade, ou seja, na porção carboxiterminal, e deve ser reconhecida por células efetoras do sistema imune, o que pressupõe certa constância estrutural (Goldsby et al., 2000).

Anticorpos recombinantes têm sido gerados nas últimas décadas, através de técnicas de engenharia de anticorpos. A utilização inicial de anticorpos monoclonais (proteínas produzidas a partir de camundongos ou ratos e utilizadas em humanos) gerou a expectativa da obtenção de excelentes resultados, uma vez se tratar de um material homogêneo e capaz de reconhecer um único alvo específico no organismo. No entanto, seu uso tornou-se limitado por sua significativa imunotoxicidade, proporcionando uma resposta imune quando injetados em humanos (resposta HAMA – *human anti-murine antibodies*), e pela possibilidade de intensificar uma resposta imunológica e, assim, a progressão da aterosclerose, a partir da ação do domínio Fc,

que recruta funções efetoras citotóxicas através de complemento e/ou receptores Fc γ (receptores Fc para gamma globulina) presentes em células como macrófagos (Maranhão et al., 2001).

Em estudo realizado pelo nosso grupo, anticorpos monoclonais (MAbs) anti-LDL(-) foram administrados via endovenosa em camundongos *knockout* para o gene do receptor da LDL e foram evidenciados a redução da área da lesão aterosclerótica, dos níveis de LDL(-) livre circulante e do número de células espumosas localizadas na região subintimal da artéria. Além disso, houve redução na expressão de VCAM-1 em camundongos tratados com o fragmento de anticorpo Fab, derivado de anticorpo policlonal anti-LDL(-), o que pode estar relacionado ao fato do fragmento Fab não apresentar a porção Fc, que pode intensificar a resposta imunológica. Dessa forma, o Fab não induziu a ativação de células endoteliais que expressam receptores para a porção Fc dos anticorpos (Grosso et al., 2008). Estes resultados confirmam a relevância não só de MAbs como também de fragmentos de anticorpos (Fab) como uma modalidade terapêutica contra aterosclerose.

Atualmente, além da utilização de anticorpos monoclonais (aproximadamente 150 kDa), também têm sido gerados anticorpos humanizados (Figura 5A), como o F(ab')₂, e fragmentos de anticorpos ativos, como o fragmento variável de cadeia única ou, do inglês, scFv (single chain fragment variable) (aproximadamente 28 kDa), que podem ser gerados em bactérias como *Escherichia coli* e leveduras como a *Pichia pastoris*. Nesse último caso, o sistema de expressão da levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem se mostrado bastante eficiente, uma vez que se trata de um método consideravelmente rápido, barato, com a utilização de metanol como única fonte de carbono, e com alta taxa de expressão (Chames et al., 2000).

1.6 - scFv

O scFv (Figura 5B) representa a menor unidade funcional do anticorpo, sendo formado pelas frações variáveis (Fv) das cadeias leve (V_L) e pesada (V_H) do anticorpo, unidas por um peptídeo hidrofílico e flexível com cerca de 10 a 25 resíduos de aminoácidos (Shen et al., 2008). Como o scFv deriva dos locais de ligação do anticorpo intacto, não existe qualquer perda significativa de especificidade e de afinidade de ligação ao antígeno (Peterson et al., 2006) e sim apenas modificações referentes às propriedades farmacocinéticas.

Figura 5: Representação esquemática do anticorpo IgG e de diferentes fragmentos de anticorpos (A) e do scFv em maior escala (B). Através de técnicas de engenharia de anticorpos, diversos fragmentos de anticorpos ativos, como o scFv. O scFv formado pelas porções variáveis da cadeias leve e pesada do anticorpo conectadas por um peptídeo hidrofílico e flexível constituído de 12 a 20 resíduos de aminoácidos, o que confere maior estabilidade à molécula. (Adaptada de Chames & Baty, 2000).

De acordo com Peterson et al. (2006), o scFv possui peso molecular de 28 kDa e, por isso, apresenta rápida difusão no tecido, diminuindo possíveis ações citotóxicas, melhor eliminação dos imunocomplexos formados e menor imunogenicidade, uma vez que não possuem a porção Fc. No entanto, pelo mesmo motivo, o scFv seria facilmente eliminado por perda renal, durante a filtração glomerular, o que torna a sua meia-vida inferior quando comparado ao anticorpo completo. Peterson et al. (2006) e Roskos et al. (2004) indicaram que a meia-vida do scFv é inferior a 21 horas, fato confirmado por Reff et al. (2001) e Fitch et al. (1999), que determinaram valores de 7 a 14 horas para a meia-vida do scFv em humanos.

Estudos utilizando scFvs comprovaram sua atividade diante da placa aterosclerótica, onde os fragmentos foram capazes de reconhecer um epítipo presente na superfície e no centro de lesões ateroscleróticas iniciais e avançadas, respectivamente, sugerindo que, inicialmente, o epítipo é expresso na superfície das lesões, sendo translocado para a íntima na progressão da placa (revisado por Robert

et al., 2006); e ainda de comprovar a existência de propriedades que tornam sua utilização mais indicada no tratamento da doença, a partir da observação de que esses fragmentos são menos tóxicos do que os anticorpos monoclonais, que têm demonstrado alta imunotoxicidade quando utilizados no modelo aterogênico (revisado por Maranhão & Brígido, 2001).

O nosso grupo trabalhou (Telles, 2008; Kazuma, 2010) no desenvolvimento de um fragmento scFv anti-LDL(-) proveniente do anticorpo monoclonal anti-LDL(-) citado no item 1.5 desta seção. O tratamento de macrófagos RAW 264.7 com LDL(-) em presença do nosso scFv anti-LDL(-), demonstrou que o scFv reduz a formação de células espumosas e a expressão gênica de CD36, TLR-4 e COX-2 (Kazuma, 2010).

Ante a observação das vantagens do scFv em relação ao uso de anticorpos como um todo na tentativa de imunização de organismos e diante dos resultados prévios obtidos, acredita-se que os fragmentos de scFv anti-LDL(-) possam ser utilizados como um fator preventivo para o surgimento da lesão aterosclerótica ou ainda como novas alternativas de tratamento contra o desenvolvimento da aterosclerose.

1.7 - Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia envolve o estudo e o controle da matéria sobre uma escala nanométrica, gerando metodologia para a produção de nanodispositivos e nanopartículas aplicáveis no tratamento, diagnóstico e monitoramento de patologias (Jain, 2005; Tansil & Gao, 2006; Dhar et al., 2008; Moghimi; Hunter; Murray, 2005).

As nanopartículas (Figura 6) são dispersões de partículas ou partículas sólidas com tamanho entre 10 e 1000 nm (Mohanraj & Chen, 2006), embora sejam frequentemente produzidas no intervalo de 100 a 500 nm (Quitana et al., 1998). O seu tamanho reduzido confere aos constituintes dessas partículas propriedades físicas, químicas, ópticas e mecânicas completamente distintas das apresentadas macroscopicamente (Psarros et al., 2012, no prelo). As nanopartículas podem possuir diferentes formatos e composição química, favorecendo a manipulação de características como estabilidade (Mitragotri; Lahann, 2009), solubilidade e superfície química a fim de torná-las adequadas para aplicações diversas (Dobrovolskaia; McNeil, 2007). Dependendo do método utilizado para sua preparação, podem ser obtidos diferentes tipos de nanoestruturas, onde as substâncias ativas podem estar adsorvidas, dispersas ou dissolvidas. Como exemplos podem ser citadas:

lipossomas, nanoemulsões, dendrímeros, nanopartículas metálicas, micelas poliméricas, nanotubos de carbono e nanopartículas poliméricas (Poletto; Pohlman; Guterres, 2008).

Na nanobiotecnologia, as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) são as mais empregadas. As nanoesferas consistem em sistemas onde a substância em estudo encontra-se homogeneamente dispersa e solubilizada no interior de uma matriz polimérica, o que determina o sistema como monolítico, ou seja, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As nanocápsulas, por sua vez, são determinadas como sistemas do tipo reservatório, constituídas por uma membrana polimérica, disposta ao redor de um núcleo oleoso e isolado do meio externo (De Azevedo, 2003; Mohanraj; Chen, 2006; Khoee; Yaghoobian, 2008), podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Schaffazick et al., 2003)

Figura 6: Representação esquemática dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: a) e b) Nanocápsulas e c) e d) Nanoesferas. As nanocápsulas são representadas por um núcleo oleoso, revestido por uma membrana polimérica. A substância ativa pode estar adsorvida à essa membrana ou dissolvida em seu núcleo, de acordo com as características de solubilidade da mesma. As nanoesferas, por sua vez, consistem em sistemas homogêneos, onde a substância ativa encontra-se uniformemente dispersa em uma matriz polimérica (Adaptada de Schaffazick et al., 2003).

As nanopartículas poliméricas têm sido estudadas, nas últimas décadas, como possíveis carreadores de substâncias ativas e drogas (Couvreux et al., 1995; Ponchel and Irache, 1998; Schaffazick et al., 2003) e as vias de administração são as mais variadas, incluindo: oral, oftálmica, tópica, intravenosa (Couvreux et al., 1995; Cruz et al., 2006), nasal e pulmonar (Dobrovolskaia; McNeil, 2007). Seu uso como carreadores é favorecido por diversas vantagens. Exemplificativamente, podemos citar que as nanopartículas: (i) permitem uma facilidade de manipulação do seu

tamanho e de suas características; (ii) propiciam o aumento da estabilidade de drogas e proteínas; (iii) fornecem um maior controle da liberação progressiva da droga, durante o transporte e no local de ação, alterando sua distribuição e depuração, reduzindo possíveis efeitos colaterais e melhorando a eficácia terapêutica; (iv) oferecem uma maior interação celular, por sua maior superfície de contato (Mohanraj; Chen, 2006; Lobatto et al., 2011); e (v) podem ser direcionados a alvos específicos, através do emprego de ligantes sítio-específicos como proteínas, peptídeos e anticorpos monoclonais ou seus fragmentos (Byrne et al., 2008; Dhar et al., 2008; Lobatto et al., 2011).

No contexto da aterosclerose, algumas abordagens são citadas como possibilidades para a introdução de sistemas nanoparticulados como carreadores direcionados a alvos específicos. Podem ser utilizados ligantes específicos para tipos celulares, como células endoteliais, macrófagos ou até células espumosas; ligantes específicos para componentes não-celulares, como elementos de matriz extracelular e lipoproteínas; ou ainda ligantes que mimetizem componentes naturais e impeçam sua ação (Kirpotin et al., 2006; Jiang et al., 2008; O'Neil et al., 2009; Briley-Saebo et al., 2011). Maximov et al. (2010) relataram a utilização de um complexo formado por uma nanopartícula de ácido(poli)lático ligada covalentemente a um anticorpo monoclonal anti-apoB100 em ensaios com macrófagos e LDL, onde a ligação do complexo a LDL promoveu a redução das concentrações de LDL por internalização pelos macrófagos.

Sabendo-se que o scFv anti-LDL(-) possui efeitos benéficos na diminuição da formação de células espumosas e na redução da expressão gênica de fatores envolvidos nesse processo, bem como considerando que sua meia-vida é relativamente baixa perante o anticorpo completo, vislumbra-se que o uso de nanopartículas poliméricas melhore a eficiência desses fragmentos de anticorpos, uma vez que promoverá um aumento do tamanho da partícula por formação do complexo e, assim, aumentará o seu tempo de circulação no organismo, permitindo a continuidade de sua ação.

Dessa forma, o desenvolvimento de uma formulação contendo nanopartículas conjugadas a fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) anti-LDL(-) são especialmente desejáveis, pois existe grande probabilidade deste sistema ter baixa imunogenicidade, adequada meia-vida na circulação, melhor controle para o

reconhecimento molecular de LDL(-) e remoção mais eficiente dos imunocomplexos pelo sistema imunológico.

O planejamento de partículas nanoestruturadas conjugadas ao scFv anti-LDL(-) além de ser relevante nos atuais estudos envolvendo as doenças cardiovasculares, gera a expectativa de que diferentes anticorpos possam ser conjugados nestas nanoestruturas propostas, o que ampliaria sua aplicabilidade na área terapêutica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da imunização passiva pelo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e pela formulação composta por nanocápsulas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) na aterosclerose induzida em camundongos *knockout* para o gene do receptor da LDL (LDLR^{-/-}).

2.2 - Objetivos Específicos

- Determinar a viabilidade celular em macrófagos murinos e células endoteliais de veia umbilical humana sob ação de diferentes concentrações do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação composta por nanocápsulas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-).
- Investigar o efeito do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e o efeito da formulação composta por nanocápsulas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) sobre a formação de células espumosas em macrófagos murinos.
- Determinar a toxicidade aguda em camundongos LDLR^{-/-} tratados com diferentes doses do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação composta por nanocápsulas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-).
- Comparar o efeito da imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-} tratados com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e com a formulação composta por nanocápsulas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) sobre a área das lesões ateroscleróticas e a expressão gênica de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, presentes nas lesões ateroscleróticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

Os reagentes foram obtidos de fontes comerciais diversas. A composição dos meios de cultura e tampões utilizados encontra-se descrita na seção ANEXOS (Anexo 1).

3.2 - Células

3.2.1 – Levedura *Pichia pastoris*

SMD1168 (Invitrogen): $\Delta pep4::URA3 \Delta kex1::SUC2his4ura3$ (Cereghino; Cregg, 2000) com fenótipo His⁻ Mut⁺. Esta linhagem foi utilizada para a expressão do scFv 2C7 anti-LDL(-). O laboratório de Bioquímica Clínica – Nível de Biossegurança 1 é certificado junto à CTNBio/Ministério da Ciência e Tecnologia (Certificado de Qualidade em Biossegurança nº 090/98) (Anexo 2). O projeto foi aprovado em 2 de setembro de 2010 pela Comissão interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Anexo 3).

3.2.2 – Macrófagos

RAW 264.7: Linhagem de células leucêmicas de monócitos e macrófagos de camundongo descritas por Raschke et al. (1978). Esta linhagem foi obtida através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ, número 0212) foi utilizada para os ensaios de viabilidade celular e captação de LDL(-).

3.2.3 – Células endoteliais

HUVEC (ATCC, número CRL-1730): Linhagem de células imortalizadas HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), disponibilizadas comercialmente pela empresa *American Type Culture Collection*. Esta linhagem foi utilizada para os ensaios de viabilidade celular.

3.3 - Animais

Para a determinação da toxicidade aguda e para a análise do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, foram utilizados 30 e 120 camundongos C57BL/6J LDLR^{-/-}, respectivamente, machos com 12 semanas de idade média, fornecidos pelo

Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A linhagem de camundongos C57BL/6J LDLR^{-/-} foi originada do Laboratório Jackson (Bar Harbor, Maine, USA). Os animais foram mantidos em salas estéreis e termostatizadas do biotério em condições apropriadas, com livre acesso à ração e água e com ciclos alternados de luz e escuridão durante os experimentos. Este projeto foi aprovado em 13 de setembro de 2010 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, protocolo n° 266 por estar de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Anexos 4 e 5).

3.3.1 – Dieta

Durante o protocolo de lesão utilizado, os animais foram alimentados *ad libitum* com a dieta aterogênica suplementada com 0,5% de colesterol. A composição da dieta (Rhoster) pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição da dieta hipercolesterolêmica oferecida aos animais.

Nutrientes	Quantidade (%)
Carboidratos ^(*)	52,45
Fonte proteica ^(**)	16,50
Lipídios ^(***)	20,00
Celulose	5,00
Mistura mineral ⁽⁺⁾	3,50
Mistura vitamínica ⁽⁺⁾	1,00
L-Cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
Ácido cólico	0,50
Colesterol	0,50

^(*) Carboidratos = amido (56,86%), amido dextrinizado (26,34%) e sacarose (18,68%).

^(**) Fonte proteica = caseína comercial (> 85% de proteína);

^(***) Lipídios = gordura de coco (70,10%) e óleo de soja (29,90%), mantendo a proporção dos ácidos linoleico e linolênico em 5:1 (Lee et al., 1989).

⁽⁺⁾ Misturas mineral e vitamínica formuladas segundo recomendação da AIN-93.

3.4 - LDL eletronegativa

3.4.1- Casuística

Foram selecionados 10 indivíduos, voluntários para a coleta de sangue e a consequente obtenção de LDL(-), de acordo com aprovação em 27 de setembro de 2010 do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FCF) da USP, protocolo nº 557 (Anexo 6). Os participantes foram convidados a participar do projeto, sendo instruídos quanto ao objetivo e métodos do presente estudo, e deram seu consentimento por escrito para sua inclusão na pesquisa, diante o preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.4.2 - Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada em sistema de coleta a vácuo através de punção em veia do antebraço. Foram coletados 30 mL de sangue de cada voluntário em tubos estéreis Vacutainer® (*Becton, Dickinson and Company*) (10 mL) contendo EDTA (Merck) como anticoagulante (1 mg/mL). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500 g por 10 minutos a 4 °C para a obtenção do plasma. O plasma foi separado e a ele foi imediatamente adicionado o antioxidante Hidroxitolueno butilado (BHT 20 mM) e inibidores de protease (Sigma): Aprotinina (2 µg/mL), Benzamidina (2 mM) e Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF 1mM). As amostras foram misturadas com a finalidade de formar um *pool*, sendo armazenado a -80 °C, para o isolamento de LDL(-), realizado no Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

3.4.3 - Isolamento de LDL

Para isolamento da fração LDL, o plasma foi submetido à ultracentrifugação sequencial, utilizando-se uma ultracentrifuga Sorvall, modelo Ultra Pro 80, com um rotor Sorvall de ângulo fixo T-1270. Foram centrifugados 100 mL do *pool* de plasma durante 8 horas, rotação de 233.000 g, a 4 °C, com salina de densidade 1,019 g/mL. A fração sobrenadante, correspondente a VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), foi removida e o plasma remanescente ajustado para a densidade 1,063 g/mL com Brometo de potássio (KBr) em densímetro Mettler Toledo (modelo KLM DA-300M), sendo centrifugado com salina de densidade 1,063 g/mL durante 8 horas, rotação de 207.128 g, a 4 °C. A LDL sobrenadante foi isolada e dialisada contra

tampão Tris-HCl (Cloridrato de Tri[(hidroximetil)aminometano] 20 mM, pH 7,4 contendo EDTA, a 4 °C, durante 4 horas com trocas sucessivas do tampão a cada hora e protegida da luz (Griffin et al., 1990; Havel et al., 1955; Hodis et al., 1994; Redgrave et al., 1975).

3.4.4 – Purificação das subfrações nativa e eletronegativa de LDL

A LDL foi filtrada em membrana com poro de 0,22 µm (Millipore) e o isolamento da LDL (-) foi realizado por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Bio-Rad) utilizando coluna de troca iônica *Sepharose* UNO Q-12 (Bio-Rad). A fase móvel constituiu um gradiente formado por tampão Tris 20 mM, pH 7,4 (bomba A) e tampão Tris 20 mM + NaCl 1 M, pH 7,4 (bomba B). Todas as soluções foram filtradas em 0,22 µm e desgaseificadas em banho ultrassônico *UltraCleaner* 1600A (Unique, SP, Brasil). O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300 mL do tampão B, seguida do seu equilíbrio com 300 mL de tampão A e da injeção da LDL na coluna. O tempo de corrida foi de 60 minutos e a taxa de fluxo 4 mL/min, como se segue: 0 a 44 mL: 0% tampão B; 44 a 74 mL: 10% tampão B; 74 a 110 mL: 20% tampão B; 110 a 140 mL: 50% tampão B; 140 a 164 mL: 100% tampão B; 164 a 212 mL: 0% tampão B. Devido a sua maior eletronegatividade, a LDL(-) foi eluída da coluna após aumento da concentração de NaCl da fase móvel. Os tempos de eluição para LDL nativa (LDL_n) e LDL(-) foram de 28,8 e 37,6 minutos, respectivamente. Os eluentes foram monitorados a 280 nm UV e os picos correspondentes a LDL(-) e LDL_n foram coletados utilizando um coletor de frações (*BioLogic BioFrac Fraction Collector*, Bio-Rad).

Ambas LDL foram dialisadas contra PBS 1X pH 7,4 e tiveram suas concentrações proteicas determinadas pelo método de *Lowry* modificado (Thermo Scientific), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Às alíquotas de LDL(-) e LDL_n foi acrescentado o mesmo conjunto de antioxidantes e inibidores de proteases utilizados durante a coleta das amostras, que, em seguida, foram armazenadas a -20 °C e protegidas da luz até o momento do uso.

A confirmação do isolamento da LDL(-) foi obtida pela migração eletroforética em gel de agarose 0,5% (Sanchez-Quesada et al., 2003). Foram aplicados 10 µg de LDL(-) ou LDL_n por poço, sendo utilizada uma fonte de eletroforese (Pharmacia Biotech, modelo EPS 600) programada para 60 volts, durante 2 horas de corrida com tampão Tris 58 mM pH 9,5. Após a corrida, o gel foi submerso em corante *Comassie*

Brilliant Blue por 20 minutos e descorado com solução de Etanol – Ácido acético - Água destilada (10:30:60, vol:vol:vol) até visualização das bandas. A mobilidade eletroforética da LDL(-) foi comparada a mobilidade eletroforética da LDLn.

3.5 - Expressão do scFv 2C7 anti-LDL(-)

A produção do scFv 2C7 anti-LDL(-) foi realizada no sistema de expressão da levedura metilotrófica *Pichia pastoris* da linhagem SMD1168 (Invitrogen). As células de *Pichia pastoris*, previamente transformadas com o vetor de expressão pPIGLE (cedido pela Dra. Andréa Queiroz Maranhão – UNB) contendo a sequência de DNA desejada e armazenadas em um banco de células do laboratório a -80 °C, foram inoculadas em 200 mL de meio BMGY (*Buffered Complex Glycerol Medium*) incubadas à 30 °C sob agitação constante (200 rpm), em incubadora (AG CH-4103 Bottmingen, Infors HT), até a cultura atingir uma densidade óptica a 600 nm de 2,0 a 6,0.

A cultura foi submetida à centrifugação a 3000 g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 mL de meio BMMY (*Buffered Complex Methanol Medium*) e incubadas novamente à 20 °C sob agitação constante (200 rpm) durante 72 horas. Metanol, que atua como indutor da expressão, foi adicionado à cultura a cada 24 horas a uma concentração final de 1%, assim como o inibidor de serino-protease PMSF a uma concentração final de 1 mM.

O sobrenadante de cultura (200 mL) obtido por nova centrifugação, idêntica a anterior, foi filtrado em membranas com poro de 0,45 µm e 0,22 µm (Millipore) e, posteriormente, submetido ao processo de purificação.

Foram realizadas 9 fermentações em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (FCF/USP) coordenado pelo Prof. Adalberto Pessoa Junior.

3.6 - Processamento do sobrenadante e purificação do scFv 2C7 anti-LDL(-)

O sobrenadante foi concentrado em tubo filtrante Vivaspín (GE Healthcare) de centrifugação com poro do tamanho de 10 kDa, seguido de diálise contra tampão de ligação (20 mM de Fosfato de sódio, 0,5 M de Cloreto de sódio e 30 mM de Imidazol). A purificação foi obtida por passagem em 1 mL de resina *Ni-Sepharose 6 Fast Flow*

(GE HealthCare), com capacidade máxima de purificar 40 mg de proteína, previamente equilibrada com 5 mL de tampão de ligação.

A aplicação da amostra foi realizada no sistema “batch”, no qual a amostra e a resina ficam em contato em um agitador orbital durante uma hora no gelo. Em seguida, foi realizada uma lavagem com 5 mL do tampão de ligação para remoção de peptídeos inespecíficos. O scFv 2C7 anti-LDL(-) foi eluído com tampão contendo 20 mM de Fosfato de sódio, 0,5 M de Cloreto de sódio e 500 mM de Imidazol.

A proteína eluída (5 mL) foi concentrada em tubo filtrante Vivaspín (GE Healthcare) de centrifugação com poro do tamanho de 10 kDa, até a obtenção de aproximadamente 1 mL, e dialisada contra PBS (solução salina tamponada com fosfato) pH 7,4. Uma alíquota foi quantificada pelo método de *Lowry* modificado (Thermo Scientific) e o restante da amostra foi armazenada em -20 °C.

3.7 - Remoção da glicosilação do scFv 2C7

Foi determinado em estudos anteriores (Kazuma, 2010), realizados pelo grupo do laboratório, que o scFv 2C7 anti-LDL(-) é expresso de duas formas distintas pela *Pichia pastoris*, tendo uma delas 35 kDa e a outra 28 kDa. Para a realização dos testes *in vitro* e posteriores testes *in vivo*, viu-se a necessidade de desglicosilar o scFv anti-LDL(-) 2C7, uma vez que a proteína glicosilada pode interferir na captação de LDL(-) em estudos com macrófagos.

3.7.1 – Tratamento enzimático da proteína com Endo H

O scFv 2C7 anti-LDL(-) purificado foi desnaturado com 0,5% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 0,04 M de DTT (Ditiotreitol) e aquecido a 100 °C durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado Citrato de sódio 50 mM pH 5,5 como tampão da reação, fornecido pelo fabricante junto à enzima Endo H (*New England Biolabs*), e 1000 unidades da enzima Endo H, de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema de digestão foi incubado a 37 °C durante 16 horas.

3.7.2 – Purificação em resina de Concanavalina A

O sistema de digestão citado no item 3.7.1 foi, em seguida, purificado em resina de Concanavalina A (GE Healthcare) para separação da porção glicosilada da proteína. O procedimento envolveu o empacotamento de 1 mL da resina em uma coluna com capacidade para 20 mL de purificado. A resina foi lavada e equilibrada

com 10 mL de tampão de ligação, (Trisc-HCl 20mM, NaCl 0,5 M, MnCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, pH 7,4) e em seguida o sistema de digestão foi aplicado, sendo incubado durante 40 minutos com a resina. A coluna foi agitada a cada 10 minutos e, após o término da incubação, passou por nova lavagem com 10 mL de tampão de ligação, onde a proteína não-glicosilada foi eluída. Uma solução contendo Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M e metil- α -D-manopiranoídeo 0,5 M, pH 7,4 foi adicionada ao sistema para remoção da glicosilação. Foram coletadas tanto a porção que fluiu direto pela resina, quanto a porção eluída ao fim do procedimento.

3.8 - Confirmação da expressão de scFv 2C7 anti-LDL(-)

3.8.1 - Análise das proteínas em SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

As proteínas purificadas a partir dos meios de cultura foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida. Inicialmente, o gel separador a 13% (p/v) foi preparado, sendo a sua polimerização catalisada pela adição de Persulfato de amônio 0,01% (p/v) e de Temed (Invitrogen) 0,003% (v/v). Em seguida, o gel concentrador a 5% (p/v) foi preparado com adição de Persulfato de amônio 0,01% (p/v) e de Temed 0,001% (v/v) para a sua polimerização e vertido no sistema. Um pente de formação dos poços foi acoplado ao sistema de eletroforese antes da polimerização do gel concentrador. As amostras foram preparadas adequando-se o volume de amostra ao volume de tampão de amostra 10X concentrado, sendo aquecidas a 95°C durante 5 minutos para a posterior aplicação nos poços do gel de poliacrilamida. Foram aplicados 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteína por poço e 3 μL do marcador de peso molecular pré- corado PageRuler Plus® (Fermentas).

A eletroforese foi realizada em cuba vertical (Bio-Rad) ligada a uma fonte de eletroforese (Pharmacia Biotech, modelo EPS 600) a 80 V nos primeiros 5 minutos e a 100 V no restante do tempo por aproximadamente 2 horas ou até que as amostras atingissem o ponto desejado. Após a corrida, um dos géis foi corado com prata e o outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL® (Amersham).

3.8.2 - Coloração do gel de SDS por prata

Um dos géis foi submetido à coloração por prata, sendo incubado com as soluções de fixação, de lavagem, de sensibilização e de coloração durante 10 minutos sob agitação, nessa ordem. Em seguida, foi adicionada a solução de revelação sob agitação até o surgimento das bandas das proteínas. Nesse momento, foi adicionada rapidamente a solução de bloqueio, de modo a interromper a reação anterior. O gel foi incubado, por fim, com solução de fixação por 10 minutos sob agitação e reidratado com água destilada sob as mesmas condições. O gel foi submetido a 3 lavagens com água destilada para remoção dos resíduos das soluções entre cada etapa descrita.

3.8.3 - Análise de scFv 2C7 anti-LDL(-) por *Western Blot*

Para confirmação da identificação das proteínas separadas por SDS-PAGE, o material foi transferido para uma membrana de nitrocelulose *Hybond ECL*[®] (Amersham). O sistema de transferência é composto pelo sistema: papel filtro (*Whatman Chromatography Paper*), membrana de nitrocelulose, gel e papel filtro. O sistema de transferência utilizado é semi-úmido (*Transblot SD System*[®], Bio-Rad) e sofre ação de uma corrente de 70 miliampéres durante 1 hora e 45 minutos.

Seguida da transferência, foi adicionada uma solução de bloqueio [5% de solução de bloqueio (fornecida no kit de revelação) diluído em PBS-Tween (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween) 0,01% (v/v), pH 7,4] à membrana de nitrocelulose por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente, uma solução contendo anticorpo primário IgG de camundongo anti-His (GE HealthCare) diluído 1:1500 por 16 horas a 4 °C, sob agitação, e uma solução de anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Zimed) na diluição de 1:1500 por 1 hora em temperatura ambiente sob as mesmas condições de agitação. Entre cada etapa, foi realizada a lavagem da membrana com solução PBS-Tween 0,05%, pH 7,4 durante 15 minutos com trocas de solução a cada 5 minutos.

A revelação foi feita através de solução reveladora do kit *Pierce ECL Advanced Western Blotting*[®] (Amersham) de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram obtidas através do *Image Quant 400* (GE Healthcare).

3.8.4 - Afinidade do scFv 2C7 anti-LDL (-) pelo método *Dot Blot*

O ensaio foi realizado a partir da sensibilização de uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL[®] (Amersham) com soluções de LDL nativa e LDL(-) com concentrações finais de 1 µg/mL em pontos específicos. A membrana, em seguida, foi incubada com solução de bloqueio, contendo leite desnatado (Molico[®], Nestlé), previamente fervido e filtrado em gaze, a 5% diluído em PBS-Tween 0,01%, durante 2 horas sob agitação a temperatura ambiente.

Posteriormente, a membrana passou por 3 novas etapas, sendo incubada com: 100 µg/mL de scFv anti-LDL (-) diluído em uma solução de leite desnatado a 1% em PBS-Tween 0,01% durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente; solução de anticorpo primário IgG de camundongo anti-His (GE Healthcare) diluído 1:1500 em leite desnatado 1% em PBS-Tween 0,01% durante 16 horas, sob agitação a 4 °C; solução de anticorpo secundário, com leite desnatado a 1% diluído em PBS-Tween 0,01% e IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Zimed) a uma diluição de 1:1500 durante 1 hora, sob agitação constante a temperatura ambiente.

A revelação da membrana foi realizada por 3,3' Diaminobenzidina tetrahydroclorato (Sigma) diluído em solução de Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 com adição de 12 µL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck) para cada 30 mL de tampão.

3.8.5 - Afinidade do scFv 2C7 anti-LDL (-) pelo método ELISA

Uma diluição seriada da proteína foi realizada para o ensaio de ligação à LDL(-) por ELISA (modificado de Faulin et al., 2008). Como controle negativo, foi utilizado LDL nativa, na qual espera-se que não haja reatividade com o scFv anti-LDL(-). A microplaca de poliestireno de 96 poços (Costar, Corning Inc., NY, USA) foi sensibilizada com 50 µL de 1 µg/mL dos antígenos LDL nativa e LDL(-) diluídos em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. A placa foi sensibilizada a 4 °C durante 16 horas.

A placa foi, então, lavada com 200 µL de PBS-Tween 0,05% (v/v) e bloqueada com 150 µL de leite desnatado 2% (p/v) diluído em PBS-Tween 0,01% (v/v), previamente inativado por aquecimento (100 °C) durante 1 hora e 30 minutos a 37 °C. Para a etapa de ligação do scFv anti-LDL(-) 2C7, a proteína purificada foi diluída de modo a manter a concentração de 20 µg/mL e foram adicionados 50 µL/poço do

mesmo. Para controle positivo de reatividade à LDL(-) foi utilizado 50 µL/poço do anticorpo monoclonal MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-) (0,5 µg/mL) produzido por nosso grupo. A placa foi mantida a 37 °C durante 1 hora. A placa foi novamente lavada com PBS-Tween 0,05% (v/v). Para detecção da ligação foi utilizado 50 µL/poço do anticorpo primário IgG de camundongo anti-His (GE Healthcare) diluído 1:1500 incubado a 37 °C durante 1 hora e 30 minutos. Como anticorpo secundário utilizou-se 50 µL/poço do IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Zimed) a uma diluição de 1:1500 em uma incubação de 1 hora a 37 °C. Nos poços contendo MAb 2C7 D5F10 anti-LDL(-), apenas o anticorpo secundário foi introduzido no sistema.

A revelação foi realizada utilizando 50 µL/poço do reagente TMB (Tetrametil Benzidina) (Sigma), substrato para detecção da atividade de peroxidases, e aguardou-se 15 minutos para a adição de 50 µL/poço da solução de parada da reação (Ácido Sulfúrico 0,5M). A leitura foi realizada em seguida em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

3.8.6 - Quantificação de proteínas pelo método de *Lowry* modificado

O método consiste na reação da proteína com Sulfato de cobre e Tartarato em solução alcalina, resultando na formação de complexos entre a proteína e o Cobre. Após a adição do reagente Folin-Ciocalteu, a proporção desses complexos é reduzida a partir da produção de um produto solúvel em água, cuja coloração azul pode ser medida em 750 nm. A proteína BSA foi utilizada como padrão nas concentrações de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 5 e 1 µg/mL. As amostras foram analisadas em triplicata. A concentração de proteína na amostra foi determinada através da equação da reta resultante da curva-padrão.

3.9 - Produção das Nanocápsulas

As nanopartículas foram produzidas de acordo com o protocolo descrito no depósito do processo de síntese “Processo sintético para a produção e uso de nanocápsulas multiparede complexadas com íons metálicos” – Patente de Invenção n.016110005557, de 11 de Outubro de 2011 (Anexo 7), proveniente de estudos realizados pelo grupo coordenado pelas Profas. Dra. Adriana Raffin Pohlmann e Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres, respectivamente, do Instituto de Química e da

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo grupo da Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla (FCF/USP).

3.9.1 - Preparação do complexo metálico de nanocápsulas multiparedes (MCMN)

A síntese de MCMN-Zn²⁺ ocorreu em duas etapas distintas. Na primeira etapa, foram preparadas as nanocápsulas multiparede (Figura 7); e na segunda etapa, foi realizada a sua complexação com íons metálicos. Ambos os protocolos foram realizados de acordo com Bender (2012).

Em um primeiro momento, foram produzidas as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) (Jager et al., 2009). Para isso, uma fase orgânica foi preparada a partir da adição de 0,1 g de poli (epsilon) caprolactona (PCL, Sigma), 0,04 g de monoestearato de sorbitano (SPAN 60[®], Sigma), 0,120 g de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Delaware) e 25 mL de acetona. Esta fase permaneceu sobre agitação magnética por 1 hora à 40 °C. Em paralelo, uma solução etanólica de 5 mL, contendo 0,03 g de fosfatidilcolina de soja (Lipoid S 75[®], Lipoid) foi preparada, sendo posteriormente adicionada à fase orgânica.

A etapa seguinte consistiu na adição desta solução orgânica sob 50 mL de uma solução aquosa formada por 0,08 g de polissorbato 80 (Tween 80, Delaware) sob agitação magnética moderada na temperatura de 40 °C. Após 10 minutos de agitação, a mistura foi transferida para balão rotatório e evaporada sobre pressão reduzida para eliminar a acetona e concentrar a suspensão (próximo a 9 mL). O volume final foi ajustado em frasco volumétrico para 10 mL com água ultrapura.

Para revestir as nanocápsulas de núcleo lipídico, uma solução de quitosana (Sigma) 0,3% (p/v) foi preparada através da dissolução do polissacarídeo em 10 mL de uma solução aquosa contendo ácido acético a 1%. Desta solução, 1 mL foi lentamente adicionado sobre 9 mL da suspensão de LNC sob agitação magnética moderada. O meio reacional permaneceu sobre agitação por 4 horas a temperatura ambiente. Ao final deste período, uma suspensão de nanocápsulas multiparede (MN) foi obtida. A formação das nanocápsulas MN baseia-se na interação eletrostática entre o grupo amônio da quitosana e grupos carregados negativamente na superfície do núcleo lipídico.

A etapa final consistiu na formação do complexo multiparede contendo íons metálicos (MCMN). Este consistiu da complexação de 25 µg/mL de íons zinco (Zn²⁺)

sobre as nanocápsulas multiparede. Para isso, primeiramente foi preparada uma solução padrão de íons zinco (Zn^{2+}) de 1 $\mu\text{g/mL}$ [28 mg de Acetato de zinco (Aldrich)] dissolvidos por 1 hora a 37 °C em 10 mL de água ultrapura]. Após esta etapa, adicionou-se lentamente 250 μL desta solução padrão em 9,750 mL da suspensão de nanopartículas MN sob agitação moderada.

Figura 7: Representação esquemática das nanocápsulas MCMN. A formação das nanocápsulas foi dividida em duas etapas. Na primeira, foram produzidas nanocápsulas com núcleo lipídico envoltas por uma membrana polimérica e por um revestimento externo de quitosana, formando as nanocápsulas multiparede (MN). A segunda fase consistiu na formação do complexo multiparede contendo íons metálicos (MCMN), através da adição de 25 $\mu\text{g/mL}$ de íons zinco (Zn^{2+}) sobre as nanocápsulas (modificada de Bender, 2012).

Todas as formulações foram caracterizadas quanto a ausência de partículas micrométricas por meio da análise de distribuição de tamanho de partículas utilizando a técnica de difração a laser - DLS (*Dynamic Light Scattering*) executadas pelo equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltda, UK). As análises foram executadas com 3 diferentes lotes de cada formulação. Os valores de cada lote foram obtidos considerando a triplicata de análises de cada um deles.

3.10 - Conjugação do scFv 2C7 anti-LDL(-) às nanocápsulas MCMN

A formulação NC-scFv (Figura 8) foi obtida a partir da conjugação das nanopartículas citadas acima ao scFv 2C7 anti-LDL(-) de acordo com o protocolo descrito no depósito de pedido de patente de invenção “Composição Farmacêutica Nanométrica e seus Usos” – Patente de Invenção n.BR 10 2012 025132-9, de 2 de Outubro de 2012 (Anexo 8). A padronização do processo de conjugação foi realizada pelo laboratório coordenado pela Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann (UFRGS) de acordo com Bender, 2012.

Para realizar a ligação entre as nanocápsulas MCMN e o scFv 2C7 anti-LDL(-), foi adicionado scFv 2C7 anti-LDL(-) à solução contendo nanocápsulas, de modo a atingir uma concentração final de 200 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) na formulação formada. A concentração da formulação NC-scFv sempre será expressa de acordo com a quantidade de scFv 2C7 anti-LDL(-) adicionado às nanocápsulas MCMN. O procedimento foi feito de modo semelhante às ligações anteriores, gotejando-se a solução contendo scFv sobre a solução de nanocápsulas sob agitação constante durante 1 minuto a 4 °C. A ligação entre os fragmentos de anticorpos e o complexo MCMN requer que a adição do ligante ocorra em aproximadamente 1 minuto após a adsorção dos íons metálicos zinco. O processo de agitação moderada também é fundamental para a melhor formação dos complexos.

Figura 8: Representação esquemática do complexo NC-scFv formado pela ligação entre as nanocápsulas MCMN e o scFv 2C7 anti-LDL(-). A formação do complexo NC-scFv ocorreu por adição do scFv 2C7 anti-LDL(-) à solução contendo nanocápsulas MCMN após 1 minuto da adsorção de íons Zinco à MN (modificada de Bender, 2012).

Foram realizadas análises (10 medidas internas) de diâmetro médio das partículas (Z-average) e índice de polidispersão (PDI) em equipamento Zetasizer Dispersion Technology Software (Versão 4.00, 2002, Malvern Instruments Ltda) para determinação da concentração ideal de scFv 2C7 anti-LDL(-) que deveria ser ligada às nanocápsulas MCMN, de modo a recobrir toda a sua superfície. Após essa determinação, novos ensaios foram realizados a fim de avaliar a ligação molecular entre a formulação NC-scFv com lipoproteínas de baixa densidade [LDL_n e LDL(-)] e confirmar a ligação adequada do complexo NC-scFv apenas a LDL(-), mantendo, assim, as características de especificidade do fragmento de anticorpo. Esta etapa de medição por DLS foi precedida pela etapa de incubação *in vitro* da formulação NC-scFv anti-LDL(-) com as formas nativa ou eletronegativa da LDL. Para isso, 25 µL da formulação contendo concentrações de 25, 50, 100, 200 ou 500 µg/mL do fragmento de anticorpo foram adicionados a 25 µL de LDL(-) (361,6 µg/mL) ou LDL_n (690 µg/mL) em solução, resultando na quantidade de 9,04 µg de LDL(-) e 17,25 µg de LDL_n em cada situação testada. Cada amostra foi cuidadosamente misturada e incubada a 25 °C por 2 minutos antes das análises de DLS. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.11 - Ensaios celulares

3.11.1 – Condições de cultura celular

Foram utilizadas duas linhagens de células neste projeto: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) e macrófagos RAW 264.7, ambas cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), contendo Bicarbonato de sódio 2,0 g/l, 100 µg/mL e Penicilina 100 UI/mL, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB, Gibco) inativado. O carenciamento de ambas as linhagens foi realizado a partir de incubação com meio RPMI 1640 suplementado com 1% SFB inativado por 16 horas. Todas as linhagens celulares utilizadas para este trabalho foram cultivadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

Em todos os ensaios foram utilizados os grupos de tratamento nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv. As duas etapas de formação das nanocápsulas foram utilizadas (MN, sem adição de Zn²⁺, e MCMN, com adição de Zn²⁺) a fim de garantir a viabilidade celular mesmo diante de pequenos erros durante o seu processo de produção.

Para cada tipo de ensaio, foram realizados pelo menos três experimentos independentes feitos, no mínimo, em duplicata.

3.11.2 - Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade foi, inicialmente, determinada através do método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) como descrito previamente por Denizot & Lang (1986).

Para o ensaio, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), onde 1×10^4 células/poço foram cultivadas em placa de 96 poços estéril a um volume inicial de 200 μ L de meio RPMI 1640. Após 3 horas de incubação, sob as condições descritas no item 3.11.1, com o objetivo de permitir aderência celular, as células foram carenciadas. Após esse período, foi adicionado 100 μ L de meio RPMI suplementado com 1% de SFB inativado por poço contendo concentrações variadas de soluções contendo nanocápsulas MN (10^9 - 39×10^5 partículas/mL), nanocápsulas MCMN (10^9 - 39×10^5 partículas/mL), scFv 2C7 anti-LDL(-) (100 – 0,390 μ g/mL) e formulação NC-scFv (200 – 0,781 μ g/mL). As concentrações dos tratamentos utilizados neste ensaio foram obtidas a partir de diluições seriadas provenientes de soluções de concentração inicial conhecida. As células também foram tratadas com o veículo PBS 1X. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido por inversão da placa e 50 μ L de uma solução de MTT (1 mg/mL) (Sigma) em meio RPMI livre de vermelho de fenol (Sigma) foi adicionada e a placa foi incubada por 3 horas a 37 °C. Em seguida, o MTT não reduzido foi removido por inversão da placa, e 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada poço. As placas foram vigorosamente agitadas, para completa solubilização do produto Formazan, e a densidade óptica de cada poço foi determinada em espectrofotômetro Synergy HT (Biotek) a 580 nm.

3.11.3 – Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo

A fim de confirmar a viabilidade celular encontrada no ensaio por MTT e investigar os possíveis mecanismos de morte celular decorrentes do tratamento de macrófagos RAW 264.7 e células da linhagem HUVEC com soluções contendo nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) e formulação NC-scFv, foram realizados ensaios de apoptose, necrose, autofagia e ciclo celular. Todos os experimentos foram realizados no citômetro FACSCanto™ *Flow Cytometer*

(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os resultados foram analisados através do software *Flow Jow* Versão 10.0.2, ©Tree Star, Ashland, Oregon, EUA.

3.11.3.1 Apoptose e Necrose: Para o ensaio de apoptose e necrose, foram cultivadas 1×10^5 células (macrófagos RAW 264.7 e HUVEC) por poço em placa de cultura de 48 poços. Após 3 horas, as células foram carenciadas e, posteriormente, receberam diferentes concentrações de soluções contendo nanocápsulas MN (10^9 - 10^4 partículas/mL), nanocápsulas MCMN (10^9 - 10^4 partículas/mL), scFv 2C7 anti-LDL(-) (100 – 3,125 µg/mL) e formulação NC-scFv (100 – 3,125 µg/mL). Os controles realizados incluíram: controle de células sem tratamento e controle positivo de morte celular com Dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) 5%.

As células foram, então, incubadas por 24 horas sob as mesmas condições anteriores. Após o tempo de incubação, a placa foi retirada da incubadora de CO₂ e iniciou-se o processamento das células para o protocolo de citometria de fluxo. O sobrenadante de cada poço foi aspirado para tubos específicos do citômetro e os poços foram lavados com 500 µL de tampão PBS 1X, tendo sido aspirado para o mesmo tubo, de forma a descolar o máximo de células possíveis do fundo do poço. Esse procedimento foi repetido e os tubos foram centrifugados a 500 g por 5 minutos. No caso de experimentos com HUVEC, foi necessário adicionar 200 µL de Tripsina (Sigma) por poço para descolar as células do fundo da placa e inativar a Tripsina com o dobro de volume de meio de cultura antes de realizar as lavagens dos poços com tampão PBS 1X. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de tampão PBS 1X aos tubos para nova centrifugação com o objetivo de lavar o *pellet* formado e retirar resquícios do meio de cultura, de modo que sua coloração vermelha não interferisse no experimento. O procedimento de lavagem foi realizado duas vezes. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de tampão de reação contido no kit para detecção de apoptose e necrose (APOAF® - Sigma). O *pellet* foi ressuspensionado no tampão e foram adicionados 2,5 µL (0,625 µg/mL) de Anexina V – FITC e 5,0 µL (2,5 µg/mL) de Iodeto de Propídeo, de acordo com as indicações do fabricante. Os tubos foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, protegidos da luz, e levados ao citômetro para leitura imediata.

A análise de apoptose e necrose no citômetro de fluxo foi feita por *dot plot*, onde no eixo X foi demonstrada, em escala logarítmica, a fluorescência do Iodeto de

Propídeo e no eixo Y foi demonstrada a fluorescência da Anexina V. As células viáveis foram reconhecidas no quadrante inferior esquerdo, as células em apoptose no quadrante superior esquerdo, as células em necrose no quadrante inferior direito e ainda células em apoptose tardia localizadas no quadrante superior direito. Foram observados 10000 eventos.

3.11.3.2 Autofagia: Para o ensaio de autofagia, foram cultivadas 1×10^5 células (macrófagos RAW 264.7 e HUVEC) por poço em placa de cultura de 48 poços. Após 16 horas de careciamento, as células receberam concentrações diversas de soluções nanocápsulas MN ($10^9 - 10^4$ partículas/mL), nanocápsulas MCMN ($10^9 - 10^4$ partículas/mL), scFv 2C7 anti-LDL(-) (100 – 6,25 µg/mL) e formulação NC-scFv (100 – 6,25 µg/mL). Como controle positivo (indução de autofagia) foi utilizado o tampão Krebs Ringer (NaCl 118 mM, KCl 4,61 mM, CaCl_2 2,5 mM, KH_2PO_4 1,19 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,76 mM e NaHCO_3 25 mM) de modo a carenciar de forma excessiva o meio de cultivo das células, e como controle negativo (inibição de autofagia), foi utilizado 10 nM de Bafilomicina (Sigma), capaz de prevenir a fusão do autofagossomo ao lisossomo.

As células foram, então, incubadas por 24 horas sob as mesmas condições anteriores. Após o tempo de incubação, a placa foi retirada da incubadora de CO_2 e o processamento das células foi iniciado. Foi adicionado 1 µg/mL de Alaranjado de Acridina (Sigma) por poço e as células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos (Filippi-Chiela et al., 2011). O Alaranjado de Acridina é um corante fluorogênico acidotrópico capaz de marcar o citoplasma e o núcleo celulares sem alterações com fluorescência verde e com fluorescência vermelha as mesmas organelas em ambiente ácido como na presença de autofagossomos, caracterizando um processo de autofagia. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado para os tubos específicos e o foi realizado o processo de lavagem, conforme descrito no item 3.11.3.1. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 200 µL de tampão PBS 1X para ressuspensão do *pellet* formado e a leitura foi realizada.

A análise da autofagia foi feita por *dot plot*, onde no eixo X foi demonstrada, em escala logarítmica, a intensidade de fluorescência do Alaranjado de Acridina referente às células em processo autofágico e no eixo Y foi demonstrada a intensidade de fluorescência do Alaranjado de Acridina referente às células sem presença de

autofagia. A autofagia é representada no quadrante superior direito. Foram observados 10000 eventos.

3.11.3.3 Ciclo celular: Para determinação da influência dos tratamentos utilizados sobre o ciclo celular de macrófagos RAW 264.7 e da linhagem HUVEC, foram cultivadas 2×10^5 células por poço em placa de cultura de 6 poços. Após 16 horas de carenciamento, as células receberam concentrações específicas dos tratamentos: 10^4 nanocápsulas MN, 10^4 nanocápsulas MCMN, 6,25 µg/mL de scFv 2C7 e 6,25 µg/mL da formulação NC-scFv.

As células foram incubadas por 24 horas, a placa foi retirada da incubadora de CO₂ e o sobrenadante foi aspirado para os tubos específicos, centrifugados a 500 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µL de tampão de lise (0,1 % de Citrato de Sódio e 0,1 % de Triton), 20 µL (10 mg/mL) de RNase A (Invitrogen) e 2 µL (1 mg/mL) de Iodeto de Propídeo (Sigma) (Filippi-Chiela et al., 2011). O *pellet* foi ressuspendido no tampão, incubado por 30 minutos protegido da luz e a leitura foi realizada. Foram observados 10000 eventos.

3.11.4 - Ensaio de captação de LDL(-)

Após a realização dos ensaios de viabilidade celular e a consequente determinação das concentrações das nanocápsulas MCMN, do scFv 2C7 e da formulação NC-scFv capazes de manter as células viáveis, foi realizado o ensaio de captação de LDL(-). Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% SFB inativado. Foram utilizadas 1×10^5 células para cada poço em uma placa de cultura de 48 poços. As células foram carenciadas durante 16 horas e, em seguida, receberam concentrações específicas de soluções contendo: 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN, 6,25 µg/mL de scFv 2C7, 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv, 37,5 µg/mL de LDLn, 37,5 µg/mL de LDL(-) e 1 µg/mL de Lipopolissacarídeo (LPS), em diversas combinações. Os experimentos envolveram a utilização dos seguintes grupos:

- (1) controle de células sem tratamento;
- (2) controle de células tratadas com 37,5 µg/mL de LDLn;
- (3) controle de células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-);
- (4) controle de células tratadas com 1 µg/mL de LPS;
- (5) controle de células tratadas com 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN;

- (6) controle de células tratadas com 6,25 µg/mL de scFv 2C7;
- (7) controle de células tratadas com 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv;
- (8) células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-) e 10⁴ partículas/mL de nanocápsulas MCMN;
- (9) células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv 2C7;
- (10) células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-) e 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv;
- (11) células tratadas com 1 µg/mL LPS e 10⁴ partículas/mL de nanocápsulas MCMN;
- (12) células tratadas com 1 µg/mL LPS e 6,25 µg/mL de scFv 2C7;
- (13) células tratadas com 1 µg/mL LPS e 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv;
- (14) células tratadas com 1 µg/mL LPS e 37,5 µg/mL LDL(-);
- (15) células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-), 1 µg/mL LPS e 10⁴ partículas/mL de nanocápsulas MCMN;
- (16) células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-), 1 µg/mL LPS e 6,25 µg/mL de scFv 2C7;
- (17) células tratadas com 37,5 µg/mL LDL(-), 1 µg/mL LPS e 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv;

Em todos os grupos o tempo de incubação com o tratamento foi de 16 horas. Após este período, as células foram fixadas em solução de PBS 1X com 10% (v/v) de formaldeído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com água destilada e submetidas à coloração com uma solução de uso de Oil Red O (Sigma) que foi diluída na proporção de 1:2, a partir de uma solução estoque, em água destilada, durante 1 hora. As células fixadas e coradas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e precipitado. A placa foi observada em microscópio ótico Nikon e as imagens foram obtidas através do programa *Motic Images Plus* versão 2.0 (Micro-Optics, Inc; Hackettstown, NJ, EUA).

3.11.5 - Estudos de fagocitose *in vitro* com Citocalasina D

Os estudos de fagocitose seguiram o protocolo inicial padronizado para o ensaio de captação de LDL(-). Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI. Foram utilizadas 1x10⁵ células para cada poço em uma placa de cultura que contém um total de 48 poços. Após a aderência das células à placa, estas foram carenciadas durante 16 horas.

Após este período as células receberam uma concentração determinada de soluções contendo 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) e 10⁴ partículas/mL de nanocápsulas MCMN e 6,25 µg/mL da formulação NC-scFv. O experimento envolveu a combinação dos grupos de tratamento e de 37,5 µg/mL de LDLn e 37,5 µg/mL de LDL(-). Além disso, foi adicionada ao experimento 20 µM Citocalasina D (Sigma), um potente inibidor da polimerização de actina, atuando sobre os microfilamentos e impedindo o processo de fagocitose, com o intuito de verificar a possibilidade de formação de células espumosas em macrófagos tratados com a formulação NC-scFv.

Em todos os grupos o tempo de incubação com o tratamento foi de 16 horas. Após este período, as células foram fixadas em solução de PBS com 10% (v/v) de formaldeído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com água destilada e submetidas à coloração com uma solução de uso de Oil Red O (Sigma) que foi diluída na proporção de 1:2 a partir de uma solução estoque, durante 1 hora. A placa foi observada em microscópio ótico e as imagens foram obtidas através do programa *Motic Images Plus* versão 2.0.

3.12 - Ensaio de toxicidade em animais

Para a avaliação da toxicidade do scFv 2C7 anti-LDL(-) e da formulação NC-scFv, separadamente, foram utilizados 30 camundongos C57BL/6J LDLR^(-/-) machos com 12 semanas de idade média, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Este protocolo baseou-se no método descrito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do “*Guideline for testing of chemicals (OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development)*” nº 423, de 17 de Dezembro de 2001. A toxicidade foi determinada a partir da administração de diferentes doses das soluções em questão, por via intravenosa (veia lateral da cauda) em grupos de 3 animais. Os grupos foram distribuídos de forma a abranger: um grupo controle, no qual não foi administrada qualquer solução; um grupo veículo, recebendo apenas PBS 1X; 4 grupos apenas com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução em doses variadas (2,5 mg/Kg, 5 mg/Kg, 10 mg/Kg e 25 mg/Kg); e 4 grupos apenas com a formulação NC-scFv em diferentes doses (2,5 mg/Kg, 5 mg/Kg, 10 mg/Kg e 25 mg/Kg).

Os animais foram avaliados durante o período de 48 horas, após o qual o número de mortes foi registrado. Além desse fator, foram avaliadas, após uma, 3, 6, 9, 18, 24

e 48 horas da administração das soluções, as seguintes condições: pêlos eriçados, dispnéia, tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma.

Os animais que sobreviveram receberam doses semanais das soluções em questão durante 3 semanas. Sob orientação dos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, foram coletados aproximadamente 100 µL de sangue, através da veia submandibular com auxílio de uma agulha 8 x 0,3 mm (30G, *Becton, Dickinson and Company*) (Golde et al., 2005), de todos os animais avaliados 48 horas após a primeira administração. 48 horas após a quarta e última administração, foi realizada nova coleta de sangue por punção cardíaca, após anestesia intraperitoneal com Cloridrato de Xilasina (2,0 g/100 mL; Vetbrands) e Cloridrato de Cetamina (1,0 g/10 mL; Vetnil) na dose de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente (revisado por Damy et al., 2010). O soro foi utilizado para dosagem dos seguintes parâmetros bioquímicos: Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato transaminase (AST), Labtest Diagnóstica (Minas Gerais, Brasil).

Os animais foram, em seguida, eutanasiados e foi realizada a coleta do fígado. Após fixação em formalina 10% tamponada, os fígados foram incluídos em parafina e seccionados com auxílio de micrótomo CUT 4050 (Microtec) em cortes aleatórios de 5 µm. Cada fígado resultou em três cortes, os quais passaram por processo de coloração por Hematoxilina (MBF) e Eosina (Sigma-Aldrich). A leitura das lâminas foi realizada por observador independente.

3.13 - Imunização passiva de camundongos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e com a formulação NC-scFv

Para o desenvolvimento do projeto, foi utilizado o protocolo de tratamento de lesão inicial (LI), já padronizado no Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF-USP. Esse protocolo visou avaliar a utilização do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv como potenciais agentes preventivos ao desenvolvimento e à progressão da lesão aterosclerótica a partir do seu estado inicial.

3.13.1 - Delineamento experimental

As imunizações no protocolo de LI foram realizadas durante 4 semanas (Tabela 2). Após a primeira imunização, realizada pela veia lateral da cauda, com os diversos tratamentos, os animais receberam dieta normal, oferecida pelo biotério. Uma

semana após essa imunização, os animais receberam a segunda dose e passaram a receber a dieta hipercolesterolêmica (HC) já descrita. Na terceira semana do protocolo, os animais receberam a terceira dose e na semana seguinte a quarta e última dose dos tratamentos, sem interrupção do consumo de ração HC. Após este período de tratamento (28 dias), os camundongos foram eutanasiados. Dados de consumo de ração (g) e massa corporal (g) foram aferidos semanalmente.

Tabela 2 - Programação para o tratamento dos camundongos LDLR^{-/-} em protocolo de lesão inicial.

Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
Dieta normal	Dieta HC	Dieta HC	Dieta HC	Eutanásia
1ª dose	2ª dose	3ª dose	4ª dose	

3.13.2 - Grupos experimentais

Foram utilizados 5 grupos (n=24/grupo) de camundongos C57BL/6J *knockout* para o gene do receptor da LDL, divididos em: (1) grupo controle 1, recebendo PBS 1X; (2) grupo nanocápsulas MCMN, recebendo $2,5 \times 10^{10}$ partículas/Kg; (3) grupo scFv anti-LDL(-), recebendo 5 mg/Kg; (4) grupo NC-scFv, recebendo 5 mg/Kg; e (5) grupo Indometacina, recebendo a dose de 1 mg/Kg, caracterizado como o controle positivo antiinflamatório (Sigma). As doses utilizadas para os tratamentos foram definidas em estudo de toxicidade realizado neste projeto (item 12) e o volume administrado nos animais variou de 90 a 120 µL, de acordo com sua massa corporal. O grupo controle 1 referiu-se ao veículo utilizado nos grupos 2, 3 e 4.

3. 13.3 – Análise bioquímica do perfil lipídico sérico

Após o tratamento dos animais dentro da programação do protocolo de LI, os camundongos foram anestesiados com Cloridrato de Xilasina (2,0 g/100 mL; Vetbrands) e Cloridrato de Cetamina (1,0 g/10 mL; Vetnil) na dose de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente, e o sangue foi coletado por punção cardíaca. As amostras de sangue foram, então, centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos a 4°C para obtenção do soro. O soro dos animais foi utilizado para a determinação bioquímica do seu perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade - HDL), LDL e VLDL). Foram determinadas também as atividades das enzimas hepáticas AST e ALT.

Todas as determinações foram obtidas a partir de kits comerciais da Labtest Diagnóstica (Minas Gerais, Brasil). Os resultados obtidos do perfil lipídico foram expressos em mg/dL e da atividade das enzimas hepáticas, em U/L.

3.13.4 – Preparação dos tecidos para processamento

Após a realização da punção cardíaca, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o coração foi exposto e perfundido com salina 0,9%. A perfusão foi realizada via ventrículo esquerdo para retirada do excesso de sangue presente no tecido. Após esta etapa, foram retirados o coração e a aorta ascendente do órgão.

Parte das amostras (n=8/grupo) foi mantida em solução salina 0,9% por uma hora para relaxamento da musculatura, e posteriormente fixada em formalina 10% tamponada, pH 7,4, por 48 horas, para análise morfométrica da área de lesão aterosclerótica. Uma segunda parte (n=8/grupo) foi seccionada imediatamente após a perfusão com salina para delimitação da área de lesão e acondicionados em tubos contendo solução de *RNAlater[®] Tissue Collection* (Qiagen, Torrance, CA, EUA). Após a eutanásia de todos os animais, os corações foram retirados e acondicionados em criotubos, sendo congelados em nitrogênio líquido para extração do RNAm. A última parte das amostras (n=8/grupo) foi fixada em formalina 10% tamponada (pH 7,4) para análise da expressão de proteínas através da técnica de imunohistoquímica.

3.14 - Preparação dos cortes histológicos

A inclusão dos tecidos para corte em lâminas foi realizada em três soluções de diferentes concentrações de gelatina: inicialmente, solução a 5% de gelatina por três horas, depois a 10% por mais três horas e a 25% *overnight*, tendo todas as etapas ocorrido em banho-maria (temperatura entre 40-50 °C).

Os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base em um plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Os corações foram embebidos no composto OCT (MBF, SP, Brasil) dentro da câmara de congelamento do criostato (modelo JUNG FRIGOCUT 2800 N, Leica). Os cortes foram desprezados até a proximidade da região de interesse.

Cortes consecutivos com 6 µm de espessura foram coletados em lâminas de microscopia silanizadas cobertas com uma fina camada de gelatina. Os cortes coletados compreenderam a região entre o sinus aórtico e o início da aorta, com uma

extensão média de 250-300 μm , conforme Paigen et al. (1987). Foram coletadas cerca de 8 lâminas, cada uma com 8 cortes, para cada animal. As referências anatômicas para a identificação do início da região de coleta foram o formato arredondado da aorta e a presença de saliências em sua parede (constituem o início da formação das válvulas aórticas na raiz da aorta). O desaparecimento das válvulas indicou o fim da região de coleta. As lâminas foram numeradas em série e coradas com *Oil Red-O* (Sigma) e contra-coradas com Hematoxilina (MBF) e *Light Green* (Sigma). Após a coloração, o material foi codificado e submetido à análise morfométrica por observador independente.

3.15 - Análise Morfométrica

Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Axio Vision*[®] para a obtenção da área das lesões. Todos os cortes histológicos obtidos foram examinados com o objetivo de quantificar as lesões ateroscleróticas próximas às válvulas aórticas na raiz da aorta. Para esse experimento foram utilizados 8 animais de cada grupo. Dos 8 animais de cada grupo utilizados para essa análise, um animal do grupo Indometacina foi excluído, uma vez que foi à óbito no 20º dia de tratamento.

3.16 - Avaliação da expressão de RNA mensageiro por RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase) em tempo real

Para investigar a expressão do RNA mensageiro tanto de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos quanto das MMP-2 e MMP-9 e dos seus inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-2 e dos receptores: scavenger CD36, CD40, CD14 e TLR-4 a técnica de PCR em tempo real foi utilizada. Para esse experimento foram utilizados 8 animais de cada grupo.

3.16.1 - Extração de RNAm e proteínas

No dia do processamento, as amostras foram retiradas do container de nitrogênio líquido e homogeneizadas com auxílio de um pistilo de teflon. O RNAm dos homogenatos de tecido cardíaco foi extraído utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, CA, EUA), segundo as especificações fornecidas pelo fabricante. Após o

término do protocolo, as amostras de RNAm foram ressuspensas em 40 µL de água tratada com Dimetil pirocarbonato (DEPC). A quantificação do RNAm extraído foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000[®] (Thermo Scientific) e foram considerados de boa qualidade os RNAs que apresentaram uma razão das absorvâncias 260/280 nm com valores próximos a 2.

3.16.2 - Construção e síntese do DNA complementar (cDNA)

Para construção do cDNA através de transcrição reversa, utilizou-se 1,0 µg de RNAm, 4 µL de *High Capacity RNA to cDNA Master Mix*[®] (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) e água DEPC para volume final de 20 µL. Os microtubos contendo a mistura foram incubados no termociclador *PX2 Thermal Cycler*[®] (Thermo Scientific) por 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C e 5 minutos a 85 °C. Após o término da reação, as amostras de cDNA foram armazenadas em -20 °C até posterior análise.

3.16.3 - Desenho de primers

A sequência dos cDNAs dos genes que foram analisados foram obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) e Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>). Os primers específicos para os genes de interesse e para os possíveis genes normalizadores (S18, RPL13a e RPS29) foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) e estão listados na Tabela 3. Depois de desenhados, a especificidade dos primers foi testada através do programa BLAST disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e sintetizados sob encomenda pela empresa Invitrogen. Após recebidos no laboratório, os primers foram armazenados em freezer -20 °C e, posteriormente, solubilizados em água de ultrapura estéril de acordo com as orientações do fabricante.

Tabela 3 - Sequências de primers utilizados para quantificação dos níveis de expressão de mRNA por PCR em tempo real.

Gene	Primer Foward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
IL-1a	CTGGAGTCCATAACCCATGAT	TGACAAACTTCTGCCTGACG
IL-1b	TTCCCATTAGACAACCTGCACTAC	GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT
IL-4	TGCACGGAGATGGATGTGCCAA	GAAGCACCTTGAAGCCCTACA
IL-6	TGTGCAATGGCAATTCTGAT	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
IL-10	GTACAGCCGGGAAGACAATAA	GCATTAAGGAGTCGGTTAGCA
TNF α	AAACTGGGCATGCACGACCT	ACTTCAGCACCATAACAGCC
IFN γ	ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC	CAAGGCCACAGGGATTTC
MMP-2	CCCTGATGTCCAGCAAGTAG	TGCGATGAGCTTAGGGAA A
MMP-9	ATTCGCGTGGATAAGGAGTT	CATGGCAGAAATAGGCTTTG
TIMP1	CGTTAGATCTGGGCGCGATC	TAGCCC TTACCTCCAACCTGA
TIMP2	CTCTCCGACCTGCCACAGA	AACCTAGATGGGCGCGATCT
VCAM	AAGTTTTACAAAGAAAAGGAGGAC	ATCCAGGAATCGGCTGCTCTTC
PECAM	GATGGAGCAAGACTGTGAACAC	TGCTTGTGTCTACTGGATATCATG
CD36	TTTCCTCTGACATTTGCAGGTCTA	AAAGGCATTGGCTGGAAGAA
CD40	CTGGACAAGCTGTGAGGATAAG	TAGAGAAACACCCCGAAAATG
CD14	GCGAGCTAGACGAGGAAAGT	CACGCTTTAGAAGGTATTCCAG
TLR4	TCATGGCACTGTTCTTCTCCT	CATCAGGGACTTTGCTGAGTT
S18	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
RPL13a	TCCTCAAGACCAACGGACTCCT	AACCTTTGGTCCCCACTTCCCT
RPS29	TCTGGGTAGCGTGTAGCTCCAA	GCTGGTGACCCATCTTGCCTT

3.16.4 - Quantificação dos níveis de expressão gênica

A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR) realizadas no equipamento 7500 *Fast Real Time PCR System*[®] (Applied Biosystems, Singapura), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-qPCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 μ L de cDNA, 1,0 μ L da mistura de um dos pares de primers sense e

antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de *SYBR Green Master Mix*[®] (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha). Foram feitos 2 ensaios independentes e cada amostra foi adicionada em duplicata. Para a quantificação dos resultados utilizou-se o método comparativo Ct, também conhecido como $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ (Livack *et al.*, 2001), utilizando-se o gene RPL13a como normalizador.

3.17 - Expressão de moléculas de adesão e receptores celulares por imunohistoquímica

A expressão proteica de moléculas de adesão VCAM-1 e PECAM-1, assim como dos receptores CD36, CD14, CD40, CD40 ligante e TLR-4, foi avaliada por imunohistoquímica. Foram utilizados 8 animais por grupo.

Após fixação em formalina 10% tamponada e os corações foram incluídos em parafina. Posteriormente foram seccionados com auxílio de micrótomo CUT 4050 (Microtec), em cortes de 5 µm. Os cortes foram realizados na região dos ventrículos entre o ápice e a base num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios, assim como no prepare das amostras para a análise morfométrica. Com os cortes aderidos a lâminas histológicas, foi realizado o procedimento de desparafinização: 3 banhos de xilol, com duração de 10 minutos em cada banho. Em seguida, foi realizado o procedimento de hidratação: 2 banhos, de 5 minutos cada, em etanol 100%, 1 banho, de 3 minutos, em etanol 70% e 1 banho, de 3 minutos, em etanol 50% e 1 banho, de 3 minutos, em etanol 30%. As lâminas foram lavadas várias vezes em água ultrapura e PBS 1X. Posteriormente, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas durante 15 minutos a temperatura ambiente com solução 10% de leite desnatado. As lâminas foram, em seguida, incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com os anticorpos primários respectivos [VCAM-1 (diluição 1:200) e PECAM-1 (diluição 1:20) – Santa Cruz Biotechnology, Inc; CD36 (diluição 1:300), CD14 (diluição 1:400), CD40, CD40 ligante (ambos com diluição 1:100) e TLR-4 (diluição 1:80) – Abcam] e posteriormente com anticorpo secundário biotilado de coelho para murinos (Abcam), durante 45 minutos a 37 °C. Para bloquear a ação de peroxidases endógenas, as lâminas foram incubadas com 3% de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, o complexo estreptoavidina-peroxidase (1:2000) foi adicionado e, em seguida, os cortes foram revelados com DAB 1:50 (DakoCytomation) e contra corados em Hematoxilina.

O material foi codificado e submetido à análise por observador independente. Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Image J*[®] Versão 1.46r para Mac (Maryland, EUA) para a quantificação da expressão dos antígenos em questão. Para esse experimento foram utilizados 8 animais de cada grupo.

3.18 - Análise estatística

Os resultados estão apresentados na forma de média + desvio padrão (DP). Os dados resultantes deste projeto foram analisados estatisticamente pelo teste de One-way ANOVA. O teste de Turkey foi utilizado na análise de comparações pareadas. Os cálculos foram realizados utilizando-se GraphPad InStat software (versão 3.01 para Windows 95, *GraphPad Software, San Diego, California*, EUA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 – Obtenção das subfrações de LDL:

As subfrações LDLn e LDL(-) obtidas por separação de troca iônica podem ser observadas no cromatograma da figura 9A, onde o pico 1 corresponde aos inibidores de protease, adicionados ao plasma de acordo com o item 3.4.2 da seção anterior, o pico 2 indica a LDLn e o pico 3 indica a LDL(-). A eficácia do processo de isolamento e purificação pode ser observada em gel de agarose (Figura 9B). Foram obtidos 10 mL de LDLn na concentração de 3,549 mg/mL e 5 mL da subfração LDL(-) na concentração de 0,722 mg/mL.

de agarose 1 2 3
0,5% (B). A - As subfrações de lipoproteína foram separadas por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Bio-Rad) utilizando coluna de troca iônica *Sepharose UNO Q-12* (Bio-Rad). B - O gel de agarose contendo LDLn e LDL(-) passou por coloração com *Comassie Blue*. A coluna da esquerda corresponde à LDL nativa e a coluna da direita, à LDL eletronegativa, apresentando uma maior migração eletroforética.

4.2 - Expressão e caracterização do scFv 2C7 anti-LDL(-) em *Pichia pastoris*:

Após coleta e purificação dos sobrenadantes de cultura (200 mL) contendo scFv 2C7 anti-LDL(-) provenientes das 9 fermentações realizadas, foram obtidos entre 5,1 e 12,42 mg/L, sendo o rendimento dos processos determinado através da multiplicação da concentração de scFv obtida em cada processo pelo volume final (mL) de purificado. A quantidade de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução obtida foi mais do que suficiente para a realização de todos os ensaios deste trabalho.

A eficiência do processo de purificação do scFv 2C7 anti-LDL(-) em resina de níquel foi comprovada através de eletroforese em gel SDS-PAGE corado com prata, que pode ser observado na Figura 10, onde as bandas correspondentes à proteína

recombinante são visualizadas com massas moleculares de 35 e 28 kDa. A banda de 28 kDa corresponde ao scFv 2C7 anti-LDL(-) e a banda de 35 kDa refere-se ao scFv 2C7 anti-LDL(-) glicosilado, ambos produzidos pela levedura *P. pastoris*.

Figura 10: Análise da purificação do scFv 2C7 anti-LDL(-) em gel de poliacrilamida 13% corado com prata. Amostras: M: PageRuler™ Plus (Fermentas); scFv 2C7 anti-LDL(-): purificado em resina de níquel, com concentração de 1,08 µg/mL. O scFv 2C7 anti-LDL(-) pode ser observado nas bandas referentes às massas moleculares de 35 e 28 kDa. A banda de 28 kDa corresponde ao scFv 2C7 anti-LDL(-) e a banda de 35 kDa refere-se ao scFv 2C7 anti-LDL(-) glicosilado, ambos produzidos pela levedura *P. pastoris*. A imagem foi recolorida para preto e branco para melhor visualização das bandas.

A confirmação da visualização da proteína foi realizada por *Western Blot* (Figura 11).

Figura 11: Análise da purificação do scFv 2C7 anti-LDL (-) em membrana de nitrocelulose por *Western Blot*. Amostras: M: PageRuler™ Plus (Fermentas); scFv 2C7 anti-LDL(-): purificado em resina de níquel, com concentração de 1,08 µg/mL. A membrana foi revelada com kit ECL Advanced® (GE HealthCare) por quimioluminescência em equipamento *Image Quant 400*® (GE Healthcare). O scFv 2C7 anti-LDL(-) pode ser observado nas bandas referentes aos pesos moleculares de 35 e 28 kDa. A banda de 28 kDa corresponde ao scFv 2C7 anti-LDL(-) e a banda de 35 kDa refere-se ao scFv 2C7 anti-LDL(-) glicosilado, ambos produzidos pela levedura *P. pastoris*.

O resultado do processo de desglicosilação do scFv 2C7 anti-LDL(-), obtido pelo tratamento da proteína com a enzima Endo H seguido de purificação em resina de Concanavalina A, foi observado em gel de 13 % de poliacrilamida corado com prata (Figura 12). O processo permitiu a separação da proteína sem resíduos de manose, que não foi adsorvida pela resina, e os resíduos de manose, que permaneceram retidos na resina.

Figura 12: Análise do padrão de glicosilação do scFv anti-LDL(-) em gel de poliacrilamida 13% por SDS-PAGE corado com prata. Amostras: M: PageRuler™ Plus (Fermentas®); 1- scFv tratado com Endo H e purificado em resina de Concanavalina A; 2- scFv não tratado com Endo H. O scFv 2C7 anti-LDL(-), com concentração de 1,02 µg/mL, pode ser observado nas bandas referentes aos pesos moleculares de 35 e 28 kDa em 2 e apenas na banda de 28 kDa em 1. A imagem foi recolorida para preto e branco para melhor visualização das bandas.

A afinidade do scFv 2C7 anti-LDL(-) purificado em relação à LDL(-) foi verificada por ensaio de *Dot Blot* (Figura 13). Não houve ligação do scFv 2C7 anti-LDL(-) à LDLn, utilizada como controle negativo.

Figura 13: Afinidade de ligação do scFv 2C7 anti-LDL(-) à LDL(-) por imunoensaio de *Dot Blot*. A membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com: 1- LDL(-); 2- scFv 2C7 anti-LDL(-) como controle positivo de marcação com os anticorpos utilizados; e 3- LDLn como controle negativo de ligação. A revelação foi realizada com o reagente DAB (Sigma). A imagem foi recolorida para preto e branco para melhor visualização das marcações.

A afinidade de scFv 2C7 anti-LDL(-) também foi comprovada por ensaio de ELISA (Figura 14), onde foi determinada a ligação da proteína à LDL(-). A LDLn foi utilizada novamente como controle negativo e não houve ligação entre essa e o scFv

2C7 anti-LDL(-) ou o MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-). Os valores de absorbância obtidos nos poços incubados com scFv 2C7 anti-LDL(-) foram semelhantes aos apresentados pelos poços contendo MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-), utilizado como controle positivo de ligação à LDL(-).

Figura 14: Afinidade de ligação do scFv 2C7 anti-LDL(-) à LDL(-) por imunoensaio de ELISA. O gráfico demonstra as absorbâncias, obtidas por ELISA, fornecidas por amostras de scFv 2C7 anti-LDL(-) e MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-) em relação às frações LDLn e LDL(-). A afinidade de ligação do scFv 2C7 anti-LDL(-) ao seu antígeno LDL(-) foi comprovada. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. *** significância estatística com nível de $p < 0,001$ do grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) + LDL(-) em relação ao grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) + LDLn. ### significância estatística com nível de $p < 0,001$ do grupo MAb 2C7 D5F10 anti-LDL(-) + LDL(-) em relação ao grupo MAb 2C7 D5F10 anti-LDL(-) + LDLn.

4.3 - Produção das Nanocápsulas e Conjugação ao scFv 2C7 anti-LDL(-):

As análises das etapas 1 e 2 de formação das nanocápsulas MN e MCMN, respectivamente, por técnica de difração a laser demonstraram a presença de uma população unimodal, dentro dos limites nanométricos (Bender, 2012). A análise do perfil granulométrico de distribuição de tamanho por volume e de distribuição de tamanho por número de partículas, demonstrou uma alta homogeneidade das amostras testadas (Figura 15).

Figura 15: Perfis granulométricos das nanopartículas MN e MCMN obtidos por difração a laser.

A) Etapa 1 de formação das nanocápsulas (MN). B) Etapa 2 da formação das nanocápsulas com adição de 25 µg/mL de íons Zinco (Zn^{2+}) (MCMN). As medidas foram realizadas em triplicata (Mastersizer 2000) (modificada de Bender, 2012).

Nos estudos envolvendo a determinação da concentração ideal de scFv 2C7 anti-LDL(-) para ligação às nanocápsulas MCMN, observou-se que o aumento da concentração de scFv 2C7 anti-LDL(-) ao sistema foi diretamente proporcional ao aumento do diâmetro médio das partículas da formulação NC-scFv. As concentrações 25 µg/mL e 50 µg/mL uma vez adicionadas às nanocápsulas MCMN causaram apenas pequenas modificações no tamanho médio das partículas (122 nm e 125 nm, respectivamente) quando comparadas ao tamanho de LNC-CS (121 nm). No entanto, ao inserir scFv 2C7 anti-LDL(-) mais concentrado ao sistema, observou-se um aumento considerável no tamanho das partículas formadas [MCMN-scFv 2C7 anti-LDL(-)].

Quanto aos ensaios utilizando NC-scFv em diversas concentrações e LDL(-) ou LDLn em concentrações pré-estabelecidas, observou-se o aumento do diâmetro médio das partículas em solução apenas nas amostras contendo LDL(-) ($p < 0,05$), mesmo na presença de concentrações maiores de LDLn ($p > 0,05$) em relação a LDL(-). Esse aumento também teve uma variação diretamente proporcional à concentração de scFv 2C7 anti-LDL(-) inserida no sistema. Nas concentrações de 200 µg/mL e 500 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-), foram obtidas partículas de tamanho muito

semelhante, correspondendo a 490 nm e 469 nm, respectivamente. A única situação onde houve, aparentemente, aumento do diâmetro médio das partículas na presença de LDLn, foi a partir da utilização de NC-scFv com concentração de scFv 2C7 anti-LDL(-) igual a 500 µg/mL, representado por 434 nm. No entanto, esse valor é muito próximo do tamanho das partículas em solução contendo NC-scFv com concentração de scFv 2C7 anti-LDL(-) igual a 500 µg/mL, ou seja, 426 nm.

Todos os valores obtidos quanto ao tamanho médio das partículas e ao índice de polidispersão (PDI), um parâmetro que fornece informações importantes sobre a homogeneidade da distribuição do tamanho das partículas em uma solução, podem ser observados na Tabela 4, a seguir.

Tabela 4 – Avaliação do tamanho médio das partículas (Z-average) e o índice de polidispersão (PDI) através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as partículas formadas pela interação entre nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-), LDLn e LDL(-).

Sistemas	Tamanho médio das partículas (nm)	PDI
LNC PCL	110	0.14
LNC PCL-CS	121	0.14
MCMN-scFv 25 µg/mL	122	0.16
MCMN-scFv 50 µg/mL	125	0.17
MCMN-scFv 100 µg/mL	130	0.20
MCMN-scFv 200 µg/mL	178	0.21
MCMN-scFv 500 µg/mL	426	0.10
MCMN-scFv 25 µg/mL + LDL(-)	205	0.10
MCMN-scFv 50 µg/mL + LDL(-)	359	0.23
MCMN-scFv 100 µg/mL + LDL(-)	403	0.26
MCMN-scFv 200 µg/mL + LDL(-)	490	0.23
MCMN-scFv 500 µg/mL + LDL(-)	469	0.21
MCMN-scFv 25 µg/mL + LDLn	121	0.18
MCMN-scFv 50 µg/mL + LDLn	129	0.22
MCMN-scFv 100 µg/mL + LDLn	127	0.18
MCMN-scFv 200 µg/mL + LDLn	216	0.19
MCMN-scFv 500 µg/mL + LDLn	434	0.20

4.4 - Ensaios celulares:

4.4.1 - Ensaio de viabilidade celular por MTT

A análise da viabilidade celular para as nanocápsulas MN, as nanocápsulas MCMN, o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv foi fundamental para a triagem das concentrações possíveis de serem utilizadas nos ensaios *in vitro* da captação de LDL(-) e formação de células espumosas.

Nos ensaios de viabilidade celular realizados, tanto as nanocápsulas MN (Figura 16A) quanto as nanocápsulas MCMN (figura 16B), não demonstraram diminuição na viabilidade celular ($p>0,05$) de macrófagos da linhagem RAW 264.7 em quaisquer das concentrações testadas, qualificando-as para serem utilizadas nos ensaios de captação e demonstrando que, provavelmente, também não devem causar prejuízo às células dos animais que serão utilizados em etapas posteriores desse estudo.

Figura 16: Efeito dos tratamentos com nanocápsulas MN (A) e MCMN (B) sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7. Gráfico representando a porcentagem de células viáveis, a partir de ensaio de MTT, utilizando nanocápsulas MN e MCMN em macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas com diferentes concentrações de solução contendo nanocápsulas MN e MCMN por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de viabilidade $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; Veículo PBS 1X; 10^9 partículas/mL; 5×10^8 partículas/mL; 25×10^7 partículas/mL; 125×10^6 partículas/mL; $62,5 \times 10^6$ partículas/mL; $31,25 \times 10^6$ partículas/mL; 156×10^5

partículas/mL; 78×10^5 partículas/mL; e 39×10^5 partículas/mL ($p > 0,05$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Quanto aos ensaios realizados com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, as concentrações acima de 6,25 µg/mL demonstraram diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular (Figura 17A) em macrófagos RAW 264.7 em relação ao controle sem qualquer tratamento. Nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL foram evidenciadas reduções ($p < 0,001$) de aproximadamente 45%, 35% e 25%, respectivamente, da viabilidade celular. Na concentração de 12,5 µg/mL, a redução ($p < 0,01$) de células viáveis mostrou-se em torno de 20%.

Os ensaios com células tratadas com diversas concentrações da formulação NC-scFv (Figura 17B) também apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular, especificamente nas concentrações 200 µg/mL e 100 µg/mL, com viabilidade celular média 20% abaixo ($p < 0,001$) dos valores encontrados para o controle, e na concentração 50 µg/mL, apresentando 10% de diferença em relação aos dois grupos anteriores ($p < 0,05$). Para concentrações abaixo de 25 µg/mL, os resultados demonstraram uma viabilidade celular muito semelhante à obtida pelos poços contendo células controle e sem tratamento ($p > 0,05$).

Figura 17: Efeito dos tratamentos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e da formulação NC-scFv (B) sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7. Gráfico representando a porcentagem de células viáveis, a partir de ensaio de MTT, utilizando scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução

e da formulação NC-scFv em macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas com diferentes concentrações de solução contendo nanocápsulas scFv 2C7 anti-LDL(-) e formulação NC-scFv por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de viabilidade $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; Veículo PBS 1X; 100 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 $\mu\text{g/mL}$; 1,562 $\mu\text{g/mL}$; 0,781 $\mu\text{g/mL}$; e 0,390 $\mu\text{g/mL}$. (***) significância estatística com $p < 0,001$; ** significância estatística com $p < 0,01$; * significância com $p < 0,05$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Os ensaios de MTT realizados na linhagem HUVEC com as nanocápsulas MN e MCMN também resultaram em dados bastante satisfatórios, não tendo apresentado em ambas as situações qualquer perda significativa de viabilidade celular, o que pode ser evidenciado nas figuras 18A (nanocápsulas MN) e 18B (nanocápsulas MCMN).

Figura 18: Efeito dos tratamentos com nanocápsulas MN (A) e MCMN (B) sobre a viabilidade celular de células da linhagem HUVEC. Gráfico representando a porcentagem de células viáveis, a partir de ensaio de MTT, utilizando nanocápsulas MN e MCMN em células da linhagem HUVEC. As células foram incubadas com diferentes concentrações de solução contendo nanocápsulas MN e MCMN por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de viabilidade $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; Veículo PBS 1X; 10^9 partículas/mL; 5×10^8 partículas/mL; 25×10^7 partículas/mL; 125×10^6 partículas/mL; $62,5 \times 10^6$ partículas/mL; $31,25 \times 10^6$ partículas/mL; 156×10^5 partículas/mL; 78×10^5 partículas/mL; e 39×10^5 partículas/mL ($p > 0,05$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

As células da linhagem HUVEC tratadas com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (Figura 19A) e formulação NC-scFv (Figura 19B) apresentaram um perfil de viabilidade semelhante ao encontrado para a linhagem RAW 264.7, onde ambos os tratamentos mostraram interferir de forma negativa sobre esse parâmetro em concentrações superiores a 6,25 µg/mL ($p < 0,001$).

Figura 19: Efeito dos tratamentos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e da formulação NC-scFv (B) sobre a viabilidade celular de células da linhagem HUVEC. Gráfico representando a porcentagem de células viáveis, a partir de ensaio de MTT, utilizando scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv em células da linhagem HUVEC. As células foram incubadas com diferentes concentrações de solução contendo nanocápsulas scFv 2C7 anti-LDL(-) e formulação NC-scFv por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de viabilidade $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; Veículo PBS 1X; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,562 µg/mL; 0,781 µg/mL; e 0,390 µg/mL. (***) significância estatística com $p < 0,001$. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Os dados demonstraram que a utilização das nanocápsulas MN e MCMN mesmo nas concentrações mais altas, não causou dano celular em ambas as linhagens. No entanto, para assegurar a viabilidade celular, utilizou-se concentrações abaixo de 6,25 µg/mL do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv em todos os ensaios *in vitro* envolvendo células da linhagem HUVEC e macrófagos da linhagem RAW 264.7.

4.4.2 – Ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo

A fim de confirmar as concentrações máximas dos quatro tratamentos em questão (nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv) que podem ser utilizadas em estudos *in vitro*, foram realizados ensaios de citometria de fluxo, por sua maior sensibilidade e por fornecer dados específicos sobre os tipos de morte celular envolvidos.

4.4.2.1 – Apoptose e Necrose:

Na figura 20, podem ser observados exemplos de *dot plots* obtidos nos ensaios realizados, onde são visualizadas as células viáveis (quadrante inferior esquerdo), as células em apoptose (quadrante superior esquerdo), as células em necrose (quadrante inferior direito) e as células em apoptose tardia (quadrante superior direito).

Figura 20: Avaliação da morte celular por apoptose e necrose em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv. 1 x 10⁵ macrófagos RAW 264.7/poço foram tratados com DMSO 5%, 10⁹ nanocápsulas MN/mL (Q1), 10⁹ nanocápsulas MCMN/mL (Z1), 100 µg /mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em

solução (S1) e 100 µg /mL de NC-scFv (C1) formado por scFv e nanocápsulas MCMN em placas de cultura de 48 poços. Foi utilizado um kit de apoptose e necrose para avaliar o mecanismo de morte celular, já evidenciado anteriormente em ensaio com MTT. Foram utilizados Anexina V para a detecção de apoptose e Iodeto de Propídeo para a observação de necrose. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata.

Os dados referentes aos ensaios de determinação da viabilidade celular por citometria de fluxo estão apresentados na forma de % de morte celular.

Em relação aos macrófagos RAW (Figura 21A) e a linhagem HUVEC (Figura 21B), as nanocápsulas MN não exerceram qualquer influência ($p>0,05$) sobre sua viabilidade, como esperado, uma vez que sua composição não indica possibilidade de causar prejuízo às células. O mesmo foi observado quanto às nanocápsulas MCMN (figura 22), não apresentando qualquer alteração ($p>0,05$) na viabilidade celular de ambas as linhagens. Em ambos os casos, apenas o controle positivo de morte celular (DMSO 5%) apresentou significância em relação ao controle ($p<0,001$).

Figura 21: Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com nanocápsulas MN. 1×10^5 macrófagos RAW 264.7 e HUVEC/poço foram tratados com DMSO 5% e variadas concentrações de nanocápsulas MN em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; DMSO 5%; 10^9 partículas/mL; 10^8 partículas/mL; 10^7 partículas/mL; 10^6

partículas/mL; 10^5 partículas/mL; 10^4 partículas/mL. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata (***) significância estatística com $p < 0,001$).

Figura 22: Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com nanocápsulas MCMN. 1×10^5 macrófagos RAW 264.7 e HUVEC/poço foram tratados com DMSO 5% e variadas concentrações de nanocápsulas MCMN em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; DMSO 5%; 10^9 partículas/mL; 10^8 partículas/mL; 10^7 partículas/mL; 10^6 partículas/mL; 10^5 partículas/mL; 10^4 partículas/mL. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata (***) significância estatística com $p < 0,001$).

Quanto ao scFv (figura 23), concentrações superiores a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ tiveram significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle, demonstrando uma variação de 50 a 30% de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em relação ao controle de macrófagos, o que não ocorreu em relação do controle de HUVEC.

A formulação NC-scFv (figura 24), por sua vez, que demonstrou valores menores que 15% de morte celular na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de MTT, apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em quase todas as concentrações em relação ao controle de macrófagos RAW 264.7, com exceção das concentrações 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$ ($p > 0,05$).

Na linhagem HUVEC, tanto o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução quanto a formulação NC-scFv não proporcionaram qualquer tipo de morte celular estatisticamente significativa em relação ao controle em nenhuma das concentrações testadas ($p>0,05$), fato que contrariou os resultados obtidos por MTT e que torna sua utilização favorável. Uma vez que não interferem na viabilidade de HUVEC, podem ser administradas em animais sem causar prejuízo ao endotélio. Por outro lado, sua capacidade de diminuição da viabilidade de macrófagos indica uma possível ferramenta de auxílio terapêutico no contexto da aterosclerose.

Figura 23: Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução. 1×10^5 macrófagos RAW 264.7 e HUVEC/poço foram tratados com DMSO 5% e variadas concentrações de scFv 2C7 anti-LDL(-) em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; Veículo PBS 1X; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,562 µg/mL; 0,781 µg/mL; e 0,390 µg/mL. (***) significância estatística com $p<0,001$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Figura 24: Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (A) e células da linhagem HUVEC (B) tratados com a formulação NC-scFv. 1×10^5 macrófagos RAW 264.7 e HUVEC/poço foram tratados com DMSO 5% e variadas concentrações de da formulação NC-scFv em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; Veículo PBS 1X; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,562 µg/mL; 0,781 µg/mL; e 0,390 µg/mL. (***) significância estatística com $p < 0,001$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Vale ressaltar que o fato de o controle de células na linhagem de macrófagos RAW 264.7 apresentar uma porcentagem média de morte celular de $24,50 \pm 3,55$ nos levou a questionar sobre a padronização do experimento e a possibilidade de realizá-lo em placas de 24 poços. Neste experimento observamos que os poços correspondentes ao controle apresentaram uma menor viabilidade celular ($38,5 \pm 4,2$) comparada àquela encontrada nos outros testes e, dessa forma, os grupos tratados demonstraram pouca significância em relação a esse controle, mas permaneceram com porcentagens de viabilidade celular semelhantes às encontrados nos ensaios anteriores (Figura 25).

Figura 25: Avaliação da morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) de macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução: 1×10^5 macrófagos RAW 264.7/poço foram tratados com DMSO 5% e com quatro concentrações (diluições seriadas) de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, a partir de uma solução inicial de 50 µg/mL em placas de cultura de 24 poços de acordo com o protocolo já descrito. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata. Os gráficos representam a % de morte celular (apoptose + apoptose tardia + necrose) observada (***) significância estatística com $p < 0,001$.

4.4.2.2 – Autofagia:

Nesse experimento qualitativo foi fundamental a observação do quadrante 2, superior direito, uma vez que a presença de autofagia é apresentada nesse espaço. Na figura 26 podem ser observados os *dot plots* obtidos em um dos ensaios com macrófagos da linhagem RAW 264.7, onde se pode acompanhar o perfil apresentado pelas células dos grupos tratados em relação do apresentado pelas células do grupo controle (sem tratamento).

Figura 26: Avaliação da autofagia em macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv: 1×10^5 macrófagos RAW 264.7/poço foram tratados com 10 nM de Bafilomicina, tampão Krebs

Ringer, concentrações diversas de soluções de nanocápsulas MN (10^8 - 10^4 partículas/mL), nanocápsulas MCMN (10^8 - 10^4 partículas/mL), 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) e 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv em placas de cultura de 48 poços. Nesta representação gráfica estão demonstrados os dot plots relativos ao grupos: controle sem tratamento, controle com tampão Krebs-Ringer, controle com Bafilomicina, 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MN, 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN, 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e 6,25 µg/mL de formulação NC-scFv. Os dados resultam de um experimento apenas.

Neste estudo, os dados sugeriram (Figura 27) que aparentemente ambas as nanocápsulas utilizadas em macrófagos RAW 264.7 não interferiram no processo de autofagia, seja induzindo ou inibindo-o. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (Figura 28A) pareceu atuar na inibição do processo de autofagia em relação ao controle sem tratamento, assim como a formulação NC-scFv (Figura 28B), em praticamente todas as concentrações testadas. Observou-se ainda que a inibição do processo autofágico foi diretamente proporcional à concentração testada, ou seja, quanto menor a concentração utilizada, menor a inibição do mecanismo de morte celular. No entanto, em ambas as situações, a concentração 6,25 µg/mL não demonstrou exercer qualquer efeito sobre as células. O controle positivo, tampão de Krebs-Ringer, não foi capaz de induzir a autofagia da forma esperada. No entanto, o controle mais relevante para esse experimento qualitativo é o controle de células sem tratamento, onde o perfil de morte por autofagia da célula pode ser utilizado como padrão em relação a qualquer tratamento utilizado. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

Figura 27: Avaliação da autofagia em macrófagos RAW 264.7 tratados 24 horas com nanocápsulas MN (A) e nanocápsulas MCMN (B). 1×10^5 macrófagos RAW 264.7/poço foram tratados com 10 nm de Bafilomicina, tampão Krebs-Ringer e variadas concentrações de nanocápsulas MN e MCMN em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata. Cada coluna representa porcentagem de autofagia $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; 10 nm Bafilomicina; tampão Krebs-Ringer; 10^8 partículas/mL; 10^7 partículas/mL; 10^6 partículas/mL; 10^5 partículas/mL; 10^4 partículas/mL. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata (***) significância estatística com $p < 0,001$).

Figura 28: Avaliação da autofagia em macrófagos RAW 264.7 tratados 24 horas com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e formulação NC-scFv (B). 1×10^5 macrófagos RAW 264.7/poço foram tratados com 10 nm de Bafilomicina, tampão Krebs-Ringer e variadas concentrações de nanocápsulas scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv em placas de cultura de 48 poços por 24

horas. Cada coluna representa porcentagem de autofagia $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; 10 nm Bafilomicina; tampão Krebs-Ringer; 100 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (***) significância estatística com $p < 0,001$; ** significância estatística com $p < 0,01$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Na linhagem de células HUVEC, ambas as nanocápsulas MN e MCMN apresentaram perfil muito semelhante (Figura 29) ao observado diante dos macrófagos RAW 264.7 em relação ao controle de células sem tratamento, sem proporcionar alterações na porcentagem de células em processo autofágico. No entanto, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução apresentou resultados (Figura 30A) bem distintos, onde mesmo em concentrações mais elevadas não acarretou em aumento ou inibição de autofagia, o que se mostra mais uma vez benéfico à sua administração em animais sem causar prejuízo ao endotélio. Já os resultados obtidos a partir do tratamento com a formulação NC-scFv (Figura 30B) sugerem um aumento na inibição de autofagia, comparável ao controle de Bafilomicina, nas concentrações 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Para concentrações a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ não foi evidenciada qualquer alteração no perfil de autofagia sobre a linhagem HUVEC.

Figura 29: Avaliação da autofagia em células da linhagem HUVEC tratadas 24 horas com nanocápsulas MN (A) e nanocápsulas MCMN (B). 1×10^5 células/poço da linhagem HUVEC foram tratadas com 10 nm de Bafilomicina, tampão Krebs-Ringer e variadas concentrações de nanocápsulas MN e MCMN em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata. Cada coluna representa porcentagem de autofagia $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; 10 nm Bafilomicina; tampão Krebs-Ringer; 10^8 partículas/mL; 10^7

partículas/mL; 10^6 partículas/mL; 10^5 partículas/mL; 10^4 partículas/mL. Foram realizados 3 ensaios independentes em duplicata (** significância estatística com $p < 0,001$).

Figura 30: Avaliação da autofagia em células da linhagem HUVEC tratadas 24 horas com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (A) e formulação NC-scFv (B). 1×10^5 células/poço da linhagem HUVEC foram tratadas com 10 nm de Bafilomicina, tampão Krebs-Ringer e variadas concentrações de nanocápsulas scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv em placas de cultura de 48 poços por 24 horas. Cada coluna representa porcentagem de autofagia $\pm$ desvio-padrão. Amostras: Controle sem tratamento; 10 nm Bafilomicina; tampão Krebs-Ringer; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL (** significância estatística com $p < 0,001$; ** significância estatística com $p < 0,01$). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

4.4.2.3 – Ciclo celular:

Diante dos resultados observados, tanto nos ensaios de viabilidade celular por MTT quanto nos ensaios de apoptose, necrose e autofagia, foram selecionadas as seguintes concentrações dos devidos tratamentos para posteriores trabalhos com ambas as linhagens celulares abordadas neste estudo: 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MN e de nanocápsulas MCMN e 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv. No caso das nanocápsulas, todas as concentrações testadas não mostraram qualquer interferência nos ensaios. A concentração de 10^4 partículas/mL foi escolhida para ser utilizada em ensaios futuros, uma vez que corresponde ao número aproximado de nanopartículas existentes em 6,25 µg/mL da formulação NC-scFv. Para o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv, por outro lado, a concentração 6,25 µg/mL foi determinada

como a concentração máxima possível de ser utilizada sem ocasionar os fenômenos estudados nos itens anteriores. Optou-se por utilizar a mesma concentração de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv para uma possível comparação dos seus efeitos observados.

Após o tratamento de 2×10^5 macrófagos RAW 264.7 e células da linhagem HUVEC por poço, com concentrações específicas pré-determinadas de nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv, observou-se que nenhum dos tratamentos exerceu influência sobre o ciclo celular em macrófagos RAW 264.7 (Figura 31) e na linhagem HUVEC (Figura 32).

Figura 31: Avaliação do ciclo celular em macrófagos RAW 264.7 após 24 horas de tratamento com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv: 2×10^5 macrófagos RAW 264.7/poço foram tratados com 10^4 partícula/mL de nanocápsulas MN, 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN, 6,25 μ g/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e 6,25 μ g/mL de formulação NC-scFv em placas de cultura de 6 poços. Cada coluna representa porcentagem células $\pm$ desvio-padrão. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata ($p > 0,05$).

Figura 32: Avaliação do ciclo celular em células da linhagem HUVEC após 24 horas de tratamento com nanocápsulas MN, nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv: 2×10^5 células/poço foram tratadas com 10^4 partícula/mL de nanocápsulas MN, 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN, 6,25 μ g/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e 6,25 μ g/mL de formulação NC-scFv em placas de cultura de 6 poços. Cada coluna representa porcentagem células $\pm$ desvio-padrão. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata ($p > 0,05$).

4.4.3 – Avaliação da captação de LDL(-) e da formação de células espumosas:

Os ensaios de captação de LDL(-) objetivaram a visualização da redução da captação dessa fração da lipoproteína de baixa densidade por macrófagos RAW 264.7 na presença de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv, uma vez que o scFv reconheceria a LDL(-) e diminuiria, assim, sua internalização pelos macrófagos.

Nos ensaios de captação de LDL(-) utilizando as concentrações pré-determinadas no item 4.4.2 desta seção, as nanocápsulas MCMN, utilizadas como controle referente à formulação NC-scFv, não ocasionaram qualquer alteração na captação de LDL(-), o que era esperado, uma vez que essas partículas não têm como função exercer qualquer efeito sobre as células. Houve, no entanto, uma redução na formação de células espumosas no tratamento das células com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução. Foi avaliada também a formação de células espumosas em macrófagos RAW 264.7 tratados com a formulação NC-scFv. No entanto, foram obtidos dados

bem distintos do esperado e surpreendentemente interessantes e promissores, uma vez que os macrófagos aparentemente internalizaram o complexo formado por NC-scFv-LDL(-). Essa internalização sugere que as nanocápsulas MCMN, uma vez conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-), propiciaram um direcionamento do scFv à LDL(-) mesmo após a internalização da lipoproteína pelos macrófagos, abrindo um leque de questionamentos sobre a natureza do mecanismo de entrada desse complexo nos macrófagos.

Nas figuras 33 e 34 podem ser observados os grupos : controle, LDLn, LDL(-), nanocápsulas MCMN e scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e suas combinações. A observação das células espumosas formadas após o tratamento com a formulação NC-scFv podem ser visualizadas na Figura 35.

As células tratadas com adição de LPS em todos os grupos testados apresentaram resultados visualmente muito semelhantes aos descritos acima (Figura 36).

Controle sem tratamento

37,5 µg/mL LDLn

37,5 µg/mL LDL(-)

Figura 33: Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com LDLn e LDL(-). Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados sem tratamento (A), tratados com 37,5 µg/mL de LDLn (B) e LDL(-) (C) em combinações citadas no topo das imagens. As células foram coradas por Oil Red O e as imagens capturadas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas em objetiva com aumento de 20 X.

10^4 partículas/mL Nanocápsulas MCMN

10^4 partículas/mL Nanocápsulas MCMN + 37,5 μ g/mL LDL(-)

6,25 μ g/mL scFv

6,25 μ g/mL scFv +37,5 μ g/mL LDL(-)

Figura 34: Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com nanocápsulas MCMN e scfv 2C7 anti-LDL(-) em solução. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN (A), 6,25 μ g/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (C) em combinações com 37,5 μ g/mL de LDL(-) (B e D) citadas no topo das imagens. As células foram coradas por Oil Red O e as imagens capturadas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas em objetiva com aumento de 20 X.

Figura 35: Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com a formulação NC-scFv. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de formulação Nc-scFv (A) e combinada à 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de DL(-) (B), em combinações citadas no topo das imagens. As células foram coradas por Oil Red O e as imagens capturadas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas em objetiva com aumento de 20 X e 40X na imagem C.

Figura 36: Ensaio de captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS, LDL(-), nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e formulação NC-scFv. Macrófagos RAW

264.7 foram tratados com 1,0 µg/mL de LPS e 37,5 µg/mL de LDL(-) com os seguintes tratamentos: 10⁴ partículas/mL de nanocápsulas MCMN (C), 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (D), 6,25 µg/mL de formulação Nc-scFv (E), em combinações citadas no topo das imagens. As células foram coradas por Oil Red O e as imagens capturadas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas em objetiva com aumento de 20 X.

4.4.4 – Avaliação da fagocitose *in vitro* com Citocalasina D:

De acordo com o observado (Figuras 37 e 38), a presença de 20 µM de Citocalasina D interferiu na morfologia do macrófago mesmo em poços sem qualquer tipo de tratamento, uma vez que atua sobre os microfilamentos de actina do citoesqueleto.

Os macrófagos tratados com LDLn não formaram células espumosas na ausência e na presença da Citocalasina D, conforme o esperado. A captação de LDL(-) foi mantida em ambos os casos, demonstrando que a entrada da LDL(-) é mediada por receptores específicos e não por um processo inespecífico de fagocitose. Essa captação foi observada nas células tratadas com as nanocápsulas MCMN e com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, apresentando, visualmente, intensidade semelhante entre os poços tratados com Citocalasina D ou não. O tratamento com scFv demonstrou uma menor intensidade de captação de LDL(-) quando comparado ao controle de LDL(-). Ao observarmos as células tratadas com a formulação NC-scFv, aparentemente a captação vista nos experimentos demonstrados no item 4.4.3 desta seção foi mantida, indicando que o processo de internalização de NC-scFv ligado à LDL(-) não foi afetado.

Controle sem tratamento

37,5 µg/mL LDLn

37,5 µg/mL LDL (-)

20 µM Citocalasina D

**37,5 µg/mL nLDL + 20 µM
Citocalasina D**

**37,5 µg/mL LDL (-) + 20 µM
Citocalasina D**

Figura 37: Ensaio de fagocitose por captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com Citocalasina D, LDLn e LDL(-). Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 20 µM de

Citocalasina D, 37,5 µg/mL de LDLn (C e D) e 37,5 µg/mL LDL(-) (E e F) em combinações citadas no topo das imagens. As células foram coradas por Oil Red O e as imagens capturadas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas em objetiva com aumento de 20 X.

10⁴ part/mL MCMN + LDL(-)

10⁴ part/mL MCMN + 37,5 µg/mL LDL(-) + 20 µM Citocalasina D

6,25 µg/mL scFv + 37,5 µg/mL LDL(-)

6,25 µg/mL scFv + 37,5 µg/mL LDL(-) + 20 µM Citocalasina D

6,25 µg/mL NC-scFv + 37,5 µg/mL LDL(-)

6,25 µg/mL NC-scFv + 37,5 µg/mL LDL(-) + 20 µM Citocalasina D

Figura 38: Ensaio de fagocitose por captação de LDL(-) em macrófagos RAW 264.7 tratados com Citocalasina D, LDL(-), nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e

formulação NC-scFv. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 20 μ M de Citocalasina D, 37,5 μ g/mL de LDLn (C e D) e 37,5 μ g/mL LDL(-) (E e F), com os seguintes tratamentos: 10^4 partículas/mL de nanocápsulas MCMN (A e B), 6,25 μ g/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (C e D), 6,25 μ g/mL de formulação Nc-scFv (E e F) em combinações citadas no topo das imagens. As células foram coradas por Oil Red O e as imagens capturadas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas em objetiva com aumento de 20 X.

4.5 – Avaliação da toxicidade *in vivo*:

Os estudos de toxicidade aguda realizados em camundongos demonstraram que nenhum dos parâmetros de sinais e sintomas, determinados pela OECD nº 423, de 17 de Dezembro de 2001, foi observado durante 48 horas após a administração dos tratamentos analisados e ao final do experimento não houve óbito em qualquer um dos 30 animais divididos em 10 grupos. Diante desses fatores, todos os animais permaneceram recebendo doses semanais dos tratamentos em questão.

O sangue coletado dos animais após 48 horas da administração da primeira dose das diferentes soluções testadas e após 48 da administração da quarta dose, foi processado para separação do soro, que foi utilizado para a determinação das enzimas hepáticas ALT e AST. Por tratar-se de camundongos, foi obtida uma quantidade muito reduzida de soro ao final das separações. Assim, foi necessário juntar o material dos animais dentro de cada grupo testado, formando um pool, para a realização das quantificações desejadas. O resultado das determinações pode ser observado nas Figuras 39 (ALT) e 40 (AST).

Figura 39: Determinação de ALT após administração da 1ª e da 4ª dose de concentrações variadas de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv. Grupos: 1- Controle; 2- Veículo PBS; 3-

scFv 2,5 mg/Kg; 4- scFv 5 mg/Kg; 5- scFv 10 mg/Kg; 6- scFv 25 mg/Kg; 7- NC-scFv 2,5 mg/Kg; 8- NC-scFv 5 mg/Kg; 9- NC-scFv 10 mg/Kg; 10- NC-scFv 25 mg/Kg. As colunas correspondentes ao número 1 indicam a determinação através do soro obtido 48 horas após a primeira administração dos tratamentos. As colunas correspondentes ao número 2 indicam a determinação através do soro obtido 48 horas após a quarta e última administração.

Figura 40: Determinação de AST após administração da 1ª e da 4ª dose de concentrações variadas de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv. Grupos: 1- Controle; 2- Veículo PBS; 3- scFv 2,5 mg/Kg; 4- scFv 5 mg/Kg; 5- scFv 10 mg/Kg; 6- scFv 25 mg/Kg; 7- NC-scFv 2,5 mg/Kg; 8- NC-scFv 5 mg/Kg; 9- NC-scFv 10 mg/Kg; 10- NC-scFv 25 mg/Kg. As colunas correspondentes ao número 1 indicam a determinação através do soro obtido 48 horas após a primeira administração dos tratamentos. As colunas correspondentes ao número 2 indicam a determinação através do soro obtido 48 horas após a quarta e última administração.

Quanto à avaliação das enzimas hepáticas, os dados sugerem que, 48 horas após a primeira administração do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv nas doses testadas, não houve dano hepático em nenhum dos 30 animais, independentemente do grupo ao qual pertencia. Não foram observadas alterações das atividades enzimáticas em relação aos valores normais de ambas as enzimas para camundongos (AST = $196 \pm 132,6$; ALT = $99 \pm 86,3$) (Laptick et al., 2009).

No entanto, foram observados aumentos relevantes da primeira para a última dose administradas nas avaliações de ambas as enzimas. De acordo com os valores normais de ambas as enzimas para camundongos, observa-se que a maioria dos grupos aparentemente não teve alteração em sua função hepática, com exceção do

grupo que recebeu 25 mg/Kg de formulação NC-scFv, mostrando-se fora dos valores de referência encontrados na literatura.

Mesmo não sendo uma exigência das diretrizes seguidas da OECD n° 423, foram obtidas imagens (Figura 41) a partir dos cortes histológicos dos fígados dos animais e analisadas por um observador independente.

Figura 41: Análise histopatológica de cortes hepáticos obtidos em ensaio de toxicidade animal. A toxicidade foi determinada a partir da administração de diferentes doses das soluções em questão,

por via intravenosa em grupos de 3 animais. Cortes aleatórios de 5 µm do fígado dos animais foram corados com Hematoxilina (Sigma) e Eosina (Sigma). Os cortes foram observados em microscópio óptico Nikon e as imagens obtidas pelo programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10.

As análises demonstraram que nos animais do grupo controle, ou seja, que não receberam qualquer tratamento, não houve indicação da existência de dano ou lesão celular hepática. No entanto, todos os animais dos outros 9 grupos apresentaram regiões com infiltrado inflamatório, atingindo apenas uma pequena porção do fígado. Além disso, pelo menos um animal de cada grupo apresentou a formação de gotículas de lipídios. Um animal do grupo Veículo PBS apresentou hepatite difusa e necrose, tendo sido essa última característica encontrada também em animais dos grupos scFv 10 mg/Kg e NC-scFv 10 mg/Kg. Apenas um animal, dos 30 analisados, apresentou um grau severo de comprometimento hepático (grupo scFv 25 mg/Kg). Os dados podem ser melhor visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Descrição da análise histopatológica do fígado de animais submetidos ao protocolo de toxicidade animal.

Grupo	Proporção hepática afetada	Descrição
Controle	Nenhuma	Normal.
Controle	Nenhuma	Normal.
Controle	Nenhuma	Normal.
Veículo	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
Veículo	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
Veículo	Marcante	Presença de infiltrado inflamatório, hepatite difusa, necrose.
scFv 2,5 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
scFv 2,5 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
scFv 2,5 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
scFv 5,0 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
scFv 5,0 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
scFv 5,0 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.

scFv 10 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
scFv 10 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório, necrose.
scFv 10 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório, necrose.
scFv 25 mg/Kg	Severa	Esteatose hepática, alteração dos hepatócitos, apoptose.
scFv 25 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
scFv 25 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 2,5 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 2,5 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 2,5 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 5,0 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 5,0 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 5,0 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 10 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 10 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório, necrose.
NC- scFv 10 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 25 mg/Kg	Pequena	Presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 25 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.
NC- scFv 25 mg/Kg	Pequena	Gotículas de lipídios citoplasmáticas, presença de infiltrado inflamatório.

4.6 – Análise do efeito da imunização passiva de camundongos com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e com NC-scFv:

4.6.1 – Controle de peso e consumo de ração

Na Tabela 6 estão demonstrados os pesos médios inicial, dia 0 do protocolo, e final, dia 28 do protocolo, dos animais submetidos à imunização passiva em protocolo de lesão inicial. Na tabela 7, são demonstrados os dados de consumo médio semanal

de ração hipercolesterolêmica (g de ração/animal). Não houve qualquer diferença estatística tanto do peso médio quanto do consumo semanal de ração entre os grupos testados. No entanto, observou-se uma tendência à perda de peso durante o protocolo, após a introdução da dieta hipercolesterolêmica.

Tabela 6: Controle de peso médio dos camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial ao início e ao fim dos 28 dias, divididos por grupos de tratamento.

Grupo	Peso médio Inicial	Peso médio Final
Controle (PBS)	28,89 ± 2,14	25,78 ± 1,69
Nanocápsulas MCMN	28,69 ± 2,62	25,63 ± 2,58
scFv 2C7 anti-LDL(-)	28,43 ± 1,65	24,43 ± 1,53
NC-scFv	27,30 ± 1,91	24,44 ± 1,98
Indometacina	28,50 ± 1,77	24,30 ± 2,36

Pesos médios inicial e final de camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial para avaliação do efeito da imunização passiva com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv, divididos nos grupos de tratamento (Controle PBS, Nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, NC-scFv e Indometacina. Os dados são apresentados na forma de média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Tabela 7: Controle do consumo médio semanal de ração pelos camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento.

Grupo	Consumo médio semanal de ração
Controle (PBS)	17,1477 ± 0,99
Nanocápsulas MCMN	15,2596 ± 0,65
scFv 2C7 anti-LDL(-)	15,6675 ± 0,52
NC-scFv	16,2993 ± 0,96
Indometacina	17,4554 ± 3,93

Consumo de ração médio por camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial para avaliação do efeito da imunização passiva com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv, divididos nos grupos de tratamento (Controle PBS, Nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, NC-scFv e Indometacina. Os dados são apresentados na forma de média e desvio padrão ($p > 0,05$).

4.6.2 – Determinação bioquímica do perfil lipídico e hepático

A determinação bioquímica do perfil lipídico e das enzimas hepáticas também não demonstrou qualquer diferença significativa entre os grupos e o controle. A tabela 8 apresenta esses dados do perfil lipídico e a tabela 9 os dados das enzimas hepáticas, onde se pode observar uma leve tendência do grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) na redução dos valores de todos os testes bioquímicos realizados.

Tabela 8: Determinação bioquímica do perfil lipídico de camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento.

GRUPOS	CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)
CONTROLE (PBS)	1860 ± 283	33,4 ± 7,52	1730 ± 267	474,0 ± 113	94,8 ± 22,7
MCMN	1910 ± 520	28,4 ± 8,57	1790 ± 505	476 ± 118	95,2 ± 23,6
scFv	1630 ± 226	26,3 ± 10,4	1520 ± 209	404 ± 136	80,8 ± 27,1
NC-scFv	2090 ± 295	27,7 ± 5,55	1960 ± 283	532 ± 114	106 ± 23,0
INDO	1710 ± 314	26,3 ± 4,5	1590 ± 295	465 ± 178	93,0 ± 35,6

Perfil lipídico (CT, HDL-C, LDL-C, TG e LDL-C) de camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial para avaliação do efeito da imunização passiva com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv, divididos nos grupos de tratamento (Controle PBS, Nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, NC-scFv e Indometacina. Os dados são apresentados na forma de média e desvio padrão ($p>0,05$).

Tabela 9: Determinação de perfil hepático de camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento.

GRUPOS	AST (U/L)	ALT (U/L)
CONTROLE (PBS)	149 ± 63,9	177 ± 125
MCMN	144 ± 57,5	179 ± 96,2
scFv	125 ± 27,3	101 ± 47,7
NC-scFv	166 ± 47,7	151 ± 71,8
INDO	169 ± 86,3	194 ± 104

Avaliação das enzimas hepáticas (AST e ATL) de camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial para avaliação do efeito da imunização passiva com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e NC-scFv, divididos nos grupos de tratamento (Controle PBS, Nanocápsulas MCMN, scFv 2C7 anti-LDL(-)

em solução, NC-scFv e Indometacina. Os dados são apresentados na forma de média e desvio padrão ($p>0,05$).

4.6.3 – Análise morfométrica e quantificação de lesões ateroscleróticas iniciais:

A análise morfométrica dos cortes histológicos (Figura 42) obtidos a partir de camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados em relação ao grupo controle (Figura 43).

Figura 42: Imagens obtidas a partir da análise morfométrica da área da lesão inicial (μm^2) de camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL: As imunizações foram realizadas durante 4 semanas. Após a primeira imunização os animais receberam dieta normal. Uma semana depois dessa imunização, os animais receberam a segunda dose e passaram a receber a dieta hipercolesterolêmica, aterogênica AIN93G com 0,5% de colesterol, e, em intervalos de uma semana, receberam as doses três e quatro de PBS (Controle) (animal 6), de $2,5 \times 10^{10}$ partículas/Kg das nanocápsulas MCMN (animal 2), de 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (animal 5), de 5 mg/Kg da formulação NC-scFv (animal 1) ou de 1 mg/mL da Indometacina (animal 1). Cortes consecutivos 6 μm de espessura foram coletados em lâminas de microscopia silanizadas e cobertas com uma fina camada de gelatina. Os cortes coletados compreendem a região entre o sinus aórtico e

o início da aorta e foram corados com Oil Red-O (Sigma®) e contra-coradas com Hematoxilina (MBF®) e Light Green (Sigma®). As imagens (objetiva de 10X) foram obtidas em microscópio Nikon acoplado a uma câmera. A captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Axio Vision*® para a obtenção da área das lesões.

Figura 43: Análise morfométrica da área da lesão inicial x 10⁴ (μm²) de camundongos LDLR^{-/-}. Gráfico em colunas representando os grupos de tratamento utilizados na imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-}. Os grupos foram divididos em: Controle (PBS), de 2,5x10¹⁰ partículas/Kg de nanocápsulas MCMN, de 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, 5 mg/Kg da NC-scFv ou de 1 mg/mL da Indometacina. Os cortes foram analisados no programa *Axio Vision* e as áreas obtidas das lesões encontradas foram analisados no programa GraphPad Prisma 5 para Windows Versão 5.04. Os dados estão demonstrados em média e desvio padrão (p>0,05).

No entanto, ao observar diferenças tão marcantes entre as amostras de um mesmo grupo (alto desvio padrão), realizou-se uma análise dos possíveis fatores interferentes do estudo. Uma vez que as condições ambientais existentes foram as mesmas para todos os grupos, assim como a composição e a oferta da ração administrada e o estresse da inoculação dos tratamentos, o único fator encontrado foi a idade dos animais. Como o biotério nos forneceu camundongos com diferenças de aproximadamente um mês de idade entre algumas ninhadas, talvez o fato tenha sido determinante em nosso estudo.

Na tabela 10, pode-se observar essa relação, onde os animais com idade entre 3 e 4 meses, no momento em que iniciamos o tratamento, estão grifados em verde-claro e os animais com idade entre 2 meses e meio e 3 meses não estão grifados. Dentro desse conjunto de informações, foi observado, na maioria dos casos, que animais mais velhos, próximo dos 4 meses de idade, apresentaram um maior acúmulo lipídico na aorta em relação aos animais mais novos, próximo dos 3 meses de idade, dentro de cada grupo individualmente.

Partindo desse pressuposto, a divisão dos animais em dois subgrupos distintos mostrou-se necessária, onde o primeiro subgrupo foi formado por animais de idade entre 3 e 4 meses e o segundo subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses.

Tabela 10: Relação entre área da lesão e idade dos camundongos submetidos à imunização passiva no protocolo de lesão inicial, divididos por grupos de tratamento.

Grupo	Controle (PBS)	Data de Nasc.	MCMN	Data de Nasc.	scFv	Data de Nasc.	NC-scFv	Data de Nasc.	Indometacina	Data de Nasc.
	(uM) ²	Dia/mês	(uM) ²	Dia/mês	(uM) ²	Dia/mês	(uM) ²	Dia/mês	(uM) ²	Dia/mês
	6041073	06/dez	5291873	06/dez	6059109	06/dez	1888949	06/dez	3311425	06/dez
	3997913	06/dez	3004312	13/dez	3664940	13/dez	1597299	13/dez	1091501	20/dez
	3474800	20/dez	2167607	11/jan	1751691	20/dez	1949997	28/dez	1380639	28/dez
	2851555	11/jan	1846359	11/jan	3664940	20/dez	1978695	28/dez	613400	15/jan
	2029786	11/jan	669967	15/jan	912917	11/jan	1227145	23/jan	532639	23/jan
	2181474	15/jan	1308714	15/jan	402613	21/jan	743868	21/jan	275816	15/jan
	1715029	15/jan	1003392	27/jan	947197	23/jan	1533706	23/jan	542128	27/jan
	1110637	27/jan	565024	27/jan	1280209	27/jan	1097857	23/jan	-	15/jan

Dados referentes à data de nascimento dos animais e à área de lesão aterosclerótica divididos por grupo de tratamento.

De acordo com o critério de idade já estabelecido, os resultados foram analisados novamente. Os dados referentes ao subgrupo de animais mais velhos (3 a 4 meses) (Figura 44) não indicaram diferença significativa entre os grupos. No entanto, é observada uma redução de quase metade da área da lesão aterosclerótica no grupo NC-scFv em relação ao grupo controle.

Figura 44: Análise morfométrica da área da lesão inicial x 10⁴ (μm²) de camundongos LDLR^{-/-} (subgrupo de camundongos com idade entre 3 e 4 meses). Gráfico em colunas representando os grupos de tratamento utilizados na imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-} do subgrupo dos animais mais velhos, com idade entre 3 e 4 meses. Os grupos foram divididos em: Controle (PBS), de 2,5x10¹⁰ partículas/Kg de nanocápsulas MCMN, de 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, 5 mg/Kg da NC-scFv ou de 1 mg/mL da Indometacina. Os cortes foram analisados no programa *Axio Vision* e as áreas obtidas das lesões encontradas foram analisados no programa GraphPad Prisma 5 para Windows Versão 5.04. Os dados estão demonstrados em média e desvio padrão (p>0,05).

No grupo dos animais mais novos (2 meses e meio a 3 meses), os grupos scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução (p<0,05) e Indometacina (p<0,05) apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle, como demonstrado na Figura 45.

A redução da área da lesão ocasionada pelo grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução está em acordo aos resultados de diminuição da captação de LDL(-) em macrófagos tratados com o fragmento de anticorpo. A diminuição proporcionada pelo grupo Indometacina já era esperada, uma vez que a Indometacina é um potencial agente antiinflamatório.

Observou-se ainda que os animais mais novos demonstraram áreas de lesão menores (aproximadamente de $50 - 200 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) em relação aos animais mais velhos (aproximadamente de $200 - 400 \times 10^4 \mu\text{m}^2$).

Figura 45: Análise morfométrica da área da lesão inicial $\times 10^4 (\mu\text{m}^2)$ de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ (subgrupo de camundongos com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). Gráfico em colunas representando os grupos de tratamento utilizados na imunização passiva de camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ do subgrupo dos animais mais novos, com idade entre 2 meses e meio e 3 meses. Os grupos foram divididos em: Controle (PBS), de $2,5 \times 10^{10}$ partículas/Kg de nanocápsulas MCMN, de 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, 5 mg/Kg da NC-scFv ou de 1 mg/mL da Indometacina. Os cortes foram analisados no programa *Axio Vision* e as áreas obtidas das lesões encontradas foram analisados no programa GraphPad Prisma 5 para Windows Versão 5.04. Os dados estão demonstrados em média e desvio padrão (* com significância de $p < 0,05$).

Ao analisarmos o grupo NC-scFv, apenas com o grupo controle e o grupo controle positivo (Indometacina), obtivemos diferença significativa no subgrupo dos animais mais novos (Figura 46) ($p < 0,05$) e dos animais mais velhos (Figura 47) ($p < 0,05$) do NC-scFv em relação ao controle, fato que poderia sugerir a obtenção de efeitos benéficos pelos camundongos com o tratamento em questão.

Figura 46: Análise morfométrica da área da lesão inicial x 10⁴ (μm²) de camundongos LDLR^{-/-} do grupo NC-scFv em relação ao controle (subgrupo de camundongos com idade entre 2 meses e meio a 3 meses). Gráfico em colunas representando os grupos de tratamento utilizados na imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-} do subgrupo dos animais mais novos, com idade entre 2 meses e meio e 3 meses. Os grupos foram divididos em: Controle (PBS), de 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, 5 mg/Kg da NC-scFv ou de 1 mg/mL da Indometacina. Os cortes foram analisados no programa *Axio Vision* e as áreas obtidas das lesões encontradas foram analisados no programa GraphPad Prisma 5 para Windows Versão 5.04. Os dados estão demonstrados em média e desvio padrão (* com significância de p<0,05; ** com significância de p<0,01).

Figura 47: Análise morfométrica da área da lesão inicial x 10⁴ (μm²) de camundongos LDLR^{-/-} do grupo NC-scFv em relação ao controle (subgrupo de camundongos com idade entre 3 meses e 4 meses). Gráfico em colunas representando os grupos de tratamento utilizados na imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-} do subgrupo dos animais mais velhos, com idade entre 3 e 4 meses. Os grupos foram divididos em: Controle (PBS), de 5 mg/Kg de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, 5 mg/Kg da NC-scFv ou de 1 mg/mL da Indometacina. Os cortes foram analisados no programa *Axio Vision* e as áreas obtidas das lesões encontradas foram analisados no programa GraphPad Prisma 5 para Windows Versão 5.04. Os dados estão demonstrados em média e desvio padrão (* com significância de p<0,05).

4.6.4 - Avaliação da expressão de RNA mensageiro por RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase) em tempo real:

No processo de extração de RNA, todas as amostras foram consideradas de boa qualidade, apresentando valores próximos a 2 na razão das absorbâncias 260/280 nm, e puderam ser consideradas para o ensaio de PCR em tempo real.

Diante da observação de que a diferença de idade entre os animais exerceu influência sobre os dados obtidos a partir da análise morfométrica das lesões ateroscleróticas, foi decidido manter a divisão dos subgrupos para todas as análises das amostras provenientes do ensaio de imunização passiva. Assim, tanto para a avaliação da expressão de RNAm por RT-qPCR quanto para a quantificação de moléculas de adesão e receptores celulares por imunohistoquímica, a divisão dos

resultados nos subgrupos de animais com 3 a 4 meses de idade e de animais com 2 meses e meio a 3 meses de idade foi mantida. Como, para esse experimento foram utilizados 8 animais de cada grupo, o subgrupo 3 a 4 meses teve um número de 5 amostras por grupo e o grupo com 2 meses e meio a 3 meses teve um número de 3 amostras por grupo.

As figuras 48, 49, 50, 51 e 52 apresentam os resultados do subgrupo 3 a 4 meses de idade da análise de expressão gênica de genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa aterosclerótica. Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) de IL-1 β nos grupos tratados com scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, NC-scFv e Indometacina. O grupo Indometacina foi o único capaz de promover o aumento significativo da expressão de IL-10, citocina antiinflamatória. Não houve alteração na expressão gênica de qualquer outro fator analisado (citocinas pró e antiinflamatórias, metaloproteinases, receptores celulares e moléculas de adesão). No entanto, foi observada uma pequena tendência à diminuição da expressão das citocinas inflamatórias IL-1 α , TNF α e IFN γ pelo grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução quando comparado ao controle. O grupo NC-scFv apresentou tendência semelhante em relação às citocinas IL-1 α e IFN γ em relação ao controle (PBS).

Figura 48: Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR

realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água miliQ estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão (*significância com $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Indometacina; *** significância com $p < 0,001$ em relação ao controle).

Figura 49: Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 50: Avaliação da expressão gênica relativa de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 51: Avaliação da expressão gênica relativa de metaloproteinases e seus inibidores teciduais envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica. (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 52: Avaliação da expressão gênica relativa de moléculas de adesão envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 3 e 4 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p < 0,05$).

As figuras 53, 54, 55, 56 e 57 os resultados do subgrupo 2 meses e meio a 3 meses de idade da análise de expressão gênica de genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa aterosclerótica. Não foi observada qualquer alteração na expressão gênica de nenhum dos fatores analisados. O grupo Indometacina apresentou uma tendência à diminuição da expressão de IL-1 α e IL-1 β e ao aumento de IL-10 em relação ao controle. O grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, NC-scFv demonstrou tendência ao aumento da expressão de IL-6.

É importante destacar que os níveis de expressão demonstrados em todos os ensaios foram, para todos os grupos, consideravelmente baixos, o que pode resultar do tempo decorrido entre a última administração dos tratamentos e a eutanásia dos animais (7 dias). Se os tratamentos alteraram, em algum momento do protocolo de LI,

os níveis de expressão dos fatores analisados, o intervalo pode ter sido determinante para o seu retorno aos valores usuais.

Figura 53: Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 μ L de cDNA, 1,0 μ L da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 μ L de água ultrapura estéril e 12,5 μ L de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 54: Avaliação da expressão gênica relativa de citocinas envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 μ L de cDNA, 1,0 μ L da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 μ L de água ultrapura estéril e 12,5 μ L de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 55: Avaliação da expressão gênica relativa de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 56: Avaliação da expressão gênica relativa de metaloproteinasas e seus inibidores teciduais envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

Figura 57: Avaliação da expressão gênica relativa de moléculas de adesão envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão de lesão aterosclerótica (subgrupo com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). A quantificação dos níveis de expressão gênica foi avaliada por reações de real time PCR realizadas no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando primers específicos. Para investigação dos efeitos sobre a expressão gênica, o protocolo padrão de RT-PCR a seguir foi empregado: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Para este protocolo foram utilizados 0,5 µL de cDNA, 1,0 µL da mistura de um dos pares de primers sense e antisense de cada gene avaliado, 11 µL de água ultrapura estéril e 12,5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems). Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes de real time PCR foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são demonstrados como média e desvio padrão ($p > 0,05$).

4.6.5 – Quantificação por Imunohistoquímica da expressão proteica de moléculas de adesão e receptores celulares presentes na lesão aterosclerótica inicial de camundongos LDLR^{-/-}:

O subgrupo 3 a 4 meses (Figuras 58 e 59) apenas apresentou diferença significativa na diminuição da expressão proteica de CD36 pelo grupo Indometacina ($p < 0,01$), na diminuição de CD14 pelos grupos scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução ($p < 0,01$) e NC-scFv ($p < 0,001$) e na diminuição de TLR-4 pelo grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução ($p < 0,05$), ambos em relação ao controle (Figura 58). O grupo Indometacina demonstrou uma tendência, anteriormente, na diminuição dos níveis de expressão gênica de RNAm de CD36. O grupo scFv 2C7 anti-LDL(-), no entanto, não

apresentou dados semelhantes em relação a CD14 e a TLR-4 ou o grupo NC-scFv em relação a CD14 para essa mesma análise, o que pode ser justificado pela possível influência do intervalo de tempo entre a eutanásia e a administração da última dose dos tratamentos, conforme mencionado no item 4.6.4 desta seção, sobre a expressão de RNAm.

Figura 58: Análise da expressão proteica de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 3 e

4 meses). As amostras (8 corações de cada grupo) foram fixadas, incluídas em parafina e, após diferentes etapas de preparo dos cortes obtidos em micrótomo, foram incubadas com anticorpos primários referentes aos antígenos em questão CD36, CD14, CD40, CD40 ligante e TLR-4 – Abcam] e posteriormente com anticorpo secundário biotilado de coelho para murinos (Abcam). Os cortes foram revelados com DAB 1:50 (DakoCytomation), contra corados em Hematoxilina e submetidos à análise por observador independente. Os cortes foram analisados por microscópio óptico (objetiva de 10x) Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Image J*® Versão 1.46r para Mac (Maryland, EUA) para a quantificação da expressão dos antígenos em questão. Os dados estão apresentados na forma de média da área ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) e desvio padrão (* com significância em $p < 0,05$; ** com significância em $p < 0,01$; *** com significância em $p < 0,001$).

Figura 59: Análise da expressão proteica de moléculas de adesão envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 3 e 4 meses). As amostras (8 corações de cada grupo) foram fixadas, incluídas em parafina e, após diferentes etapas de preparo dos cortes obtidos em micrótomo, foram incubadas com anticorpos primários referentes aos antígenos em questão CD36, CD14, CD40, CD40 ligante e TLR-4 – Abcam] e posteriormente com anticorpo secundário biotilado de coelho para murinos (Abcam). Os cortes foram revelados com DAB 1:50 (DakoCytomation), contra corados em Hematoxilina e submetidos à análise por observador independente. Os cortes foram analisados por microscópio óptico (objetiva de 10x) Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Image J*® Versão 1.46r para Mac (Maryland, EUA) para a quantificação da expressão dos antígenos em questão. Os dados estão apresentados na forma de média da área ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) e desvio padrão ($p > 0,05$).

Em relação ao grupo de animais com idade entre 2 meses e meio e 3 meses, o grupo NC-scFv demonstrou diminuição de expressão proteica significativa em relação ao controle para o receptor CD36 ($p < 0,01$), para o receptor CD14 ($p < 0,001$) e para TLR-4 ($p < 0,001$), assim como o grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução para CD14 ($p < 0,05$) e TLR-4 ($p < 0,05$). Não foi evidenciada qualquer alteração sobre os níveis dos receptores CD40 e CD40 ligante (Figura 60).

Os dados referentes às moléculas de adesão VCAM e PECAM não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados (Figura 61).

Figura 60: Análise da expressão proteica de receptores celulares envolvidos no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 2 meses e meio a 3 meses). As amostras (8 corações de cada grupo) foram fixadas, incluídas em

parafina e, após diferentes etapas de preparo dos cortes obtidos em micrótomo, foram incubadas com anticorpos primários referentes aos antígenos em questão CD36, CD14, CD40, CD40 ligante e TLR-4 – Abcam] e posteriormente com anticorpo secundário biotilado de coelho para murinos (Abcam). Os cortes foram revelados com DAB 1:50 (DakoCytomation), contra corados em Hematoxilina e submetidos à análise por observador independente. Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon (objetiva de 10x) acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Image J*® Versão 1.46r para Mac (Maryland, EUA) para a quantificação da expressão dos antígenos em questão. Os dados estão apresentados na forma de média da área ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) e desvio padrão (* com significância em $p < 0,05$; ** com significância em $p < 0,01$; *** com significância em $p < 0,001$).

Figura 61: Análise da expressão proteica de moléculas de adesão envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica (grupo dos animais com idade entre 2 meses e meio e 3 meses). As amostras (8 corações de cada grupo) foram fixadas, incluídas em parafina e, após diferentes etapas de preparo dos cortes obtidos em micrótomo, foram incubadas com anticorpos primários referentes aos antígenos em questão CD36, CD14, CD40, CD40 ligante e TLR-4 – Abcam] e posteriormente com anticorpo secundário biotilado de coelho para murinos (Abcam). Os cortes foram revelados com DAB 1:50 (DakoCytomation), contra corados em Hematoxilina e submetidos à análise por observador independente. Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon (objetiva de 10x) acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa NIS-Elements AR(tm) version 3.10. Foi utilizado o programa de análise de imagens *Image J*® Versão 1.46r para Mac (Maryland, EUA) para a quantificação da expressão dos

antígenos em questão. Os dados estão apresentados na forma de média da área ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) e desvio padrão ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A aterosclerose é uma doença crônica com envolvimento do sistema imune em resposta a um complexo processo de disfunção endotelial. Seu desenvolvimento e progressão são frequentemente relacionados à presença de lipoproteínas de baixa densidade modificadas, como a LDL eletronegativa.

Tendo em vista a importância da LDL(-) no contexto da aterosclerose e mediante o desenvolvimento de um fragmento de anticorpo (scFv) anti-LDL(-) por nosso grupo (Kazuma, 2010), avaliamos o efeito *in vitro* do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e associado a nanocápsulas sobre a formação de células espumosas e na aterosclerose experimental em camundongos LDLR^{-/-}.

A primeira fase do trabalho foi dedicada à expressão de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução para a realização do estudo. De acordo com alguns autores, a quantidade de proteína recombinante expressa em *Pichia pastoris* pode variar muito, dependendo das condições do processo de fermentação, com rendimento variando desde 1 mg/L até 80 mg/L (Coelho et al., 2007; Tanfous et al., 2006; Wan et al., 2008). Nas condições utilizadas neste trabalho, o maior rendimento obtido no processo fermentativo foi igual 12,42 mg/L de scFv 2C7 anti-LDL(-). A quantidade obtida em todas as fermentações foi suficiente para a realização dos testes *in vitro*, dos testes de conjugação com as nanocápsulas MCMN e dos experimentos *in vivo*.

Demonstramos a identificação do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução, assim como sua pureza e afinidade de ligação à LDL(-), por eletroforese em gel de poliacrilamida, *Western Blot* e ensaios de *Dot Blot* e ELISA, respectivamente. A presença da banda de 35 kDa, adicionalmente à banda de 28 kDa, correspondente ao peso molecular do scFv, já havia sido determinada em estudos anteriores (Kazuma, 2010), sendo proveniente de uma glicosilação da proteína recombinante. Esta glicosilação proporciona o aumento de seu peso molecular por adição de resíduos de manose (Heimo et al., 1998; Sainz-Pastor et al., 2006). A necessidade de separação dessa proteína glicosilada da não-glicosilada decorre da possibilidade de interferência da manose no processo de captação de LDL(-) por macrófagos, uma vez que, de acordo com Ezekowitz et al. (1990), os resíduos de manose adicionados pela própria levedura metilotrófica podem se ligar aos receptores de manose dos macrófagos, proporcionando sua ativação.

Após a produção das nanocápsulas MCMN, realizamos os estudos de conjugação destas com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução. Foi dada atenção especial à padronização da concentração ideal de scFv 2C7 anti-LDL(-) para sua ligação adequada às nanocápsulas MCMN, possibilitando a ligação do maior número possível de moléculas de scFv 2C7 anti-LDL(-) às nanocápsulas MCMN para a obtenção do complexo NC-scFv.

Nesse contexto, constatamos que as partículas da formulação NC-scFv na concentração de 200 µg/mL apresentaram tamanho médio de 178 nm e na concentração de 500 µg/mL, seu tamanho atingiu aproximadamente 446 nm. Uma vez adicionada LDL(-) ao sistema, o tamanho médio das partículas do complexo formado por NC-scFv-LDL(-) aumentou para 490 e 469 nm, respectivamente. Esse resultado sugere a saturação do sistema e a consequente diminuição da ligação de LDL(-) à formulação NC-scFv, por impedimento estérico ocasionado pelo excesso de scFv inserido ao sistema (Bender, 2012). Dessa forma, a concentração de 200 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) foi a mais adequada para formação da formulação NC-scFv.

Dentre os resultados mais significativos, demonstramos a especificidade de ligação da formulação NC-scFv apenas à LDL(-) e não à LDLn, que foi comprovada pela discreta alteração do tamanho médio das nanopartículas NC-scFv, na concentração de 200 µg/mL (178 nm) após adição de LDLn (216 nm) e de LDL(-) (490 nm), separadamente, ao sistema. Esse dado demonstra que, uma vez compondo a formulação NC-scFv, o scFv 2C7 anti-LDL(-) não teve suas características alteradas durante o processo de conjugação, em especial quanto à sua ligação ao epitopo na LDL(-)

É importante esclarecer que o tamanho médio máximo obtido nos sistemas contendo NC-scFv-LDL(-) não ultrapassou 500 nm, não existindo, assim, a possibilidade de formação de aglomerados micrométricos, que poderiam causar danos vasculares e inviabilizar a utilização do complexo NC-scFv em ensaios *in vivo* (Bender, 2012).

Vale ressaltar que a constatação de que os valores do índice de polidispersão mantiveram-se próximos a 0,2 em todos os ensaios realizados evidencia a formação de partículas homogêneas e bem distribuídas quanto à quantidade de scFv 2C7 anti-LDL(-) conjugados à superfície das nanocápsulas.

Uma vez estabelecida a formulação NC-scFv, realizamos estudos de viabilidade celular e de avaliação da presença de autofagia, uma vez que alguns

estudos têm apresentado evidências de que nanopartículas podem atuar sobre a indução de autofagia em diversos tipos de células (Zabirnyk, Yezhelyev & Seleverstov, 2006; Li et al., 2011), propiciando o surgimento de efeitos tóxicos (Chenggang et al., 2009; Lee et al., 2010; Li et al., 2010). Tanto o tamanho reduzido quanto a composição das nanopartículas pode influenciar a ativação da autofagia (Zabirnyk, Yezhelyev & Seleverstov, 2006).

Nossos resultados mostraram que as nanopartículas MN e MCMN não interferiram na viabilidade celular e não promoveram autofagia em relação ao controle. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv não promoveram a diminuição da viabilidade celular quando utilizados em concentrações abaixo de 6,25 µg/mL e demonstraram efeito inibitório sobre a autofagia. Em todas as situações, o mecanismo de autofagia não foi favorecido pelos tratamentos utilizados. Adicionalmente, o ciclo celular não foi afetado, tanto em macrófagos da linhagem RAW 264.7 como em células endoteliais da linhagem HUVEC, pelas nanocápsulas MN e MCMN e pelo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução ou complexado às nanocápsulas.

Esse conjunto de resultados foi determinante para justificar a realização do ensaio *in vitro* de captação de LDL(-) nas concentrações selecionadas, a saber: 10⁴ partículas/mL de nanocápsulas MCMN; 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução; e 6,25 µg/mL da formulação NC-scFv; sem ocasionar danos às células.

Os ensaios de captação de LDL(-) indicaram a existência de um efeito benéfico do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução baseado na constatação da diminuição da captação da lipoproteína modificada, em relação ao controle, em macrófagos tratados com 6,25 µg/mL de scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução. Tal evidência sugere sua utilização como potencial agente na prevenção da formação de células espumosas, evento fundamental no desenvolvimento da doença aterosclerótica.

Adicionalmente, as nanocápsulas MCMN foram qualificadas para serem utilizadas na formação do complexo com o scFv 2C7 anti-LDL(-), uma vez que não apresentaram qualquer atividade sobre a formação de células espumosas. A princípio, os resultados obtidos com a formulação NC-scFv sugeriram que essa formulação poderia favorecer a formação de células espumosas, a partir da visualização de acúmulo intracelular de lipídios em todas as células cultivadas. Com base nessa observação, surgiu o questionamento sobre o mecanismo de internalização de NC-scFv ligado à LDL(-), o que nos levou a investigar o processo

pelo qual este complexo estaria sendo internalizado pelas células, através de um mecanismo de fagocitose ou através de endocitose mediada por receptores.

O mecanismo de endocitose de nanopartículas já é conhecido e decorre de uma simples interação entre estas e a membrana plasmática das células (revisado por Sahay, Alakhova & Kabanov, 2010). A endocitose envolve múltiplas fases, incluindo a formação de endossomos, podendo ser dividida em fagocitose, pinocitose e endocitose mediada por receptores. A fagocitose é realizada por macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas e envolve a internalização de partículas com tamanho superior a 200 nm (Geiser, 2010), por mecanismo dependente de actina (Aderem; Underhill, 1999). A pinocitose, por outro lado, pode ocorrer em todos os tipos de células e está relacionada a internalização de fluidos, envolvendo vias dependentes ou não de clatrina, uma proteína estrutural envolvida no processo de formação de vesículas (Coner & Schmid, 2003). A endocitose mediada por receptores proporciona a absorção seletiva de partículas, que, para serem internalizadas, se ligam a receptores específicos da superfície celular, como os receptores Fc, os receptores de manose e os *scavenger* (Ziello; Huang; Jovin, 2010). No caso das nanopartículas poliméricas, a superfície, geralmente carregada negativamente, pode ser alterada por agentes tensoativos catiônicos e, assim, ter sua entrada e acúmulo facilitados em diversas células (Rappoport, 2008).

O ensaio de captação de LDL(-) realizado na presença de Citocalasina D, que é um inibidor de fagocitose, demonstrou que a formulação NC-scFv ligada à LDL(-) foi internalizada pelos macrófagos, sugerindo que esse processo estaria ocorrendo via receptores específicos. O próximo passo desse estudo será investigar outros possíveis mecanismos de internalização dessas nanopartículas pelos macrófagos.

Os estudos experimentais da aterosclerose para a investigação de novas estratégias terapêuticas são realizados em dois modelos clássicos, que são o camundongo *knockout* para a Apo-E (apoE^{-/-}) e o camundongo *knockout* para o receptor de LDL (LDLR^{-/-}) (Hansson & Libby, 2006). Nestes dois modelos, ocorre o desenvolvimento de hipercolesterolemia e a formação de lesões ateroscleróticas, induzidos por uma dieta rica em colesterol (Dansky et al., 1997; Reardon et al., 2001; Fonteinós et al., 2005; Lutgens et al., 2005; Maatsura et al., 2002). O estudo realizado por Buga et al. (2008) demonstrou tanto o desenvolvimento de aterosclerose, como a presença de disfunção endotelial e de inflamação das arteríolas do cérebro dos camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR^{-/-}). Esses animais apresentam

níveis plasmáticos aumentados de LDL em relação aos animais sem a deleção do alelo do gene do receptor de LDL (Ishibashi et al., 1993). As lesões ateroscleróticas formadas nestes animais apresentam macrófagos contendo acúmulo de lipídios em seu interior, denominados células espumosas (Roselaar et al., 1996). Após 4 semanas de dieta hipercolesterolêmica são observadas lesões iniciais e estrias gordurosas (*The Jackson Laboratory*, 2012). Algumas das características de lesões mais avançadas, contendo centro necrótico e calcificação, só conseguem ser obtidas após tempo prolongado de dieta hipercolesterolêmica maior que 12 semanas (Roselaar et al., 1996).

Antes da avaliação da eficácia do tratamento com a formulação NC-scFv na progressão da aterosclerose nos camundongos LDLR^{-/-}, realizamos o estudo de segurança do seu uso *in vivo*, utilizando os testes de toxicidade aguda de acordo com a OECD nº 423, de 17 de Dezembro de 2001.

Os testes de toxicidade realizados em camundongos LDLR^{-/-} não demonstraram efeitos deletérios, quanto à avaliação de sinais e sintomas ou óbito, durante as 48 horas exigidas pelo protocolo. Quanto à avaliação bioquímica das atividades das enzimas hepáticas ALT e AST, observou-se uma tendência apenas do grupo NC-scFv 25 mg/Kg da elevação de ambas em relação aos níveis séricos normais encontrados em camundongos C57BL/6J, utilizados como fator comparativo diante do fato de não existir um padrão estabelecido para a linhagem C57BL/6J LDLR^{-/-}. Como os resultados são provenientes de um *pool* de soro para cada grupo testado, os valores elevados podem não representar alterações do grupo como um todo. Estes resultados indicaram, assim, que as doses de 5 mg/Kg de ambos os tratamentos poderiam ser utilizadas sem elevações das atividades enzimáticas. Por fim, a análise histopatológica de cortes provenientes do fígado dos animais envolvidos no ensaio de toxicidade aguda demonstrou um perfil comum de presença de infiltrado inflamatório e de gotículas de lipídios em todos os grupos, com comprometimento moderado ou severo do tecido hepático apenas em um animal do grupo Veículo (PBS) e um animal do grupo scFv 25 mg/Kg. Esses dois últimos achados parecem ser isolados e não representativos dos grupos a que se referem. Além disso, mesmo diante de lesões severas e até mesmo após hepatectomia parcial, o fígado tem alta capacidade regenerativa, transmitida ao órgão por diversos eventos evolucionários relacionados à sua grande variedade de funções no

organismo (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Taub, 2004; Michalopoulos & Khan, 2005; Fausto et al., 2006).

Sabe-se que a linhagem C57BL6/J LDLR^{-/-}, de acordo com dados fornecidos pelo *The Jackson Laboratory* (2012), apresenta níveis elevados de colesterol total hepático, níveis séricos elevados de colesterol total, triglicérides e LDL-colesterol e concentrações diminuídas de HDL-colesterol, além de demonstrar uma tendência a apresentar quadros de esteatose hepática, de acordo com a composição da dieta oferecida. Dentro desse contexto, não é possível relacionar de forma definitiva os achados provenientes da análise histopatológica às doses e tratamentos administrados.

Os dados de controle de peso e consumo médio de ração encontrados nesse estudo são semelhantes aos determinados em outros trabalhos do grupo (Daleprane, 2011), sendo constantemente observada uma diminuição do peso médio dos animais após a introdução da dieta hipercolesterolêmica. Os dados referentes à determinação bioquímica do perfil lipídico não apresentaram qualquer diferença significativa em relação aos grupos testados. Isto pode ser devido ao fato do scFv 2C7 anti-LDL(-) atuar apenas sobre a LDL(-), que é aterogênica mas constitui uma subfração minoritária da LDL cujas alterações não afetam o perfil lipídico, o qual apresentou níveis similares aos demonstrados por Ma et al. (2012) em animais com idade semelhante e com mesmo tempo de dieta hipercolesterolêmica. Ainda sobre as avaliações bioquímicas, os valores obtidos para a atividade das enzimas hepáticas, ao final do protocolo de lesão inicial, foram inferiores aos demonstrados no ensaio de toxicidade aguda, não sendo constatada diferença estatística em relação ao controle, comprovando que os tratamentos escolhidos e utilizados realmente não provocaram hepatotoxicidade.

Atualmente, estudos têm abordado o uso de fragmentos de anticorpos como potenciais agentes para o diagnóstico ou terapêutica de diversas doenças. No estudo de imagens *in vivo* e *ex vivo*, o uso de anticorpos promove a melhoria da sensibilidade e da precisão das técnicas utilizadas, uma vez que são direcionados a células específicas (Ta, 2011). Diversos estudos têm demonstrado diferentes scFvs específicos para plaquetas ativadas, conjugados a radioisótopos (Heidt, 2011) e a partículas metálicas (Ta, 2011), com potencial utilização em técnicas de microscopia intravital, ressonância magnética e ainda em equipamentos de tomografia computadorizada (SPECT-CT, *Single Photon Emission Computed Tomography*)) para

a identificação seletiva dessas células na superfície de placas propensas à ruptura, tornando-as ferramentas úteis no diagnóstico e acompanhamento de trombose, inflamação e aterosclerose (Ta, 2011). Estudos de Dietrich et al. (2007) demonstraram o desenvolvimento de um scFv anti-ED-B fibronectina conjugado a um fluorocromo, que foi utilizado para investigar a associação entre ED-B fibronectina e placas ateroscleróticas em camundongos apoE^{-/-}, tendo demonstrado sinais significantes em áreas com lesão estabelecida.

No estudo do uso de fragmentos de anticorpos no desenvolvimento de alternativas terapêuticas na aterosclerose, tem sido desenvolvidos tanto Fabs quanto scFvs relacionados principalmente ao reconhecimento de LDLox. Zhou et al. (2012) desenvolveram vacinas de DNA para MCP-1 e seu receptor através da imunização de camundongos C57BL/6J semanalmente, por 3 semanas. Observou-se a inibição significativa da migração de macrófagos tratados com soro obtido dos animais imunizados em ensaio envolvendo a ativação de células endoteliais com TNF- α . Estudo envolvendo um scFv e um Fab humanos ambos anti-LDLox inibiram a formação de células espumosas e proporcionaram a diminuição da progressão da lesão aterosclerótica em macrófagos murinos e camundongos LDLR^{-/-}, respectivamente, através do bloqueio da ligação de LDLox aos macrófagos e sua consequente internalização, tornando tais fragmentos potenciais agentes terapêuticos para doenças cardiovasculares (Tsimikas, 2011).

Diversos tipos de nanopartículas têm sido produzidos com finalidades terapêuticas em doenças como a aterosclerose. Os lipossomas, revestidos por polietileno glicol (PEG), são utilizados como carreadores de fármacos, diante de suas propriedades de baixa imunogenicidade, alta biocompatibilidade e proteção aos fármacos no organismo. Fármacos como glicocorticóides têm sido encapsulados em lipossomas, aumentando sua meia-vida na circulação sistêmica. Joner et al. (2008) utilizaram fosfato de prednisolona encapsulado em um lipossomo revestido com PEG e obtiveram uma redução significativa da lesão aterosclerótica em coelhos. Nesse estudo, a liberação do fármaco foi obtida por endocitose do lipossomo, que teve como resultados benéficos a utilização de uma menor dose de prednisolona e a diminuição dos efeitos colaterais. Estudos realizados por Maranhão et al. ao longo da última década, também têm demonstrado diversas aplicações para uma nanoemulsão rica em colesterol com estrutura lipídica semelhante à lipoproteína de baixa densidade,

denominada LDE (Maranhão et al., 1997), incluindo potencial ação benéfica na aterosclerose (Tavares et al., 2011).

As nanopartículas complexadas a anticorpos e a fragmentos de anticorpos podem ser direcionados a áreas ou células específicas, permitindo a veiculação sítio dirigida de fármacos (Psarros et al., 2011). McCarthy, Jaffer e Weissleder (2006) relataram a utilização de uma nanopartícula de dextrano e ferro ligada covalentemente a um fotossensibilizador como um potencial tratamento fotodinâmico para aterosclerose, tendo demonstrado aumento da absorção das partículas por macrófagos presentes em placas ateroscleróticas, seguido de morte celular, após produção de oxigênio singlete por fotossensibilização. Portanto, o uso de nanodispositivos está em rápida expansão, fornecendo opções promissoras no tratamento de aterosclerose através do direcionamento de drogas a alvos específicos (Psarros et al., 2011).

Resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo demonstraram que anticorpos monoclonais anti-LDL(-) (clone 31036), administrados via intravenosa em camundongos *knockout* para o gene do receptor da LDL, reduziram a área da lesão aterosclerótica e o número de células espumosas localizadas na região subintimal da artéria (Grosso et al., 2008). Esse estudo indicou que a imunização passiva com o MAb anti-LDL(-) forneceu um efeito protetor sobre a lesão aterosclerótica. Os anticorpos IgG são bivalentes, possuem a habilidade de se ligar a 2 moléculas de antígeno ao mesmo tempo, o que promove um aumento de sua afinidade funcional e fornece maior tempo de retenção ou avidéz pelo antígeno (Hollinger & Hudson, 2005).

No presente estudo, a complexação do scFv recombinante, proveniente do anticorpo monoclonal anti-LDL(-) anteriormente utilizado, às nanocápsulas foi realizada com a expectativa de que a formulação NC-scFv aumentasse a eficiência de ateroproteção em relação ao scFv em solução, considerando-se a possibilidade da presença de vários fragmentos scFv na superfície das nanocápsulas, assim como o aumento da meia-vida da formulação em relação ao scFv em solução. .

De fato, a imunização do subgrupo de animais com 3 a 4 meses de idade com a formulação NC-scFv diminuiu a área média da lesão aterosclerótica em aproximadamente 50% em relação ao grupo controle. Em contraste, no subgrupo de animais com 2 meses e meio a 3 meses de idade, o grupo scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução foi capaz de reduzir de forma significativa a área da lesão. No entanto,

quando o grupo tratado com a formulação NC-scFv foi analisado apenas em relação ao controle sem tratamento e com o controle positivo de Indometacina, observamos redução significativa da área da lesão em ambos os subgrupos com diferentes idades, em relação ao controle. Essa última evidência demonstra que os desvios obtidos pelas variações internas entre os grupos possivelmente influenciaram as análises realizadas anteriormente. Sendo assim, os resultados da análise morfométrica das lesões ateroscleróticas demonstraram ateroproteção nos animais mais jovens e mais velhos, respectivamente, indicando o potencial ateroprotetor do scFv e da formulação NC-scFv na prevenção precoce da aterosclerose.

Recentemente, Maganto-Garcia e col. (2012) demonstraram que a área das lesões ateroscleróticas em camundongos pode variar muito devido à complexidade observada no processo aterosclerótico, sendo necessário grupos de no mínimo 10 a 15 animais, sempre com a mesma idade, para a validação estatística dos resultados. Portanto, na continuidade deste estudo, utilizaremos maior número de animais para diminuir as variações intra-grupo, no sentido de validar tanto a eficácia do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução quanto da formulação NC-scFv na prevenção e diminuição da progressão de lesões ateroscleróticas.

A análise da expressão gênica de RNAm não nos permitiu uma avaliação completa dos possíveis efeitos benéficos fornecidos pelos tratamentos, possivelmente devido a dois motivos: o primeiro foi o intervalo de tempo de 7 dias entre a coleta das amostras no momento da eutanásia e o momento da última administração do tratamento nos grupos estudados. Este intervalo está de acordo com o protocolo de lesão inicial desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, mas, possivelmente, foi extenso para o nosso estudo em particular. O segundo motivo está relacionado às grandes variações de expressão gênica apresentadas pelos grupos, uma vez que a amostra utilizada é um tecido com grande heterogeneidade de tipos celulares, podendo variar na composição das lesões formadas. Não houve alteração no perfil de expressão dos fatores analisados, com exceção de IL-1 β , o que é altamente relevante para a terapêutica da aterosclerose.

Evidenciamos, no subgrupo dos animais de 3 a 4 meses de idade, diminuições significativas proporcionadas pelos tratamentos com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e com a formulação NC-scFv na expressão de IL-1 β ($p < 0,05$), uma citocina pró-inflamatória e pró-aterogênica relacionada à ativação de linfócitos T (Greaves & Channon, 2002) e à produção de IL-6 (Zohlnhöfer et al., 2000). Essa interleucina atua

como um importante mediador na resposta inflamatória em processos de proliferação e diferenciação celular (revisado por Tedgui & Mallat, 2006) e desempenha funções diretas na formação e estabilidade da placa aterosclerótica, estimulando a produção de citocinas adicionais e enzimas proteolíticas por macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas (Bhaskar, V et al., 2011). Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos *knockout* para o gene do receptor de IL-1 β apresentaram lesões ateroscleróticas diminuídas (aproximadamente 33%) em relação a animais sem a deleção desse, sugerindo seu papel na promoção da aterosclerose (Kiriti, H et al., 2003).

A análise da expressão proteica de receptores celulares possivelmente envolvidos no reconhecimento da LDL(-), demonstrou que o tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução diminuiu de forma significativa a expressão de CD14 ($p < 0,01$) e de TLR-4 ($p < 0,01$) em todos os animais. Efeito semelhante foi observado no tratamento com a formulação NC-scFv, que reduziu a expressão de CD14 ($p < 0,001$) no subgrupo de 3 a 4 meses de idade e a expressão de CD14 ($p < 0,001$) e TLR-4 ($p < 0,001$) no subgrupo de 2 meses e meio a 3 meses de idade. Adicionalmente, o tratamento com a formulação NC-scFv induziu a diminuição da expressão proteica de CD36 ($p < 0,05$) no subgrupo de 2 meses e meio a 3 meses.

O CD36 é um receptor *scavenger* envolvido no reconhecimento de LDLox e sua consequente internalização, contribuindo para a formação de células espumosas e desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Manning-Tobin et al., 2009). O TLR-4 é um receptor que reconhece patógenos microbianos e induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Choi et al., 2009). O TLR-4 tem a capacidade de reconhecer lipoproteínas minimamente modificadas, que, por apresentarem modificações muito discretas, não são reconhecidas pelos receptores *scavenger* (Witztum, 2005; Webb & Moore, 2007). Foi demonstrado ainda que essas lipoproteínas podem induzir a ativação de macrófagos, a partir de ligação ao receptor CD14, em um mecanismo TLR-4-dependente e ocasionar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo, assim, para o desenvolvimento do processo aterogênico (Miller et al., 2005; Harzewicz et al., 2008). De fato, o CD14 atua como co-receptor de TLR-4, reconhecendo a LDL minimamente modificada e favorecendo sua internalização e a formação de células espumosas (Miller et al., 2003). Portanto, nossos resultados têm grande impacto para a inibição do desenvolvimento do processo aterosclerótico, tendo em vista que os receptores analisados são possíveis candidatos no

reconhecimento da LDL(-) e que os tratamentos utilizados foram capazes de diminuir sua expressão proteica, tornando-os ferramentas terapêuticas importantes.

Em resumo, o presente estudo forneceu evidências da eficácia do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv sobre a redução da área de lesões ateroscleróticas, assim como de alguns mecanismos envolvidos nesta resposta, o que garante a continuidade dos estudos para validar a utilização destes candidatos a biofármacos como estratégia terapêutica na intervenção precoce para prevenir o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose.

Como continuidade deste trabalho, propomos: 1) validar os resultados em um número maior de animais jovens e com idade mais avançada; 2) investigar de forma mais aprofundada o processo de inibição de autofagia nos macrófagos e células endoteliais, através da análise das proteínas LC3 e Atg8 envolvidas nesse processo de morte celular; 3) estudar os mecanismos de internalização de NC-scFv por macrófagos, o que pode confirmar a capacidade da formulação em atuar como carreadora de substâncias ativas em seu núcleo lipofílico para as lesões ateroscleróticas; 4) determinar a meia-vida do scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e da formulação NC-scFv na circulação sistêmica, a fim de investigar a necessidade de aumento da frequência do tratamento e as doses mais adequadas que deverão ser administradas para uma validação mais completa da eficácia dos tratamentos propostos neste trabalho.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Diante dos presentes resultados, concluímos que:

1. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv não causam diminuição da viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 e em células da linhagem HUVEC em concentrações a partir de 6,25 µg/mL.

2. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução diminui a formação de células espumosas em macrófagos RAW 264.7, enquanto a formulação NC-scFv ocasiona o seu aumento, por mecanismo ainda não investigado.

3. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv, em doses entre 2,5 a 25 mg/Kg, não apresentam toxicidade quando administrados em camundongos C57BL/6J LDLR^{-/-}.

4. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução na dose de 5 mg/Kg inibe a progressão da lesão aterosclerótica em camundongos C57BL/6J LDLR^{-/-} com 2.5-3 meses de idade e a formulação NC-scFv na mesma dose demonstra uma tendência nesse processo de inibição em camundongos C57BL/6J LDLR^{-/-} com 3-4 meses de idade.

5. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv na dose de 5 mg/Kg diminuem a expressão gênica *in vivo* de IL-1β.

6. O scFv 2C7 anti-LDL(-) em solução e a formulação NC-scFv na dose de 5 mg/Kg diminuem a expressão proteica *in vivo* de CD14, de TLR-4 e de CD36 apenas para esta última.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, **Nature**, v.406, p.782–787, 2000.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages, **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.593-623, 1999.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, p.783–801, 2006.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre: **Artes Médicas**, cap.19, p. 948 – 1009, 1997.

ANDERSSON J.; LIBBY P.; HANSSON G.K. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clin. Immunol.**, n.134, n.1, p.33 – 46, 2010.

ARMAN, A. et al. Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene VNTR Polymorphism is Associated with Coronary Artery Disease. **Arq. Bras. de Cardiologia**, v.91, n.5, p.268-273, 2008.

AVOGARO, P; BON, G.B; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v.8, p.79-87, 1988.

BENDER, Eduardo. Desenvolvimento de nanocápsulas multiparede complexadas com metais (MCMN) e conjugadas a fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL minimamente oxidado [scFv anti-LDL(-)], 139f., Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BENÍTEZ, S. et al. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. **Biochim Biophys Acta**, v.1761, n.9, p.1014-21, 2006.

BERLINER, J. A. M. et al. Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**, v.91, p.2488–2496, 1995.

BHASKAR, V. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v.216, n.2, p.313-320, 2011.

BINDER, C.J. et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nat Med**, v.8, p.1218 –1226, 2002.

BRILEY-SAEBO, K. C. et al. Targeted iron oxide particles for in vivo magnetic resonance detection of atherosclerotic lesions with antibodies directed to oxidation-specific epitopes. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.57, p.337–347, 2011.

BUGA, G.M. et al. D-4F reduces EO6 immunoreactivity, SREBP-1c mRNA levels, and renal inflammation in LDL receptor-null mice fed a Western diet. **Journal of Lipid Research**, v.49, p.192 - 205, 2008.

CAGLAR, K. et al. Inflammatory signals associated with hemodialysis. **Kidney Int**, v.62, p.1408–1416, 2002.

CARRERO, J.J. et al. P. Cytokines, Atherogenesis, and Hypercatabolism in Chronic Kidney Disease: A Dreadful Triad. **Seminars in Dialysis**, v.22, n.4, p.381-386, 2009.

CEREGHINO, J. L, CREGG, J. M. Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.45-66, 2000.

CHAMES, P; BATY, D. Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. **Microbiology Letters**, v.189, p.1-8, 2000.

CHANG, Y. H; ABDALLA, D. S; SEVANI, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein, **Free Radical Biol. Med.**, v.2, p.202–214, 1997.

CHENG GANG et al. Pamam nanoparticles promote acute lung injury by inducing autophagic cell death through the Akt-TSC2-mTOR signaling pathway. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.1, n.1, p.37-45, 2009.

CHOI, SOO HO et al. Lipoprotein Accumulation in Macrophages via Toll-Like Receptor-4 Dependent Fluid Phase Uptake. **Circ. Res**, v.104, p.1355-1363; 2009.

COELHO, V. et al. Design, construction, and in vitro analysis of A33scFv: CDy, a recombinant fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapy in colon cancer. **International Journal of Oncology**, v.31, p.951-957, 2007.

CONNER, S.D., SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell, **Nature**, v.422, p.37–44, 2003.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, n.2, p.99-134, 2002.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.313, p.198-205, 2006.

DALEPRANE, Julio Beltrame. Atividade anti-angiogênica e modulação das proteínas envolvidas na neoformação vascular por compostos bioativos da própolis. 136p., Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DAMASCENO NRT. Influência das isoflavonas extraídas da soja na hipercolesterolemia e na aterosclerose experimental induzida pela caseína. Tese de doutorado. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, 2001.

DAMASCENO, N.R.T. et al. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL⁻) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.1, p.28-38, 2006.

DHAR, S. et al. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v.105, p.17356-17361, 2008.

DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentias da experimentação animal: aplicações em cirurgia experimental. **Rev Assoc Med Bras.** v.56, n.1, p.103-111, 2010.

DANSKY, H.M. et al. Lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Proc Natl Acad Sci**, v.94, p.4642–6, 1997.

DE AZEVEDO, M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, São Paulo, SP, 2003.

DE CASTELLARNAU, C. et al. Chemotactic Protein Secretion by Human Endothelial Cells **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, p.2281-2287, 2000.

DE CASTELLARNAU, C. et al. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions. **Clinica Chimica Acta**, v.376, p.233–236, 2007.

DENIZOT F & LANG R .Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v.89, n.2, p.271-7, 1987.

DIETRICH, T. ED-B fibronectin (ED-B) can be targeted using a novel single chain antibody conjugate and is associated with macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. **Basic Res. Cardiol.**, v.102, n.4, p.298-307, 2007.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; MCNEIL, S.E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v.2, p. 469-478, 2000.

DORFMAN SE. et al. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden- Syrian hamsters. **J Nutr**, v.135, n.3, p.492-8, 2005.

DORIA, A. et al. Inflammation and Accelerated Atherosclerosis: Basic Mechanisms. **Rheum Dis Clin N Am**, v.31, p.355–362, 2005.

EDFELDT K. et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. **Circulation**, v.105, p.1158–1161, 2005.

ENDEMANN G. et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. **J Biol Chem**, v.268, p.11811–11816, 1993.

EZEKOWITZ, A. B. et al. Molecular Characterization of the Human Macrophage Mannose Receptor: Demonstration of Multiple Carbohydrate Recognition-like Domains and Phagocytosis of Yeast in Cos-1 Cells. **J. Exp. Med.** v.172, p.1785-1794, 1990.

FAULIN, T.E.S. et al. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. **Clin Chem Lab Med**, v.46, n.12, p.1769–1775, 2008.

FAULIN, T.E.S.; CAVALCANTE, M.F.; ABDALLA, D.S.P.Role of electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin. Lipidol.** v.5, n.5, p.719-729 ,2010.

FAUSTO N, CAMPBELL JS, RIEHLE KJ. Liver regeneration. **Hepatology**, v.43, p.45–53, 2006.

FESSI, H. et al. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FILIPPI-CHIELA, E.C. et al. Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. **Plos One**, v.6, n.6, e20849, 2011.

FITCH, J.C.K; ROLLINS, S; MATIS, L. Pharmacology and biological efficacy of recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. **Circulation**, v.100, p.2499–506, 1999.

FRANCHI, A. et al. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck: correlations with p53 status, inducible nitric oxid synthase activity and angiogenesis. **Cancer**, v.95, n.9, p.1902-10, 2002.

FOTEINOS, G. et al. Anti–Heat Shock Protein 60 Autoantibodies Induce Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice via Endothelial Damage. **Circulation**, v.112, p.1206-1213, 2005.

GALIS, Z. S. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J. Clin. Invest.**, v.94, p.2493-2503, 1994.

GEISER, M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 23, n.4, p.207 – 217, 2010

GEORGE, J. et al. Adoptive Transfer of β 2-Glycoprotein I–Reactive Lymphocytes Enhances Early Atherosclerosis in LDL Receptor–Deficient Mice. **Circulation**, v.102, p.1822-1827, 2000.

GERMAIN, R.N. An innately interesting decade of research in immunology, **Nature Medicine**, v.10, p.1307–1320, 2004.

GERSH B.J. et al. The epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. **Eur Heart J**, v.31, n.6, p.642-648, 2010.

GLAS, C.K., WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, v. 104, p. 503–516, 2001.

GOLDE, W.T.; GOLLOBIN, P. RODRIGUEZ, L.L. A rapid, simple and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Lab Animal**, v.34, n.9, p.39-43, 2005.

GOLDSBY, R.A; KINDT, T.J; OSBORNE, B.A. Kuby Immunology. 4^a Edição. **W. H. Freeman and Company**, New York, NY, USA, p.83-149, 2002.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v.111, p.927–930, 2002.

GREAVES, D.V.; CHANNON, K.M. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. **Trends in Immunology**, v.23, n.11, p. 535-541, 2002.

GRIFFIN, B. A. et al. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. **Atherosclerosis**, v.83, n.1, p.59-67, 1990.

GROSSO, D. M. et al. Antibodies against electronegative LDL inhibit atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.1086-1092, 2008.

GU, L. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice, **Mol. Cell**, v.2, p.275–281, 1998.

HARKEWICZ R. et al. Cholesteryl ester hydroperoxides are biologically active components of minimally oxidized LDL. **J Biol Chem**, v.283, p.10241–10251, 2008.

HANSSON, G.K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v.21, p.1876-1890, 2001.

HANSSON, G.K; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Publishing Group**; v.6, p.508 – 519, 2006.

HANSSON G.K.; ROBERTSON, A.K.; Soderberg-Nauck, C. Inflammation and Atherosclerosis, **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, v.1, p.297–329, 2006.

HAVEL, R.J.; EDER, H.A.; BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J Clin Invest**, v.34, n.9, p.1345-53, 1955.

HEIDT, T. Activated platelets in carotid artery thrombosis in mice can be selectively targeted with a radiolabeled single-chain antibody. **Plos One**, v.6, n.3, e18446, 2011.

HEIMO, H. et al. Human Placental Alkaline Phosphatase: Expression in *Pichia pastoris*, Purification and Characterization of the Enzyme. **Protein Expression and Purification**, v.12, p.85-92, 1998.

HEVONOJA, T. et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.3, p.189–210, 2000.

HODIS, H.N. et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). **J Lipid Res**, v.35, n.4, p.669-77, 1994.

HUANG, P.L. et al. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell**, v.75, p.1273-86, 1993.

ISHIBASHI, S. et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. **J Clin Invest**. v.5, n.93, p.1885-93, 1994.

ITABE, H. Oxidative Modification of LDL: Its Pathological Role in Atherosclerosis. **Clinic. Rev. Allerg. Immunol**, v.37, p. 4-11, 2008.

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**. v.358, p. 37-54, 2005.

JAYARAMAN, S.; GANTZ, D.L.; GURSKY, O. Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein. **Biochemistry**, v.46, n.19, p.5790-5797, 2007.

JIANG, W. et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size- dependent. **Nature Nanotechnol**. v.3, p. 145–150, 2008.

JONER M, MORIMOTO K, KASUKAWA H, et al.. Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.28, p.1960–1966, 2008.

KATO, Y; YAMASHITA, T; ISHIKAWA, M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. **Oncol Rep.**, v.3, n. 9, p.565-569, 2002.

KAZUMA, Soraya Megumi, Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de células espumosas, Tese de mestrado em Análises Clínicas. São Paulo: Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

KIRI, H et al. Lack of Interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficiente mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, p.656-660, 2003.

KIRPOTIN, D. B. et al. Antibody targeting of long- circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. **Cancer Res**. v. 66, p. 6732–6740, 2006.

KHOEE, S., YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **Eur. J. Med. Chem.**, v.44, n.6, p.2392-2399, 2010.

KOVANEN, P.T; PENTIKÄINEN, M.O. Circulating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. **Curr. Opin. Lipidol.** v.14, n.5, p.411-419, 2003.

KUMAR V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robins e Cotran: patologia, bases patológicas de doenças. Tradução da 7.ed. Rio de janeiro: **Elsevier**, cap.11, p. 549, 2005.

KUNJATHOOR V.V. et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. **J Biol Chem.**, v.277, p.49982– 49988, 2002.

LAPTICK, V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo, **Atheneu Editora**, p.156-157, 2009.

LEE, F. H. et al. The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. **F. Nutr.**, v.119, p. 1893-1899, 1989.

LEE et al.. C₆₀ fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the β -amyloid peptides. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.7, n.1, p. 107-114, 2011.

LEEUWEN, M. V. et al. Accumulation of Myeloperoxidase-Positive Neutrophils in Atherosclerotic Lesions in LDLR/Mice. **Artheroscl. Thromb. Vasc. Biol.**, v.28, p.84-89, 2008.

LI,H. et al. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. **Nat. Nanotechnol.**, v.6, n.18, p. 645-40, 2011.

LI, J.J. et al. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. **Biomaterials**, v.31, n.23, p.5996-6003, 2010.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, p.868-874, 2002.

LIBBY, P. et al. Inflammation in Atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ J**, v.74, p.213-220, 2010.

LIVAK, K. J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LOBATTO, M.E. et al. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.10, p.835-852, 2011.

LOBO, J. et al. Electronegative LDL and lipid abnormalities in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. **Nephron Clin Pract**, v.108, n.4, p.298-304, 2008.

LOSCALZO, J. Molecular mechanisms of atherosclerosis. **London and New York: Taylor & Francis**, cap.2, p.3-28, 2005.

LUNDBERG, A.M.; HANSSON, G.K. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clinical Immunology**, v.134, p.5–24, 2010.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v.407, p.233-241, 2000.

LUTGENS, E. et al. Gene Profiling in Atherosclerosis Reveals a Key Role for Small Inducible Cytokines: Validation Using a Novel Monocyte Chemoattractant Protein Monoclonal Antibody. **Circulation**; v.111, p. 3443-3452, 2005.

MA, Y et al. Hyperlipidemia and Atherosclerotic Lesion Development in LDLR-Deficient Mice on a Long-Term High-Fat Diet. **PLoS One**, v.7, n.4, e35835, 2012.

MAGANTO-GARCIA, E.; TARRIO, M.; LICHTMAN, A.H. Mouse models of atherosclerosis. **Current Protocols in Immunology**, v.15, n.24, p.1-23, 2012.

MANNING-TOBIN J.J. et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.29, n.1, p.19-26, 2009.

MARANHÃO, A; BRIGIDO, M. M. Anticorpos Humanizados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.23, p.38-43, 2001.

MARANHÃO, R.C. et al. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipid microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids**, v.32, n.6, p.627-633, 1997.

MATSUURA, E; KOBAYASHI, K; KOIKE, T; SHOENFELD, Y. Autoantibody-mediated atherosclerosis. **Autoimmunity Reviews**; v.1, p. 348–353, 2002.

MATSUURA E, HUGHES GR, KHAMASHTA MA: Oxidation of LDL and its clinical implication. **Autoimmun. Rev**, v.7, n.7, p.558–566, 2008.

MAXIMOV V.D. et al. Protein–nanoparticle conjugates as potential therapeutic agents for the treatment of hyperlipidemia. **Nanotechnology**, v.21, n.26, p.265103, 2010.

MCCARTHY JR, JAFFER FA, WEISSLEDER R. A macrophage-targeted 696 theranostic nanoparticle for biomedical applications. **Small**, v.2, n.697, p. 983-987, 2006.

Mc MAHON, M; HAHN, B. H. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus mechanistic basic of the association. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.633-639, 2007.

MCMURRAY H.F., PARTHASARATHY S.; STEINBERG D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. **J Clin Invest**, v.92, p.1004–1008, 1993.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity, **Nat.Rev. Immunol.**, v.1, p.135–145, 2001.

MENDIS,S.; PUSKA,P.; NORRVING, B. Global Atlas o Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva, 2011.

METHE, H. et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive mono- cytes in patients with acute coronary syndrome, **Circulation**, v.111, p.2654–2661, 2005.

MICHALOPOULOS GK, DEFRANCES MC. Liver regeneration. **Science**, v.276, p.60–66, 1997.

MICHALOPOULOS GK, KHAN Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. **Gastroenterology**, v.128, p.503–506, 2005.

MILLER, Y.I. et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. **J Biol Chem**, v.278, n.3, p.1561-1568, 2003.

MILLER, Y.I. et al. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.25, p.1213–1219, 2005.

MITRAGOTRI, S. & LAHANN, J. Physical approaches to biomaterial design. **Nature Mater.**, v.8, p.15–23, 2009.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **Faseb J.**, v.19, p.311–330, 2005.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p.561-573, 2006.

MOLAVI B, MEHTA JL: Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. **Curr Opin Cardiol**, v.19, p.488–493, 2004.

MOORE, K.J.; FREEMAN, M.W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis Beyond Lipid Uptake. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.26, p.1702- 1711, 2006.

NILSSON, J; HANSSON, G. K; SHAH, P. K. Immunomodulation of Atherosclerosis: Implications of Vaccine Development. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Bio.**, v.25, p.18-28, 2005.

O'NEIL, C. P. et al. Extracellular matrix binding mixed micelles for drug delivery applications. **J. Control Release**, v.137, p.146–151, 2009.

OTSUI, K. et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. **Heart Vessels**, v.22, p.416–422, 2007.

PAIGEN, B. et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. **Atherosclerosis**, v.68, p.231-240, 1987.

PEDROSA, A.M.C. et al. Electronegative LDL-induction of apoptosis in macrophages. Involvement of Nrf2. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1801, n.4, p.430-7, 2010.

PEREIRA, L. V. Novos caminhos de pesquisa biomédica. Artigo desenvolvido para o **Jornal da Ciência – SBPC**; JC e-mail 3370, 16 de Outubro de 2007. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=51435>>. Visualizado em: 19 de Outubro de 2009.

PETERSON, E; OWENS, S.M; HENRY, R.L. Anticorpo monoclonal Forma e Função: Produção de Anticorpos direito para tratar do Abuso de Drogas. **AAPS Journal**, v.8, n.2, p.E383-E390, 2006.

POLETO, F. S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Uma pequena grande revolução. Artigo de revista. *Ciência Hoje*, v. 43, n. 255, p 26-31, 2008.

PSARROS C. et al. Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis. **Maturitas**, doi:10.1016, 2012 (no prelo).

QUINTANAR, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 24, p.1113–1128., 1998.

RAPPOPORT, J.Z. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 412, p. 415–423, 2008.

REAPE T.J., GROOT P.H. Chemokines and atherosclerosis. **Atherosclerosis**; v. 147, p. 213-225, 1999.

REARDON, C.A. et al. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein e-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1011-1016, 2001.

REDGRAVE, T.G.; ROBERTS, D.C.; WEST, C.E. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. **Anal Biochem**, v.65, n.1-2, p.42-49, 1975.

REFF, M. E; HEARD, C. A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.40, n.1, p.25-35, 2001.

ROBERT, R. et al. Identification of Human scFvs Targeting Atherosclerotic Lesions: Selection by single round in vivo phage display. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 281, n. 52, p.40135–40143, 2006.

ROSELAAR, S. E; KAKKANATHU, P.X; DAUGHERTY, A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE $-/-$ and LDL receptor $-/-$ mice. Decreasing density with disease progression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 16, n.8, p. 1013-8, 1996.

ROSKOS, L.K; DAVIS, C.G; SCHWAB, G.M. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies. **Drug Dev Res**, v.61, p.108-120, 2004.

SAHA, P. et al. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v.9, p.109-118, 2009.

SAHAY, G., ALAKHOVA, D.Y., KABANOV, A.V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release** v. 145, p.182–195, 2010.

SAINZ-PASTOR, N. et al. Deglycosylation to obtain stable and homogeneous *Pichia pastoris* expressed N–A1 domains of carcinoembryonic antigen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.39, p.141-150, 2006.

SALONEN J.T. et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. **Lancet** v. 339, p. 883– 887, 1992.

SAMNEGARD, A. et al. Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients. **Atherosclerosis**, v.202, n.2, p. 550-556, 2008.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. **Diabetologia**, v.39, n.12, p.1469-76, 1996.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. et al. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Am J Cardiol**, v.84, n.6, p.655-9, 1999.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. et al. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.7, p.3243-9, 2001.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. **Journal of Lipidic Research**, v. 43, p. 699-705, 2002.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. et al. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v.166, n.2, p.261-70, 2003.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L. et al. Electronegative low-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v.15, n.3, p.329-35, 2004.

SEABRA, F.R.G. Análise imunohistoquímica das metaloproteinases da matriz (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) na doença periodontal. **UFRN**, Natal, RN. p.31 – 42, 2006.

SERRANO J.R., C. V. Risco Cardiovascular Global: Papel dos Fatores de Risco para a Doença Aterosclerótica. **Revista Racine**, v.104, p.41-48, 2002.

SEVANIAN A., et al. LDL(–) is a lipid hydroperoxide- enriched circulating lipoprotein. **J Lipid Res.** v. 38, p.419-428, 1997.

SHAFFAZICK, S.R. et al.. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

SHASHKIN, P; DRAGULEV, B; LEY, K. Macrophage Differentiation to Foam Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.3061-3072, 2005.

SHEN, Z. et al.. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Anal Chem**, v.80, n.6, p.1910-1917, 2008.

SIQUEIRA, A. F. A; ABDALLA, D. S. P; FERREIRA, S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 50, p. 334-343, 2006.

STEINBERG, D.; LEWIS, A. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. **Circulation**, v.95, n.4, p.1062-1071, 1997.

STEINBERG D. et al. Beyond cholesterol. Modifications of low- density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**. v.320p. 915-924, 1989.

STENVINKEL, P. et al. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how to do new pieces fit into the uremic puzzle? **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, p. 505–521, 2008.

STIKO-RAHM A. et al. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* v. 12, p. 1099 –1109, 1992.

STOCKER, R; KEANEY JR, J. F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiol. Rev.**, v. 84. p. 1381-1478, 2004.

STOLL, G; BENDSZUS, M. Inflammation and Atherosclerosis: Novel Insights Into Plaque Formation and Destabilization. **Journal of the American Heart Association**, v. 37, p. 1923-1032, 2006.

SUN, B. et al.. Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. **J. Lipid Res.**, v. 48, p. 2560–2570, 2007.

SUZUKI, T. et al. Clinical Trial of Oxidized LDL (CTOL) investigators. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. **Clin Biochem**, v.35, n.5, p.347-353, 2002.

TA, H.T. et al. Enzymatic single-chain antibody tagging: a universal approach to targeted molecular imaging and cell homing in cardiovascular disease. **Circ Res.**, v.109, n.4, p.365-373, 2011.

TAI, M.H et al. Modulation of angiogenic processes in cultured endothelial cells by low density lipoproteins subfractions from patients with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**. v. 186, p. 448-457, 2006.

TANFOUS, N. G. B. et al. Expression in *Pichia pastoris* of a recombinant scFv form of Mab 107, an anti human CD11b integrin antibody. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.636-642, 2006.

TANG, L. et al. Observation on In Situ Hybridization and Immunocytochemistry of Matrix Metalloproteinases in Rat Pancreas. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**. v.23, n. 4, p. 332 – 334, 2003.

TANSIL, N. C; GAO, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **Nanotoday**. v. 1, n. 1, p. 28-37, 2006.

TAUB R. Liver regeneration: From myth to mechanism. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 5, p. 836–847, 2004.

TEDGUI A, MALLAT Z: Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol Rev**, v. 86, p. 515–581, 2006.

TELLES, A.E.R. Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpo de cadeia única (scFv) anti-LDL eletronegativa em *Pichia pastoris*, Dissertação de mestrado. 2008 USP.

THE JACKSON LABORATORY

(<http://www.jax.org/search/Main.jsp?sg=46&qt=C57Bl/6%20LDLR&page=2>). Acesso em: 20 de julho de 2012.

TSIMIKAS, S. et al. Human oxidation-specific antibodies reduce foam cell formation and atherosclerosis progression. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.58, n.16, p.1715-1727, 2011.

WADA, T. et.al. Cloning, expression and chromosomal mapping of a human ganglioside sialidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 261, p. 21 – 27, 1999.

WAN, L. et al. High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 81, p.33-41, 2008.

WANROOIJ, E. J. A. et.al. Interruption of the Tnfrs4/Tnfs4 (OX40/OX40L) Pathway Attenuates Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, p. 204-210, 2006.

WITZTUM JL. You are right too! **J Clin Invest.**, v. 115, p.2072–2075, 2005.

WEBB NR. , MOORE KJ. Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy. **Curr Drug Targets.** v. 8, p. 1249 – 1263, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention of cardiovascular disease: Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. Geneva, WHO, 2007.http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/Prevention_of_Cardiovascular_Disease/en/index.html. Acesso em: 13 de julho de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Causes of death 2008, World Health Organization, Geneva, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf. Acesso em: 15 de julho de 2012.

XU XH, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. **Circulation** v. 104, p. 3103–3108, 2001.

YLA-HERTTUALA S. et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J Clin Invest.**, v. 84, p.1086-1095, 1989.

YU, H. et al. Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- κ B activation in macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1823, n. 7, p.1192–1198, 2012.

ZAMBIRNYK, O.; YEZHELYEV, M.; SELEVERSTOV, O. Nanoparticles as a Novel Class of Autophagy Activators – **Autophagy**, v.3, n.3, p.278-281; 2007.

ZHOU, J.J. et al. DEC205-DC target DNA vaccine to CX3CR1 and CCL2 are potent and limit macrophage migration. **Int J Clin Exp Med**, v.5, n.1, p.24-33, 2012.

ZIELLO, J.; HUANG, Y.; JOVIN I.S. Cellular Endocytosis and Gene Delivery. **Mol Med.**, v.16, n.5-6, p.222-229, 2010.

ZOHLNHÖFER, D. et al. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1 β –Dependent Expression of Interleukin-6 in Endothelial Cells. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.20, p.353-359, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 – SOLUÇÕES E TAMPÕES

Soluções utilizadas no isolamento de LDL(-):

- Tampão A

Tris-HCl 10 mmol/L

EDTA 1 mmol/L

pH = 7,4.

- Tampão B

Tris-HCl 10 mmol/L

NaCl 1 mol/L

EDTA 1 mmol/L

pH = 7,4.

Meios de cultura para *Pichia pastoris*:

- Meio de crescimento- BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*)

Extrato de levedura 1%

Peptona de Caseína 2%

Tampão Fosfato, pH 6,0 100mM

YNB 13,4%

Biotina 4×10^{-5} (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Casaminoácidos 2%

O tampão fosfato de potássio e o glicerol serão esterilizados em autoclave, enquanto biotina, casaminoácidos e YNB serão esterilizados por filtração em membrana de 0,22µm. Se necessário, o volume deve ser completado com água estéril.

- Meio de crescimento- BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*)

Extrato de levedura 1%

Peptona de Caseína 2%

Tampão Fosfato, pH 6,0 100mM

YNB 13,4%

Biotina 4×10^{-5} (p/v)

Casaminoácidos 2%

Metanol 3% (v/v)

O tampão fosfato de potássio e o glicerol serão esterilizados em autoclave, enquanto biotina, casaminoácidos, metanol e YNB serão esterilizados por filtração em membrana de 0,22µm. Se necessário, o volume deve ser completado com água estéril.

- YNB (Yeast Nitrogen Base) - Solução estoque 10x

YNB (Sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) 3,4% (p/v)

Sulfato de Amônio 10% (p/v)

Esterilização por filtração em membrana de 0,22µm.

- Biotina - Solução estoque 500x

Biotina 0,02% (p/v)

Esterilização por filtração em membrana de 0,22µm.

- Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0

K₂HPO₄ 132mM

KH₂PO₄ 868mM

Esterilização em autoclave.

Soluções utilizadas para cultura de *Pichia pastoris*:

- Solução estoque para inibidor de protease

PMSF 0,2 M

Dissolução em isopropanol. Concentração de uso de 1 mM.

Soluções para purificação do scFv anti-LDL(-) em resina de Níquel:

- Tampão de ligação

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 0,5 M

Imidazol 30 mM

pH = 7,4.

- Tampão de eluição

NaH₂PO₄ de sódio 20 mM

NaCl 0,5 M

Imidazol 500 mM

pH = 7,4.

Soluções para purificação de proteínas glicosiladas em resina de ConcanavalinaA:

- Tampão de ligação

Tris-HCl 20 mM

NaCl 0,5 M

MnCl₂ 1 mM

CaCl₂ 1mM

pH = 7,4.

- Tampão de Eluição

Tris-HCl 20 mM

NaCl 0,5 M

Metil- α -D-manopiranosídeo 0,5 M

pH = 7,4.

Soluções utilizadas em eletroforese:

- Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TAE) 50x

Tris Base 2,42% (p/v)

Ácido Acético Glacial 5,71% (v/v)

EDTA 0,5M pH 8 10% (v/v)

Concentração de uso 1x.

- Tampão de Amostra para Gel de Agarose 10X

Tampão de corrida TAE 20X 50% (v/v)

Glicerol 50% (v/v)

Azul de bromofenol 0,1% (p/v)

Xileno cianol 0,1% (p/v)

- Tampão de Corrida para SDS-PAGE

Tris Base 3,03% (p/v)

Glicina 1,44% (p/v)

SDS 1% (p/v)

Completar o volume com água destilada. pH = 8,3.

- Tampão de amostra 2x

Tris pH 6,8 100mM

SDS 4%

Glicerol 20%

Bromofenol 2%

b-mercaptoetanol 5%

- Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (30:0,8) 4%

Tris-HCl, pH 6,8 125mM

SDS 0,1% (p/v)

Persulfato de amônio 10% (v/v)

Temed 0,001% (v/v)

- Gel de Separação SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (30:0,8) 12%

Tris-HCl, pH 8,8 400 mM

SDS 0,1% (p/v)

Persulfato de amônio 10% (v/v)

Temed 0,003% (v/v)

Soluções para coloração de gel por *Comassie Brilliant Blue*:

-Solução corante

Etanol 30% (v/v)

Ácido Acético 10% (v/v)

Comassie Blue G-250 0,5% (p/v)

Solução descorante

Etanol 30% (v/v)

Ácido Acético 10% (v/v)

Soluções para coloração de géis SDS-PAGE com prata:**- Solução Fixação e Preservação**

Metanol 50% (v/v)

Ácido Acético 12% (v/v)

Formaldeído 0,05% (v/v)

- Solução de Lavagem

Etanol 50% (v/v)

- Solução de Sensibilização

Tiosulfato de sódio 0,03% (p/v)

- Solução de Coloração

Nitrato de Prata 0,2% (p/v)

Formaldeído 0,07% (v/v)

- Solução de Revelação

Na₂CO₃ 6% (p/v)

Formaldeído 0,05% (v/v)

- Solução de Bloqueio

Metanol 50% (v/v)

Ácido Acético 12% (v/v)

- Solução de Fixação

Metanol 50% (v/v)

Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

Soluções utilizadas em ensaios imunológicos:

- Tampão PBS 10x

Na₂HPO₄.H₂O 0,07M (p/v)

KH₂PO₄ 0,01M (p/v)

NaCl 1,4M (p/v)

KCl 0,02M (p/v)

Ajustar pH para 7,4.

- PBST (PBS- Tween)

PBS 1x contendo 0,05% de Tween pH 7,4

- Tampão de Transferência para *Western Blotting*

Glicina 1,44% (p/v)

Tris Base 0,3% (p/v)

Metanol 20% (v/v)

Soluções para coloração de células por Oil Red:

- Solução estoque de Oil Red

Oil Red O 0,5%

Diluído em isopropanol.

- Solução de trabalho de Oil Red

Solução estoque 6 mL

Diluído em 6 mL de água destilada. Esta solução foi filtrada em papel filtro Whatman® e foi preparada somente no momento do uso.

- Solução de fixação das células

Formaldeído 10% (v/v) diluído em PBS 1X.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE
QUALIDADE EM BIOSSEGURANÇA

PARECER TÉCNICO Nº 2538/2010

Processo nº: 01200.003570/1998-08

Requerente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

CQB: 090/98

Assunto: Solicitação de Extensão de CQB / NB-1

Data de Protocolo: 27/04/10

Próton: 16151/10

Extrato Prévio: 2359/10 publicado em 12/05/10

Reunião: 134ª Reunião ordinária da CTNBio, realizada em 24 de junho de 2010

Decisão: **DEFERIDO**

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à Solicitação de Extensão do CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança), concluiu pelo **deferimento**, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

PARECER TÉCNICO

1) Fundamentação técnica

O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da instituição solicitou a extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança nº 090/98, para credenciar o Laboratório de Bioquímica Clínica – Nível de Biossegurança 1 para pesquisa em regime de contenção, transporte, descarte, ensino e armazenamento de microrganismos geneticamente modificados da classe de risco 1. Foi enviada na documentação a declaração do responsável legal, planta baixa, descrição pormenorizada das instalações e informações relativas à biossegurança.

Trata-se de anexação de uma área de 35,61 m², constituindo o Laboratório referido acima, de nível NB 1, nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, para extensão do CQB. Será destinada no momento à realização de 3 projetos envolvendo o estudo da expressão de uma proteína recombinante denominada GFP5-scFv em bactéria que será usada para estudo imunológico do LDL eletronegativo, que pode ser útil na terapêutica da aterosclerose, entre outras alternativas. Foi anexada planta física do local, bem como a extensa lista de equipamentos que serão utilizados.

Os organismos serão *Escherichia coli* DH5-alfa, *Escherichia coli* BL21(DE3) e *Escherichia coli* SMD1168.

2) Medidas de biossegurança descritas no processo

Embora não haja descrição de detalhes, entendemos que as medidas de biossegurança são as mesmas que já vêm sendo tradicionalmente usadas na Faculdade, cuja CIBio conta com 7 membros (dos quais 5 professores) e 4 suplentes (dos quais 3 professores), cuja relação foi anexada ao processo.

A CTNBio esclarece que este parecer não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Dr. Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

ANEXO 3 – APROVAÇÃO DA
COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0402010/FCF

São Paulo, 02 de setembro de 2010

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Efeito da imunização passiva com nanopartículas derivatizadas com fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos knockout para o gene do receptor de LDL".

Em anexo envio cópia do CQB da Unidade para necessário quando da solicitação de recursos junto a agências de fomento.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

YARA MARIA LIMA MARDEGAN
Membro da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

ANEXO 4 – APROVAÇÃO DA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE
ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/70/2010

São Paulo, 14 de setembro de 2010.

Ilmo(a). Sr(a)

Marcela Frota Cavalcante

Orientador: Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 13 de setembro de 2010, APROVOU o projeto "Efeito da imunização passiva com nanopartículas derivatizadas com fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos 'knockout' para o gene do receptor de LDL" (Protocolo CEUA nº 266) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser corrigido a data do início do experimento, no item 4 do Formulário de Registro.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO 5 – APROVAÇÃO DO
CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE
DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/78/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Efeito da imunização passiva com nanopartículas derivatizadas com fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos 'knockout' para o gene do receptor de LDL”** (Protocolo CEUA/FCF/266), de responsabilidade da pesquisadora **Marcela Frota Cavalcante**, sob a orientação da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 04 de outubro de 2010.

São Paulo, 07 de outubro de 2010.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO 6 – APROVAÇÃO DO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/114/2010
Protocolo CEP/FCF/557
CAAE: 0019.0.018.000-10

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Efeito da imunização passiva com nanopartículas derivatizadas com fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos <i>knockout</i> para o gene do receptor de LDL
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
Área Temática Especial:	Biossegurança
Patrocinadores:	CNPq

II - Sumário Geral do Protocolo:

As doenças coronárias estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo e a aterosclerose encontra-se no topo dessas doenças, sendo responsável por mais vítimas fatais do que todos os tipos de câncer combinados. A aterosclerose é uma doença crônico-inflamatória multifatorial com o envolvimento do sistema imunológico, tendo atuação da imunidade inata e adaptativa e sendo o resultado da interação de diferentes elementos celulares como linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. A LDL eletronegativa, uma fração modificada da LDL nativa, desempenha um papel-chave na aterosclerose, uma vez que as modificações sofridas pela molécula são capazes de induzir o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos e a subsequente formação de células espumosas. Uma vez confirmado o envolvimento do sistema imunológico no processo aterogênico, faz-se necessário manipular a sua ação, através do emprego de alternativas, como: a utilização de drogas imunossupressoras ou realização de uma imunização, seja ela passiva ou ativa. Anticorpos recombinantes têm sido gerados nas últimas décadas, através de técnicas de engenharia genética de anticorpos. Atualmente, além da utilização de anticorpos monoclonais (proteínas produzidas a partir de camundongos ou ratos e utilizadas em humanos), de uso limitado por sua significativa imunotoxicidade, também têm sido gerados anticorpos humanizados, como o F(ab')₂ e fragmentos de anticorpos ativos, como o scFv, que podem ser gerados em bactérias como *Escherichia coli* e leveduras como a *Pichia pastoris*. O scFv representa a menor unidade funcional do anticorpo e acredita-se que possa ser utilizado como novas alternativas de tratamento contra o desenvolvimento da aterosclerose ou ainda como um fator preventivo para o surgimento da lesão. No intuito de aumentar a eficiência da ação do scFv no organismo, nanopartículas têm sido desenvolvidas e conjugadas a esses fragmentos, pois existe grande probabilidade deste sistema ter baixa imunogenicidade, adequada meia-vida na circulação, controle para o reconhecimento molecular do antígeno e remoção dos imunocomplexos pelo sistema imunológico.

Os objetivos do presente estudo são:

Geral: Investigar o efeito da imunização passiva pelo scFv 2C7 anti-LDL(-) e por nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) em camundongos *knockout* para receptor da LDL (LDLR^{-/-}) no modelo aterogênico.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Específico:

- Comparar o efeito do tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em relação ao tratamento com as nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-).
- Investigar os efeitos do tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) e com as nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) sobre a expressão e atividade de Metaloproteinases (MMPs).
- Investigar os efeitos do tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) e com as nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) sobre a expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, presentes nas lesões ateroscleróticas.

Tipo de estudo: Transversal

Descrição da Casuística:

Serão selecionados 10 indivíduos, voluntários, número semelhante de homens e mulheres, para a coleta de sangue e a consequente obtenção de LDL(-). Os participantes serão convidados a participar do projeto por meio da divulgação interna da Universidade. O sujeito será instruído quanto ao objetivo e métodos do presente estudo, dará seu consentimento por escrito para sua inclusão na pesquisa, e serão coletados 30 mL de sangue.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Serão incluídos no estudo indivíduos sem doença cardiovascular, não-diabéticos (tipo I e II), não-fumantes, com pressão arterial normal (sistólica até 140 mmHg e diastólica até 90 mmHg), níveis de colesterol total até 200mg/dL e que não façam uso de medicamentos para diminuir lipídios, idade igual ou superior a 25 anos. Serão adotados cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador se sintam obrigados a participarem do estudo.

Serão critérios de exclusão:

Não serão incluídos no estudo indivíduos com doença cardiovascular, diabéticos (tipo I e II), fumantes, hipertensos (sistólica acima de 140 mmHg e diastólica acima de 90 mmHg), hipercolesterolêmicos (colesterol acima de 200mg/dL), usuários de medicamentos para diminuir lipídios, idade inferior a 25 anos, mulheres grávidas.

III – SITUAÇÃO DO PROTOCOLO: APROVADO em reunião de 27 de setembro de 2010.

O presente estudo será encaminhado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP para análise, por se tratar de área temática especial “Biossegurança” e o pesquisador responsável deverá aguardar a aprovação do projeto pela CONEP para dar início à pesquisa.

São Paulo, 29 de setembro de 2010.

Prof. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

ANEXO 7 – PATENTE DE INVENÇÃO
N.0161100055575

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 0624 / 2012

São Paulo, 20 de junho de 2012.

REF.: DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO "PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCAPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM IONS METÁLICOS"

Senhor(a) Professor(a),

Informamos a V.Sa. que o(s) pedido(s) de patente(s) em referência recebeu(ram) o(s) nº P.I. 1.106.193-6.

Em 19.06.12 foi publicado na Revista Propriedade Industrial - RPI Nº. 2163, pág. 65, o item 2.10 (REQUERIMENTO DO PEDIDO DE PATENTE), conforme cópia(s) anexa.

Outrossim, comunicamos para os devidos fins que este pedido está sendo gerenciado pela equipe UFRGS.

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Cleide do ~~Nas~~ G. Vieira
Téc. Adm. de Apoio a Inovação

Ilm^o(^a). Sr(^a).
Prof(^a). Dr(^a). DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
DEPTO: Análises Clínicas e Toxicológicas

AGÊNCIA USP INOVAÇÃO

AV. BRÁSIL, 1381 - JARDIM PAULISTA - 05508-900 - SÃO PAULO - SP, B-42 - 88
FONE: (11) 3081-4454 - FAX: (11) 3081-4455 - E-mail: inovacao@usp.br

<p>11/10/2011 016110005557 12-33 DERB</p> <p>0000221107109781</p> <p>Espaço reservado ao protocolo</p>	<p style="text-align: center;">« Uso exclusivo do INPI »</p> <p style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">PI1106193-6</p> <p>Espaço para etiqueta</p>
--	---

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

1.2 Qualificação:

1.3 CNPJ/CPF: 92969856000196

1.4 Endereço Completo: AV. PAULO GAMA, 110, CENTRO, PORTO ALEGRE - RS BR

1.5 CEP: 90040-060

1.6 Telefone: 51 3308 4236

1.7 Fax: 51 3308 4237

1.8 E-mail: SEDETEC@UFRGS.BR

☒ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção

☐ Modelo de Utilidade

☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCAPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM IONS METÁLICOS

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº

Data de Depósito:

5. Prioridade:

☐ interna

☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: ADRIANA RAFFIN POHLMANN

6.2 Qualificação: DOCENTE

6.3 CPF: 50910353034

6.4 Endereço completo:

6.5 CEP:

6.6 Telefone: 51 33166293

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: pohlmanna@iq.ufrgs.br

☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 APROAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de sequências em formato impresso: fl.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo de Resolução INPI nº 226/08: fl.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	fl.	☒	11.5 Relatório descritivo	14 fl.
☐	11.2 Procuração	fl.	☒	11.6 Reivindicações	6 fl.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fl.	☐	11.7 Desenhos	fl.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fl.	☒	11.8 Resumo	1 fl.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar): Termo de Cessão, Portaria de Competência, Cópia DOU e Procuração				11 fl.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 32 fl.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Porto Alegre, 10/10/2011

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Profa. Raquel S. Maier
Secretaria de Desenvolvimento
Tecnológico
UFRGS

ANEXO DE DEPOSITANTES

Título: PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCAPSULAS

Página 1

Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Qualificação:

CNPJ / CPF / Número INPI: 63025530000104

Endereço Completo: Rua Praça do Relógio, 129 Cidade Universitária, Butantã, São Paulo -

CEP: 05508-900

Telefone: 11 38184474

FAX:

E-mail:

ANEXO DE INVENTORES

Título: PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCAPSULAS

Página 1

Nome: SILVA STANISQUASKI GUTERRES

Qualificação: DOCENTE

CPF: 50879707020

Endereço Completo:

CEP:

Telefone: 51 33165500

FAX:

E-mail: NANOC@FARMACIA.UFRGS.BR

Nome: EDUARDO ANDRÉ BENDER

Qualificação: ALUNO

CPF: 97110604004

Endereço Completo: AV BAGÉ, 150303 PETROPOLIS PORTO ALEGRE RS BR

CEP:

Telefone: 33086285

FAX:

E-mail: EABENDER@HOTMAIL.COM

Nome: MARCELA FROTA CAVALCANTE

Qualificação: ESTUDANTE

CPF: 007.630.853.38

Endereço Completo: AV IPIRANGA, 209311 BLOCO B REPÚBLICA SÃO PAULO SP BR

CEP: 01048-010

Telefone: 1138132197

FAX:

E-mail: marcela.frota@usp.br

Nome: DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA

Qualificação: DOCENTE

CPF: 861.029.908-20

Endereço Completo: RUA CARLOS WEBER, 1419 AP 51 SÃO PAULO SP br

CEP:

Telefone: 1138379443

FAX:

E-mail: dspa@usp.br

ANEXO 8 – PATENTE DE INVENÇÃO
Nº BR 10 2012 025132-9

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 0889 / 2012

São Paulo, 03 de outubro de 2012.

REF.: DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO "COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
NANOMÉTRICA E SEUS USOS".

Senhor(a) Professor(a),

Informamos a V.Sa. que em 02.10.12 foi protocolado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - I.N.P.I./S.P. o depósito do pedido de patente de invenção em referência, o qual recebeu o nº. **BR 10 2012 025132-9**, conforme cópia anexa.

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Jussara S. Ferreira

Ch. Seq. Apoio a Inovação

Ilmº(a). Sr(a).

Prof(a). Dr(a). DULCINEIA SAES PARRA ABDALA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
DEPTO.: Análises Clínicas e Toxicológicas

c.c.

Ilmº(a). Sr(a).

ADALBERTO CHEIRAN - Assistente de Propriedade Intelectual
SEDETEC/UFRGS

Praça Argentina, s/n, Prédio Chateau

Porto Alegre – RS – 90040-020

Ilmº(a). Sr(a).

MÁRCIA ADJUTO BOAVENTURA ABRITTA AGUIAR – D.D. Coordenadora
Núcleo de Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia – NUPITEC
Gerência de Inovação e Transferência de Tecnologia – GITT
Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy Ribeiro - Edifício CDT - 70910-900

AGÊNCIA USP INOVAÇÃO

AV. BRASIL, 1971- JARDIM PAULISTA - SÃO PAULO - S. P. 01431 - 001
TEL.: (11) 3091.4474 / 4415 - <http://www.inovacao.usp.br> - e-mail: inovacao@usp.br

02/10/2012 018120006744
14:24 USP

BR 10 2012 025132 9

Espaço reservado para protocolo

Espaço para digitar

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

1.2 Qualificação: AUTARQUIA ESTADUAL DE REGIME ESPECIAL

1.3 CNPJ/CPF: 63025530000104

1.4 Endereço completo: AV. BRASIL, N° 1971 JARDIM PAULISTA São Paulo SP

1.5 CEP: 01431001 1.6 Telefone: (11)30911580 1.7 FAX: (11)30310922

1.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR ☒ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: 2.1 INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS"

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido

Data do Depósito:

5. Prioridade ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA

6.2 Qualificação: BRASILEIRA DIVORCIADA PROF. UNIVERSITÁRIA 6.3 CPF: 88102900820

6.4 Endereço completo: RUA CARLOS WEBER, 1419, APT. 51 LAPA SÃO PAULO SP

6.5 CEP: 05303907 6.6 Telefone: (11)30911580 6.7 FAX: (11)30310922

6.8 E-mail: PIDIRETO@USP.BR ☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ **7.1** Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: MARIA APARECIDA DE SOUZA

9.2 CPF/CNPJ: 12184617806

9.3 API/OAB: 1833

9.4 Endereço completo: AV. BRASIL, Nº 1871

9.5 CEP: 01431001

9.6 Telefone: (11)30911580

9.7 FAX: (11)30310822

9.8 E-Mail: PICIRETO@USP.BR

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs e DVDs (originais e cópias):
- ☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- ☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- ☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução do INPI nº 228/08: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	30 fls.
☒	11.2 Procuração	1 fls.	☒	11.6 Reivindicações	2 fls.
☐	11.3 Documentos de prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	3 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☐	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar):				fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 38 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

SÃO PAULO, 02/10/2012

Local e Data

MARIA APARECIDA DE SOUZA - API 1833
CPF: 12184617806

Assinatura e Carimbo

ANEXO DE TITULARES

Título: "COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS"

Página : 5

Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
Qualificação: AUTARQUIA FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR CNPJ/CPF: 92969854000198
Endereço: AV. PAULO GAMA, 110 4. ANDAR
Bairro: FAURDOLINHA Cidade: PORTO ALEGRE
CEP: 90048060 Estado: RS País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FUB
Qualificação: INSTITUIÇÃO FEDERAL DE ENSINO SUPERIOR CNPJ/CPF: 00018174000143
Endereço: UNB - ED-CBT - CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
Bairro: ASA NORTE Cidade: BRASÍLIA
CEP: 70904970 Estado: DF País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

ANEXO DE INVENTORES

Título: "COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NANOMÉTRICA E SEUS USOS"

Página : 2

Nome: ANDREA QUEIROZ MARIANELLO
Qualificação: BRASILEIRA CASADA PROFESSORA UNIVERSITÁRIA CNPQ/CPF: 28468568320
Endereço: SQN 205 BL H APTO. 406 ASA NORTE
Bairro: Cidade: BRASÍLIA
CEP: 70843080 Estado: DF País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: ADRIANA RAFFIN POHLMANN
Qualificação: BRASILEIRA SOLTEIRA PROFESSORA UNIVERSITÁRIA CNPQ/CPF: 50940352024
Endereço: RUA COMENDADOR RODOLFO GOMES, 631, APT. 503, TI
Bairro: Cidade: PORTO ALEGRE
CEP: 90150101 Estado: RS País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: SÍLVIA STANISÇUASKI GUTERRES
Qualificação: BRASILEIRA SOLTEIRA PROFESSORA CNPQ/CPF: 50679707020
Endereço: RUA COM. RODOLFO GOMES, 631, APT. 503, TI
Bairro: Cidade: PORTO ALEGRE
CEP: 90105101 Estado: RS País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: EDUARDO ANDRÉ BENDER
Qualificação: BRASILEIRO CASADO ESTUDANTE DE DOUTORADO CNPQ/CPF: 97110604004
Endereço: RUA 15 DE NOVEMBRO, 1600 APTO. 504
Bairro: CENTRO Cidade: URUGUAIANA
CEP: 97500570 Estado: RS País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: MARCELA PIOTA CAVALCANTE
Qualificação: BRASILEIRA SOLTEIRA ESTUDANTE PÓS G. (MESTRADO) CNPQ/CPF: 00763095328
Endereço: AV. IPIRANGA, 200/311, BLOCO B
Bairro: Cidade: SÃO PAULO
CEP: 01046010 Estado: SP País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: MARCIA DUARTE ADORNE
Qualificação: BRASILEIRA SOLTEIRA FARMACÊUTICA CNPQ/CPF: 00628082104
Endereço: RUA BENTO GONÇALVES, 178
Bairro: Cidade: CACHOEIRA DO SUL
CEP: 96301090 Estado: RS País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922

Nome: SORAYA MEGUMI KAZUMA
Qualificação: BRASILEIRA SOLTEIRA ESTUDANTE CNPQ/CPF: 04481090626
Endereço: RUA MARSELHESA, 29
Bairro: VILA MARIANA Cidade: SÃO PAULO
CEP: 04020000 Estado: SP País: BR
Telefone: (11)30911580 Fax: (11)30310922