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

Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL
eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a
formação de células espumosas

Soraya Megumi Kazuma

Dissertação para Obtenção de grau de
MESTRE

Orientadora:
Profª Drª Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2010

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

Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL
eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a
formação de células espumosas

Soraya Megumi Kazuma

Dissertação para Obtenção de grau de
MESTRE

Orientadora:
Profª Drª Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

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

K23p 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 / Soraya Megumi Kazuma. -- São Paulo, 2010.
124p.

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

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Doenças coronárias 2. Macrófago : Fagocitose : Endocitose :
Metabolismo 3. Plasmídeo : Engenharia genética I. T. II. Abdalla,
Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.123 CDD

Soraya Megumi Kazuma

Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL
eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de
células espumosas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profª Drª Dulcineia Saes Parra Abdalla

Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, 17 de junho de 2010.

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais,
aos meus irmãos, meu namorado
e amigos pelo amor, apoio e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fornecer toda a força necessária para superar todos os obstáculos.

A Dulcineia, pela oportunidade de aprendizado em um laboratório de pesquisa.

Aos meus pais Jorge e Neuza, meus irmãos Ayumi e Leandro, meus sobrinhos Lucas, Gabriel, Mateus e Aya, por todo o amor, carinho, apoio e compreensão e por serem a base da minha vida.

Ao meu namorado Dan, por ser meu alicerce para os momentos difíceis, por todo o seu amor e companheirismo e aos pais dele, Teresa e Kojiro, por me acolherem de braços abertos.

A tia Eliza e tio Akio e aos meus primos-irmãos Adriana e Marcel, por todo o amor, carinho, apoio, compreensão, e pela moradia quando cheguei a São Paulo.

Aos meus avós Yoshio e Taeko, meus tios Choiti, Lina, Luiza e Jorge, e primas Aline e Jéssica que desde o início do mestrado sempre acreditaram em mim e me apoiaram muito.

Aos meus amigos do laboratório Tanize, pela amizade, carinho, apoio, ajuda e ensinamentos; Marcela, Fernanda Gomes e Daniel, pela ajuda, compreensão e amizade nesta etapa final; Fernanda Cesar, Martina, Luciane e Cris pela amizade, carinho, apoio e por toda ajuda com as células; Julio, pela amizade, carinho, apoio e por me apelidar de JoJo; Elaine pela amizade, ajuda e todas as sugestões que contribuíram para o trabalho; ao Leo e a Pri, pela amizade e pelas boas risadas no laboratório; a Cris Garcia, pela amizade e por ter me ensinado muito sobre Biologia Molecular; ao Alejandro, pela amizade e pelas sugestões para o trabalho e as pessoas novas que entraram recentemente no grupo Thais e Ricardo.

A professora Irene pelas sugestões para melhorar o trabalho e as meninas do laboratório de Parasitologia, Nani, Kátia, Amanda, Mayne, Vitória, Fernanda, pela amizade e por toda a ajuda com a *Pichia*.

A professora Andrea Maranhão, pela contribuição que sempre me ajudou com toda a parte de Biologia Molecular e aos seus alunos Rafael e Victor, por serem tão engraçados e pela ajuda quando fiz uma parte do trabalho em Brasília.

A Andreinha, pela amizade, carinho, ajuda no início do Mestrado e por ter iniciado todo o trabalho para o qual dei continuidade.

Ao Beto, pela grande amizade, compreensão, apoio, carinho e toda a atenção.

A Elisângela, Fernanda, Déia, professora Lígia, pelo carinho e compreensão por utilizar o laboratório de Imunologia.

A Karen, pela amizade e contribuições para o trabalho.

As meninas do laboratório de Hematologia, Karina e Amanda, pela amizade, risadas e pela ajuda com equipamentos do laboratório.

Ao grupo Jp.máfia, pela amizade, carinho e saídas para os barzinhos.

RESUMO

Os produtos de modificação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) como a subfração eletronegativa [LDL(-)] desempenham um importante papel na progressão da aterosclerose. O acúmulo massivo de LDL modificada captada por macrófagos resulta em células espumosas que liberam mediadores inflamatórios e contribuem para a aterogênese. O scFv (*single chain fragment variable*) é um fragmento de anticorpo recombinante que contém o sítio completo de ligação ao antígeno. Diante do papel da LDL(-) na aterogênese e da necessidade de novas intervenções terapêuticas que possam inibir o acúmulo de lipídeos em macrófagos, este trabalho objetivou a expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7 em *Pichia pastoris*, bem como a avaliação do efeito deste fragmento de anticorpo sobre a formação de células espumosas em cultura de macrófagos RAW 264.7. O vetor inicial de expressão pPIgLE apresentava como estratégia de detecção e purificação o fusionamento com a proteína A. No entanto, a alta imunogenicidade da proteína A inviabilizaria o estudo da proteína de fusão em cultura de macrófagos, o que determinou a substituição da estratégia de purificação anterior pela cromatografia com resina de níquel através da inserção de hexahistidina na região C-terminal da proteína. A análise de sequenciamento confirmou a presença da inserção e das regiões determinantes de complementariedade. O cassete de expressão com hexahistidina foi inserido no vetor pPIgLE de *P. pastoris* e transformado na linhagem SMD1168 (Invitrogen®). Testes preliminares de expressão em pequena escala permitiram a análise entre sete clones diferentes, demonstrando uma banda correspondente ao peso molecular de 28 KDa em SDS-PAGE, confirmado por Western Blot. A separação do scFv 2C7 através de resina de níquel obteve uma proteína pura, conforme foi analisado em SDS-PAGE corado com prata. A afinidade do scFv 2C7 a

LDL(-) foi confirmada por Dot Blot. O ensaio de captação de LDL(-) demonstrou que o scFv 2C7 foi eficaz na redução de células espumosas e este efeito foi acompanhado pela diminuição na expressão gênica de CD36, TLR-4 e COX-2. Baseado nestes dados, o scFv 2C7 demonstra uma propriedade importante para uma futura intervenção terapêutica para a aterosclerose.

ABSTRACT

The modification products of low-density lipoprotein (LDL), as the electronegative subfraction [LDL(-)], play an important role in the progression of atherosclerosis. The massive accumulation of modified LDL uptake by macrophages results in foam cells that release inflammatory mediators and contribute to atherogenesis. The scFv (single-chain fragment variable) is a recombinant antibody fragment that contains the complete site antigen-binding. Considering the role of LDL(-) in atherogenesis and the need for new therapeutic interventions that may inhibit the accumulation of lipids in macrophages, this study aimed the expression of anti-LDL(-) 2C7 scFv in *Pichia pastoris* and the evaluation of the effect of this recombinant antibody fragment on foam cells formation in cultured RAW 264.7 macrophages. The pPIgLE expression initial vector presented as a strategy for detection and purification the fusion with protein A. However, the high immunogenicity of the protein impairs the study of the fusion protein in cultured macrophages, leading to the replacement of the previous strategy of purification by chromatography with nickel resin by inserting hexahistidine tag at the C-terminus of the protein. The sequence analysis confirmed the presence of insertion and the complementary determining regions. The expression cassette with hexahistidine was inserted into the pPIgLE vector of *P. pastoris* and transformed in the SMD1168 strain (Invitrogen®). Preliminary tests of expression in small-scale allowed the analysis of seven different clones, showing a band corresponding to the molecular weight of 28KDa on SDS-PAGE, confirmed by Western Blot. The separation of 2C7 scFv by the nickel resin yield a pure protein, as it was shown by SDS-PAGE stained with silver. The affinity of 2C7 scFv was confirmed by Dot Blot. The assay of LDL(-) uptake showed that the 2C7 scFv was effective in reducing foam cells and this effect was determined by the

decrease in gene expression of CD36, TLR-4 and COX-2. Based on these data, the 2C7 scFv demonstrates an important property for future therapeutic intervention for atherosclerosis.

Lista de Figuras

Figura 1 – Início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica.....	21
Figura 2 – Representação esquemática da molécula de anticorpo e seus principais fragmentos.....	34
Figura 3 – Representação esquemática da reação de PCR de inserção da sequência codificadora da hexahistidina.....	50
Figura 4 – SDS-PAGE 12% e Western Blot do sobrenadante de cultura de <i>P. pastoris</i> com 48 horas de indução de expressão no final do 2º Round de expressão.....	66
Figura 5 – Dot Blot das frações eluídas com a purificação por cromatografia de afinidade em resina de IgG humana.....	67
Figura 6 – Gel de poliacrilamida corado com <i>Comassie Blue Brilliant</i> e Western Blot, respectivamente, das frações eluídas da purificação em cromatografia de afinidade...	68
Figura 7 – Gráfico do ELISA, demonstrando a atividade de ligação do scFv ao seu antígeno LDL(-).....	69
Figura 8 – Mapa de restrição do plasmídeo plg16.....	70
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o inserto eluído.....	70
Figura 10 – Mapa de restrição do vetor de expressão pPIgLE de leveduras.....	71
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% com a digestão do vetor pPIgLE com as enzimas <i>XmaI</i> e <i>EcoRI</i>	72
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a digestão do vetor pGEM scFv 2C7 com as enzimas <i>XmaI</i> e <i>EcoRI</i>	72
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando vetor intacto e digerido em ordem sequencial de clones obtidos da reação de ligação.....	73
Figura 14 – Análise de SDS-PAGE e Western Blot do sobrenadante de cultura da expressão com 48 horas de indução.....	75
Figura 15 – Análise da purificação do scFv 2C7 por gel de poliacrilamida e confirmado por Western Blot, respectivamente.....	76
Figura 16 – Imunoensaio de Dot Blot confirmando a afinidade de ligação do scFv 2C7.....	76
Figura 17 – Ensaio de captação de LDL em macrófagos RAW.....	78
Figura 18 – Ensaio de captação de LDL sob a avaliação do efeito do scFv 2C7.....	79

Figura 19 – Análise do gradiente de concentração do scFv 2C7 em macrófagos.....	80
Figura 20 – Análise do padrão de glicosilação do scFv 2C7 sob tratamento com a enzima Endo H.....	81
Figura 21 – Análise em Western Blot do scFv 2C7 tratado com Endo H e purificado em Concanavalina A.....	82
Figura 22 – Gráfico de viabilidade celular em macrófagos com o ensaio de MTT, utilizando o scFv 2C7 glicosilado.....	83
Figura 23 – Gráfico com a porcentagem de células viáveis utilizando o tratamento do scFv 2C7 desglicosilado.....	84
Figura 24 – Ensaio de captação de LDL(-) com o scFv 2C7.....	85
Figura 25 – Imagem representativa das gotículas de lipídeos acumuladas no interior dos macrófagos.....	86
Figura 26 – Efeito do scFv 2C7 sobre a expressão relativa de RNAm de CD36, COX-2 e TLR-4.....	88

Lista de Abreviaturas

apoB	Apolipoproteína B
Ag	Antígeno
AOX	Álcool oxidase (<i>alcohol oxidase</i>)
AP-1	Proteína de ativação 1 (<i>Activation Protein-1</i>)
BHT	Hidroxitolueno butilado
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex Medium</i>
CDRs	Regiões determinantes de complementaridade
COX-2	Ciclooxygenase-2
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fab	Fração ligante ao antígeno (<i>fragment antigen binding</i>)
FB	<i>Transformation Buffer</i>
Fc	Porção efetora
FDA	Food and Drug Administration
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fv	Fragmento variável
HAMA	<i>Human anti-murine antibodies</i>
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
Ig	Imunoglobulina
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF-γ	Interferon- γ
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL(-)	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
mmLDL	Lipoproteína de baixa densidade minimamente modificada (<i>minimally modified LDL</i>)
LBP	Proteína de ligação ao LPS (<i>LPS-binding protein</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo (<i>lipopolysaccharide</i>)
MAb	Anticorpo monoclonal
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos (<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>)
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos (<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
MD	Meio mínimo com Glicose
MM	Meio mínimo com Metanol
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NEFA	Ácidos graxos não-esterificados (<i>Non Esterified Fatty Acid</i>)
NF-κB	Fator nuclear Kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa</i>)
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos (<i>pathogens-associated molecular pattern</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS -Tween	Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Pep-4	Enzima vacúolo peptidase A
PLA2	Fosfolipase A2 (<i>Phospholipase A2</i>)
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PRR	Receptor de reconhecimento padrão (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
scFv	Fragmento variável de anticorpo cadeia simples (<i>Single-chain fragment variable</i>)

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Syk	Enzima tirosina quinase do baço (<i>spleen tyrosine kinase</i>)
SR	Receptor <i>scavenger</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
Tris-HCl	Cloridrato de Tri(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Moléculas de adesão vascular-1 (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VL	Cadeia variável leve de anticorpo
VH	Cadeia variável pesada de anticorpo
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactopiranosídeo
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

Sumário

I. Introdução.....	20
1. Sistema imune: papel do macrófago na aterosclerose.....	20
2. Importância dos receptores imunológicos.....	24
3. Papel dos anticorpos na aterosclerose.....	27
4. Lipoproteínas de baixa densidade.....	29
5. Engenharia de anticorpos.....	32
6. Expressão de anticorpos recombinantes.....	36
II. Objetivos.....	40
1. Geral.....	40
2. Específicos.....	40
III. Materiais e Métodos.....	41
1. Células.....	41
1.1 Linhagem bacteriana.....	41
1.2 Linhagem de levedura.....	41
1.3 Macrófagos.....	41
2. Plasmídeos.....	42
3. Isolamento de LDL(-).....	42
4. Clonagem das sequências codificadoras das regiões variáveis das cadeias leve e pesada para montagem do scFv anti-LDL(-).....	43
5. Expressão e caracterização do scFv anti-LDL(-) fusionado à proteína A.....	44
5.1 Expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7.....	44
5.2 Purificação do scFv anti-LDL(-) por cromatografia de afinidade utilizando resina de IgG humana.....	44
5.3 Análise da proteína purificada pelo método de Dot Blot.....	45
5.4 Análise das proteínas em eletroforese em gel de poliacrilamida.....	46
5.5 Coloração de gel de poliacrilamida por Comassie Brilliant Blue.....	46
5.6 Coloração de gel de poliacrilamida por prata.....	46
5.7 Análise de proteínas por Western Blot.....	47
5.8 Ensaio de ligação à LDL(-) por ELISA direto.....	48
6. Subclonagem da sequência codificadora do scFv anti-LDL(-) 2C7 para obtenção da proteína fusionada à hexahistidina.....	49

6.1	Preparação de DNA plasmidial pelo kit HiSpeed Plasmid Purification (Qiagen®).....	49
6.2	Digestão dos fragmentos de DNA com as enzimas de restrição Xma I e Nco I.....	49
6.3	Análise de DNA em eletroforese em gel de agarose.....	49
6.4	Eluição dos fragmentos de DNA.....	50
6.5	PCR para inserção da região codificadora da hexahistidina.....	50
6.6	Clonagem do produto de PCR no plasmídeo pGEM T-Easy.....	51
6.7	Transformação por choque térmico.....	52
6.8	Sequenciamento de DNA.....	53
6.9	Análises em banco de dados.....	53
6.10	Ligação da sequência codificadora para scFv anti-LDL(-) no vetor de expressão pPIgLE.....	53
6.11	Preparo de células eletrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	54
6.12	Transformação.....	55
6.13	Seleção das colônias transformantes pelo método de Colony Blot.....	56
7.	Expressão e caracterização do scFv anti-LDL(-) com hexahistidina C-terminal.....	56
7.1	Expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7.....	56
7.2	Processamento do sobrenadante de cultura e purificação em resina de níquel.....	57
7.3	Análises da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot.....	58
7.4	Teste de afinidade do scFv anti-LDL(-) por Dot Blot.....	58
8.	Ensaio de captação de LDL(-) por macrófagos.....	59
8.1	Ensaio de captação de LDL(-) utilizando-se um gradiente de concentração de scFv 2C7.....	60
9.	Avaliação do padrão de glicosilação do scFv 2C7.....	61
9.1	Tratamento enzimático da proteína com Endo H.....	61
9.2	Purificação em resina de Concanavalina A.....	61
10.	Ensaio de viabilidade celular.....	62

10.1 Ensaio de captação de LDL(-).....	62
11. Análise da expressão de genes pró-inflamatórios no ensaio de captação de LDL(-).....	63
11.1 Condições de cultura.....	63
11.2 Extração de RNA.....	63
11.3 Construção dos cDNAs.....	63
11.4 Desenho dos primers.....	64
11.5 Reação de PCR Real Time.....	65
11.6 Análise estatística.....	65
IV. Resultados.....	66
1. Expressão do scFv 2C7 fusionado com proteína A.....	66
2.Obtenção da sequência codificadora do scFv anti-LDL(-) com hexahistidina.....	69
3. Expressão do scFv 2C7 em <i>P. pastoris</i>	74
4. Caracterização do efeito do scFv 2C7 <i>in vitro</i> em ensaio de captação de LDL(-) por macrófagos.....	77
V. Discussão.....	89
VI. Conclusão.....	96
VII. Referências.....	97
Anexos.....	114

I. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença crônica da parede arterial caracterizada pela retenção de lipídeos e um intenso processo inflamatório. O início e a progressão da aterosclerose envolvem mecanismos imunológicos complexos que recrutam células efetoras imunes, principalmente o macrófago (HANSSON, 2001). O sistema imune desencadeia a patogênese da aterosclerose, pois componentes inflamatórios das imunidades inata e adaptativa, bem como elementos autoimunes são encontrados durante toda a progressão da doença. Complicações clínicas incluem o estreitamento do lúmen dos vasos sanguíneos, podendo ocasionar a ruptura da placa aterosclerótica e trombose, tendo como consequência mais grave o infarto do miocárdio (SHERER *et al*, 2005).

1. Sistema imune: papel do macrófago na aterosclerose

O evento inicial na aterogênese se constitui na migração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para a parede arterial, induzindo uma resposta inflamatória que gera disfunção endotelial e proliferação de células musculares lisas. LDL é transportado dentro da parede arterial através de difusão passiva e este processo é dependente da interação entre a apolipoproteína B e proteoglicanos da matriz extracelular (SAHA *et al*, 2009). Na íntima arterial, a LDL sofre modificações por enzimas ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, transformando-se inicialmente em LDL minimamente oxidada até a forma extensivamente oxidada, e então resultando em partículas pró-inflamatórias (GLEISSNER *et al*, 2007).

O estímulo da LDL modificada induz células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, assim como, células musculares lisas vasculares a secretarem quimiocinas e quimioatraentes, que recrutam monócitos e células T para a parede arterial em sítios específicos onde se encontram os depósitos de LDL modificada. Monócitos infiltrados na íntima se diferenciam em macrófagos e capturam a LDL modificada através dos receptores *scavenger* (YAN, 2007; McMAHON, 2007) (Figura 1).

Figura 1 – Início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Acúmulo de lipoproteínas na camada íntima das artérias ocorre devido à sua associação com componentes da matriz extracelular como os proteoglicanos. Neste local, as lipoproteínas sofrem modificação como a oxidação, gerando partículas que induzem inflamação por recrutar células efectoras do sistema imune como macrófagos. Estes formam as células espumosas devido à captação descontrolada de lipoproteínas modificadas que por fim, morrem por apoptose (Devlin *et al*, 2002).

Receptores *scavenger* não apresentam regulação negativa do controle de colesterol intracelular, ao contrário dos receptores B/E da LDL, e acumulam quantidade excessiva de LDL modificada, desta forma, determinando a formação de células espumosas e as estrias gordurosas (SAHA *et al*, 2009). Quando as células espumosas morrem, debris e colesterol formam um pool extracelular, que origina o core lipídico/necrótico que não pode ser removido e, conforme a doença aterosclerótica progride para a lesão avançada, torna-se calcificada (LUNDBERG *et al*, 2009). Algumas placas ateroscleróticas são mais instáveis, sendo que a ativação de células inflamatórias no interior da placa pode ocasionar a sua ruptura (MORENO *et al*, 2006).

LDL modificada é um termo coletivo utilizado para as várias modificações da LDL nativa como oxidação, lipólise, acetilação, proteólise e agregação (SHASHKIN *et al*, 2005), sendo que as formas modificadas da LDL são os principais alvos da captação por macrófagos no espaço subendotelial. A LDL oxidada pode ser encontrada em diferentes estágios de modificação, de acordo com o seu grau de oxidação (TIWARY *et al*, 2008). Além disso, existem fortes evidências de que a LDL oxidada é a forma modificada de LDL que contribui para a formação de células espumosas *in vivo* (SALONEN *et al*, 1992; STEINBRECHER *et al*, 1990).

O macrófago é importante para a aterogênese como modulador do metabolismo de lipídeos e da resposta imune. Algumas respostas induzidas pelos macrófagos parecem ser protetoras, como a remoção das lipoproteínas oxidadas e o efluxo de colesterol para partículas de HDL para o transporte reverso do colesterol (LI & GLASS, 2002). Entretanto, a observação de que camundongos tornam-se extremamente resistentes à aterosclerose quando deficientes em macrófagos representa uma das

linhas de evidências de que o conjunto de suas ações promovem o início e progressão da lesão (SMITH *et al*, 1995).

A proliferação de macrófagos amplifica a resposta inflamatória devido à secreção de citocinas e fatores de crescimento, principalmente TNF- α e a interleucina 1- β (IL-1 β). Estas duas citocinas apresentam uma ampla gama de ações na aterogênese, pois induzem a expressão de moléculas de adesão vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1-VCAM-1*), quimiocinas como a proteína quimiotática para monócitos (*Monocyte chemotactic protein-1- MCP-1*), fatores de crescimento como o fator estimulador de colônias de macrófagos (*Macrophage colony-stimulating factor M-CSF*) e proteases como as metaloproteinases (PACKARD *et al*, 2009).

A diferenciação de monócitos é induzida por M-CSF, produzido por células endoteliais e células musculares lisas, e simultaneamente há o aumento da expressão de inúmeros receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors – PRRs*) (YAN *et al*, 2007). Como participantes da imunidade inata, os macrófagos são as primeiras células efetoras responsáveis pela defesa do organismo no surgimento de uma infecção, sendo que o mecanismo de reconhecimento de antígenos é o resultado da interação entre padrões moleculares associados a patógenos (*pathogens-associated molecular pattern – PAMPs*) e PRRs.

Macrófagos são mediadores nas interações com células T e citocinas para a evolução da resposta inflamatória e auxiliam a estabelecer uma imunidade adaptativa (TIWARY *et al*, 2008). Células T também são encontradas em abundância nas lesões ateroscleróticas e, em uma fase inicial, são ativadas nos linfonodos através da apresentação de antígenos oriundos da placa aterosclerótica e então, após entrarem na circulação, se aderem às moléculas de adesão de superfície celular expressas por

células endoteliais na região da lesão aterosclerótica. No interior da placa, as células T ativadas entrariam em contato com antígenos apresentados por moléculas de MHC em macrófagos, resultando em futuras etapas de ativação (HANSSON & LIBBY, 2006). Células T não reagem a nenhum componente de LDL nativa, porém quando ocorre modificação oxidativa desta partícula desencadeiam a quebra da sua tolerância de reatividade, como já foi demonstrado por alguns estudos que identificaram a presença de células T reativas à LDL oxidada em placas ateroscleróticas, linfonodos e na circulação de pacientes com aterosclerose e em modelos experimentais (STEMME *et al*, 1995; ZHOU *et al*, 2001).

Células T helper (Th) CD4⁺ são predominantes em placas ateroscleróticas e podem se diferenciar em dois tipos: Th1, que secretam e respondem ao interferon- γ (INF- γ) e Th2 que secretam e respondem à interleucina-4 (IL-4). INF- γ bloqueia diferenciação em células Th2 e IL-4 bloqueia a diferenciação em células Th1, promovendo uma polarização da resposta imune. Células Th1 apresentam um papel pró-inflamatório e por isso, INF- γ induz a progressão da aterosclerose (NEWBY *et al*, 2009).

2. Importância dos receptores imunológicos

Células do sistema imune expressam uma ampla variedade de PRRs, os quais se constituem de duas classes diferentes: os receptores endocíticos que medeiam a captação e apresentação de antígenos como os receptores *scavenger*, e os receptores de sinalização, onde a interação com seus ligantes resultam na expressão de uma gama de genes pró-inflamatórios e nesta classe estão incluídos os *Toll Like Receptors* (TLRs) (LUNDBERG *et al*, 2009). Os receptores *scavenger* (SRs) estão divididos em

duas classes mais importantes: SRs A, incluindo SR-A I, SR-A II, SR-A III; e SRs B, que consistem de CD36, SR-B I e SR-B II. Os receptores SR-A I e CD36 se destacam como os principais responsáveis pela captação de LDL oxidada por macrófagos (YAN *et al*, 2007).

CD36 é um receptor *scavenger* expresso em inúmeros tipos celulares como monócitos/macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e plaquetas. Seu envolvimento no desenvolvimento da lesão aterosclerótica está em sua capacidade em se ligar e participar da endocitose de LDL oxidada em macrófagos, além de induzir diferenciação de macrófagos residentes em células espumosas que, basicamente, constituem o núcleo necrótico da lesão (COLLOT-TEIXEIRA *et al*, 2007). Alguns componentes da LDL oxidada não somente são degradados e processados para apresentação de antígenos, como também podem ativar o próprio macrófago.

Dentre os PRRs mais importantes na aterogênese destacam-se os TLRs, que intensificam a resposta inflamatória. O estímulo de TLRs aumenta a expressão de moléculas de adesão sobre células endoteliais e a liberação de quimiocinas que recrutam células efectoras para o sítio inflamatório. A expressão destes receptores encontra-se aumentada em lesões ateroscleróticas, principalmente de TLR-2 e TLR-4, que foram identificadas em macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas.

Em placas ateroscleróticas humanas, demonstrou-se um aumento na expressão de TLR-1, TLR-2 e TLR-4 (EDFELDT *et al*, 2002). Além disso, verificou-se maior expressão de TLR-4 em monócitos circulantes de pacientes com doença coronariana (GENG *et al*, 2005). Um estudo, realizado com macrófagos murino e humano obtidos de lesões ateroscleróticas, demonstrou aumento na expressão de TLR-4 que foi estimulada na presença de LDL oxidada, sem sofrer alteração pela incubação com LDL

nativa (XU *et al*, 2001). TLR-4 ativa o fator nuclear Kappa B (*Nuclear Factor Kappa B-NF- κ B*) que aumenta a expressão de uma variedade genes inflamatórios, em resposta a agentes microbianos, que ativam células do sistema imune inato, críticas na aterogênese. Macrófagos reconhecem componentes estruturais conservados e comuns de origem microbiana e, por isso, os TLRs expressos nestas células estão envolvidos na ativação do sistema imune inato e no reconhecimento de patógenos.

A ativação de ambos, TLR-4 e TLR-2, é mediada por co-receptores. TLR-4 é um receptor para lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide-LPS*) de bactérias Gram-negativas, no entanto, essa interação só ocorre com a participação de proteínas acessórias como a proteína de ligação ao LPS (*LPS-binding protein – LBP*). Um importante ligante dentro da progressão da aterosclerose é a LDL minimamente modificada (*minimally modified LDL-mmLDL*), forma inicial de oxidação da LDL.

Recentemente, demonstrou-se que o tratamento de macrófagos com LDL minimamente modificada gera espécies reativas de oxigênio através da ativação seqüencial de TLR-4, portanto, estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6 (BAE *et al*, 2009). Por outro lado, a LDL minimamente modificada não é reconhecida por receptores *scavenger*, mas induz o aumento na expressão destes receptores em macrófago (YOSHIDA *et al*, 1998).

Entretanto, foi demonstrado que a LDL minimamente modificada se liga ao receptor de LPS, o CD14, induzindo polimerização da actina e espraiamento em macrófagos através da ativação da via TLR-4/MD-2, que resulta em consequências aterogênicas como a inibição da fagocitose de células apoptóticas e o aumento da captação de LDL oxidada (MILLER *et al*, 2003). Choi e colaboradores (2009) observaram que a LDL minimamente modificada induz o recrutamento da enzima

tirosina quinase do baço (*spleen tyrosine kinase-Syk*) para o complexo de sinalização TLR-4 e eventos de macropinocitose que, juntos, aumentam a captação de pequenas moléculas e mais importante, de ambas, LDLs nativa e oxidada, que colaboram para o acúmulo intracelular de lipídeos. Estes dados descrevem um novo mecanismo de aumento de captação de lipoproteínas em macrófagos que contribuiria para a formação de células espumosas e o desenvolvimento da aterosclerose. Outro estudo recente, utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 como modelo de célula espumosa, sugere a macropinocitose como um possível mecanismo importante para a captação de lipídeos em macrófagos (YAO *et al*, 2009).

3. *Papel dos anticorpos na aterosclerose*

A imunidade adaptativa, consistindo de resposta celular específica e humoral, ocorre por reações específicas a um antígeno via células T e células B/anticorpos. Células T em lesões ateroscleróticas reconhecem epítomos da LDL modificada quando apresentados por macrófagos (STEMME *et al*, 1995). Depois que a LDL modificada foi processada pelo macrófago, seus epítomos são apresentados pelo MHC de classe II para reconhecimento das células T CD4+ específicas. Quando as células T encontram seu antígeno específico em uma molécula de MHC classe II, uma resposta imune adaptativa é ativada, incluindo proliferação clonal de células T e produção de citocinas e imunoglobulinas (Ig) (NILSSON *et al*, 2005). De acordo com Zhou *et al* (2001), aproximadamente 10% dos clones de células T da placa aterosclerótica humana respondem especificamente para a LDL oxidada.

Estudos têm relatado a presença de níveis aumentados de anticorpos anti-LDL oxidada em indivíduos com fatores de risco para essas doenças, envolvendo uma rápida progressão (PUURUNEN *et al*, 1994; DOTEVALL *et al*, 2001). Fang e colaboradores (2002) observaram elevados níveis de anticorpos anti-LDL oxidada em pacientes com disfunção endotelial coronariana. Em camundongos, os níveis de anticorpos anti-LDL oxidada são baixos, quando alimentados com dieta controle, porém quando alimentados com dieta hipercolesterolêmica, esses níveis aumentam drasticamente (revisado por NILSSON *et al*, 2007). Além disso, tem sido observado que pacientes com doenças auto-imunes, como artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico, têm maior risco para desenvolver aterosclerose, indicando que os mecanismos imuno-regulatórios e os mediadores de inflamação liberados nestes pacientes podem ter um importante papel na aterogênese (MANZI *et al*, 2000).

Anticorpos anti-LDL oxidada, tanto do tipo IgG quanto IgM, são encontrados em indivíduos saudáveis e em pacientes com aterosclerose estabelecida. Atualmente, acredita-se que a resposta de anticorpos IgM à LDL oxidada seja anti-aterogênica, enquanto que a resposta por anticorpos IgG é pró-aterogênica. Anticorpos IgG promovem a captação de LDL oxidada, com subsequente formação de células espumosas, via interação com receptores Fc γ , enquanto que anticorpos IgM facilitam a remoção da LDL oxidada sem a ativação de macrófagos (LEUWEEN *et al*, 2009). Palinski e colaboradores (1995) demonstraram, em modelo animal de aterosclerose, uma correlação entre anticorpos anti-LDL oxidada e o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Este grupo clonou anticorpos IgM obtidos a partir de camundongos com aterosclerose, que foram caracterizados como anticorpos naturais com especificidade ao epítopo de fosforilcolina (IgM T15).

O papel protetor dos anticorpos IgM foi demonstrado em um estudo que utilizou camundongos deficientes em interleucina-5 com reduzida secreção de anticorpos IgM T15, nos quais observou-se uma aterosclerose acelerada. Outros estudos também demonstram uma relação inversa entre títulos de IgM anti-LDL oxidada e progressão da aterosclerose, enquanto que altos níveis de anticorpos IgG foram positivamente associados com eventos de doenças cardiovasculares (HULTHE *et al*, 2001; KARVONEN *et al*, 2003; TSIMIKAS *et al*, 2007).

4. Lipoproteínas de baixa densidade

A LDL é o principal carreador de colesterol no sangue. O seu papel é transportar colesterol para os tecidos periféricos e regular a síntese de colesterol nesses locais. A LDL liga-se a receptores na superfície da membrana celular, fazendo a transferência do seu conteúdo. Quando o colesterol está abundante dentro da célula, não são sintetizados novos receptores de LDL, e deste modo a captação adicional de colesterol do plasma fica bloqueada (BRAUNWALD, 1999).

Dentre as LDLs minimamente modificadas se enquadra uma forma relatada por Avogaro, em 1988, com sendo uma subfração eletronegativa da LDL, LDL(-), isolada do plasma humano em concentrações suficientes para ter um significativo papel na patogênese da aterosclerose, ou seja, cerca de 1 a 10% do total de LDL em indivíduos saudáveis, sendo que em indivíduos com hipercolesterolemia familiar essa proporção triplica (AVOGARO *et al*, 1988; SANCHEZ-QUESADA *et al*, 2003). A concentração de LDL(-) é elevada no plasma de pacientes com alto risco de doença cardiovascular como resultado de hipercolesterolemia (BITTOLO-BON *et al*, 1994; SANCHEZ-QUESADA *et al*, 1999), hipertrigliceridemia (SANCHEZ-QUESADA *et al*, 2002),

diabetes (SANCHEZ-QUESADA *et al*, 2001; APOLINÁRIO *et al*, 2006) e doença arterial coronariana (TOMASIK *et al*, 2003; OLIVEIRA *et al*, 2006).

Apesar da hipótese oxidativa de aterogênese sugerir que o acúmulo de lipídeos oxidados na lesão aterosclerótica resulta da oxidação de LDL retida na íntima da parede arterial, existem evidências de que uma pequena porção de partículas de LDL encontrada na circulação pode sofrer modificações, produzindo partículas bioativas. Diversos tipos de modificações da LDL como oxidação, acetilação e glicação não-enzimática aumentam a carga negativa da LDL. Além disso, o enriquecimento com ácidos graxos não-esterificados (*Non Esterified Fatty Acid-NEFA*) (BENITEZ *et al*, 2002) ou modificação enzimática por fosfolipase A2 (*Phospholipase A2-PLA2*) (KLEINMAN *et al*, 1988) ou colesterol tripsina/esterase (KLOUCHE *et al*, 1995) também aumentam a eletronegatividade da LDL. Esta variedade de modificações provavelmente ocorre durante a circulação da partícula de LDL no plasma e contribuem para a dificuldade na caracterização química e biológica da LDL(-).

Comparada à LDL nativa, a LDL(-) tem menor conteúdo de vitamina E, maior peroxidação lipídica, mais agregados de apolipoproteína B (apoB), maior densidade e maior susceptibilidade à oxidação (CAZZOLATO *et al*, 1991; AVOGARRO *et al*, 1991; HODIS *et al*, 1994).

Existe uma controvérsia entre diversos autores quanto à afinidade da LDL(-) pelo receptor de LDL (AVOGARRO *et al*, 1988; SHIMANO *et al*, 1991; DEMUTH, 1997). Alguns estudos relatam uma pobre afinidade da LDL(-) pelo receptor de LDL, que pode estar relacionado ao dobramento incorreto de apoB e, além disso, pelo fato dos receptores *scavenger* não serem capazes de reconhecer a LDL(-), o tempo de residência desta partícula na circulação aumentaria e, conseqüentemente, a sua ação

inflamatória persistiria por um longo tempo (AVOGARO *et al*, 1988; BENITEZ *et al*, 2004).

Esta fração da LDL é citotóxica para células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Esta citotoxicidade apresenta 3 principais características: ocorre após um período de incubação curto como 4 horas; induz lise específica de células aderidas, seguida por morte celular e desligamento; provavelmente envolve 2 mecanismos separados, o primeiro dependente da oxidação celular e o segundo independente da peroxidação lipídica (DEMUTH *et al*, 1996). Nessa mesma linhagem celular, a LDL(-) induz a produção de fatores quimiotáticos, como IL-8, MCP-1 e parece aumentar a expressão de VCAM-1 induzida pelo fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor- α -TNF- α*), através do complexo NF- κ B, além de ativar o fator de transcrição AP-1 (*Activation Protein-1*, proteína de ativação-1). Contudo, esses estudos foram desenvolvidos em células endoteliais de origem venosa, (DE CASTELLARNAU *et al*, 2000; ZIOUZENKOVA *et al*, 2003; DE CASTELLARNAU *et al*, 2007).

Esses dados foram confirmados por Benitez e colaboradores (2006), utilizando um sistema *protein array* que determina 43 citocinas simultaneamente. Nesse estudo o *protein array* sugere um efeito múltiplo inflamatório da LDL(-) em células endoteliais, produzindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que desempenham papel importante em vários estágios do desenvolvimento da aterosclerose, como o recrutamento leucocitário, proliferação celular e indução de perfil pró-inflamatório sistêmico. Portanto, esses dados mostram claramente o papel da LDL(-) nos eventos iniciais da aterogênese e inflamação.

Além disso, um trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou que a administração endovenosa de anticorpos monoclonais anti-LDL(-) em camundongos

knockout para o gene do receptor da LDL reduziu a área da lesão aterosclerótica, os níveis de LDL(-) livre circulante e o número de células espumosas localizadas na região subintimal da artéria. Além disso, os anticorpos monoclonais anti-LDL(-) diminuíram os produtos de peroxidação lipídica e óxidos de colesterol no plasma, como consequência da remoção de LDL(-) da circulação, pois esta partícula modificada aumenta o conteúdo de produtos de peroxidação lipídica. A expressão de VCAM-1 também foi reduzida nos camundongos tratados com o fragmento de anticorpo Fab, derivado de anticorpo policlonal anti-LDL(-), devido ao fato de que este fragmento não apresenta a porção Fc, desta forma, não induz a ativação de células endoteliais que expressam receptores para a porção Fc dos anticorpos (GROSSO *et al*, 2008).

5. Engenharia de anticorpos

Anticorpos recombinantes são importantes para a pesquisa biomédica e são progressivamente usados como reagentes terapêuticos e para o diagnóstico clínico. O interesse em fármacos baseados em anticorpos tem aumentado muito nos últimos anos e pelo menos 20 produtos de anticorpos (anticorpos, fragmentos de anticorpos e proteínas de fusão com anticorpos) foram aprovados pelo *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* (LOBO *et al*, 2004). Espera-se que o mercado de anticorpos recombinantes arrecade ao redor de 6 bilhões de dólares por ano (nos Estados Unidos), incluindo desde imunoensaios *in vivo* até diagnóstico de tumores por imagem (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

A molécula de anticorpo é comparada a um Y (figura 2). Utilizando-se esta representação podemos dizer que os "braços" do Y são os Fabs (fração ligante ao antígeno – *fragment antigen binding*), que retêm a atividade ligante ao antígeno e são

constituídos pela cadeia leve (V_L) e por parte da cadeia pesada (V_H), a porção F_d , ou seja, a porção variável e um dos domínios constantes (revisado em MARANHÃO & BRIGIDO, 2000). A porção variável do anticorpo denomina-se F_v e está localizada na porção amino terminal da molécula, sendo formada pelos domínios variáveis leve e pesado do Fab. Anticorpos intactos (IgG, IgM, IgA, IgE) são altamente específicos para os seus alvos e fornecem ao organismo a defesa contra patógenos e toxinas. IgG, o principal anticorpo do soro e o formato intacto quase exclusivamente utilizado em anticorpos terapêuticos, é uma proteína multidomínio com sítios de ligação ao antígeno localizados sobre 2 Fabs e com o recrutamento das funções efetoras mediado pela porção F_c . Anticorpos IgG são bivalentes e por isso, esta habilidade em se ligar a 2 antígenos aumenta muito a sua afinidade funcional e fornece maior tempo de retenção (também chamado de avidéz) sobre receptores de superfície celular (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

O processo de produção de anticorpos monoclonais (MAbs), que envolve a imortalização de células produtoras de anticorpos (oriundas do animal imunizado) por fusão com células tumorais, gerou grande expectativa por ser uma preparação homogênea, monoespecífica, capaz de reconhecer um único alvo específico dentro do organismo. Apesar do amplo potencial de aplicação dos anticorpos monoclonais, a utilização extensiva é limitada pela sua alta imunotoxicidade, pois esses são proteínas produzidas em laboratório a partir de células de camundongos ou ratos, e quando injetados em humanos acabam gerando uma resposta imune (resposta HAMA-*human anti-murine antibodies*) (MARANHÃO & BRÍGIDO, 2001).

Além disso, o domínio F_c que recruta funções efetoras citotóxicas através de complemento e/ou receptores $Fc\gamma$ (receptores F_c para gamma globulina) presentes em

células como macrófagos pode intensificar uma resposta imunológica e, deste modo, a progressão da aterosclerose, uma vez que esta doença apresenta em todo o decorrer de seu desenvolvimento a atuação de células do sistema imune.

Para remover a porção Fc (e seus efeitos associados), as IgGs têm sido dissecados em seus domínios constituintes, inicialmente através de proteólise (com enzimas como papaína e pepsina) e, posteriormente, por engenharia genética em fragmentos monovalentes (Fab, scFv) e bivalentes (Fab'₂, diabodies, minibodies) (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

Figura 2 - Representação esquemática da molécula de anticorpo e seus principais fragmentos. Os fragmentos Fab e o Fc derivados da molécula inteira de imunoglobulina podem ser obtidos por clivagem proteolítica. Os fragmentos recombinantes scFv e o FvFc apresentam um peptídeo conector flexível (linha vermelha) unido o carboxi-terminal da cadeia variável pesada com o amino-terminal da cadeia variável leve e são obtidos por manipulação genética dos genes de imunoglobulinas. Ressalta-se o caráter dimérico do fragmento FvFc, apresentando dois

sítios de reconhecimento antigênico, como na molécula inteira. (MARANHÃO & BRÍGIDO, 2000).

O advento da tecnologia do DNA recombinante permitiu que várias formas de anticorpos recombinantes fossem geradas, incluindo anticorpos quiméricos e humanizados, além de uma infinidade de fragmentos de anticorpos que podem até ser fusionados a outras moléculas produzindo, desta forma, reagentes poderosos no tratamento de diversas doenças (KRIANGKUM *et al*, 2001). Como a molécula de anticorpo é grande, aproximadamente 150 KDa, a clonagem de fragmentos de anticorpos que retêm a atividade de ligação ao antígeno (Ag) (Fab ou scFv) é a forma mais corrente de expressá-los em bactérias (PLÜNCKTHUN & SKERRA, 1989) e em eucariotos inferiores (ANDRADE *et al*, 2000).

O scFv é o fragmento no qual as cadeias V_L e V_H estão unidas por um peptídeo flexível que previne dissociação. As interações hidrofóbicas entre estes dois domínios não são muito fortes, por isso, a engenharia de um *link* covalente entre V_L e V_H foi necessária para a obtenção de uma molécula estável. Portanto, tem se utilizado um peptídeo conector flexível constituído de 12-20 resíduos de aminoácidos que unem estes dois domínios. Além disso, scFvs mantêm a especificidade, monovalência, afinidade de ligação ao antígeno similar ao seu parental IgG, enquanto demonstram melhor farmacocinética para penetração nos tecidos (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

Os pequenos scFvs são particularmente interessantes para aplicações clínicas. Eles possuem a metade do tamanho dos Fabs e, portanto apresentam menor tempo de retenção nos tecidos não alvos reduzindo a sua citotoxicidade, maior rapidez de

remoção da circulação, são menos imunogênicos (pela ausência da porção Fc) e mais aptos para fusões com proteínas e peptídeos (KIPRIYANOV & LE GALL, 2004).

A utilização de imunoglobulinas, na forma de fragmentos, é importante quando se pretende que a molécula tenha alta penetrabilidade, porém com uma meia-vida reduzida nos indivíduos que recebem a imunização passiva (MARANHÃO & BRÍGIDO, 2000). Os scFvs podem se ligar e neutralizar vários agentes estranhos como toxinas e viroses e por terem menor tamanho em relação aos anticorpos intactos, apresentam rápida difusão no tecido e melhor eliminação dos imunocomplexos produzidos.

6. *Expressão de anticorpos recombinantes*

Atualmente, existem diversos sistemas de expressão para anticorpos recombinantes como, por exemplo, a bactéria *E. coli*, células de inseto, leveduras e células de mamíferos (HAYDEN *et al.*, 1997; FROMMER & NINNEMANN, 1995). Para encontrar a expressão desejada, o gene clonado precisa ser transcrito e traduzido eficientemente. A produção e atividade biológica da proteína diferem muito e dependem de inúmeros fatores inclusive solubilidade, estabilidade e tamanho da proteína. Cada proteína possui problemas únicos de expressão devido à sua sequência única de aminoácidos. Portanto, um sistema de expressão utilizado para um anticorpo pode não funcionar bem para outro anticorpo (VERMA *et al.*, 1998).

As principais vantagens da expressão em leveduras em relação aos outros sistemas estão relacionadas ao fato de que são eucariotos. *Pichia pastoris* é um sistema que tem sido muito utilizado com sucesso na expressão de scFv (HELLWIG *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2007; TANFOUS *et al.*, 2006), além de

apresentar maior facilidade de manipulação pois utiliza o metanol como sua única fonte de carbono (LEE & KOMAGATA, 1980; PATRICK *et al*, 2005). A enzima álcool oxidase (*alcohol oxidase- AOX*), que catalisa o primeiro passo na via de utilização do metanol, é codificada pelo gene AOX1, o qual é regulado e induzido pelo metanol (CREGG *et al*, 1989). O promotor AOX1 tem sido muito utilizado nos vetores de expressão de *P. pastoris* para controlar a expressão de genes de proteínas recombinantes que são transcritos e traduzidos mediante a adição de metanol ao meio de cultura.

Foi demonstrado em estudos bioquímicos que a utilização do metanol requer outra via metabólica com enzimas únicas (VEENHUIS *et al*, 1993). Existem 2 genes que codificam álcool oxidase em *P. pastoris*: AOX1 e AOX2, sendo que AOX1 é o maior responsável pela atividade desta enzima. Por isso, o forte promotor AOX1 pode ser utilizado para dirigir a expressão da proteína recombinante em altos níveis mesmo com uma simples cópia do cassete de expressão integrado ao seu genoma. Além disso, o promotor AOX1 pode ser reprimido quando a célula cresce em meio com outras fontes de carbono como o glicerol e a glicose, reduzindo a possibilidade de contaminantes e/ou mutantes durante a produção de biomassa (DALY & HEARN, 2005).

Outra vantagem da levedura *P. pastoris* é a possibilidade de escolha entre diferentes linhagens com genótipos variados. Entre essas linhagens, existem algumas que são propriamente desenhadas para reduzida produção e secreção de proteases que degradam a proteína recombinante. As linhagens SMD1168 e SMD1168H são deficientes na enzima vacúolo peptidase A (*pep 4*). Esta enzima é responsável por ativar carboxipeptidase Y e protease B1 e, portanto, as linhagens SMD1168 e SMD1168H são deficientes nestas proteases (DALY & HEARN, 2005). Em culturas

fermentadas de *P. pastoris*, são encontrados elevados níveis dessas proteases vacuolares que resultam da combinação de alta densidade celular e lise celular de uma pequena porcentagem de células (PATRICK *et al*, 2005).

Vetores de expressão em *P. pastoris* são integrativos ao seu genoma para maximizar a estabilidade das linhagens de expressão. A integração ocorre quando o vetor é digerido com enzimas de restrição em genes marcadores (*his4*) ou genes promotores (*aox1*) e as terminações de DNA livre estimulam uma recombinação homóloga que resultam em eventos de integração dentro destes *loci* em altas frequências (cerca de 50-80% dos transformantes) (CEREGHINO & CREGG, 2000).

P. pastoris também apresenta uma facilidade de transição de culturas em pequena escala em frascos de shaker para larga escala em fermentadores sem perda da produtividade (CREGG *et al*, 1993). A capacidade de crescimento em fermentação é especialmente importante para proteínas secretadas, sendo que a concentração do produto é proporcional à concentração de células na cultura. Além disso, as condições de crescimento para *P. pastoris* são ideais para produção de proteínas em larga escala, pois seus componentes do meio de cultura são baratos, consistindo de fontes puras de carbono (glicerol e metanol), biotina, sais, elementos-traço e água. Este meio é livre de ingredientes que possam ser fontes de pirógenos ou toxinas e, portanto, é compatível com a produção de biofármacos. O risco de contaminação com outros microrganismos também é reduzido devido ao fato de que *P. pastoris* ser cultivada em meio com pH relativamente baixo e metanol (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Além disso, *P. pastoris* ainda apresenta o potencial de realizar modificações pós-traducionais tipicamente associados à eucariotos superiores, tais como processamento de sequência sinal, (ambos do tipo pre e prepro), enovelamento correto, formação de

pontes dissulfeto, *N* e *O*-glicosilação e ainda certos tipos de adição de lipídeos. A levedura *P. pastoris* tem sido utilizada com sucesso para produzir proteínas com muitas pontes dissulfeto, que são essenciais para a atividade das mesmas como a proteína de ligação ao hormônio juvenil de hemolinfa de *Galleria mellonella* (PATRICK *et al*, 2005; CEREGHINO & CREGG, 2000).

Proteínas exógenas podem ser produzidas tanto intracelularmente quanto extracelularmente em *P. pastoris*. Pelo fato desta levedura secretar poucas proteínas endógenas, as proteínas heterólogas secretadas constituem a maior parte das proteínas totais encontradas no meio de cultura. Este fato elimina alguns passos iniciais da etapa de purificação, como, por exemplo, lise celular para a liberação do conteúdo celular, seguida pela remoção de debris celular (PATRICK *et al*, 2005).

Considerando que a aterosclerose é um processo imune-inflamatório crônico, sua prevenção e tratamento devem ser focados não somente no controle de fatores de risco tradicionais, mas também na imunomodulação do processo. Por isso, diante do papel da LDL(-) na aterogênese e da necessidade de novas intervenções terapêuticas que possam inibir o acúmulo de lipídeos em macrófagos, sendo este um evento inicial do processo aterogênico, expressamos scFv anti-LDL(-) em *P. pastoris* para, futuramente, caracterizarmos o efeito deste fragmento de anticorpo em cultura de células de macrófagos murinos.

II. OBJETIVOS

Geral

Subclonagem e expressão de fragmentos de anticorpos de cadeia simples (scFv) anti-LDL(-) em *P. pastoris* e avaliação de seu efeito sobre a formação de células espumosas.

Específicos

- Obtenção do fragmento scFv anti-LDL(-) com nova estratégia de purificação baseada em cromatografia de afinidade com níquel
- Investigação do efeito do scFv anti-LDL(-) sobre a formação de células espumosas em macrófagos murinos, *in vitro*
- Investigação do efeito do scFv anti-LDL(-) sobre a expressão de fatores pró-inflamatórios em cultura de macrófagos murinos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A composição dos meios de cultura e dos tampões utilizados encontra-se descrita no Anexo.

1 - Células

1.1 – Linhagem Bacteriana

DH5 α : **supE44**, Δ lacU169, (Φ 80lacZ Δ M15, **hsdR17**, **recA1** **endA1**, **gyrA96**, **thi-1**, **relA1**. Esta linhagem de *Escherichia coli* foi utilizada para amplificação dos plasmídeos.

1.2 – Linhagem de levedura *Pichia pastoris*

SMD1168 (Invitrogen®): Δ pep4::URA3 Δ kex1::SUC2his4ura3 com fenótipo His⁻ Mut⁺. Esta linhagem é deficiente para a expressão do gene *his4* que codifica a enzima da via biossintética *histidinol desidrogenase* e do gene *pep4* que confere ao hospedeiro uma deficiência na produção de proteases como a peptidase A (CEREGHINO & CREGG, 2000). Esta linhagem foi utilizada para transformação do cassete de expressão no locus *HIS4*, para expressão do scFv anti-LDL(-) em *P. pastoris*.

1.3 – Macrófagos

RAW 264.7: Linhagem de células leucêmicas de monócitos e macrófagos de camundongo descritas por Raschke *et al* (1978). Esta linhagem foi utilizada para o ensaio de captação de LDL(-).

2 - Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados durante as etapas de clonagem e expressão foram:

pGem-T Easy (Promega®) - 3015pb, derivado do pGEM 5Z f(+) (Promega®), promotores T7 e SP6, ori ColE1, ori f1, Ap^R, com múltiplos sítios de clonagem. Este plasmídeo foi adquirido na forma linear adicionado de timidina nas extremidades 3'-terminal para a clonagem de produtos de PCR.

pIg16 Z22- 4142pb, codifica para o scFv Z22 fusionado ao domínio B da proteína A de *Staphylococcus aureus*, sob controle do promotor do gene 10 do fago T7, ori ColE1, Ap^R, derivado do pGEMEX-1 (Promega®), construído pelo grupo da profa. Dra. Andrea Maranhão da Universidade de Brasília (www.unb.br/ib/cel/imol).

pPlg LE Z22- 8955pb, promotor AOX1, sinal de secreção fator α , múltiplos sítios de clonagem, terminador do gene AOX1, HIS4 ORF, ori ColE1, Ap^R, derivado do plasmídeo pPIC9 (Invitrogen®), construído pelo grupo da profa. Dra. Andrea Maranhão da Universidade de Brasília (www.unb.br/ib/cel/imol).

3- Isolamento de LDL(-)

O sangue obtido de voluntários normocolesterolêmicos foi coletado em tubos contendo EDTA e imediatamente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e a 4°C. Ao plasma obtido foi adicionado uma solução contendo aprotinina 2 µg/mL, benzamidina 400 mM, PMSF 200 mM e BHT 4 mM. Em seguida, o plasma foi submetido à ultracentrifugação sequencial para obtenção da LDL utilizando-se uma ultracentrifuga Sorvall®, modelo Ultra Pro 80, com um rotor T-1270. A LDL isolada foi dialisada contra tampão Tris-HCl pH 7,4 contendo EDTA, a 4 °C e durante 4 horas com trocas sucessivas do tampão a cada hora (Redgrave *et al*, 1975). O isolamento da LDL(-) foi

realizado por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) utilizando coluna UNO Q-12 (BioRad®). O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300 mL do tampão B e depois equilibrada com 300 mL de tampão A. A LDL foi dialisada contra o tampão A, sendo então injetada na coluna. No procedimento cromatográfico estabeleceu-se num fluxo de 4 mL/min em diferentes gradientes: a) 0 a 100 mL: 0% tampão B; b) 100 a 200 mL gradiente contínuo: 0 a 10% tampão B; c) 200 a 400 mL: 22% tampão B; d) 400 a 600 mL: 50% tampão B; e) 600 a 800 mL: 100% tampão B (DE CASTELLARNAU *et al*, 2000). A confirmação do isolamento da LDL(-) foi obtida pela migração eletroforética em gel de agarose utilizando-se kit comercial (CELMGEL®) onde foram aplicados 0,5 µl de cada fração de LDL separada por FPLC utilizando como tampão de corrida Tris pH 9,5. O gel foi corado em Amido Black (Sigma®) e descorado em ácido acético 5%.

4 – Clonagem das sequências codificadoras das regiões variáveis das cadeias leve e pesada para montagem do scFv anti-LDL(-)

As sequências foram obtidas, primeiramente, a partir do cDNA dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal 2C7D5F10, o qual foi desenvolvido anteriormente em nosso laboratório e que contém reatividade à LDL(-) (Faulin *et al*, 2008). Após a obtenção das sequências codificadoras, o cassete para expressão do scFv anti-LDL(-) foi construído conforme descrito por Telles (2008), e então foi inserido no plasmídeo pPIgLe para expressão em *Pichia pastoris*. Este plasmídeo apresenta uma fusão da proteína recombinante com proteína A como forma de detecção para Western Blot e ELISA, além de ser uma estratégia de purificação.

5 – Expressão e caracterização do scFv anti-LDL(-) fusionado à proteína A

A construção pIgLE/scFv anti-LDL(-) 2C7 foi introduzida na linhagem SMD1168 da levedura *P. pastoris* através do método de transformação denominado eletroporação, obtendo-se um clone transformante e positivo para a expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7 (Telles, 2008).

5.1 – Expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7

A colônia positiva foi induzida para o procedimento de expressão, iniciando-se com 200 mL de meio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) em cultura de frasco, nas condições de 200 rpm e 30°C até a densidade óptica da cultura a 600 nm atingir 2,0 a 6,0. Quando a cultura estava na densidade óptica ideal, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos e as células foram ressuspensas em 200 mL de meio BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*), sendo que metanol 1%, PMSF 1 mM e EDTA 5 mM foram adicionados a cada 24 horas. Após 48 horas de indução, sobrenadante de cultura foi coletado e as mesmas células foram ressuspensas em 200 mL de meio BMMY para prosseguimento da expressão por mais 48 horas, sob as mesmas condições citadas anteriormente.

5.2 – Purificação do scFv anti-LDL(-) por cromatografia de afinidade utilizando resina de IgG humana

A purificação do scFv anti-LDL(-) foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Sepharose acoplada a IgG humana (cedida pela Profa. Dra. Andréa Maranhão, UnB). Utilizando 4 mL de resina, a ativação da resina foi realizada com Ácido Acético 0,1M pH 3,0; seguida por uma lavagem com PBS pH 7,2. Posteriormente foi aplicada a

amostra (10, 20 e 50 mL do sobrenadante de cultura) sem auxílio de bomba peristáltica, apenas sob ação da força da gravidade. Novamente a resina foi lavada com PBS pH 7,2 para remoção das proteínas inespecíficas. As proteínas purificadas foram eluídas da resina através da redução de pH com Ácido Acético 0,1M pH 3,0; sendo que nesta condição a força de interação entre a proteína A e a IgG humana é muito baixa, permitindo assim a eluição das proteínas. Foram coletadas as frações eluídas para posterior análise em Dot Blot e gel de poliacrilamida. As frações coletadas foram neutralizadas com tampão de neutralização Tris 2M pH 11. As frações que apresentaram a proteína eluída por análise de Dot Blot foram concentradas e dialisadas em PBS através de Centriprep YM-10 (Millipore®).

5.3 – Análise da proteína purificada pelo método de Dot Blot

5 µl de cada fração coletada a partir da eluição foram aplicados sobre uma membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham®). A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado a 5% diluído em PBST sob agitação a 4°C durante 16 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com PBST e incubada com solução de anticorpo primário contendo leite desnatado a 2% e IgG de coelho (Zimed®) diluído 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBST, uma solução contendo anti-IgG de coelho (Zimed®) na diluição 1:5000 foi utilizada para a segunda incubação a temperatura ambiente durante 1 hora. Para a revelação, a membrana foi incubada com tampão para a atividade de fosfatase alcalina e em seguida, com os reagentes NBT/BCIP até o surgimento das bandas, sendo que a reação foi interrompida com lavagem de água destilada.

5.4 – Análise das proteínas em eletroforese em gel de poliacrilamida

A proteína purificada a partir do meio de cultura foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes. O gel separador foi preparado a 12% e a polimerização catalisada pela adição de persulfato de amônio 0,01% e de Temed (Invitrogen®) 0,003%. A seguir, o gel concentrador a 5% foi vertido, tendo a sua polimerização catalisada por 0,01% de persulfato de amônio e 0,001% de Temed. Uma vez vertido o gel concentrador, um pente de formação dos poços foi introduzido e, após sua polimerização, o gel foi acoplado ao sistema de eletroforese. As amostras foram preparadas adequando-se o volume de amostra ao volume de tampão de amostra 10X concentrado, aquecidos a 95°C durante 5 minutos e posteriormente, foram aplicados sobre o gel de poliacrilamida. Após a corrida do gel a 100 V por aproximadamente 2 horas, este foi submetido aos procedimentos de coloração por *Comassie Brilliant Blue* ou por prata.

5.5 – Coloração de gel de poliacrilamida por *Comassie Brilliant Blue*

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi incubado com 10 volumes de solução corante de *Comassie Brilliant Blue* por 30 minutos sob agitação. Após este período, o gel foi descorado, sob agitação, com solução descorante de *Comassie Brilliant Blue*, trocando-se esta solução até o momento da visualização das bandas.

5.6 – Coloração de gel de poliacrilamida por prata

Para a coloração por prata, o gel de poliacrilamida foi incubado com as seguintes soluções durante 10 minutos sob agitação: solução de fixação, de lavagem, de sensibilização, de coloração, respectivamente. Em seguida, o gel foi incubado com

a solução de revelação sob agitação até o surgimento das bandas e, então, incubado com a solução de bloqueio da reação. Entre cada incubação, o gel foi submetido a 3 lavagens com água destilada para remoção dos resíduos das soluções. O gel foi incubado novamente com solução de fixação por 10 minutos sob agitação e rehidratado com água destilada por 10 minutos sob agitação.

5.7 - Análise de proteínas por Western Blot

As proteínas separadas por eletroforese em SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham®). O sistema de transferência foi montado na seguinte ordem: sobre a placa branca foram colocados a esponja, o papel filtro (*Whatman Chromatography Paper*®), a membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida, o papel filtro e por último a esponja. O sistema foi fechado e a cuba de transferência mantida em gelo com uma corrente de 100 V durante 1 hora. Após a transferência, a membrana foi lavada com água destilada e incubada com solução de bloqueio 5% (p/v) de leite desnatado diluído em PBST, por 16 horas sob agitação a 4°C. A membrana foi lavada com PBST e incubada com solução de leite desnatado a 2% (p/v) contendo anticorpo primário IgG de coelho (Zimed®) diluído 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Novamente, a membrana foi lavada com PBST e incubada com solução de anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma®) na diluição de 1:5000. A revelação foi realizada utilizando os reagentes NBT/BCIP conforme descrito no item 5.3.

5.8 - Ensaio de ligação à LDL(-) por ELISA direto

Uma diluição seriada da proteína foi realizada para o ensaio de ligação à LDL(-). Como controle negativo, foi utilizado como antígeno a LDL nativa, na qual espera-se que não haja reatividade com o scFv anti-LDL(-). A placa de ELISA foi sensibilizada com 1 µg/mL dos antígenos LDL nativa e LDL(-) diluídos em Tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9,6. A placa foi sensibilizada a 4°C durante 16 horas. Então, a placa foi lavada com PBS-Tween 0,05% (v/v) e bloqueada com leite desnatado 2% (p/v) diluído em PBS-Tween 0,01% (v/v) durante 1 hora e 30 minutos a 37°C. Para a etapa de ligação do scFv anti-LDL(-) 2C7, a proteína purificada foi diluída na proporção 1:30, contendo inicialmente 344 ng de proteína. Partindo-se desta concentração foi realizada uma diluição seriada de 1:3, obtendo-se as seguintes concentrações: 111; 37; 12; 41; 1 e 0,4 ng de proteínas. A placa foi mantida a 37°C durante 1 hora e 30 minutos. A placa foi novamente lavada com PBS-Tween 0,01% (v/v). Para detecção da ligação foi utilizado como anticorpo primário IgG de coelho (Zimed®) na diluição 1:5000 incubado a temperatura ambiente durante 16 horas. Como anticorpo secundário utilizou-se anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1: 5000 (Sigma®) em uma incubação de 1 hora a 37 °C. A revelação foi realizada utilizando o reagente *p*-Nitrofenil Fosfato (Sigma®), substrato para detecção da atividade de fosfatase alcalina, sendo que a leitura da placa foi realizada a 405 nm.

Estas análises foram importantes para o conhecimento das características da proteína, porém, visando um aperfeiçoamento do scFv 2C7, a segunda etapa do trabalho teve como objetivo a inserção de hexahistidina como nova estratégia de purificação baseada na afinidade deste peptídeo por metais como o níquel.

6 - Subclonagem da sequência codificadora do scFv anti-LDL(-) 2C7 para obtenção da proteína fusionada à hexahistidina

6.1 – Preparação de DNA plasmidial pelo kit HiSpeed Plasmid Purification (Qiagen®)

A purificação do DNA plasmidial foi realizada segundo manual do fabricante.

6.2 - Digestão dos fragmentos de DNA com as enzimas de restrição *Xma I* e *Nco I*

A sequência codificadora do scFv 2C7 foi obtida através da digestão do plasmídeo intermediário plg16, o qual foi utilizado para a clonagem do scFv 2C7, com as enzimas de restrição *Xma I* e *Nco I*, utilizando-se 30 unidades das enzimas, 2 µg de DNA em um volume final de 50 µl e incubando-se o sistema de digestão a 37 °C durante 16 horas. O produto digerido foi analisado em eletroforese de gel de agarose 1%, conforme descrito no item 6.3.

6.3 - Análise de DNA em eletroforese em gel de agarose

A agarose foi preparada na concentração de 1 a 1,5% em tampão TAE 1x, contendo 5 µl do corante Gel Red (Biotium®). As amostras de DNA, adicionadas de tampão de amostra 1x adequado de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA analisados, foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese. O sistema de eletroforese foi mantido a 100 V. O DNA foi analisado por exposição do gel à luz UV por meio de um transiluminador e documentado por sistema de fotodocumentação.

6.4 - Eluição dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição separados em eletroforese de gel de agarose foram recortados do gel e coletados em microtubos para purificação do DNA por meio do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®).

6.5 – PCR para inserção da região codificadora da hexahistidina

O DNA digerido pelas enzimas de restrição *Xma I* e *Nco I* foi utilizado como molde para a reação de PCR com um primer 3' inserindo a porção referente às 6 histidinas (Tabela 1), conforme demonstrado na figura 3. As concentrações finais utilizadas para a reação de PCR foram 4 mM de dNTPs; 6 mM de $MgCl_2$; 0,6 μM de primers, 10 ηg de inserto de DNA e 1,5 Unidade da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®). As reações de PCR foram realizadas com 5 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, de anelamento dos primers a 50°C por 1 minuto, de polimerização a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; seguidos por 30 ciclos de desnaturação por a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, de anelamento a 65°C por 1 minuto e de polimerização a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose 1%, conforme item 6.3.

Figura 3: Representação esquemática da reação de PCR de inserção da sequência codificadora da hexahistidina. A figura A representa a hibridização dos *primers* nos primeiros ciclos de PCR, sendo que o *primer* 3' apresenta uma região não hibridizada em sua sequência. A figura B já demonstra os últimos ciclos de PCR, nos quais a região hibridizada foi incorporada à sequência dos produtos finais de PCR.

Tabela 1: Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de PCR de inserção e na análise de sequenciamento

Nome	Sequência	Finalidade
VH3 <i>Xma</i> I	5' CCA CTC CCG GGT TCA GCT GCA GCA 3'	Oligonucleotídeo específico para a região 5' da sequência codificadora do scFv anti-LDL(-)
2C7 Eco <i>His</i>	5'GAATTCTCAACCATGGTGATGGTGATGATG GTAAATCTCGAGCTT3'	Oligonucleotídeo que insere a região codificadora da hexahistidina na extremidade 3' da sequência codificadora do scFv anti-LDL(-)

6.6 – Clonagem do produto de PCR no plasmídeo pGEM T-Easy

Para permitir a ligação no plasmídeo, é necessário que o inserto apresente uma região 3' terminal poliadenilada pois o mecanismo de ligação é baseado na

complementariedade das bases timinas na região 3' terminal localizada no próprio vetor linearizado. Por isso, a poliadenilação consistiu de uma reação na qual foi adicionado aos produtos de PCR 1 µl da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen®), 2,5 mM de dATPs e 50 mM de MgCl₂, incubando-se a reação a 72°C por 30 minutos. Os produtos de PCR poliadenilados foram inseridos no plasmídeo pGEM T-Easy através de uma reação de ligação sob ação da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®), com uma proporção de 3:1 (vetor:inserto), sendo que este sistema de ligação foi mantido a 4°C durante 16 horas. A ligação foi confirmada através de digestão com 10 Unidades da enzima *Xma* I e 40 Unidades da enzima *Eco*R I em uma incubação de 16 horas a 37°C e, posteriormente, o plasmídeo digerido foi analisado em eletroforese de gel de agarose 1%.

6.7 – Transformação por choque térmico

As células competentes da linhagem DH5-α de *Escherichia coli* foram misturadas com o volume total da reação de ligação em uma quantidade de 500 ng de DNA. As células e o DNA foram mantidos no gelo por 30 minutos e incubados a 42°C durante 2 minutos. Após este tempo, os tubos foram recolocados no gelo imediatamente, sendo incubados por mais 2 minutos. Após o choque, 1 mL de meio LB foi adicionado ao sistema de transformação que foi mantido durante 1 hora sob agitação a 37 °C. Foram semeados 100, 150 e 300 µl de células transformadas sobre placas LB-Agar contendo 100 µg/mL do antibiótico de seleção ampicilina, 80 µg/mL de X-Gal e 0,5 mM de IPTG, incubados em estufa a 37 °C por 16 horas. As colônias isoladas foram selecionadas para crescimento e expansão do DNA plasmidial, que

posteriormente foi extraído conforme item 6.1 e analisado em eletroforese em gel de agarose 1%.

6.8 - Sequenciamento de DNA

O sequenciamento do DNA, a partir do plasmídio pGEM T-Easy, foi realizado pelo Serviço de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare®) foi utilizado conforme instruções do fabricante, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090 e as sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

6.9 – Análises em banco de dados

As análises das sequências nucleotídicas foram realizadas pelo programa “Electropherogram quality analysis”, disponível no site do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (www.biomol.unb.br/phph/). Análises posteriores foram realizadas utilizando o software Bioedit versão 7.0.9.0, sendo que as regiões hipervariáveis do anticorpo foram analisadas segundo o esquema numérico de Kabat (www.biochem.ucl.ac.uk/abs/#kabatnum).

6.10 – Ligação da sequência codificadora para scFv anti-LDL(-) no vetor de expressão pIgLE

Após a confirmação da inserção da hexahistidina à porção C-terminal da sequência scFv anti-LDL(-) 2C7, o plasmídeo clonado pGEM-T Easy foi digerido com

as enzimas de restrição *Xma I* e *EcoR I*, obtendo-se a sequência a ser ligada. O vetor de expressão pPIgLE também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição citadas anteriormente, sendo que ambos inserto e vetor foram purificados a partir de gel de agarose conforme descrito no item 6.4. Para esta ligação, foram testados: proporções de inserto/vetor de 1/1, 2/1, 3/1, 5/1 e 6/1; temperaturas de 4°C e 24°C; tempos de incubação de 1 e 16 horas; 1 e 5 Unidades da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®). Métodos diferentes de transformação do material ligado também foram avaliados como a eletroporação na linhagem XL1-Blue e o choque térmico em DH5- α competentes, ambas de *Escherichia coli*. A ligação foi obtida através da precipitação conjunta de inserto e vetor em um mesmo microtubo com 2,5 volumes de etanol 100% gelado, 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 60 μ g de glicogênio, mantidos a -80°C por 1 hora. O DNA precipitado então foi centrifugado a 12000 rpm e 4°C, lavado com etanol 70% gelado e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Descartou-se o sobrenadante e o microtubo permaneceu aberto para a secagem do DNA e a evaporação do etanol. O DNA foi ressuspendido em 3 μ l de água estéril e no mesmo microtubo foi adicionado 1 Unidade da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®), tampão de enzima e água completando um volume total de reação de 10 μ l. Esta ligação foi incubada a 4°C durante 18 horas. O método de transformação utilizado foi o choque térmico na linhagem DH5- α .

6.11 – Preparo de células eletrocompetentes de *P. pastoris*

Uma colônia de *P. pastoris* linhagem SMD 1168 foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada a 30°C durante 16 horas, sob agitação a 200 rpm. A seguir 0,1 a 0,5 mL do pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio YPD. A cultura foi incubada nas

mesmas condições acima até a cultura atingir uma leitura de densidade óptica a 600 nm de 1,3 a 1,5. As células foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 250 mL de água gelada estéril. A centrifugação foi repetida duas vezes, sendo que na primeira o sedimento foi ressuspensionado em 125 mL de água gelada estéril e na segunda em 20 mL de sorbitol 1M estéril e gelado. As células foram centrifugadas novamente e ressuspensionadas em 400 µL de sorbitol estéril gelado. As células eletrocompetentes então foram aliquotadas em um volume de 80 µL em microtubos estéreis.

6.12 – Transformação

O DNA plasmidial foi digerido com uma enzima que possui sítio único no vetor (*Sal I*) com o objetivo de linearização do material genético. A digestão do vetor pPIgLE com a enzima *Sal I* foi realizada em banho-maria a 37°C durante 16 horas e confirmada em eletroforese de gel de agarose 1%. Posteriormente, o plasmídeo linearizado foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% gelado; 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2; 60 µg de glicogênio e incubado a -20°C durante 16 horas. As células eletrocompetentes e o DNA plasmidial precipitado foram submetidos às seguintes condições: 1500 V, 400 Ω, 25 µF, 10 ms em um campo de 7500 V/cm, utilizando o equipamento Gene Pulser II (Biorad®). As células transformadas foram semeadas sobre placas contendo meio MD-Agar (*Minimal Dextrose Medium*) e mantidas a 30°C até o surgimento das colônias isoladas.

6.13 – Seleção das colônias transformantes pelo método de Colony Blot

As colônias isoladas foram repicadas para placas contendo meio MM-Ágar de indução da expressão e placas com meio MD-Ágar e foram mantidas em estufa a 30°C durante 48 horas, sendo que o metanol a uma concentração final de 1% foi reposto a cada 24 horas. Sobre as placas MM-Ágar, as colônias foram diretamente adsorvidas em membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham®), desta forma transferindo-se as proteínas expressas para a membrana. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com uma solução contendo 5% (p/v) de leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,05% (v/v) incubada a 4° C durante 16 horas. A incubação com a solução de anticorpo primário contendo anticorpo IgG de camundongo Anti-His (GE Healthcare®) a uma diluição 1:3000 foi realizada durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween 0,05% (v/v). A incubação da membrana com anticorpo secundário contendo anti-IgG de camundongo (Zymed®) conjugado com peroxidase na diluição de 1:3000 também foi mantida durante 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação. Finalmente, a membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência com o reagente ECL (Amersham®), conforme instruções do fabricante.

7 – Expressão e caracterização do scFv anti-LDL(-) com hexahistidina C-terminal

7.1 – Expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7

O clone positivo foi inoculado em 200 mL de meio BMGY e mantido sob agitação (200 rpm) a 30 °C até a cultura atingir uma densidade óptica a 600 nm de 2 a 6. As células foram coletadas em tubos falcon de 50 mL por centrifugação a 5000 rpm por 5

minutos, a temperatura ambiente. As células eram ressuspensas em 200 mL de meio BMMY para indução da expressão. A cultura com o meio BMMY foi mantida sob agitação (200 rpm) a 20 °C. Diferentes concentrações finais de metanol como 0,5; 1 e 3% foram testadas. A concentração de 1% no meio de cultura foi mantida adicionando-se metanol a cada 24 horas. Inibidor de protease como PMSF a 1 mM também foi utilizado durante a expressão, suplementado a cada 24 horas. A indução foi mantida por 48 horas e, após este período, o meio de cultura foi centrifugado a 5000 rpm durante 40 minutos e o sobrenadante coletado. As mesmas células foram novamente ressuspensas em novo meio BMMY para a continuação da indução da expressão por 48 horas. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e PMSF 1mM foi adicionado.

7.2 – Processamento do sobrenadante de cultura e purificação em resina de níquel

O sobrenadante foi concentrado em tubo filtrante Vivaspin (GE Healthcare®) de centrifugação com poro do tamanho de 10 KDa e depois foi dialisado contra tampão de ligação da resina de níquel. O volume da resina Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare®) utilizado foi de 1 mL com capacidade máxima de purificar 40 mg de proteína. Inicialmente, 5 mL de água destilada foram adicionados à coluna para remoção do etanol, seguido de 5 mL de tampão de ligação para equilibrar a resina. A purificação foi realizada com 20 mL de sobrenadante de cultura incubado no sistema “batch”, no qual durante 1 hora o sobrenadante dialisado e a resina são mantidos sob agitação orbital, no gelo. A lavagem da inespecificidade foi realizada com 5 mL de

tampão de ligação e a proteína eluída com 500 mM de imidazol. O scFv purificado foi coletado em um mesmo tubo e concentrado no Vivaspín (GE Healthcare®) e posteriormente foi dialisado em PBS pH 7,4; sendo armazenado em alíquotas mantidas em -20°C.

7.3 – Análises da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot

A expressão do scFv anti-LDL(-) 2C7 com hexahistidina foi analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% conforme o item 5.4 e corado por prata (item 5.6). A confirmação da expressão da proteína foi realizada pelo método de Western Blot (item 5.7), sendo que o anticorpo utilizado como primário foi IgG de camundongo Anti-His (GE Healthcare®) na diluição 1:3000, enquanto que o anticorpo secundário foi um Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Zimed®) diluído 1:3000. A revelação foi feita por 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (Sigma®) diluído em solução de Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 com adição de 12 µl de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) (Merck®).

7.4 - Teste de afinidade do scFv anti-LDL(-) por Dot Blot

A quantidade de proteína purificada foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Uma membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham®) foi sensibilizada com soluções de LDL nativa, LDL eletronegativa e scFv anti-LDL(-) com concentrações finais de 1 µg/mL. A membrana foi bloqueada com solução de leite

desnatado a 5% diluído em PBS-Tween 0,05% durante 16 horas sob agitação a 4°C. A membrana foi lavada com PBS-Tween 0,05% e então incubada com 193 µg/mL de scFv anti-LDL(-) diluído em uma solução de leite desnatado a 1% em PBS-Tween 0,01% durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. A solução com anticorpo primário continha IgG de camundongo anti-His (GE Healthcare®) diluído 1:1000 em uma solução de leite desnatado 1% e foi mantida durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween 0,05% e incubada com anticorpo secundário que consistia de uma solução de leite desnatado a 1% com um anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Zimed®) a uma diluição de 1:1000, que também foi mantido durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. A revelação da membrana foi realizada por 3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (Sigma®) diluído em solução de Tris-HCl 0,05M pH 7,4 com adição de 12 µl de peróxido de hidrogênio 30% (Merck®).

8 – Ensaio de captação de LDL(-) por macrófagos

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI contendo bicarbonato de sódio 2,0 g/l, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% SFB inativado. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em ar totalmente humidificado. Utilizou-se 1x10⁵ células para cada poço em uma placa de cultura que continha um total de 48 poços. Após a aderência das células à placa, estas foram carenciadas com 1 % de soro fetal bovino durante 10 horas. Após este período as células receberam o tratamento. O estudo foi realizado utilizando-se 5 grupos:

(1) células sem tratamento como controle;

- (2) células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL nativa;
- (3) células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL eletronegativa;
- (4) células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL eletronegativa e 150 µg/mL de scFv 2C7;
- (5) células incubadas com 150 µg/mL de scFv 2C7;

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. As células fixadas e coradas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e precipitado. As imagens foram obtidas através do programa Motic Images Plus versão 2.0.

8.1 – Ensaio de captação de LDL(-) utilizando-se um gradiente de concentração de scFv 2C7

Utilizando-se uma placa de cultura de 48 poços, avaliou-se a atividade do scFv 2C7 em um gradiente de concentração em macrófagos RAW 264.7. As células foram incubadas com 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL de scFv 2C7 e cultivadas em meio RPMI. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em ar totalmente humidificado durante 16 horas. Então, as células foram fotografadas através do programa Motic Images Plus versão 2.0.

9 – Avaliação do padrão de glicosilação do scFv 2C7

9.1 – Tratamento enzimático da proteína com Endo H

O scFv 2C7 purificado foi, primeiramente, desnaturado com 0,5 % de SDS e 0,04 M de DTT e aquecido a 100°C durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 % de citrato de sódio pH 5,5 como tampão da reação e 1000 unidades da enzima Endo H (New England Biolabs®). Este sistema de digestão foi incubado a 37°C durante 16 horas. A proteína foi analisada por gel de poliacrilamida (item 5.4) e Western Blot (item 5.7), onde a revelação da membrana foi realizada através do kit ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare®).

9.2 – Purificação em resina de Concanavalina A

O sistema de digestão citado no item 9.1 foi posteriormente purificado em resina de Concanavalina A (GE Healthcare®) para separação da porção glicosilada da proteína. 1 mL da resina foi empacotada em uma coluna e esta foi lavada com 10 mL de tampão de ligação para remoção do conservante. A resina foi equilibrada com 10 mL de tampão de ligação antes de se aplicar o sistema de digestão, o qual foi incubado durante 40 minutos com a resina, agitando-se a coluna a cada 10 minutos. A porção que fluiu direto pela resina foi coletada e a coluna foi lavada com 10 mL de tampão de ligação. A eluição da proteína glicosilada foi realizada com 500 mM de metil- α -D-manopiranosídeo. Em todas as etapas, foram coletadas alíquotas para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida (item 5.4) e posteriormente, Western Blot (item 5.7).

10 – Ensaio de viabilidade celular

Para comparação do efeito do scFv 2C7 glicosilado e desglicosilado sobre a viabilidade dos macrófagos, foi realizado um ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]. Para cada poço 1×10^4 células foi utilizado em uma placa de cultura de 96 poços. Após a aderência das células, 100 μ l de meio RPMI contendo o tratamento foi adicionado, incubando-se a placa de cultura por um período de 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Foram testadas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09 e 0,04 μ g/mL. Então, o meio foi retirado por inversão e 50 μ l de MTT foi adicionado (na concentração de 1mg/mL diluído em meio RPMI sem vermelho de fenol). A placa de cultura foi mantida sob agitação durante 3 horas em temperatura ambiente. A solução foi removida por inversão e 100 μ l de DMSO (Merck®) foi adicionado e incubado durante 30 minutos, sob agitação. Em seguida, a absorbância da placa foi medida em 580 nm.

10.1 – Ensaio de captação de LDL(-)

Após a determinação da concentração do scFv 2C7 que manteve as células viáveis foi realizado o ensaio de captação de LDL(-) conforme descrito no item 8, porém utilizando a concentração de 6,25 μ g/mL de scFv 2C7 para o tratamento dos macrófagos.

11 – Análise da expressão de genes pró-inflamatórios no ensaio de captação de LDL(-)

11.1 – Condições de cultura

Macrófagos foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio 2,0 g/l, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e 10% soro fetal bovino inativado. As células foram incubadas a 37° C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Para estes experimentos, foram utilizadas placas de cultura de 12 poços, com 1x10⁶ células em cada poço. Para análise da expressão dos genes CD36, TLR-4 e COX-2 as células foram carenciadas por 16 horas com 1% de soro fetal bovino e posteriormente tratadas com 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6, 25 µg/mL de scFv 2C7 durante 3 horas.

11.2 – Extração de RNA

RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen) segundo especificações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e considerados de boa qualidade os RNAs que apresentaram uma razão da absorbância 260/280 nm com valores próximos de 2. Após a quantificação espectrofotométrica, a qualidade dos RNAs foi verificada em gel de agarose-formaldeído.

11.3 – Construção dos cDNAs

Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 µg de RNA total e um mix contendo oligo dT12-18 (0,5 µg /µl), dNTP mix (10 mM) e RNAsin (40 U/µl), Superscript III (200 U/µl), bem como DTT (0,1M) e 1st strand buffer (5X). Os tubos foram incubados por 5

min a 65°C, 120 min a 50°C e 5 min a 95°C. Após a reação, os tubos foram colocados imediatamente em gelo e armazenados a -20°C.

11.4 – Desenho dos primers

Após a escolha dos genes que seriam avaliados, a sequência dos cDNAs desses genes 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 genes normalizadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) e estão listados na tabela 2. Os primers selecionados possuíam 18-22 nucleotídeos, conteúdo de G/C aproximado de 50%, temperatura de anelamento entre 58-60°C, além de não conter mais de 2 Gs ou Cs na extremidade 3' e o tamanho do fragmento resultante permanecer entre 50 e 150 bp. Além disso, os *primers* Sense e Antisense localizavam-se em éxons distintos e possuíam uma diferença máxima de 2°C em suas temperaturas de anelamento. 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 solubilizados em água de MiliQ estéril e armazenados em freezer -20°C.

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados para análise de expressão gênica.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
CD36	5' TTTCCTCTGACATTTGCAGGTCTA 3'	5' AAAGGCATTGGCTGGAAGAA 3'
COX-2	5' TGGTGCCTGGTCTGATGATG 3'	5' GTGGTAACCGCTCAGGTGTTG 3'
TLR-4	5' TCATGGCACTGTTCTTCTCCT 3'	5' CATCAGGGACTTTGCTGAGTT 3'
18 Sr RNA	5' GTAACCCGTTGAACCCCAT 3'	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'

11.5 – Reação de PCR *Real Time*

Para as reações de *real time PCR* (qRT-PCR) foram utilizados 0,5 µl de cDNA, 1 µl da mistura de um dos pares de primers *forward* e *reverse* de cada gene citado anteriormente, 11 µl de água miliQ estéril e 12,5 µl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®).

O ensaio qRT-PCR foi realizado no aparelho 7500 FAST (Applied Biosystems®) nas seguintes condições: 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. Cada amostra foi feita em duplicata. A análise dos dados resultantes das reações de *real-time PCR* foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

11.6 – Análise estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre a expressão de RNAm foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA ou *t* Student. O teste de Turkey foi utilizado na análise de comparações pareadas. Todos os cálculos foram realizados pelo software GraphPad Prisma.

IV. RESULTADOS

1. Expressão do scFv 2C7 fusionado com proteína A

Uma colônia positiva foi induzida para o procedimento de expressão em pequena escala em cultura de frasco. A expressão da proteína iniciou-se em 24 horas de indução, sendo que em 48 horas foi observada maior expressão da proteína. Os *rounds* de expressão foram importantes porque mantiveram as mesmas células induzidas para a produção da proteína por mais 48 horas (Figura 4).

Figura 4: SDS-PAGE 12% e Western Blot do sobrenadante de cultura de *P. pastoris* com 48 horas de indução de expressão no final do 2º Round de expressão. As setas indicam a banda correspondente a proteína scFv anti-LDL(-) com um peso molecular de 35 KDa. Padrão de peso molecular: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas®).

A partir da purificação do sobrenadante de cultura em resina de IgG humana foram coletadas frações eluídas para posterior análise em Dot Blot (Figura 5), gel de poliacrilamida 12% e Western Blot (Figura 6).

Figura 5: Dot Blot das frações eluídas com a purificação por cromatografia de afinidade em resina de IgG humana. A: Purificação com 10 mL de aplicação do sobrenadante; 1-28: Frações eluídas. B: Purificação com 25 mL de aplicação do sobrenadante; 1-7: Lavagem após aplicação do sobrenadante; 8-32: Frações eluídas. C: Purificação com 50 mL de aplicação de sobrenadante; 1-27: Frações eluídas. C+: Controle positivo com solução de IgG de coelho (Zimed®); C-: Controle negativo com PBS.

A análise de Dot Blot demonstrou que a proteína foi eluída entre as frações 1 e 3 para a purificação de 10 mL de sobrenadante, 10 e 21 para a aplicação de 25 mL, 2 e 11 para a aplicação de 50 mL. Estas frações foram concentradas a fim de se obter maior quantidade de proteína purificada.

Figura 6: Gel de poliacrilamida corado com *Comassie Blue Brilliant* e Western Blot, respectivamente, das frações eluídas da purificação em cromatografia de afinidade. Colunas 1-3: Frações eluídas; Coluna 4: Sobrenadante de cultura com 48 horas de indução. As setas indicam o scFv anti-LDL(-) com aproximadamente 35 kDa. M: Padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas®).

Após a purificação da proteína, foi avaliado a afinidade de ligação do scFv 2C7 à LDL(-) por ensaio de ELISA direto, o qual confirmou que a proteína eluída manteve sua especificidade de ligação a LDL(-), mesmo em quantidades relativamente baixas (Figura 7), demonstrando que houve maior reatividade com 0,0041 e 0,0014 µg de scFv 2C7.

Figura 7: Gráfico do ELISA, demonstrando a atividade de ligação do scFv ao seu antígeno LDL(-).

Confirmados a purificação e a afinidade do scFv 2C7, o trabalho foi direcionado para a aplicação terapêutica desta proteína e por isso, objetivou-se uma melhora na sua construção através de engenharia genética. Portanto, o trabalho retornou para a etapa de clonagem, com o desenho de novos *primers* direcionados para a região C-terminal da proteína, com o objetivo de inserção da hexahistidina. Retomando com o vetor bacteriano plg16 utilizado para montagem do cassete de expressão foi possível a obtenção dos moldes de DNA para a PCR de inserção.

2. Obtenção da sequência codificadora do scFv anti-LDL(-) com hexahistidina

A sequência codificadora do scFv 2C7 foi obtida através de digestão com enzimas de restrição *XmaI* e *NcoI*. As enzimas de restrição *XmaI* e *NcoI* digeriram regiões do plasmídeo plg16 que flanqueiam o cassete e removem a proteína A que está localizada entre os sítios de restrição de *NcoI* e *EcoRI* (Figura 8).

Figura 8: Mapa de restrição do plasmídeo pIg16. A faixa indicada pelas cores vermelha, amarela e verde correspondem à região codificadora do scFv 2C7, enquanto que as setas indicam os sítios de restrição *NcoI* e *EcoRI* demonstrando a sequência codificadora da proteína A, na cor azul, e que foi removida do cassete de expressão (www.unb.br/ib/cel/imol).

Após a confirmação da liberação do inserto pela digestão com as enzimas de restrição *XmaI* e *NcoI*, a banda correspondente ao inserto foi eletroeluída do gel de agarose. A eletroforese em gel de agarose confirmou a integridade dos insertos de DNA após a eluição do material (Figura 9).

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o inserto eluído. Coluna 1: inserto correspondente à sequência removida do plasmídeo pIg16 com um tamanho de aproximadamente 800 pares de bases; M1: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); M2: Low Mass Ladder (Invitrogen®).

A determinação da quantidade de DNA do inserto foi realizada no Nanodrop™, obtendo-se uma quantidade de 26,8 ng de DNA. O inserto purificado e quantificado foi utilizado como molde para a reação de PCR com o *primer* 3' inserindo a porção referente às 6 histidinas, um *stop codon* (sinal de término de expressão) e um sítio de *EcoRI*. Esta reação resultou no produto amplificado, confirmado por análise em gel de agarose.

Então, os produtos de PCR foram inseridos no vetor de clonagem pGEM T-Easy. O vetor ligado foi transformado na linhagem DH5-α de *E. coli* pelo método de choque térmico para a preparação plasmidial em larga escala. O vetor pGEM/scFv 2C7 extraído foi enviado para o serviço de sequenciamento. As sequências analisadas pelo software BioEdit apresentavam todas as 3 regiões determinantes de complementariedade da cadeia pesada e 3 regiões da cadeia leve do anticorpo, demonstrando a conservação da especificidade do scFv 2C7, a inserção da hexahistidina na região C-terminal da proteína, o *stop codon* e o sítio de restrição *EcoRI* que possibilita a ligação da porção final da sequência do scFv 2C7 no vetor de expressão pPIgLE (Figura 10).

Figura 10: Mapa de restrição do vetor de expressão pPIgLE de leveduras. Este vetor derivado do vetor comercial pPIC9 (Invitrogen®) de *P. pastoris* foi cedido pela Profa. Dra. Andrea Maranhão (Universidade de Brasília). Este vetor apresenta uma

sequência do scFv anti-Z22, o qual foi substituído pelo scFv anti-LDL(-) 2C7 (www.unb.br/ib/cel/imol; Andrade et al, 2000).

Para a reação de ligação no vetor pPIgLE, este foi digerido com as enzimas de restrição *XmaI* e *EcoRI* para a linearização do mesmo (Figura 11). O vetor pGEM scFv 2C7 também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição (Figura 12). As bandas correspondentes ao inserto e vetor foram eletroeluídas do gel de agarose.

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% com a digestão do vetor pPIgLE com as enzimas *XmaI* e *EcoRI*. Coluna 1: vetor pPIgLe intacto; Coluna 2: vetor pPIgLe digerido. A seta indica a porção referente ao vetor linearizado que foi utilizado na reação de ligação com o inserto scFv 2C7. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a digestão do vetor pGEM scFv 2C7 com as enzimas *XmaI* e *EcoRI*. Coluna 1 - vetor pGEM scFv

2C7 digerido, com a seta demonstrando a liberação do inserto. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

A visualização em gel de agarose confirmou a digestão completa do vetor e a banda correspondente ao vetor linearizado foi eletroeluída do gel. A precipitação conjunta do inserto e vetor no mesmo microtubo antes da reação de ligação, seguida pela transformação por choque térmico favoreceu o surgimento de colônias isoladas. Seis colônias diferentes foram inoculadas em meio líquido LB para preparação plasmidial em larga escala e análise em eletroforese de gel de agarose. O vetor pPIgLE scFv 2C7 foi submetido ao sistema de digestão com enzimas *XmaI* e *EcoRI* para confirmação da ligação do inserto no vetor de expressão (Figura 13).

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando vetor intacto e digerido em ordem sequencial de clones obtidos da reação de ligação. Colunas 1, 3, 5, 7, 9, 11: clones 1- 6 do vetor pPIgLE scFv 2C7 intacto; colunas 2, 4, 6, 8, 10, 12: clones 1-6 do vetor pPIgLE scFv 2C7 digeridos com as enzimas *XmaI* e *EcoRI*. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Todos os clones obtidos apresentaram liberação do inserto que apresenta aproximadamente 800 pares de bases, confirmando que a reação de ligação com precipitação prévia do DNA foi eficiente. Destes clones, apenas um deles foi digerido com *Sall* para linearização do plasmídeo e transformação na cepa SMD1168 de *P. pastoris*. Foram obtidas poucas colônias isoladas nesta transformação, sendo estas colônias repicadas para a seleção das colônias positivas pelo método de Colony Blot.

3. Expressão do scFv 2C7 em *P. pastoris*

Após a seleção das colônias positivas foi realizado um teste de expressão em pequena escala utilizando-se 7 colônias. O processo de expressão do scFv 2C7 foi realizado com 48 horas de indução com o metanol. Então, a cultura foi centrifugada para que o sobrenadante de cultura fosse coletado para análise posterior das proteínas em SDS-PAGE e Western Blot (Figura 14).

Apesar de todos os clones expressarem o scFv 2C7, pois foram todos selecionados positivamente no método de Colony Blot (dados não mostrados), amostras do sobrenadante de cultura de alguns desses clones apresentaram uma expressão bastante baixa que não foi detectada pelo Western Blot. Devido a essa diferença de expressão entre os 7 clones, somente o clone 4 foi escolhido para expressão em volume maior de cultura, pois foi este que apresentou maior expressão em relação aos outros 6 clones.

Figura 14: Análise de SDS-PAGE e Western Blot do sobrenadante de cultura da expressão com 48 horas de indução. Colunas 1-7: sobrenadante de cultura dos clones 1-7 que continham o vetor pIgLE scFv 2C7. As setas indicam a expressão do scFv 2C7 que apresentava um peso molecular de aproximadamente 28 KDa. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas®).

Expressão em 200 mL de volume de cultura utilizando o clone 4 resultou em um rendimento de 9,5 mg/L de proteína. A purificação do scFv 2C7 em resina de níquel no sistema “*batch*” foi eficiente e apresentou uma pureza que foi representada no gel de poliacrilamida corado com prata e confirmado por Western Blot (Figura 15). O gel de poliacrilamida com scFv 2C7 purificado demonstra a visualização de 2 bandas com tamanhos de 28 e 30 KDa. Foram analisadas formas diferentes de processamento do sobrenadante de cultura, onde uma delas consistia em concentrar e dialisar o sobrenadante antes da purificação em resina de níquel, enquanto que a outra forma consistia em apenas ajustar o pH do sobrenadante para 7,4. Na forma concentrada e dialisada, houve maior recuperação da proteína e menos contaminantes durante a purificação por afinidade.

Figura 15: Análise da purificação do scFv 2C7 por gel de poliacrilamida e confirmado por Western Blot, respectivamente. Coluna 1: proteína purificada através da passagem direta do sobrenadante de cultura; coluna 2: proteína purificada obtida a partir do sobrenadante de cultura previamente concentrado e dialisado. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas®). A revelação do Western Blot foi realizada através do reagente DAB (Sigma®).

Foi verificado a afinidade do scFv 2C7 purificado em relação à LDL eletronegativa por ensaio de Dot Blot, utilizando como controle negativo a LDL nativa e como controle positivo da detecção da hexahistidina pelo anticorpo anti-His o próprio scFv 2C7, demonstrado na figura 16. O ensaio de Dot Blot confirmou a afinidade do scFv 2C7 em relação ao controle negativo com a LDL nativa, no qual não se verificou nenhum tipo de ligação.

Figura 16: Imunoensaio de Dot Blot confirmando a afinidade de ligação do scFv 2C7. A membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com: 1- LDL nativa como controle negativo; 2- LDL eletronegativa; 3- scFv 2C7 como controle positivo. A revelação foi realizada com o reagente DAB (Sigma®).

4. Caracterização do efeito do scFv 2C7 *in vitro* em ensaio de captação de LDL(-) por macrófagos

A fim de testar o efeito do scFv 2C7 sobre a formação de células espumosas, foi padronizado um método de captação de LDL(-) por macrófagos RAW 264.7. Foram realizados experimentos com o tratamento das células com LDL nativa e LDL(-). O tratamento com LDL(-) apresentou maior captação quando comparado com o tratamento com LDL nativa, no qual se visualizou um efeito semelhante ao controle (Figura 17).

LDL(-)

Figura 17: Ensaio de captação de LDL em macrófagos RAW. Macrófagos foram expostos a 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de LDL nativa ou LDL eletronegativa e depois fixados e corados por Oil Red O. As imagens foram obtidas pelo programa Motic Images Plus versão 2.0.

Com o ensaio de captação de LDL padronizado, foi possível analisar a formação das células espumosas sob o tratamento do scFv 2C7, conforme demonstrado na figura 18.

Controle

LDL (N)

LDL(-)

LDL(-) + scFv 2C7

scFv 2C7

Figura 18: Ensaio de captação de LDL sob a avaliação do efeito do scFv 2C7.

Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de LDL (N) ou LDL(-) e 150 $\mu\text{g/mL}$ de scFv 2C7, 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 no aumento de 20 X.

O tratamento das células com scFv 2C7 na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou a formação de vacúolos intracelulares e a possibilidade de maior captação pelos macrófagos quando comparado ao tratamento com LDL(-). Devido à este efeito

observado do scFv, foi avaliado um gradiente de concentração de scFv 2C7 sobre os macrófagos utilizando concentrações menores de 50 , 25, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19).

Figura 19: Análise do gradiente de concentração do scFv 2C7 em macrófagos. As células foram expostas a 50, 25, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ de scFv 2C7 durante 16 horas e

imagens foram capturadas através do programa Motic Images Plus versão 2.0. Nenhum tipo de coloração foi utilizado. As imagens foram visualizadas no aumento de 20 X.

Através das imagens obtidas com a análise do gradiente de concentração demonstraram que na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ainda há formação de vacúolos, sendo menor na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e quase inexistente nas concentrações de 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$.

Para investigar a possível causa deste efeito do scFv 2C7 sobre os macrófagos, foi analisado a presença de glicosilação nesta proteína através de um tratamento com a enzima Endo H (New England Biolabs®), a qual possui a capacidade de clivar resíduos de alta manose (Figura 20).

Figura 20: Análise do padrão de glicosilação do scFv 2C7 sob tratamento com a enzima Endo H. 1: scFv 2C7 não tratado; 2: scFv 2C7 tratado; 3: glicoproteína 43 não tratada; glicoproteína 43 tratada. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas®).

Segundo o padrão de migração observado na figura 20, existe uma diferença na migração do scFv 2C7 após o tratamento com a enzima Endo H, sugerindo que há a ocorrência de glicosilação na proteína. A glicoproteína 43 foi utilizada como controle da atividade da enzima, pois é uma proteína glicosilada, sendo que após o tratamento seu padrão de migração apresenta dupla banda. Ainda na figura 20, a imagem do Western Blot confirma a presença do scFv 2C7 antes e depois do tratamento com a enzima Endo H. Analisando a sequência de aminoácidos do scFv 2C7, foi localizado um provável sítio de N-glicosilação formado pelos aminoácidos asparagina – x – serina/ treonina na primeira região determinante de complementariedade da cadeia leve.

Posteriormente, para confirmação da presença destes resíduos, a proteína tratada com a enzima foi purificada em uma resina de Concanavalina A que tem afinidade por resíduos de carboidratos, onde a proteína sem resíduos de manose não foi adsorvida pela resina e a porção da proteína que contém manose permaneceu retida na resina (Figura 21).

Figura 21: Análise em Western Blot do scFv 2C7 tratado com Endo H e purificado em Concanavalina A. 1: scFv 2C7 tratado com Endo H que não interagiu com a

resina; 2: lavagem da resina; 3: eluição com 500 mM de metil- α -D-manopiranosídeo.
M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas®).

Conforme observado na figura 21, o scFv 2C7 tratado e submetido à resina de Concanavalina A apresentou banda única, com aproximadamente 28 KDa, conforme demonstrado pela coluna 1. O scFv 2C7 não foi detectado no eluato de lavagem e eluição da resina, pois não foi visualizado pelo Western Blot.

Após a confirmação do padrão de glicosilação do scFv 2C7, um ensaio de viabilidade celular foi realizado para analisar se o efeito observado no primeiro ensaio de captação de LDL(-) seria devido aos resíduos de manose presentes na proteína. A viabilidade celular foi avaliada com a proteína glicosilada (Figura 22) e a proteína desglicosilada (Figura 23).

Figura 22: Gráfico de viabilidade celular em macrófagos com o ensaio de MTT, utilizando o scFv 2C7 glicosilado. Macrófagos foram tratados com scFv 2C7 diluído

serialmente iniciando-se de uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ durante um período de 24 horas. Cada coluna representa a porcentagem de viabilidade $\pm$ desvio-padrão.

Figura 23: Gráfico com a porcentagem de células viáveis utilizando o tratamento do scFv 2C7 desglucosilado. As células foram incubadas com scFv 2C7 que foi anteriormente tratado com a enzima Endo H e purificado em resina de Concanavalina A para a remoção dos resíduos de manose. Cada coluna representa porcentagem de viabilidade $\pm$ desvio-padrão.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais tóxica, com menos de 50% de viabilidade celular. A partir da concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ as células tratadas com a proteína glicosilada estavam viáveis, com mais de 80% de viabilidade celular.

Portanto, para o ensaio de captação de LDL(-) foi utilizada a concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de scFv 2C7 glicosilado por ser a maior concentração onde o efeito do tratamento seria mais pronunciado (Figura 24).

Controle

LDL (N)

LDL(-)

LDL(-) + scFv 2C7

scFv 2C7

Figura 24: Ensaio de captação de LDL (-) com o scFv 2C7. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de LDL (N) ou LDL (-); 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de scFv 2C7 por 16

hs. As células foram fixadas e coradas com Oil Red O e as imagens foram capturadas através do programa Motic Images Plus versão 2.0. As imagens foram visualizadas no aumento de 20 X.

O ensaio de captação de LDL(-) utilizando a concentração determinada pela porcentagem de viabilidade celular demonstrou uma redução na formação de células espumosas no tratamento com scFv 2C7. A intensidade da coloração avermelhada localizada no citoplasma demonstra o acúmulo de lipídeos, sendo que no aumento de 40X foi possível visualizar as gotículas de lipídeos no interior das células (Figura 25). Na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ houve pouca formação de vacúolos e as células mantiveram sua morfologia normal, comparando com as células sem tratamento.

Figura 25: Imagem representativa das gotículas de lipídeos acumuladas no interior dos macrófagos. As células foram tratadas com LDL(-) e a imagem obtida foi visualizada no aumento de 40X.

Visando entender os mecanismos do efeito inibitório do scFv 2C7 sobre a formação de células espumosas, a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento

da aterosclerose foi analisada em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Desse modo, o efeito do scFv 2C7 na expressão de COX-2, CD36 e TLR-4 foi avaliado. A expressão do RNAm foi detectada pela reação de qRT-PCR utilizando *primers* específicos para cada gene (apresentados na seção de materiais e métodos). Resultados preliminares sugerem que a incubação de células RAW 264.7 com scFv 2C7 (6,25 µg/mL) por 3 horas não apresentou qualquer efeito significativo sob as condições experimentais utilizadas (Figura 26). Em contraste ao resultado observado com o tratamento com scFv 2C7, a incubação com LDL(-) na concentração de 37,5 µg/mL induziu um aumento significativo no RNAm de CD36, COX-2 e TLR4. No entanto, quando as células RAW 264.7 foram estimuladas com scFv 2C7 e LDL(-), a presença do scFv 2C7 aboliu significativamente o efeito da LDL(-) sobre a expressão gênica de todos os mediadores avaliados.

A

CD36

Figura 26: Efeito do scFv 2C7 sobre a expressão relativa de RNAm de CD36, COX-2 e TLR-4. Células foram tratadas com scFv 2C7 (6,25 $\mu\text{g/mL}$); LDL(-) (37,5 $\mu\text{g/mL}$) ou scFv + LDL(-) durante um período de 3 horas. Os valores foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão; sendo que * representa $p < 0,05$ comparado ao controle e # representa $p < 0,05$ comparado ao tratamento com LDL (-).

V. DISCUSSÃO

Pichia pastoris é uma levedura considerada metilotrófica, pois basicamente utiliza como energia uma fonte de carbono. É um organismo eucarioto que expressa scFv com vantagens em relação a *Escherichia coli* como produção de proteínas solúveis que são secretadas para o meio de cultura através da presença de um sequência sinal de secreção fator α (WAN *et al*, 2008). Além disso, as condições redutoras do citoplasma de *E. coli* não permitem a formação das pontes dissulfeto importantes para a estabilidade do scFv (WORN & PLUCKTHUN, 2001) mas que podem ser formadas por *P. pastoris* pela capacidade deste organismo realizar modificações pós-traducionais (PATRICK *et al*, 2005).

Estudos relatam produção de scFv, em sistema de expressão *P. pastoris*, desde 1 mg/L (COELHO *et al*, 2007) até 40 e 80 mg/L em frasco de culturas (TANFOUS *et al*, 2006; WAN *et al*, 2008). O teste de expressão em um volume de 200 mL de meio de cultura resultou em um rendimento de 9,5 mg/L; sendo uma quantidade suficiente para os testes iniciais com os macrófagos.

Esta primeira fase do trabalho foi dedicada à expressão do scFv fusionado à proteína A, o que facilita muito a detecção da proteína em Western Blot e ELISA, que inclusive possibilitou a confirmação da afinidade do scFv 2C7 pela LDL(-). Apesar disso, a proteína de fusão apresenta a possibilidade de ser imunogênica, sendo inviável a sua aplicação para fins terapêuticos. Alguns trabalhos descrevem a proteína A como um fator de virulência e superantígeno para células B (GÓMEZ *et al*, 2007). Esta preocupação é válida, pois este trabalho é o primeiro de uma linha de pesquisa do nosso laboratório que objetiva o uso do scFv 2C7 como potencial agente imunoterapêutico para a aterosclerose.

Dentro dos domínios variáveis encontram-se regiões hipervariáveis concentradas em loops, denominadas *complementary determining regions* (CDRs), e são primeiramente, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno (WEISSER & HALL, 2009). A análise da sequência dos domínios variáveis da cadeia leve e pesada que formam o scFv 2C7 demonstraram que estas regiões hipervariáveis se mantiveram intactas mesmo após os processos de clonagem nos quais a sequência foi submetida, sugerindo que houve a manutenção da especificidade do fragmento de anticorpo a LDL(-).

A expressão da proteína em *P. pastoris* é fortemente regulada sob ação do gene promotor *AOX1*, o qual está localizado no vetor pPIgLE. Este gene codifica a enzima álcool oxidase que catalisa o primeiro passo na via de utilização do metanol, sendo responsável por grande parte da atividade desta enzima na célula (CEREGHINO & CREGG, 2000). A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot apresentou uma proteína de peso molecular de 28 KDa, que corrobora outros estudos de scFv (YANG *et al*, 2009; IRANI *et al*, 2009; YAMAWAKI *et al*, 2007; FREYRE *et al*, 2000), os quais visualizaram uma proteína de peso molecular muito similar.

A purificação por afinidade pela hexahistidina é baseada na interação entre um íon metal imobilizado e grupos doadores de elétrons da superfície da proteína. Os metais de transição mais utilizados são cobre, níquel, zinco, cobalto e ferro (POREKAR & MENAR, 2001). A habilidade do complexo de resíduos de histidinas em se ligar com alta afinidade aos íons metálicos mesmo na presença de agentes desnaturantes e a utilização de condições de eluição mais suaves tornam hexahistidina a ferramenta mais versátil para purificação de proteínas (GOEL *et al*, 2000). Por isso, a purificação com proteínas fusionadas à hexahistidina é o método mais utilizado em diversos trabalhos,

permitindo a detecção e purificação de proteínas recombinantes em organismos procarióticos e eucarióticos (SKERRA *et al*, 1991; JANKNECHT *et al*, 1992).

Apesar de uma proteína de 28 KDa ter sido observada a partir do sobrenadante de cultura, após a purificação em resina de níquel, observou-se a presença de dupla banda demonstrado pelo gel de poliacrilamida, com pesos moleculares de 28 e 30 KDa. Estudos indicam que bandas adicionais podem ocorrer devido à glicosilação da proteína recombinante, com a adição de resíduos de manose que aumentam o peso molecular da proteína (HEIMO *et al*, 1998; SAINZ-PASTOR *et al*, 2006).

Leveduras podem realizar glicosilação no nitrogênio de resíduos de asparagina em uma proteína quando encontrada a sequência consenso Asparagina – X – Serina/Treonina, formando N-glicosilação. Além disso, a informação de que somente oligossacarídeos com alto conteúdo de manose são encontrados em glicoproteínas de leveduras desencadeou o desenvolvimento de métodos que identificassem N-glicosilação em proteínas recombinantes, entre eles está o uso da enzima Endo- β -N-acetilglicosaminidase H (Endo H), cuja atividade altera a mobilidade de proteínas glicosiladas no gel de poliacrilamida (BRETTHAUER & CASTELLINO, 1999).

A enzima Endo H foi capaz de clivar resíduos de manose no scFv 2C7, pois reduziu o peso molecular da proteína demonstrado no gel de poliacrilamida na forma de uma única banda. Após o tratamento com a enzima Endo H, foi possível remover os resíduos de manose através de purificação em resina de concanavalina A, pois análise em Western Blot demonstrou a presença da banda de 28 KDa, confirmando a N-glicosilação da proteína. Considerando que a glicosilação aumenta o peso molecular da proteína recombinante e que existe uma porção desta proteína que não foi glicosilada pela *P. pastoris*, sugere-se que a atividade da enzima poderia degradar os resíduos de

manose, permitindo um aumento de proteína desglicosilada, conforme observado pelo gel de poliacrilamida e Western Blot, onde a banda correspondente ao scFv 2C7 desglicosilado aparece de forma mais intensa.

Em nosso laboratório, a padronização do protocolo de captação de LDL(-) em macrófagos permitiu avaliar o efeito do scFv 2C7 sobre a formação de células espumosas. Na análise qualitativa através da coloração das células por Oil Red O, foi observado que o tratamento com apenas LDL(-) aumentou o acúmulo intracelular de lipídeos em relação ao tratamento com a LDL nativa, indicando que a modificação oxidativa da partícula de LDL foi necessária para a formação de célula espumosa.

No entanto, os resultados obtidos quando os macrófagos foram tratados com o scFv 2C7 neste modelo experimental indicam que na concentração de 150 µg/mL houve uma indução na captação de LDL(-) ao invés de uma inibição do seu acúmulo, além da formação de vacúolos intracelulares que poderiam estar associados a este efeito. Por isso, avaliamos se essa formação de vacúolos era dependente da concentração de scFv 2C7, que foi confirmado quando macrófagos demonstraram menor formação de vacúolos quando incubados em menores concentrações.

Por outro lado, a confirmação de N-glicosilação do scFv 2C7 seria uma explicação para o aumento na captação de LDL(-), uma vez que os resíduos de manose que foram adicionados à proteína pela *P. pastoris* poderiam se ligar aos receptores de manose de macrófagos, resultando na ativação destas células, pois estes receptores participam da endocitose e fagocitose de glicoproteínas manosiladas (EZEKOWITZ *et al*, 1990).

Apesar deste aumento na formação de célula espumosa, o ensaio de viabilidade celular demonstrou que a proteína desglicosilada foi mais tóxica e por isso, optou-se

por realizar o ensaio com o scFv 2C7 glicosilado. O tratamento dos macrófagos utilizando a concentração de 6,25 µg/mL possibilitou manter a viabilidade das células sem a formação de vacúolos, e ainda foi capaz de diminuir a formação de células espumosas na presença de LDL(-).

Posteriormente, estudando os mecanismos envolvidos no efeito do scFv 2C7 sobre a inibição da formação de células espumosas, foram avaliados genes descritos no processo aterogênico. Devido à grande quantidade de mediadores envolvidos no processo de formação de placa aterosclerótica, foram eleitos para análise dois genes participantes da resposta inflamatória, COX-2 e TLR-4 e um gene implicado no influxo de lipídeos em macrófagos, o CD36. Além disso, a avaliação da expressão do gene de CD36 é importante, pois nosso grupo já demonstrou anteriormente que a presença de LDL(-) aumenta a expressão deste receptor em macrófagos RAW 264.7 (PEDROSA *et al*, 2010).

Por sua vez, dados recentes indicam o receptor toll-like-4 (TLR-4) como um provável candidato a receptor para LDL(-) devido à sua capacidade de ligação a LDL minimamente modificada (MILLER *et al*, 2003). Além disso, Bae e colaboradores (2009) demonstraram que LDL minimamente modificada induz a ativação pró-aterogênica de macrófagos por um mecanismo dependente de TLR-4, através da geração de espécies reativas de oxigênio que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima envolvida na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias expressas em células espumosas derivadas de macrófagos presentes em lesões ateroscleróticas (LI & GLASS, 2002). Desse modo, a

análise da expressão do gene COX-2 é importante, pois poderia representar a intensidade de resposta inflamatória.

Em nossos experimentos preliminares, macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LDL(-) demonstraram uma expressão aumentada de CD36, TLR-4 e COX-2 quando comparados a células não estimuladas. Em contrapartida, conforme esperado, a incubação de células RAW 264.7 com scFv 2C7 não demonstrou qualquer efeito sobre a expressão dos genes avaliados. Contudo, nossos resultados demonstraram que nas células incubadas com LDL(-) na presença do scFv 2C7, o efeito pró-inflamatório de LDL(-) não foi detectado.

Além disso, o scFv 2C7 mediante incubação com LDL(-) diminuiu a expressão gênica de TLR-4 e por isso supõe-se que houve menor ativação deste receptor que, conseqüentemente, pode ter reduzido a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Lee e colaboradores (2001) demonstraram em macrófagos RAW que ácidos graxos saturados induzem a expressão de COX-2 mediado pela ativação de NF κ B e que esta ativação é inibida por um mutante dominante negativo de TLR-4, sugerindo que os componentes de sinalização afetados por ácidos graxos saturados incluem o TLR-4 ou moléculas associadas a este receptor. Com base nestes dados, um provável mecanismo de ação do scFv 2C7 sobre macrófagos incubados com LDL(-) estaria na menor expressão e ativação de TLR-4, resultando na expressão reduzida de COX-2, demonstrando que o scFv 2C7 pode minimizar a resposta inflamatória gerada por células espumosas. Esta idéia é reforçada por Eberhart e colaboradores (1994) que associou o aumento da expressão de COX-2 com sítios de inflamação que ocorrem em alguns estados patológicos.

Um estudo realizado por Terra e colaboradores (2009) demonstrou resultados semelhantes, no qual houve uma redução na formação de células espumosas quando macrófagos RAW foram tratados com LDL minimamente modificada e coradas com Oil Red O, tendo uma relação com a menor expressão gênica de CD36.

A ativação do sistema imune está presente em todos os estágios do desenvolvimento da aterosclerose. A importância da inflamação é bem reconhecida atualmente e o sistema imune tem sido o foco da atenção como possível alvo para prevenção e tratamento da aterosclerose (NILSSON *et al*, 2005). Como a imunidade inata é a primeira a ser ativada em uma resposta inflamatória, agentes que possam neutralizá-la são importantes para impedir a evolução da doença para eventos clínicos mais graves. A participação do macrófago na imunidade inata que atua sobre a aterosclerose é muito importante, pois basicamente representa uma consequência da resposta destas células à presença de lipoproteínas modificadas na parede arterial, reforçando a idéia de que uma intervenção terapêutica mais direcionada aos macrófagos possa impedir diversas de suas funções que atuam na progressão da doença.

VI. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o scFv 2C7 anti-LDL(-) foi expresso com sucesso em *P. pastoris*. Além disso, sua purificação em resina de níquel obteve uma proteína pura e em concentrações suficientes para testes iniciais.

Posteriormente, a avaliação do scFv 2C7 anti-LDL(-) em macrófagos demonstrou que a proteína é capaz de inibir a formação de células espumosas. Resultados preliminares permitiram delinear alguns dos mecanismos envolvidos na atividade do scFv 2C7 como a expressão reduzida de CD36, COX-2 e TLR-4, sugerindo uma menor resposta inflamatória. Estes resultados são promissores e garantem a continuidade dos estudos relacionados às estratégias preventivas e terapêuticas na aterosclerose.

Portanto, apresentamos neste trabalho um potencial terapêutico do scFv 2C7 anti-LDL(-), e deste modo, estes dados conduzirão os trabalhos futuros do grupo em modelo animal de aterosclerose.

VII. REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. V., *et al.* Single-chain Fv with fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. **J. Biochem.** v. 128, p.891-895, 2000.

APOLINÁRIO, E. *et al.* Minimally modified (electronegative) LDL– and Anti-LDL– autoantibodies in diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. **Int. J. Atheroscler.**, v.1, n.1, p.42-47, 2006.

AVOGARO, P., BON, G. B., CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis**. v. 8, n.1, p. 79-87, 1988.

AVOGARO, P., CAZZOLATTO, G., BITTOLO-BON, G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. **Atherosclerosis**, v.91, p.163–171, 1991.

BAE, Y. S. *et al.* Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized LDL: TLR4- and Syk-dependent activation of Nox2. **Circ Res.**, v.104, n.30, p.210-218, 2009.

BENYTEZ, S. *et al.* Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. **Atherosclerosis**, v.160, p. 223–232, 2002.

BITTOLO, B. G., CAZZOLATO, G., AVOGARRO, P. Probucol protects low-density lipoproteins from in vitro and vivo oxidation. **Pharmacol. Res.**, v. 29, p.337–344, 1994.

BRAUNWALD, E. *Tratado de medicina cardiovascular*. 5. ed. São Paulo : Roca, 1999.

BRETTTHAUER, R. K. & CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.30, p.193-200, 1999.

CAZZOLATO, G., P. AVOGARRO, BITTOLO-BON, G. Characterization of a more electronegatively-charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. **Free Radic. Biol. Med.**, v.11, p. 247–253, 1991.

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

CHOI, S. H. *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.

COLLOT-TEIXEIRA, S. *et al.* CD36 and macrophages in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v.75, p.468-477, 2007.

CREGG, J.M. *et al.* Functional characterisation of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol. Cell. Biol.**, v.9, n.3, p.1316-1323, 1989.

CREGG, J. M., VEDVICK, T. S., RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes. **Nature Biotechnology**, v.11, p.905-910, 1993.

DALY, R. & HEARN, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit.**, v.18, p.119-138, 2005.

DEBELJAK, N. *et al.* Variability in the Immunodetection of His-tagged Recombinant Proteins. **Anal Biochem.**, v.359, n.2, p.216-223, 2006.

DE CASTELLARNAU, C. *et al.* Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n.10, 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.

DEMUTH, K. *et al.* A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.16, n.6, p.773-83, 1996.

DEVLIN, T. M. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 5. ed. São Paulo: Edgard Lúcher, 2002.

DOTEVALL, A. *et al.* Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and C-reactive protein are associated with diabetes and myocardial infarction in women. **Clin. Sci.**, v.101, p.523-531, 2001.

EBERHART, C. E. *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v.107, n.4, p.1183-1188, 1994.

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, 2002.

EMBERSON, L.M. *et al.* Expression of an anti- CD33 single-chain antibody by *Pichia pastoris*. **Journal of Immunological Methods**, v.305, p.135-151, 2005.

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.

FANG, J. C. *et al.* Circulating Autoantibodies to Oxidized LDL Correlate With Impaired Coronary Endothelial Function After Cardiac Transplantation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.22, p.2044-2048, 2002.

FAULIN, T. E. S. *et al.* Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n.12, p. 1769–1775, 2008.

FREYRE, F.M. *et al.* Very high expression of na anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v.76, p.157-163, 2000.

FROMMER, W. B., NINNEMANN, O. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal and plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.419-444, 1995.

GENG, H. L. *et al.* Increased expression of Toll like receptor-4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v.143, p. 269-273, 2005.

GLEISSNER, C. A. *et al.* Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. **Hypertension**, v.50, p.276-283, 2007.

GOEL, A. *et al.* Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1523, p.13-20, 2000.

GOMÉZ, M.I. *et al.* *Staphylococcus aureus* protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling. **The EMBO Journal**, v.26, p.701-709, 2007.

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.

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

HANSSON, G. K. e LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Reviews/Immunology**, v.6, p.508-519, 2006.

HAYDEN, M. S., GILLILAND, L. K., LEDBETTER, J. A. Antibody engineering. **Curr Opin Immunol.** v.9, n.2, p. 201-12, 1997.

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.

HELLWIG, S. *et al.* Analysis of Single-Chain Antibody Production in *Pichia pastoris* Using On-Line Methanol Control in Fed-Batch and Mixed-Feed Fermentations. **Biotechnol. Bioeng.**, v.74, p.344-352, 2001.

HODIS, H. N. *et al.* Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL). **J. Lipid Res.**, v.35, p.669–677, 1994.

HOLLIGER, P. & HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the of rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n.9, p.1126-1136, 2005.

HULTHE, J., BOKEMARK, L., FAGERBERG, B. Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58-year-old subjectively clinically healthy men. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, n.1, p.101-107, 2001.

IRANI, Y. *et al.* Production of scFv antibody fragments from a hybridoma with functional activity against human vascular endothelial growth factor. **Hybridoma. In press.**,2009.

JANKNECHT, R. *et al.* Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. **Gene**, v.121, p.321-324, 1992.

KARVONEN, J. *et al.* Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. **Circulation**, v.108, n.17, p.2107-2112, 2003.

KIPRIYANOV, S. M., LE GALL, F. Generation and production of engineered antibodies. **Molecular Biotechnology**, v.26, n.1, p.39-60, 2004.

KLEINMAN, Y. *et al.* Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected apoB100 epitopes and the interaction of LDL with cells. **J. Lipid Res.** v.29, p.729–743, 1988.

KLOUCHE, M. *et al.* On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. **J. Exp. Med.**, v.182, p.1959–1971, 1995.

KRIANGKUM, J. *et al.* Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. **Biomolecular Engineering**. v. 18, p.31-40, 2001.

LEE, J. D., KOMAGATA, K. Taxonomic study of methanol assimilating yeasts. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 26, p.133-158, 1980.

LEE, J. Y. *et al.* Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.20, p. 16683–16689, 2001.

LEEUWEN, M. V. *et al.* The IgM Response to Modified LDL in Experimental Atherosclerosis: Hypochlorite-modified LDL IgM Antibodies versus Classical Natural

T15 IgM Antibodies. **Contemporary Challenges in Autoimmunity: Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1173, p. 274–279, 2009.

LI, A. *et al.* Construction and Expression of a Single Chain Antibody Mimicing Human Ovarian Cancer Antigen CA125. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 3, n.1, p.59-63, 2006.

LI, A. C. & GLASS, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nature Medicine**, v.8, n.11, p.1235-1242, 2002.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

LOBO, E. D., HANSEN, R. J., BALTHASAR, J. P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.11, p.2645-2668, 2004.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUNDBERG, A. M. & HANSSON, G. K. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clinical Immunology**, *In press*, 2009.

MANZI, S., WASKO, M.C. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v.59, p.321-325, 2000.

MARANHÃO, A. Q. & BRIGIDO, M. M. Anticorpos Humanizados. *Biotechnologia – Ciência e Desenvolvimento*. v.23, p.38-43, 2000.

MCMAHON, M. & HAHN, B. H. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus — mechanistic basis of the association. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.633-639, 2007.

MILLER, Y. I. *et al.* Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.3, p.1561-1568, 2003.

MORENO, P. R. *et al.* Neovascularization in Human Atherosclerosis. **Circulation**, v.113, p.2245-2252, 2006.

NEWBY, A. C. *et al.* Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. **Thromb. Haemost.**, v.101, p.1006-1011, 2009.

NILSSON, J.; HANSSON, G.K.; SHAH, P.K. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development. **Arterioscler., Thromb., and Vasc. Biol.** v. 25, p.18-28, 2005.

NILSSON, J. *et al.* Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. **Curr. Pharm. Des.**, v.13, n.10, p.1021-1030, 2007.

OLIVEIRA, J. A. *et al.* Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. **Clin Biochem.** V.39, n.7, p.708-714, 2006.

PACKARD, R. R. S., LICHTMAN, A. H., LIBBY, P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. **Semin. Immunopathol.**, v.31, p.5-22, 2009.

PALINSKI, W. *et al.* Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92, n.3, p. 821-825, 1995.

PATRICK, S. M. *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p.249-270, 2005.

PEDROSA, A. M. C. *et al.* Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: Involvement of Nrf2. **Biochimica et Biophysica Acta**, *In press*, 2010.

PLUCKTHUN, A., SKERRA, A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.** v.178, p.497-515, 1989.

POREKAR, V. G. & MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.49, p.335-360, 2001.

PUURUNEN, M. *et al.* Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. **Arch. Intern. Med.**, v. 154, p.2605-2609, 1994.

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

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.

SANCHEZ-QUESADA, J. L. *et al.* Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with familial hypercholesterolemia. **Am. J. Cardiol.**, v.84, p.655–659, 1999.

SANCHEZ-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, p.3243–3249, 2001.

SANCHEZ-QUESADA, J. L. *et al.* Density distribution of electronegative LDL [LDL(2)] in normolipemic and hyperlipemic subjects. **J. Lipid Res.**, v. 43, p.699–705, 2002.

SANCHEZ-QUESADA, J. L. *et al.* Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 166, p. 261-270, 2003.

SHASHKIN, P. Macrophage Differentiation to Foam Cell. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.3061-3072, 2005.

SHERER, Y. & SHOENFELD, Y. Mechanisms of Disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v.2, n.2, p.99-106, 2006.

SHIMANO, H. *et al.* Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography. **J Lipid Res.**, v.32, n.5, p.763-73, 1991.

SKERRA, A. *et al.* The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. **Biotechnology**, v.9, p.273-278, 1991.

SMITH, J. D. *et al.* Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (*op*) and apolipoprotein E. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.8264-8268, 1995.

STEINBRECHER, U.P. *et al.* Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radicals Biol. Med.**, v.9, p.155-168, 1990.

STEMME, S., FABER, B., HOLM, J. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.92, p. 3893–3897, 1995.

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.

TELLES, A. E. R. **Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpo de cadeia única (scFv) anti-LDL eletronegativa em *Pichia pastoris*.** 2008. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TERRA, X. *et al.* Inhibitory Effects of Grape Seed Procyanidins on Foam Cell Formation in Vitro. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.2588-2594, 2009.

TIWARY, R. L., SINGH, V., BARTHWAL, M. K. Macrophages: An Elusive Yet Emerging Therapeutic Target of Atherosclerosis. **Medicinal Research Reviews**, v.28, n.4, p.483-544, 2008.

TOMASIK, A. *et al.* Circulating electronegatively-charged low-density lipoprotein in patients with angiographically documented coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Med.**, v.63, p.259–266, 2003.

TSIMIKAS, S. *et al.* Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein antigens reflects structure and disease activity of carotid plaques. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.25, n.6, p.1250-1255, 2005.

VEENHUIS, M. , DIJKEN, J.P., HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 24, p. 1-82, 1983.

VERMA, R., BOLETI, E., GEORGE, A. J. T. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **Journal of Immunological Methods**, v.216, p.165-181, 1998.

XU, X. H. *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.

YAMAWAKI, S. *et al.* Production of single-chain variable fragment antibody (scFv) in fed-batch and continuous culture of *Pichia pastoris* by two different methanol feeding methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.105, n.5, p.403-407, 2007.

YAN, Z. & HANSSON, G. K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. **Immunological Reviews**, v.219, p.187-203, 2007.

YANG, B. *et al.* Isolation, expression and characterization of two single-chain variable fragment antibodies against an endo-polygalacturonase secreted by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Protein Expression and Purification**, v.64, p.237-243, 2009.

YAO, W., LI, K., LIAO, K. Macropinocytosis contributes to the macrophage foam cell formation in RAW264.7 cells. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v.41, n.9, p.773-780, 2009.

YOSHIDA, H. *et al.* Receptor A, CD36, and Macrosialin in Resident Mouse Peritoneal Macrophages Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein Increases Expression of Scavenger. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.18, p.794-802, 1998.

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.

WEISSER, N.E. & HALL, J.C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnology Advances**, v.27, p.502-520, 2009.

WORN, A. & PLUCKTHUN, A. Stability engineering of antibody single-chain fv fragments. **J. Mol. Biol.**, v. 305, p.989-1010, 2001.

ZIOUZENKOVA, O. *et al.* Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 39874-39881, 2003.

ZHOU, X. *et al.* LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p.108-114, 2001.

ANEXOS

Meios de cultura para *Escherichia coli*

Meio LB

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 1,0% (p/v)

Ajustar pH 7,0

Meio LB ágar

Meio LB foi adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

Meio SOB

Peptona de caseína 2,0% (p/v)

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

NaCl 0,05% (p/v)

KCl 0,00186% (p/v)

Ajustar para pH 7,0.

Meio FB

KCl 100mM 0,745% (p/v)

CaCl₂·2H₂O 50mM 0,73% (p/v)

Glicerol 10% (v/v) 10% (p/v)

Acetato de Potássio 10mM 0,98% (p/v)

Ajustar pH 6,2 com HCl 6N 1:10.

*Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Meios de cultura para *Pichia pastoris*

Meio YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Extrato de Levedura 1,0% (p/v)

Peptona de Caseína 2,0% (p/v)

Glicose 2,0% (p/v)

As soluções contendo extrato de levedura, peptona de caseína e glicose foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos. No momento da utilização foram misturadas nas concentrações relacionadas acima.

YP-Ágar

Extrato de Levedura 1,0% (p/v)

Peptona de Caseína 2,0% (p/v)

Glicose 2,0% (p/v)

As soluções contendo extrato de levedura, peptona de caseína e glicose foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos. Para a preparação do meio, os reagentes estéreis foram misturados no momento do uso, completando-se com ágar 2% (p/v) até o volume necessário.

MD (Meio mínimo com Glicose)

YNB 13,4% (p/v)

Glicose 5% (p/v)

Biotina 4x10⁻⁵% (p/v)

Para o preparo deste meio, todos os reagentes foram previamente esterilizados por filtração, combinando água estéril ou ágar 2% (p/v) até completar o volume necessário.

MM (Meio mínimo com Metanol)

YNB 13,4% (p/v)

Metanol 5% (p/v)

Biotina 4x10⁻⁵% (p/v)

Para o preparo deste meio, todos os reagentes foram previamente esterilizados por filtração, combinando água estéril ou ágar 2% (p/v) até completar o volume necessário.

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 4x10⁻⁵ (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Casaminoácidos 2%

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)

Para o preparo dos meios BMGY e BMMY, à solução de extrato de levedura e peptona de caseína autoclavada separadamente foram adicionados os demais reagentes previamente esterilizados por autoclave (tampão fosfato de potássio e glicerol) ou por filtração (biotina, casaminoácidos, metanol e YNB), adicionando água destilada estéril até completar o volume necessário.

YNB (Yeast Nitrogen Base) - Solução estoque 10x

YNB * 3,4% (p/v)

Sulfato de Amônio 10% (p/v)

Esterilizada por filtração. Estocada a 4°C.

* Sem aminoácidos e sem sulfato de amônio.

Biotina - Solução estoque 500x

Biotina 0,02% (p/v)

A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm e estocada a 4°C.

Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0

K_2HPO_4 132mM

KH_2PO_4 868mM

Esta solução foi esterilizada em autoclave e estocada a temperatura ambiente.

Soluções

Solução estoque para inibidor de protease

PMSF 0,2 M

Dissolvido em isopropanol. Sua concentração de uso foi de 1 mM.

Soluções utilizadas em ensaios imunológicos

Western Blot

Tampão PBS 10x

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,32% (p/v)

KH_2PO_4 0,2% (p/v)

NaCl 1,6% (p/v)

KCl 0,2% (p/v)

Ajustar pH para 7,4.

*Concentração de uso 1x.

PBST (PBS- Tween)

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

Tampão de Transferência

Glicina 1,44% (p/v)

Tris Base 0,3% (p/v)

Metanol 20% (v/v)

Soluções utilizadas no isolamento de LDL eletronegativa

Tampão A

Tris-HCl 10 mmol/L

EDTA 1 mmol/L

Ajustar o para pH 7,4.

Tampão B

Tris-HCl 10 mmol/L

NaCl 1 mol/L

EDTA 1 mmol/L

Ajustar o para pH 7,4.

Soluções utilizadas na eletroforese em gel de agarose

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)

Soluções utilizadas em eletroforese em gel SDS-PAGE

Tampão de Corrida

Tris Base 3,03% (p/v)

Glicina 1,44% (p/v)

SDS 1% (p/v)

Completar o volume com água bidestilada. Ajustar para o 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 Parada/ 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 para purificação em resina de IgG

Tampão de ligação

PBS 1X pH 7,4

Tampão de Eluição

Ácido acético 0,1 M

Ajustar o pH para 3,0.

Tampão de Neutralização

Tris 2 M

Ajustar o pH para 11,0.

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

Tampão de ligação

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 0,5 M

Imidazol 30 mM

Ajustar o pH para 7,4.

Tampão de eluição

NaH₂PO₄ de sódio 20 mM

NaCl 0,5 M

Imidazol 500 mM

Ajustar o pH para 7,4.

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.

Solução para quantificação de proteínas por método de Lowry

Tartarato alcalino

Na₂CO₂ 2% (p/v)

Tartarato de sódio e potássio 0,05% (p/v)

NaOH 0,1N 0,4% (p/v)

Soluções para purificação de proteínas glicosiladas em resina de Concanavalina

A

Tampão de ligação

Tris-HCl 20 mM

NaCl 0,5 M

MnCl₂ 1 mM

CaCl₂ 1mM

Ajustar pH para 7,4.

Tampão de Eluição

Tris-HCl 20 mM

NaCl 0,5 M

Metil- α -D-manopiranosídeo 0,5 M

Ajustar pH para 7,4.