UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Estudos de interação de β_2 -glicoproteína I em solução aquosa e
com interfaces lipídicas**

Fernanda Martins Pozzi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Estudos de interação de β_2 -glicoproteína I em solução aquosa e
com interfaces lipídicas**

Fernanda Martins Pozzi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2008

Fernanda Martins Pozzi

**Estudos de interação de β_2 -glicoproteína I em solução aquosa e com
interfaces lipídicas**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, _____ de _____

*“Nenhuma quantidade de experimentação pode jamais provar o correto;
porém um único experimento pode provar o errado.”*

Albert Einstein

*“... Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Eu nada sei”*

Almir Sater e Renato Teixeira - Tocando em Frente

*À Lígia, pela acolhida em seu laboratório
e pelo apoio e confiança depositados em mim.*

*Aos meus pais, Helio e Sônia,
por me darem condições para a realização dos meus sonhos
e por serem sempre meu porto seguro.*

*Aos meus irmãos, Francesca, Júnior e Eduardo,
por torcerem sempre por mim.*

*Ao meu amado, Osvaldo,
pelo carinho dedicado a mim,
pelo apoio, convivência e muita paciência.*

AGRADECIMENTOS

- Às verdadeiras amizades que perdurarão para sempre.
- Aos meus colegas de laboratório, que estão e que passaram pelo grupo, Elisângela, Julia, Carolina, Marc, Meire, Lucas, Cássia, Andréia, Daniel, Érica, William e Flávia, pelos momentos de descontração e de muito trabalho também.
- À Profa. Dra. Kioko pela total disposição no fornecimento das bolsas de plasma para a purificação da β_2 GPI. A toda equipe do laboratório, Profa. Adelaide, Andréia, Cris e Cris. Ao Alberto, pelos auxílios e sempre boa disposição.
- Ao Prof. Dr. Mario José Politi (Instituto de Química - USP) por abrir as portas do seu laboratório e por todos os ensinamentos. Ao Décio pelos auxílios e conversas... Ao Emiliano e ao Fábio, pelas ajudas e orientações nos espalhamentos.
- À Profa. Dra. Rosângela Itri (Instituto de Física - USP) pela realização das medidas de SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e ao Leandro pela grande ajuda nas análises dos dados.
- À Profa. Dra. Iolanda Cuccovia (Instituto de Química - USP) por me dar liberdade em utilizar os equipamentos de seu laboratório. A pós-doutora Kátia pelo grande auxílio nas tentativas de calorimetria.
- Ao Prof. Dr. Flavio Aparecido Rodrigues e ao Prof. Dr. Claudio Shida (Universidade de Mogi das Cruzes) pela realização do AFM.
- Ao Prof. Dr. Raul Maranhão (Incor) pelo fornecimento da LDE e por colocar o seu laboratório a disposição.
- Ao pesquisador Dr. Luiz Carlos Gonçalves (EPUSP) pelas tentativas de infravermelho, pela ajuda na interpretação de todos os nossos dados e pela paciência na escrita.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	1
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 TEORIA	11
2.1 β_2-GLICOPROTEÍNA I.....	11
2.1.1 ESTRUTURA DA β_2 -GLICOPROTEÍNA I.....	11
2.1.2 INTERAÇÃO ENTRE β_2 -GLICOPROTEÍNA I E LÍPIDES	15
2.1.3 PURIFICAÇÃO DA β_2 GPI.....	17
2.1.4 ELETROFORESE SDS-PAGE.....	17
2.1.5 IMUNOBLOT	17
2.2 AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	18
2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA β_2 GPI EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	19
2.2.1.1 ESPALHAMENTO DE LUZ	19
2.2.1.1.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO	19
2.2.1.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO	20
2.2.1.1.3 DISSIMETRIA DA INTENSIDADE DE LUZ	21
2.2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	22
2.2.1.2.1 PARÂMETRO P	22
2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	24
2.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA β_2GPI A SUPERFÍCIES LIPÍDICAS	26

2.4.1 LDE	26
2.4.2 MICROGAVIMETRIA QCM-D	26
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 MATERIAIS.....	29
3.2 MÉTODOS	31
3.2.1 PURIFICAÇÃO DA β_2 GPI.....	31
3.2.1.1 LIOFILIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GRAU DE UMIDADE	32
3.2.1.2 ELETROFORESE SDS-PAGE 12.5%	33
3.2.1.3 IMUNOBLOT	33
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA β_2 GPI EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	34
3.2.2.1 ESPALHAMENTO DE LUZ	34
3.2.2.1.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO	34
3.2.2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO	35
3.2.2.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO.....	35
3.2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	35
3.2.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA β_2 GPI A SUPERFÍCIES LIPÍDICAS	36
3.2.4.1 LDE	36
3.2.4.2 MICROGAVIMETRIA QCM-D	36
4 RESULTADOS	39
4.1 PURIFICAÇÃO.....	39
4.1.1 ELETROFORESE E IMUNOBLOT	39
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA β_2GPI EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	40
4.2.1 ESPALHAMENTO DE LUZ	40
4.2.1.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO	40
4.2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO	43
4.2.1.2.1 DISSIMETRIA DA INTENSIDADE DE LUZ	47

4.2.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	48
4.2.1.3.1 PARÂMETRO P	49
4.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	50
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA β_2GPI A SUPERFÍCIES LIPÍDICAS E A EMULSÕES	
LIPÍDICAS: MICROGAVIMETRIA QCM-D	53
4.4.1 PS/PC.....	53
4.4.2 LDE	55
 <u>5 DISCUSSÃO</u>	<u>59</u>
 <u>6 CONCLUSÕES</u>	<u>65</u>
 <u>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>67</u>
 <u>8 ANEXOS.....</u>	<u>75</u>
 8.1 ANEXO I - FICHA DO ALUNO.....	75
8.2 ANEXO II - CURRICULUM LATTES.....	78

RESUMO

A β_2 GPI é uma glicoproteína que circula livre ou em lipoproteínas. Adsorve em superfícies negativas, tem efeitos anticoagulantes e moduladores da inflamação. Neste trabalho caracterizou-se a interação de moléculas da proteína entre si e com superfícies lipídicas. O SDS-PAGE e o imunoblot da β_2 GPI identificaram monômeros, dímeros e oligômeros. Técnicas de espalhamento de luz (estático, dinâmico, Raios-X) revelaram que β_2 GPI forma soluções aquosas de macroagregados anisométricos. Seca sobre mica, a β_2 GPI forma elipsóides prolatos, observáveis por microscopia de força atômica. A forma e o tamanho das partículas dependeram de pH e concentração de proteína. A interação entre a β_2 GPI e superfícies lipídicas foi estudada por microgravimetria. Superfícies de fosfatidilcolina pura adsorveram β_2 GPI mais fracamente do que ouro ou misturas com fosfatidilserina. A adsorção de lipoproteínas artificiais à β_2 GPI foi dependente de pH. Sugere-se que os efeitos biológicos da β_2 GPI sejam mediados por interações proteína-proteína e proteína-lipídio, e dependentes de pH.

Palavras-chave: Glicoproteína. β_2 -glicoproteínaI. Espalhamento de luz estático. Espalhamento de luz dinâmico. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Microgravimetria. LDE.

ABSTRACT

β_2 GPI is a blood glycoprotein circulating free or bound to lipoproteins. β_2 GPI adsorbs to negatively charged surfaces, acting as anticoagulant and modulator of inflammation. This work was designed to characterize the interaction between protein molecules and among protein molecules and lipid surfaces. The β_2 GPI SDS-PAGE and immunoblot revealed monomer, dimer and oligomers. Light scattering methods (static, dynamic and X-ray) showed that β_2 GPI generates aqueous solutions of anisometric macroaggregates. Atomic force microscopy showed that β_2 GPI dried on muscovite surfaces assembles itself in prolate ellipsoids. The particle shape and size depended both on the pH and protein concentration. The interaction among β_2 GPI and lipid surfaces was studied by microgravimetry. β_2 GPI adsorption to pure phosphatidylcholine was weaker than to gold or phosphatidylcholine/phosphatidylserine surfaces. Artificial lipoproteins adsorbed to β_2 GPI in a pH dependent manner. Results suggest that β_2 GPI biological effects could be mediated by protein-protein interactions and lipid surface binding, and pH dependent.

Keywords: Glycoprotein. β_2 -glycoproteinI. Static light scattering. Dynamic light scattering. Small-angle X-ray scattering. Microgravimetry. LDE.

LISTA DE ABREVIATURAS

β_2 GPI - β_2 -Glicoproteína I

Ac - Anticorpo

AFM - Microscopia de Força Atômica

APS - Persulfato de Amônia

CCP - Proteínas de Controle do Complemento

CL - Cardiolipina

DLS - Espalhamento de Luz Dinâmico

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

MES - ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico

PAGE - Gel de Poliacrilamida

PEG - Polietilenoglicol

PC - Fosfatidilcolina

PC - Fosfatidilserina

SAXS - Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

SCR - Repetições Consensuais Curtas

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SLS - Espalhamento de Luz Estático

TEMED - N,N,N,N-tetrametilenodiamina

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

1 INTRODUÇÃO

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína plasmática cujas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária foram descritas na literatura. A maior parte de seus efeitos biológicos tem sido justificada em função de sua estrutura terciária. A existência de um domínio positivo é considerada determinante para as propriedades de ligação a superfícies negativas de diversas naturezas, especialmente membranas contendo cardiolipina e fosfatidilserina, implicando a sinalização de eventos como a apoptose (CHONN et al., 1995) e dano mitocondrial, inibição da agregação plaquetária e a fase de contato da cascata de coagulação (BRIGHTON; CHESTERMAN, 1994; GOLDSMITH et al., 1994), a ativação da Lipoproteína Lipase, aumentando a utilização periférica de lipídios contidos em lipoproteínas (NAKAYA et al., 1980) e alteração do *burst* respiratório de fagócitos (GOMES et al., 2004; PEREIRA, 2005).

Uma estrutura quaternária foi descrita, com formação de dímeros e agregados de ordem superior, embora não se conheçam detalhes estruturais desses agregados. A dimerização implica a modificação nos efeitos biológicos, aumenta a antigenicidade e diminui a ligação a lípidos e a superfícies negativas. A remoção da proteína por ligação a anticorpos auto-imunes ou pela formação de dímeros ocorre em doenças inflamatórias autoimunes com importante componente trombótico. A formação de dímeros tem sido associada à clivagem da molécula entre os resíduos Lys317 e Thr318 e é facilitada pela ancoragem da molécula em superfícies negativas. Além da dimerização, foi proposta a existência de oligômeros contendo moléculas de β_2 GPI e subunidades de baixo peso molecular. A estrutura dos oligômeros e de uma possível subunidade de peso molecular menor do que 15 kDa não foram confirmadas na literatura.

Não existem receptores descritos para a β_2 GPI, embora sejam conhecidos diversos ligantes (heparina, açúcares sulfatados, DNA, óxidos lipídicos, fosfolípidos negativos). Uma hipótese do grupo é que a própria proteína possa organizar-se em estruturas sinalizadoras quando da ancoragem a sítios negativos na superfície celular ou em regiões anatômicas onde exerce seus efeitos, tais como placas de ateroma, matriz extracelular em focos inflamatórios e sítios de imuno-privilegio (humor aquoso, sinóvia, líquido folicular). Uma forma de abordar o problema é caracterizar a existência de agregados em soluções de β_2 GPI. Este foi um dos objetivos deste trabalho. Confirmada a presença de agregados, os estudos de interação passaram a incluir as

propriedades de adsorção da β_2 GPI, agregada ou não, a superfícies modelo dos seus alvos para as interações funcionais em organismos vivos, acrescentando-se aos objetivos deste trabalho.

A estratégia utilizada foi identificar a presença de agregados e medir o seu tamanho em solução, por meio de técnicas de espalhamento de luz estático, dinâmico e de raios-X; por microscopia de força atômica e por eletroforese em gel de poliacrilamida. As propriedades de interação proteína-proteína e proteína-superfície foram estudadas em ensaios de microgravimetria, e estimadas a partir da verificação dos efeitos de concentração salina, concentração de proteína, e pH sobre a agregação, pelas técnicas já mencionadas. A combinação das diversas técnicas possibilitou um melhor estudo dos agregados, visto que cada técnica possuiu um limitante.

2 TEORIA

2.1 β_2 -GLICOPROTEÍNA I

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI), também conhecida com apolipoproteína H é uma glicoproteína descrita inicialmente no sangue humano em 1961 (SCHUTZ et al., 1961). É encontrada no plasma, na linfa, no líquido cefaloraquidiano e no humor aquoso. No plasma, cerca de 60% da proteína total circula na forma livre e 40% ligada a lipoproteínas, principalmente em frações ricas em triglicerídios, quilomicrons e VLDL, um pouco menos na HDL (POLZ et al., 1980). É ainda encontrada no sangue circulante de várias outras espécies (POLZ et al., 1980; MATSUURA et al., 1998; GROOT et al., 2000). O principal sítio de síntese da β_2 GPI é o fígado, porém, sua expressão (mRNA e proteína) tem sido demonstrada em outros tecidos e em diversos tipos celulares como intestino, placenta, astrócitos fetais, células endoteliais, linfócitos, monócitos, astrócitos e neurônios (CONTI et al., 2003; AVERNA et al., 2004). É depurada no rim, ligada a megalina. Humanos saudáveis têm concentrações plasmáticas variáveis, cerca de 0.280 mg/mL; aumentos ocorrem em doenças inflamatórias e autoimunes (ARVIEUX et al., 1996; BRIGTON et al., 1996; HORBACH et al., 1998; BALASUBRAMANIAN et al., 1998; BIASIOLO et al., 1999, GOMES et al., 2004). A ausência ou a deficiência de β_2 GPI no plasma circulante não estão associadas a alterações patológicas conhecidas (YASUDA et al., 2000).

Embora os mecanismos não estejam completamente elucidados, há evidências clínicas de que a β_2 GPI possa participar da fisiopatologia da aterosclerose e na correlação entre o processo aterogênico e doenças cardiovasculares (LIN et al., 2001; GOMES et al., 2004). As funções fisiológicas inicialmente descritas para esta proteína relacionam-se principalmente com sua atividade antitrombótica e antiaterogênica. Autoanticorpos para β_2 GPI ou seus complexos são encontrados em doenças inflamatórias autoimunes com componente trombótico como Síndrome do Anticorpo Antifosfolipídico Primário, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Doença de Chagas congênita e Sífilis congênita, mas também na população assintomática (GHARAVI et al., 2000).

2.1.1 ESTRUTURA DA β_2 -GLICOPROTEÍNA I

A β_2 GPI possui cadeia polipeptídica de 326 resíduos de aminoácidos, 11 pontes dissulfeto e 5 sítios de glicosilação (LOSIER et al., 1984 ; KATO; ENJYOJ, 1991), com massa molecular

de cerca de 50 kDa. Apresenta cinco domínios repetidos e estruturalmente dispostos em forma de J ou anzol com dimensão total de 13,2 x 7,2 x 2,0 nm (Figura1).

Figura 1- Representação estrutural da β_2 GPI revelando os seus cinco domínios e suas dimensões. As conformações em folhas- β são mostradas em azul e as α -hélices em vermelho. (SCHWARZNBACHER et al., 1999)

Com exceção do quinto domínio (domínio V), os outros quatro domínios dividem uma estrutura comum típica da superfamília de repetições consensuais curtas (SCR - *short consensus repeats*) a qual pertencem as proteínas de controle do complemento (CCPs), conhecidos também como domínios Sushi (ICHINOSE et al., 1990). Cada um destes domínios é composto de

aproximadamente 60 aminoácidos e duas pontes dissulfeto. A estrutura primária do domínio V é diferente do típico domínio Sushi pela adição de uma ponte dissulfeto e 24 resíduos de aminoácidos no C-terminal. Esta região é altamente móvel e é chamada de *loop* flexível. A sequência primária dos resíduos de aminoácidos é bastante conservada (>80%) entre humanos, bovinos e camundongos. A Figura 2 mostra a conformação molecular da β_2 GPI bovina.

Figura 2- Sequência de aminoácidos e localização das pontes dissulfeto da β_2 GPI bovina. -CHO indicam N-glicosilação. (KATO & ENJOJI, 1991)

O domínio V possui uma região particular rica em lisina (K282NKEKK287) (Figura 3) com afinidade de ligação a superfícies carregadas negativamente, heparina, DNA (SCHOUSBOE et al., 1988) e fosfolípidos negativos, como fosfatidilserina (PS) e cardiolipina (CL) (BRINGTON; CHESTERMAN, 1994; GOLDSMITH et al., 1994; AVERNA et al. 2004).

Figura 3- Modelo molecular do domínio V da β_2 GPI ligado a uma molécula de fosfatidilserina. Os principais átomos carregados positivamente, parte rica em lisina (KNKEKK), são indicados. (HAMMEL et al., 2001)

O cristal da β_2 GPI foi determinado por Schwarzenbacher e colaboradores em 1999 (Figura 4). Esta estrutura pertence a um grupo espacial ortorrômbico $C222_1$ ($a = 15.95$ nm, $b = 16.48$ nm e $c = 11.43$ nm) com um alto conteúdo de solvente de aproximadamente 84%.

Figura 4- Cristal da β_2 GPI na unidade assimétrica com um alto conteúdo de solvente de ~84%. Moléculas individuais na mesma orientação são mostradas em cores correspondentes. A unidade da cela é indicada em vermelho (C222₁, a = 15.95 nm, b = 16.48 nm, c = 11.43 nm). (SCHWARZNBACHER et al., 1999)

2.1.2 INTERAÇÃO ENTRE β_2 -GLICOPROTEÍNA I E LÍPIDES

As interações da β_2 GPI com fosfolípidos são consideradas relevantes para seus efeitos fisiológicos e patogênicos (WANG et al., 1998). A β_2 GPI possui maior afinidade por fosfolípidos carregados negativamente, como PS e CL, que são normalmente encontrados no interior das células, sendo expostos na face externa das membranas plasmáticas quando as células sofrem apoptose ou morte celular programada. A β_2 GPI pode participar da remoção de partículas contendo lipídios negativamente carregados *in vivo* (HORBACH et al., 1999; CHONN et al. 1995). Liga-se também a lipoproteínas modificadas, por exemplo, a LDL oxidada (MATSUURA et al., 1998). Na LDL oxidada, a molécula de 7-cetocolesterol-9-carboxinanoato (ox-Lig1) é um ligante específico para β_2 GPI (KOBAYASHI et al., 2001).

Wang et al. (1998) e Bouma et al. (1999) propõem que a β_2 GPI sofre uma mudança

conformacional, na ligação com membranas carregadas negativamente, expondo regiões hidrofóbicas que se inserem na membrana (Figura 5). Variações na orientação espacial também são observadas durante a ligação da β_2 GPI a fosfolipídios (WANG et al.,2002; BEGALLI et al., 2008).

Figura 5- Modelo proposto para ligação da β_2 GPI em bicamadas contendo fosfolípides negativos. (BOUMA et al., 1999)

Wang et al. (2002) sugere que os diferentes estados espaciais nos quais a proteína se orienta ao ligar-se a fosfolípides resultam em uma variedade de efeitos biológicos da β_2 GPI. Por exemplo, a ligação de anticorpos anti-fosfolípides à β_2 GPI depende do reconhecimento de regiões que são expostas durante as interações entre a β_2 GPI e membranas aniônicas (WANG et al., 2000). Laat et al. (2006), propõe um modelo (Figura 6), onde a β_2 GPI é reconhecida pelo anticorpo somente depois da interação da proteína com a membrana, e este reconhecimento é mais estável quando a proteína encontra-se na forma dimérica.

Figura 6- Mecanismo descrevendo a ligação de anticorpos anti-fosfolípidos com a β_2 GPI. (LAAT et al, 2006)

2.1.3 PURIFICAÇÃO DA β_2 GPI

O método de purificação da β_2 GPI é baseado na sua resistência ao ácido perclórico e sua afinidade por heparina. A maioria das proteínas do plasma precipita na presença deste ácido.

2.1.4 ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) é uma técnica usada para separar proteínas de acordo com o peso molecular. Com a adição de dodecil sulfato de sódio (SDS - Sodium Dodecyl Sulfate), ocorre a desnaturação da proteína e a associação das cargas negativas do detergente à proteína. Deste modo, a carga intrínseca à proteína é mascarada, e a razão carga/massa torna-se aproximadamente equivalente para as mais diversas proteínas conhecidas. A mobilidade eletroforética assim modificada das diversas proteínas permite que elas se separem em função do seu tamanho aproximado, por aplicação de um campo elétrico a géis de poliácridamida de densidade apropriada.

2.1.5 IMUNOBLOT

O Imunoblot consiste na identificação de uma determinada proteína baseada no

reconhecimento de antígenos específicos da mesma por anticorpos mono ou policlonais. Esta reação é feita sobre um suporte sólido, usualmente uma membrana de nitrocelulose, após aplicação direta (dot-blot) ou transferência mediada por corrente elétrica, a partir de géis de eletroforese (imunoblot, Western-blot).

2.2 AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS

O estudo de aglomerados, mudanças conformacionais ou enovelamento de macromoléculas biológicas têm sido amplamente estudados (LAUGHLIN et al., 2000). Extensas evidências têm mostrado que várias doenças possuem a mesma base molecular: a mudança na conformação de proteínas. Estas doenças são conhecidas como doenças conformacionais (CARRELL; LOMAS, 1997) e inclui a doença de Alzheimer, desordens relacionadas ao príon, amiloidoses sistêmicas, desordens devido à deficiência de serpina, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica. O evento marcante nas doenças conformacionais é a mudança na estrutura secundária e terciária da proteína normal sem alteração da estrutura primária, que pode ser estabilizada através da agregação ou oligomerização. A modificação conformacional de proteínas pode implicar em doenças pela atividade tóxica direta, pela deficiência da função biológica da proteína normalmente enovelada, pela localização imprópria da proteína ou, como sugere nosso grupo, pela sinalização de novos eventos. A maioria destas doenças pode ser tanto de origem genética (mutações) como de origem esporádica, sendo esta última causada pela alteração do balanço por leves flutuações do meio (pH, força iônica, íons de metais, radicais livres, estresse oxidativo, etc), pela mudança na concentração da proteína ou pelo efeito fisiológico e patológico de chaperonas (SOTO, 1999). Para a caracterização da agregação de proteínas são utilizadas técnicas físicas como a microscopia de força atômica e de tunelamento, espectroscopia de dicroísmo circular, microscopia de transmissão de elétrons, espectroscopia de fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (ETIENNE et al., 2007), e espalhamento de raios-X (SILVA, 2005).

2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA β_2 GPI EM SOLUÇÃO AQUOSA

2.2.1.1 ESPALHAMENTO DE LUZ

2.2.1.1.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO

No espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS – *Small-angle X-ray Scattering*), a intensidade espalhada $I(q)$ por um conjunto de partículas monodispersas, distribuídas aleatoriamente em função do tempo e do espaço, é dada por:

$$I(q) = \gamma n_p (\Delta\rho)^2 V^2 P(q) S(q)$$

onde γ é um fator relacionado aos efeitos instrumentais; n_p corresponde à densidade numérica de partículas; $\Delta\rho$ ao contraste de densidade eletrônica entre a partícula espalhadora e o meio; V é o volume da partícula espalhadora; $P(q)$ é o fator forma normalizado da partícula ($P(0) = 1$) e $S(q)$ é o fator de interferência interpartículas.

Na ausência de efeitos de interferência, a transformada de Fourier conecta $P(q)$, e, por conseguinte $I(q)$, com a função de distribuição da distância entre os centros espalhadores, $p(r)$. A probabilidade de encontrar dois centros em uma distância r dentro do volume inteiro das partículas espalhadoras é dada por:

$$p(r) = \left(\frac{1}{2\pi^2} \right) \int_0^\infty I(q) q r \sin(qr) dq$$

Esta função fornece informação sobre o formato da partícula espalhadora bem como a dimensão máxima, D_{max} , considerada para um valor fixo de r onde $p(r)$ é zero. A característica de simetria das partículas em solução pode ser inspecionada pela análise da função de distribuição $p(r)$ (Figura 7). Para centros espalhadores com simetria radial, ou seja, de formato esférico, $p(r)$ apresenta-se como uma distribuição simétrica. Curvas de distribuição não-simétricas, correspondentes a formas elipsóidicas prolata e oblata, resultam em funções de distribuição $p(r)$ assimétricas. Essa assimetria é caracterizada por um alongamento (*skew*) das distribuições, o que evidencia a característica anisométrica dos centros espalhadores.

Figura 7- Gráfico do $\bar{R}_g$ versus o $\bar{R}_h$. As linhas sólidas indicam as previsões teóricas para bastões, elipsóides oblatos e esferas. (ITRI; AMARAL, 1993)

2.2.1.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO

O espalhamento de luz é um método absoluto para determinação da massa molar média (M_w) e das dimensões geométricas de macromoléculas, podendo fornecer informações estruturais detalhadas destas partículas (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997), embora a obtenção de dados e a sua interpretação seja mais difícil quando as espécies em estudo apresentam comportamento associativo que pode resultar em agregados macromoleculares (MERTINS, 2004). O espalhamento de luz estático (SLS – *Static Light Scattering*) avalia a intensidade de espalhamento de luz em função da concentração e ângulo de medida. Vários modelos são utilizados pelo espalhamento de luz estático, como de Rayleigh e Zimm (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). O modelo de Rayleigh é aplicado quando os centros espalhadores são muito menores que o comprimento de onda (λ) da luz incidente, ou seja, menores que $\lambda/20$, seguindo a equação:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c$$

onde K é uma constante óptica, definida por

$$K = 4\pi n^2 \cdot (\delta n / \delta c)^2 / N\lambda^4$$

e $\delta n / \delta c$ representa a variação do índice de refração da solução em função da concentração do soluto; n é o índice de refração; N é o número de partículas; c é a concentração da amostra em g/cm^3 ; R_θ é a razão de espalhamento de Rayleigh dada pela relação entre a contagem absoluta da amostra e a contagem referencial; M_w é a massa molar média e A_2 é o segundo coeficiente virial. Por esta equação pode-se construir o gráfico de Debye, com R_θ/Kc em função da concentração c ,

sendo o intercepto igual a $1/M_w$.

Para partículas maiores que $\lambda/20$ e que passam a ter dependência angular, os dados de espalhamento de luz estático podem ser analisados também por gráficos de Zimm (ZIMM, 1948), segundo a equação:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w \cdot (1 + q^2 \left(\frac{R_g^2}{3}\right))} + 2A_2c$$

onde, q é o vetor de espalhamento definido por $q = (4\pi n/\lambda) \cdot (\sin(\theta/2))$; R_g^2 é o raio de giração médio. A intensidade média da luz espalhada por macromoléculas em soluções de diferentes concentrações a diferentes ângulos de espalhamento, extrapolada para $\theta \rightarrow 0$ e $c \rightarrow 0$, fornece o valor absoluto de M_w , bem como o raio de giro (R_g), através do gráfico de Kc/R_θ em função de $\sin^2(\theta/2) + c$ (Figura 8).

Figura 8- Gráfico de Zimm. (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001)

2.2.1.1.3 DISSIMETRIA DA INTENSIDADE DE LUZ (YOUNG ET AL., 1978)

Grandes partículas podem gerar aumento da dissimetria angular ($d(\theta)$) na intensidade de luz espalhada. No caso de moléculas grandes e rígidas e de agregados, a dissimetria demonstra um comportamento linear e é definida pela seguinte equação:

$$d(\theta) = \frac{I(\theta)}{I(180^\circ - \theta)}$$

Onde θ é o ângulo de observação da luz espalhada, $I(\theta)$ é a intensidade de luz espalhada

no ângulo de observação e $I(180^\circ - \theta)$ é a intensidade de luz espalhada no ângulo complementar ao ângulo de observação.

Para estruturas alongadas encontramos a aproximação descrita pela equação

$$d(\theta) \cong 1 + \left(\frac{4\pi n}{\lambda_0} \right)^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \cos(\theta)$$

Este método permite a obtenção do R_g pela inclinação da curva obtida da relação de $d(\theta)$ com o $\cos(\theta)$.

2.2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

O espalhamento de luz dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scattering*) baseia-se nas flutuações de intensidade de luz espalhada ao longo do tempo. A luz incide sobre moléculas, induzindo momentos dipolares, com re-emissão de radiação. A magnitude e a orientação do momento dipolar induzido dependem da polarização dos fótons incidentes. Devido ao movimento Browniano, as moléculas estão em constante mudança aleatória de posição, e o dipolo induzido também flutua. Por isso, a intensidade de luz espalhada flutua também. As flutuações de intensidade de luz espalhada ao longo do tempo podem ser representadas através de uma função de correlação, $G(t)$:

$$G(t) = A [1 + C_i e^{-2Dq^2}] + C_\delta(t)$$

onde q é o vetor de espalhamento; D é o coeficiente de difusão; C_i representa o intercepto e $C_\delta(t)$ é a função delta que é o termo do ruído de disparo no $t = 0$. O coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico (R_h) das partículas, de acordo com a relação de Stokes-Einstein (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997; VALSTAR et al, 2000; SEGOTA et al., 2001):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_o R_h}$$

onde k_B é a constante de Boltzman, T é a temperatura absoluta e η_o é a viscosidade do solvente.

2.2.1.2.1 PARÂMETRO P (BURCHARD; RICHTER, 1989)

O parâmetro P pode ser obtido pela combinação do $\bar{R}_g$, obtido pelo SLS, e o $\bar{R}_h$, obtido pelo DLS:

$$P = \frac{\bar{R}_g}{\bar{R}_h}$$

O valor deste parâmetro é dependente da estrutura das partículas (Figura 9).

Figura 9- Gráfico do $\bar{R}_g$ versus o $\bar{R}_h$. As linhas sólidas indicam as predições teóricas para bastões, elipsóides oblato e esferas. (YOUNG et al., 1978)

O parâmetro P para algumas estruturas estão na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros P de algumas estruturas

Arquitetura	P
Esfera homogênea	0.778
Conformação ao acaso (monodisperso)	1.50
Conformação ao acaso (polidisperso)	1.73
Bastão rígido	> 2.0

2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As técnicas de microscopia de força atômica (AFM - *Atomic Force Microscope*) baseiam-se na interação da superfície com uma ponta muito fina, com raio da ordem de 50 nm e com resolução lateral de aproximadamente 10 nm, montada na extremidade livre de um cantilever, que funciona como mola, e que é sensível a variações de forças fracas de interação atômica, vibrando sobre a superfície da amostra ou simplesmente tocando sua superfície. A força agente entre ponta e amostra no AFM é a de Van der Waals. Para grandes distâncias entre ponta e amostra esta força tende a zero. Para pequenas distâncias ela é repulsiva e aumenta rapidamente com a diminuição da distância. Para valores intermediários ela é atrativa, possuindo um módulo máximo em uma dada distância (Figura 10).

Figura 10- Forças entre a ponta e a amostra em função da distância entre elas, com os respectivos regimes de operação: C- AFM de contato; CI- AFM de contato intermitente; NC- AFM de não contato.

A deflexão do cantilever é proporcional à variação de força e depende da sua constante elástica (Lei de Hooke). A deflexão é detectada por técnicas ópticas. Um feixe laser incide no cantilever e a sua reflexão é direcionada para um fotodiodo. Deste modo, os deslocamentos verticais da ponta, e logo a topografia da amostra, são analisados com base nas diferentes intensidades recolhidas pelo fotodiodo e nos valores de deslocamento vertical do cantilever.

O AFM se subdivide em 3 tipos principais:

- AFM de contato;
- AFM de não contato;

- AFM de contato intermitente (*Tapping Mode*).

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve “contato físico” com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato.

No modo de não contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de ângstrons da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10^{-12} N. Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de Van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas. O modo de não contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra causada pela ponta, conforme é observado no modo de contato após diversas varreduras. Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente.

O modo de contato intermitente é similar ao de não contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo de contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (Figura 11).

Figura 11- Representação esquemática dos modos de operação em AFM: C- AFM de contato; NC- AFM de não contato; CI- AFM de contato intermitente. (FERREIRA; YAMANAKA, 2006)

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA β_2 GPI A SUPERFÍCIES LIPÍDICAS

2.4.1 LDE

A LDE é uma partícula lipídica artificial, preparada como um análogo estrutural da LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade). Esta partícula não contém a apolipoproteína B100, que caracteriza a lipoproteína natural, mas apresenta composição lipídica equivalente à mesma e é capaz de ligar-se à apolipoproteína E e ser reconhecida, *in vivo*, pelo receptor fisiológico da LDL (receptor B/E). A LDE foi utilizada, neste trabalho, como um modelo de superfície lipídica com a qual a β_2 GPI interage *in vivo*.

2.4.2 MICROGAVIMETRIA QCM-D

As medidas de microgravimetria em equipamento QCM-D (*Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring*) são baseadas na relação entre frequência e massa, descrita pela equação de Sauerbrey:

$$\Delta m = -C \times 1/n \times \Delta f$$

onde C é uma constante que inclui características do disco de quartzo do aparelho utilizado e n é número do harmônico da frequência medida. No nosso caso, C é igual a $17,7 \text{ ng.s/cm}^2$, e n é um número ímpar entre 1 e 7, já que esta balança mede simultaneamente quatro harmônicos de frequência (5MHz, 15MHz, 25MHz e 35 MHz). A equação é válida para a deposição de massas rígidas de forma uniforme e estável. Se o material for viscoso, é necessário considerar outras características da amostra líquida.

Os dados obtidos, para cada tempo, são: frequência e dissipação. A dissipação indica o

tipo de interação entre a amostra e a superfície. Quanto mais estável ela se apresentar, mais próximo é o valor de interação daquele calculado pela equação de Sauerbrey. Quando a dissipação varia, assume-se que as propriedades viscoelásticas do material depositado sobre o eletrodo respondam por parte da variação na frequência medida, e o valor experimental desvia-se do valor teórico para a massa depositada.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

No decurso do texto são utilizados os seguintes reagentes e respectivas abreviações:

- ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES - Sigma);
- ácido acético glacial (Merck);
- ácido cítrico (Merck);
- ácido perclórico 70% (HClO_4 - Merck);
- ácido sulfúrico 98% (H_2SO_4 - Synth);
- acrilamida (Sigma);
- albumina de soro bovino (BSA – Sigma);
- anticorpo IgG (Fc específico) de cabra, anti-camundongo, conjugado a Peroxidase (Sigma);
- anticorpo Monoclonal Anti- β_2 GPI Humana clone 5F7 (ICN);
- bisacrilamida (Sigma);
- bromofenol (Difco Laboratories, Detroit, MI);
- carbonato de sódio (CaCO_3 - Merck);
- cloreto de potássio (KCl - Merck);
- cloreto de sódio (NaCl - Merck);
- diaminobenzidina (Sigma);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS - Sigma);
- fosfatidilserina (PS - Sigma);
- fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 - Merck);
- fosfato dissódico (Na_2HPO_4 - Merck);
- glicerol (Sigma);
- glicina (Ajinomoto);
- hidróxido de amônio 30% (NH_4OH - Synth);
- hidróxido de sódio (NaOH - Synth);
- leite em pó desnatado (Molico Nestlè);

- metanol (Merck);
- monolaurato polioxietileno (20) sorbitato (Tween 20 – LGC);
- N,N,N,N-tetrametilenodiamina (TEMED – Sigma);
- Octadecanotiol (Sigma);
- padrão de peso molecular (Protein Molecular Weight Marker - Fermentas, 15-116 kDa,);
- permanganato de sódio (NaMnO_4 - Synth);
- peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2 - Merck);
- peróxido de hidrogênio 50% (H_2O_2 - Synth);
- Persulfato de Amônia (APS - Sigma);
- polietilenoglicol (PEG - Sigma)
- ponceau (Merck);
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris - Serva);
- Tris-HCl (Sigma);

Para a eletroforese foram utilizados os seguintes tampões:

- Tampão do compartimento inferior: Tris 1.5 M/SDS 0.4% pH 8.8;
- Tampão do compartimento superior: Tris 0.5 M/SDS 0.4% pH 6.8;
- Tampão de amostra: 4 mL Tris-HCl 1 M, pH 6.8; 5 mL SDS 20%; 5 mL glicerol; 0.5 mL azul de bromofenol 0.1%; 32.5 mL H_2O deionizada;
- Tampão de eletroforese: 12 g Tris; 57 g glicina; 4 g SDS; q.s.p. 1 L H_2O deionizada; para concentração 4 X).

No imunoblot foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão de transferência: 3 g Tris; 14.4 g glicina; 200 mL metanol; q.s.p. 1 L H_2O deionizada e filtrada;
- Solução Ponceau: 1 g Ponceau; 10 mL ácido acético; q.s.p. 100 mL H_2O deionizada e filtrada;
- Tampão PBS: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 0.91 g Na_2HPO_4 ; 0.2 g KH_2PO_4 ; q.s.p. 1 L H_2O .
- Tampão PBS Tween: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 0.91 g Na_2HPO_4 ; 0.2 g KH_2PO_4 ;

0.5 mL Tween 20; q.s.p. 1 L H₂O.

- Solução de Bloqueio - PBS Tween leite 5%: 100 mL PBS Tween 0.05%; 5 g leite em pó desnatado;
- PBS Tween leite 1%: 100 mL PBS Tween 0.05%; 1 g leite em pó desnatado;
- Solução reveladora: 2.5 mg diaminobenzidina; 15 mL PBS; 75 μ L H₂O₂ 30%.

Nos demais procedimentos as seguintes soluções foram utilizadas:

- pH 5.0: MES 20 mM;
- pH 5.0/NaCl: MES 20 mM; NaCl 350 mM;
- pH 6.8/NaCl: NaCl 350 mM;
- pH 8.5: Tris 20 mM;
- pH 8.5/NaCl: Tris 20 mM; NaCl 350 mM.

Todas as soluções foram preparadas com H₂O deionizada e filtrada e, após preparo, foram filtradas através de filtros Millipore-GS (0.22 μ m) ou nylon (Gelman Sciences, 0.45 μ m)

Exceções e particularidades no preparo de soluções são especificadas ao longo do texto.

3.2 MÉTODOS

Inicialmente a β_2 GPI foi purificada no laboratório. A pureza e estabilidade de cada lote foram estudadas por eletroforese SDS-PAGE 12.5% e imunoblot. Para a caracterização das propriedades físico-químicas da β_2 GPI em solução aquosa foi utilizado o espalhamento de raios-X a baixo ângulo, as técnicas de espalhamento de luz estático e dinâmico, e a microscopia de força atômica. A interação da β_2 GPI com superfícies lipídicas foi estudada por microgravimetria. O pH, a concentração de sal e a concentração da β_2 GPI nas soluções foram modificados afim de comparar o comportamento da proteína nas condições em que ela é purificada, em condições próximas à fisiológica e, condições que simulam situações patológicas, como a inflamação, que acidifica o meio.

3.2.1 PURIFICAÇÃO DA β_2 GPI (POLZ ET AL, 1980, MODIFICADA)

A β_2 GPI foi purificada a partir de um “pool” de plasma humano por precipitação em ácido perclórico, seguida por cromatografia em coluna de afinidade de sepharose-heparina (CL-6B, Pharmacia Biotech).

Precipitação em ácido perclórico

Para cada 50 mL de plasma foram acrescentados 1.25 mL de ácido perclórico gota a gota durante 15 minutos e sob agitação constante. A mistura formada foi centrifugada a 11.000 x g por 30 min, a 4°C (Himac CR20B2 – Hitachi). Após a centrifugação, o sobrenadante foi colhido, neutralizado a pH 7.0 com carbonato de sódio saturado e dialisado em tampão Tris 20mM / NaCl 30 mM, pH 7.0, por 24 h a 4°C.

Cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-heparina

A amostra dialisada, resultante do processo de precipitação em ácido perclórico, foi passada pela coluna de sepharose-heparina equilibrada com tampão Tris 20mM/NaCl 30mM, pH 7.0. Após a passagem de toda a amostra, ligações fracas ou inespecíficas foram eluídas lavando-se a coluna com tampão Tris 20 mM/ NaCl 150 mM pH 7.0, até que a absorbância em 280 nm do eluído fosse menor que 0.01.

A β_2 GPI foi então eluída com um tampão de Tris 20 mM/ NaCl 350 mM pH 8.5, em alíquotas de 1.5 mL. As alíquotas contendo proteína foram reunidas e utilizadas nos experimentos, dialisadas ou não.

A coluna foi lavada com tampão Tris 20mM/NaCl 500 mM pH 8.5. Todo o procedimento de purificação foi realizado em geladeira (4°C) e as absorbâncias obtidas em um espectrofotômetro Beckman DU 640, em 280 nm, ou em um NanoDrop ND-1000 (Uniscience), colocando-se as amostras diretamente sobre o sensor óptico do aparelho. A concentração da proteína bem como o rendimento total, foram calculados a partir do valor do coeficiente de extinção molar da β_2 GPI, $\epsilon_{280\text{nm}} = 1.0 \text{ mL/mg.cm}$.

A pureza e a estabilidade foram estudadas por eletroforese e imunoblot, e quando os experimentos exigiam concentrações superiores às existentes, a proteína foi concentrada em membrana de diálise com PEG 8000, ou dialisada em H₂O deionizada e filtrada, congelada a - 80°C e liofilizada.

3.2.1.1 LIOFILIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GRAU DE UMIDADE

A β_2 GPI foi liofilizada num aparelho Edwards L4kr118, em condições de condensação a - 40°C e secagem a 15°C sob vácuo de 10^{-4} mbar. A duração de cada etapa dependeu da quantidade de amostra. O grau de umidade do pó foi determinado em um medidor de atividade da

água aw - center/box (NOVASINA). A proteína liofilizada foi guardada em geladeira e reconstituída, em H₂O deionizada e filtrada ou em tampão, para uso.

3.2.1.2 ELETROFORESE SDS-PAGE 12.5%

A eletroforese foi realizada em um sistema Protean 3 (BioRad), com gel de separação 12.5% (5.3 mL água deionizada; 4.0 mL tampão do compartimento inferior; 6.7 mL acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%; 40 μ L APS 10%; 25 μ L TEMED) e gel de empacotamento 3.0% (2,95 mL H₂O deionizada, 1.25 mL tampão do compartimento superior; 0.8 mL acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 25 μ L APS; 15 μ L TEMED).

O sistema montado foi colocado em uma cuba contendo tampão de eletroforese e 0.5 μ g de proteína purificada foi aplicada em cada poço. Um padrão de peso molecular foi utilizado (3 μ L) para comparação com a migração das bandas reveladas nas amostras de proteína.

A cuba foi polarizada por uma diferença de potencial de 120 V, a uma corrente inicial de 2 A, procedendo-se à eletroforese por um tempo aproximado de 80 min. Após a corrida, o gel foi corado pela prata.

3.2.1.3 IMUNOBLOT

Em um gel SDS-PAGE 12.5%, 2 μ g por poço das amostras de proteína purificada e 5 μ L do padrão de peso molecular foram submetidos à eletroforese. Após a corrida, o gel foi colocado no tampão de transferência.

Uma membrana de nitrocelulose (Amershan-Pharmacia Biotech) e papéis de filtro de 3 e 1 mm de espessura (Chromatography Paper – Whatman) foram montadas em um sistema de gel de transferência. Antes da montagem, a membrana de nitrocelulose foi umedecida em H₂O deionizada e filtrada (2 min) e posteriormente saturada em tampão de transferência por 10 min.

A membrana de nitrocelulose e o gel foram fechados entre os papéis de filtro previamente molhados no tampão de transferência, em um suporte disposto dentro da cuba de transferência (BioRad), com o gel voltado para o potencial negativo e a membrana de nitrocelulose para o potencial positivo da cuba. A cuba de transferência polarizada por uma diferença de potencial de 50 V a 400 mA, por 18 h a 4°C ou, a 120 V e 400 mA por 2 h em banho de gelo.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada em solução de Ponceau até

o aparecimento das bandas de proteína. Em seguida, a membrana foi lavada com água deionizada e colocada para secar. As tiras foram cortadas e colocadas em solução de bloqueio por 2 h sob agitação, com exceção das tiras referentes ao padrão molecular que foram guardadas na geladeira, entre papéis absorventes, para posterior comparação com as bandas reveladas no imunoblot.

Depois, foram lavadas com PBS Tween 0.05%, 3 vezes, por 10 min. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo monoclonal Anti- β_2 GPI Humana 5F7 diluído 1:1000 em PBS Tween leite 1%, ou com os Anticorpos produzidos pelo grupo (K2124 e CL-33 diluídos 1:200, e K2, 1:1000), por uma noite sob agitação, a 4°C ou, por 2 h a 37°C. Nova lavagem foi realizada e as tiras foram incubadas com Anticorpo IgG (Fc específico) de cabra, anti-camundongo, conjugado a Peroxidase diluído 1:2000 em PBS Tween leite 1% por 1 h sob agitação. Para a visualização das bandas, as tiras foram lavadas novamente e colocadas na solução reveladora. O bloqueio da revelação foi feito com sucessivos banhos de H₂O deionizada e filtrada.

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA β_2 GPI EM SOLUÇÃO AQUOSA

3.2.2.1 ESPALHAMENTO DE LUZ

3.2.2.1.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO

Neste trabalho, foi utilizado o programa GIFT para a obtenção de $p(r)$ a partir das intensidades experimentais $I(q)$ do SAXS. A distância amostra-detector utilizada foi de 1308 mm. A amplitude do vetor espalhamento q é definida como $q=4\pi \sin\theta/\lambda$, sendo 2θ o ângulo do espalhamento, e λ o comprimento de onda do raio-X de 1068 Å. As intensidades experimentais foram corrigidas devido a contribuições do tampão, atenuação da amostra e homogeneidade bidimensional do detector, a partir do solvente como fundo branco. As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil, pela Profa. Dra. Rosângela Itri e o Doutorando Leandro R. S. Barbosa do Instituto de Física da USP.

A proteína foi utilizada liofilizada e reconstituída em H₂O e em soluções de pH 5.5 e pH 8.5 nas concentrações de 7.7 mg/mL, 7.2 mg/mL e 7.0 mg/mL respectivamente. Para o estudo do efeito da força iônica, foi acrescentado uma solução de pH 5.5/NaCl 4.5 M à solução de β_2 GPI em pH 5.5 de forma a obter soluções contendo 60mM e 350mM de NaCl. O mesmo procedimento foi realizado para soluções em H₂O e pH 8.5.

3.2.2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO

O espalhamento de luz estático foi realizado em um fotômetro com coleta de dados multiangular Dawn-F (Wyatt Technologies), com laser de $\lambda = 632\text{nm}$. A intensidade da luz espalhada foi medida em 18 ângulos entre 26.6° e 144.5° para cada amostra. O instrumento foi calibrado com tolueno e os detectores foram normalizados com SDS. Para o cálculo da constante óptica K, foi utilizado o $\delta n/\delta c$ de 0.185 mL/g , que corresponde a uma aproximação citada na literatura para proteínas (FOLTA-STONIEW; WILLIAMS, 1999; DUPUY D'ANGEAC et al., 2006).

Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente. A proteína foi utilizada recém-purificada e dialisada no pH 5.5, pH 5.5/NaCl, H_2O , pH 6.8/NaCl, pH 8.5 e em pH 8.5/NaCl.

O procedimento padrão para a limpeza da cela da medida de espalhamento foi a imersão por 5 min em solução de NaMnO_4 diluído em NaOH (1:2) e posterior imersão em solução “piranha” ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 50%, 3:1) por cerca de 10 min, intercaladas por um enxágüe em H_2O deionizada e filtrada abundante. Após essa etapa, o interior foi lavado com a solução na qual a proteína foi diluída, antes de cada ensaio. Todas as etapas de limpeza foram efetuadas para garantir-se o não espalhamento de luz por particulados em solução e na câmara de medida.

3.2.2.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

As medidas foram feitas em um analisador de tamanho de partículas 90Plus (Brookhaven Instruments Corporation) a 25°C , com soluções de $\beta_2\text{GPI}$ em pH 5.5/NaCl, pH 6.8/NaCl e pH 8.5/NaCl, nas concentrações de, 0.15 mg/mL , 0.3 mg/mL , 1.0 mg/mL e 1.5 mg/mL . As intensidades de luz foram detectadas a 90° , durante 5 min. Os resultados foram analisados com o *software* Particle Sizing - 9kpsdw, versão 2.30 (1997), pelo método de multiexponenciais através do programa CONTIN. As cubetas utilizadas para as medidas foram lavadas com a solução filtrada na qual a proteína foi diluída, antes de cada ensaio.

3.2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica foi feita utilizando o modo de contato intermitente, em um microscópio de força atômica SPM – 9600 (Shimadzu). Esta parte do trabalho foi realizada na Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, São Paulo, com colaboração do Prof. Dr. Flavio Aparecido Rodrigues e do Prof. Dr. Claudio Shida.

A β_2 GPI foi liofilizada e reconstituída em H_2O e em soluções de pH 5.5 e pH 8.5 e utilizada na concentração de 0.252 $\mu\text{g/mL}$ para a obtenção das imagens. Foram colocados 10 μL da proteína, em cada condição, sobre superfície de mica e deixados secar em estufa a 37°C. A varredura da amostra foi feita a temperatura ambiente.

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA β_2 GPI A SUPERFÍCIES LIPÍDICAS

3.2.4.1 LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg et al. (1982) modificada por Maranhão et al. (1993). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0.5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio:metanol (2:1). Os solventes foram então evaporados da mistura sob fluxo de N_2 e, depois, por dessecação a vácuo, por 16 h, a 4°C. Após a adição de 10 mL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450 A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125 W, durante 3 h, sob atmosfera de N_2 , com temperatura variando entre 51 a 55°C. Para obtenção da LDE na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW - 41). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200000 g por 30 min, a 4°C, foi removido por aspiração (1 mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1.21 g/mL. Após a segunda centrifugação (200000 g por 2 h a 4°C), a LDE foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8.0. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0.22 μm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até trinta dias.

3.2.4.2 MICROGAVIMETRIA QCM-D

Foi utilizada uma balança microgravimétrica de quartzo Q-Sense D300, para estudar a interação da β_2 GPI com a superfície de ouro do detector da própria balança, entre a β_2 GPI e a superfície de ouro funcionalizada com fosfatidilcolina (PC – purificada de ovo de galinha) e com uma solução 1:9 de PC e fosfatidilserina (PS). Além disso, estudaram-se as interações entre a LDE e a superfície de ouro do detector funcionalizada ou não com a β_2 GPI em diferentes

condições, pH 5.5/NaCl 35 mM, pH 6.8/NaCl 35 mM e pH 8.5/NaCl 35 mM.

Antes de uma série de medidas ou da funcionalização, o eletrodo de ouro foi limpo por incubação em solução de água, NH_4OH 30% e H_2O_2 30% (5:1:1) a 75°C por 5 min. A tubulação do aparelho foi limpa com SDS 2% e água deionizada e filtrada. A secagem do detector e dos tubos foi feita com N_2 . Todas as soluções utilizadas para a limpeza e medidas foram filtradas em membranas Millipore-GS (0.22 μm). As linhas base para cada série de medidas foram registradas no início dos ensaios, com água ou tampão.

A funcionalização do eletrodo com PC ou PS/PC (1:9) consistiu da deposição dos fosfolípidios sobre o eletrodo previamente recoberto por octadecanotiol (KASTL et al, 2002). A deposição foi realizada a partir de uma suspensão de vesículas unilamelares de PC ou PS/PC extrusadas por membranas de 0.1 μm . A proteína foi adicionada na concentração de 3.2 $\mu\text{g/mL}$ até a saturação.

A funcionalização do eletrodo com a $\beta_2\text{GPI}$ para os ensaios com a LDE foi feita com a deposição da proteína na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. A LDE foi adicionada nas concentrações de 3.75 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 300 $\mu\text{g/mL}$, consecutivamente até a saturação.

4 RESULTADOS

4.1 PURIFICAÇÃO

4.1.1 ELETROFORESE E IMUNOBLOT

A purificação é um procedimento realizado rotineiramente em nosso laboratório, com um rendimento entre 5 e 8 mg de proteína por lote purificado (a partir de 500 mL de plasma). O perfil eletroforético da β_2 GPI purificada, no SDS-PAGE 12.5%, mostrou bandas de alto peso correspondendo a macroagregados, uma banda de dímeros em 115 kDa (GALAZKA et al., 1998), bandas múltiplas de monômeros da proteína entre 40 kDa a 60 kDa e formas clivadas com peso molecular de 37 kDa (HORBACH et al., 1999, SAKAI et al., 2007). Entre as bandas de monômero, a banda em 45 kDa foi a que mais fortemente reagiu com os anticorpos monoclonais K2 e 5F7. Além disso, o 5F7 reconheceu as bandas de 60 kDa, formas de alto peso e clivadas/oxidadas, com menor afinidade. O anticorpo K2124 marcou mais intensamente as formas de alto peso e modificadas da proteína. A banda de dímeros foi reconhecida pelo CL-33 (Figura 12).

Figura 12- Eletroforese SDS-PAGE 12.5% corado pela prata com seu respectivo imunoblot. PM: Padrão de Peso Molecular. 1: β_2 GPI lote 15 corada pela prata; 1A: imunoblot com o Ac 5F7. 2: β_2 GPI lote 27 corada pela prata; 2A: imunoblot com o Ac 5F7; 2B: imunoblot com o Ac K2. 3: β_2 GPI lote 29 corada pela prata; 3A: imunoblot com o Ac 5F7; 3B: imunoblot com o Ac K2124; 3C: imunoblot com o Ac CL-33.

A eletroforese e o imunoblot mostraram bandas de alto peso, sugerindo a presença de agregados nas soluções de β_2 GPI. Estes agregados foram melhor estudados pelas técnicas de espalhamento de luz e microscopia de força atômica, onde não sofrem efeito de SDS.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA β_2 GPI EM SOLUÇÃO AQUOSA

4.2.1 ESPALHAMENTO DE LUZ

4.2.1.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO

O SAXS nos forneceu o D_{max} mínimo que a β_2 GPI em solução possui, de acordo com o limite da técnica, onde q mínimo equivale a cerca de $0.015 \text{ \AA}^{-1}$. As características gerais da forma do agregado da proteína foram deduzidas pela análise da simetria da curva da função $p(r)$.

A Figura 13 mostra as curvas experimentais de SAXS e suas respectivas funções $p(r)$ para a β_2 GPI nas condições de pH estudadas (pH 5.5, 6.8 e 8.5) sem NaCl e com a adição deste. A proteína apresenta-se na forma de agregados com D_{max} maiores ou iguais a $350 \text{ \AA}$. Não foi observada nenhuma alteração significativa na forma do agregado de proteínas, nos diferentes pHs tanto em ausência quanto em presença de NaCl.

Figura 13- (A) Curvas de SAXS da β_2 GPI em solução nos diferentes valores de pH, em ausência e presença de concentrações crescentes de NaCl, juntamente com os ajustes teóricos (linhas cheias). (B) Funções $p(r)$ relativas aos melhores ajustes teóricos.

A Figura 14 mostra as curvas experimentais de SAXS mostrando o efeito da variação de pH nas soluções de β_2 GPI com 350 mM de NaCl.

Figura 14- Curvas de SAXS da β_2 GPI em pH 5.5, 6.8 e 8.5, em presença de 350 mM de NaCl, juntamente com os ajustes teóricos (linhas cheias).

A curva de SAXS do sistema a pH 5.5 é ligeiramente diferente das curvas de SAXS dos outros sistemas. Esta diferença pode ser também visualizada nas funções $p(r)$ (Figura 15). Devido a não simetria destas funções, deduz-se que os agregados da proteína apresentam uma forma alongada (com uma dimensão máxima de, no mínimo, 300 Å), que poderia ser do tipo: elipsóide prolato ou cilindro.

Figura 15- Funções $p(r)$ obtidas através dos ajustes das curvas de SAXS da β_2 GPI em pH 5.5, 6.8 e 8.5, em presença de 350 mM de NaCl.

Com esta técnica observamos que a β_2 GPI apresenta-se agregada em solução nas diferentes condições de pH e concentração de NaCl, no entanto atingiu-se o limite da técnica com relação à dimensão destes agregados (D_{max}) e outras técnicas de espalhamento foram utilizadas.

4.2.1.2 ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO

Com os resultados do espalhamento de luz estático da β_2 GPI em solução, nas condições estudadas (pH 5.5, 6.8 e 8.5 com ou sem NaCl), primeiramente foi construído o gráfico de Debye, com R_θ/Kc em função da concentração c , sendo o intercepto igual a $1/M_w$ (Figura 16). Este gráfico é utilizado para a determinação de M_w de partículas menores que $\lambda/20$ (~32 nm) e considera apenas a intensidade da luz espalhada pelas partículas em 90° .

Figura 16- Gráfico de Debye da β_2 GPI em solução para as condições estudadas e respectivos M_w obtidos em kDa.

Devido aos altos valores de M_w obtidos com o gráfico de Debye, foram construídos os gráficos de Zimm, através de Kc/R_θ em função de $\text{sen}^2(\theta/2)+c$ (Figura17). A intensidade média da luz espalhada por macromoléculas em soluções de diferentes concentrações a diferentes ângulos de espalhamento, extrapolada para $\theta \rightarrow 0$ e $c \rightarrow 0$, fornece o valor absoluto de $1/M_w$ em seu intercepto. Este gráfico é uma aproximação mais adequada para partículas superiores a $\lambda/20$ que passam a ter dependência angular.

Figura 17- Gráficos de Zimm da β_2 GPI em solução nas diferentes condições estudadas e com suas respectivas concentrações. Os gráficos da esquerda e da direita referem-se às soluções sem e com NaCl respectivamente.

Em geral, os limites dos valores experimentais de c e θ excedem os limites de validade da teoria, e o gráfico de Zimm mostra alguma curvatura (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). Segundo Wyatt (1992) esta curvatura é um indício de agregação e, portanto, foi calculada a massa molar média para cada concentração de cada condição estudada a fim de verificar o comportamento de agregação ou desagregação da β_2 GPI em solução, com a diluição da amostra (Figura 18).

Figura 18- Perfil da massa molar média (M_w) em relação a concentração da β_2 GPI em solução nas condições estudadas.

O M_w e o número de agregação, calculados a partir das duas aproximações matemáticas utilizadas e considerando o monômero descrito na literatura (45-50 kDa), foram comparados na Tabela 2 para cada condição estudada.

Tabela 2- M_w e número de agregação da β_2 GPI em diferentes pHs, calculado a partir dos gráficos de Zimm e de Debye.

pH	NaCl (mM)	Zimm		Debye	
		M_w (kDa)	nº de agregação	M_w (kDa)	nº de agregação
5.5	0	750	15.3	1800	36
	350	129	2.6	111	2.2
6.8	0	49	1	50	1
	350	1564	31.9	921	18.4
8.5	0	120	2.5	125	2.5
	350	2608	53.2	1058	21.2

Comparando os dados calculados a partir do gráfico de Zimm com os do gráfico Debye é possível observar que os valores para M_w são divergentes quando tratam-se de agregados grandes, acima de 125 kDa.

4.2.1.2.1 DISSIMETRIA DA INTENSIDADE DE LUZ

Pela construção do gráfico que relaciona $d(\theta)$ com o $\cos(\theta)$ é possível observar o comportamento linear, característico de agregados alongados, em todas as condições (Figura 19).

Figura 19- Gráfico da dissimetria versus o co-seno do ângulo da β_2 GPI em solução nas condições estudadas.

4.2.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

O espalhamento de luz dinâmico nos forneceu diferentes distribuições de tamanhos para a β_2 GPI em solução nas condições estudadas com NaCl (pH 5.5, 6.8 e 8.5) (Figura 20). A proteína apresenta-se agregada de maneira polidispersa, com agregados de diâmetros bem definidos que variam com o pH e a concentração.

Figura 20- Distribuição normalizada dos diâmetros da β_2 GPI pelo espalhamento de luz dinâmico para as diferentes condições estudadas com NaCl.

4.2.1.3.1 PARÂMETRO P

O parâmetro P foi determinado considerando o $\bar{R}_g$ calculado a partir da dissimetria, que permanece constante nas diferentes concentrações, e o $\bar{R}_h$ de cada concentração estudada, obtido a partir do DLS (tabela 3).

Tabela 3: Valores de $\bar{R}_g$, $\bar{R}_h$ e P da β_2 GPI em solução.

pH	Concentração (mg/mL)	$\bar{R}_g$ (nm)	$\bar{R}_h$ (nm)	P
5.5	0.15	51.5±6.1	87.2	0.59±0.04
	0.3		85.4	0.60±0.04
	1.0		56.8	0.91±0.10
	1.5		35.3	1.46±0.26
6.8	0.15	33.4±4.2	39.7	0.84±0.09
	0.3		33.6	0.99±0.13
	1.0		24.3	1.38±0.25
	1.5		24.1	1.39±0.25
8.5	0.15	69.1±7.5	76.1	0.91±0.09
	0.3		106.3	0.65±0.05
	1.0		50.8	1.36±0.21
	1.5		31.6	2.19±0.55

Comparando estes valores com os da literatura.(Tabela 1), observamos que em soluções ácidas diluídas os agregados apresentam-se mais próximos da forma esférica. À medida que a concentração e o pH aumentam a forma passa a ser mais próxima de bastão.

4.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A morfologia da β_2 GPI seca sobre mica nas condições estudadas está representada na Figura 21.

Figura 21- Imagem de AFM de contato intermitente da β_2 GPI seca sobre mica: (A) em pH 5.5; (B) em H_2O e (C) em pH 8.5.

A análise das imagens de AFM demonstrou a presença de agregados com diâmetros e alturas discretos, que dependem do pH e que permanece de forma orientada de acordo com as características químicas e físicas da superfície (WANG et al., 2002; ROACH et al., 2005). Os agregados no pH 5.5 apresentam diâmetro médio de cerca de $0.160\ \mu m$ e alturas máximas de $0.12\ \mu m$ que unem-se formando uma estrutura de aspecto irregular. Em H_2O , pH 6.8, os agregados apresentam uma estrutura mínima com diâmetro médio de $0.07\ \mu m$ que unem-se formando estruturas fibrilares com alturas que chegam a $2.54\ \mu m$. No pH 8.5 os agregados possuem diâmetros que de $0.05\ \mu m$ e altura máxima de $5.63\ \mu m$ (Figura 22).

Figura 22- Imagem tridimensional do AFM de contato intermitente da β_2 GPI seca sobre mica: (A) em pH 5.5; (B) em H_2O e (C) em pH 8.5. À esquerda ampliação do eixo z da β_2 GPI em pH 5.5, para melhor visualização.

Embora essas medidas tenham sido feitas com a amostra seca sobre a superfície de mica, estima-se que a quantidade de água neste tipo de preparação seja suficientemente alta para que a β_2 GPI reflita, de alguma forma, o aspecto da proteína em solução, visto que cristais da proteína apresentam aproximadamente 84% de solvente em sua composição (SCHWARZENBACHER et al., 1999) e o grau de umidade da β_2 GPI liofilizada medido foi de cerca de 46%.

Os tamanhos de agregados de β_2 GPI obtidos para cada técnica utilizada e seus respectivos limites encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Tamanho de agregados de β_2 GPI obtido com as diferentes técnicas utilizadas e seus respectivos limites.

Técnica	Limite da Técnica	pH 5.5	pH 6.8	pH 8.5
SAXS	2-35 nm	32 nm	33 nm	35 nm
DLS	1-6000 nm	4-900 nm	3-700 nm	5-1700 nm
AFM	>10 nm	120-160 nm	70-2540 nm	50-5630 nm

O tamanho dos agregados da β_2 GPI, tanto em solução como seca em superfície de mica, apresentam-se menores em pH ácido e aumentam conforme a alcalinização do meio.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA β_2 GPI A SUPERFÍCIES LIPÍDICAS E A EMULSÕES LIPÍDICAS: MICROGAVIMETRIA QCM-D

4.4.1 PS/PC

A β_2 GPI depositou-se sobre a superfície de ouro do eletrodo com uma velocidade de 4 ng/cm².min. Adições sucessivas a partir de uma solução contendo 3.2 μ g/mL da proteína resultaram em uma saturação do efeito de adsorção em 191.0 ng/cm². A aplicação de tampão e de água não removeu a proteína da superfície do eletrodo (Figura 23).

Figura 23- Microgravimetria do experimento da β_2 GPI sobre a superfície de ouro do eletrodo. A seta indica o momento em que é adicionado tampão.

A Figura 24 mostra o gráfico fornecido pelo aparelho nos experimentos com as vesículas de PC e PS/PC. Na superfície de PC foram adsorvidos 453.9 ng/cm^2 de β_2 GPI com uma velocidade de $2.6 \text{ ng/cm}^2.\text{min}$, que foram totalmente removidos com a passagem do tampão e água. Na superfície de PS/PC, 363.4 ng/cm^2 da proteína foram adsorvidos com uma velocidade de $3.1 \text{ ng/cm}^2.\text{min}$, não removidos pela passagem de tampão e água.

Figura 24- Microgravimetria da adsorção de β_2 GPI sobre superfícies de PC e PS/PC. As setas da esquerda indicam o momento de adição da proteína e as da direita a adição de tampão e H_2O .

As propriedades da interação proteína-superfície modificaram-se durante a adsorção da proteína. As variações de dissipação e a frequência apresentam-se linearmente correlacionadas, como mostrado na Figura 25.

Figura 25- Variação de ΔD por Δf durante a adsorção de β_2 GPI segundo a superfície do eletrodo.

4.4.2 LDE

A LDE deposita-se sobre a superfície de ouro do eletrodo, conforme mostrado na Tabela 5. Os valores de massa depositada na saturação do efeito e de velocidade de deposição têm uma diferença de cerca de 10%, entre os pHs ácidos. Em pH 8.5 a massa depositada e a velocidade são um pouco maiores, mas a LDE pode ser parcialmente removida da superfície do eletrodo com a aplicação de tampão.

Tabela 5- Variação da massa depositada de LDE sobre ouro com o pH e sua respectiva velocidade.

pH	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)
5.5	139.8	6.1
6.8	153.1	6.7
8.5	188.7	7.5

Nos pHs 5.5 e 6.8 não houve nenhuma remoção, como pode ser visto na Figura 26.

Figura 26- Microgravimetria do experimento da LDE sobre a superfície de ouro do eletrodo em diferentes pHs. As setas indicam o momento em que foi adicionado tampão.

Na Figura 27 é representado o perfil de adsorção da β_2 GPI seguida pela LDE em pH 6.8 e 8.5.

Figura 27- Microgravimetria do experimento da LDE sobre a superfície do eletrodo recoberta com β_2 GPI. As setas da esquerda indicam o momento em que foi adicionada a LDE e as da direita indicam o momento em que foi adicionado β_2 GPI sobre LDE.

A massa e a velocidade de deposição tanto da β_2 GPI sobre o eletrodo, quanto da LDE sobre a β_2 GPI e desta sobre a LDE, nos diferentes pHs estão mostradas na Tabela 6.

Tabela 6- Variação da massa depositada de β_2 GPI e LDE em diferentes superfícies e suas respectivas velocidades com o pH.

pH	β_2 GPI sobre eletrodo		LDE sobre β_2 GPI		β_2 GPI sobre LDE	
	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)
6.8	1310.6	8.3	964.7	2.2	241.0	12.1
8.5	1427.0	9.2	869.6	2.9	471.1	42.8

No pH 8.5 a β_2 GPI se deposita sobre a LDE em maior quantidade que no pH 6.8 e com uma velocidade também maior, mas a maior parte desta β_2 GPI (319.7 ng/cm²) é removida quando o tampão é passado, ficando ao final uma massa de β_2 GPI (151.4 ng/cm²) menor que a depositada no pH 6.8 (201.6 ng/cm²).

No pH 5.5 tanto a β_2 GPI quanto a LDE se comportam de forma instável, não reproduzindo o sistema de um experimento para o outro (Figura 28).

Figura 28- Microgravimetria do experimento da LDE sobre a superfície do eletrodo recoberta com β_2 GPI em pH 5.5. As setas da esquerda indicam o momento em que foi adicionada a LDE e as da direita indicam o momento em que foi adicionado β_2 GPI sobre LDE.

A massa e a velocidade de deposição tanto da β_2 GPI sobre o eletrodo, quanto da LDE sobre a β_2 GPI e desta sobre a LDE, variam de um experimento para o outro no pH 5.5 (Tabela 7).

Tabela 7- Variação da massa depositada de β_2 GPI e LDE em diferentes superfícies e suas respectivas velocidades no pH 5.5.

Dia	β_2 GPI sobre eletrodo		LDE sobre β_2 GPI		β_2 GPI sobre LDE	
	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)	Massa (ng/cm ²)	Velocidade (ng/cm ² .min)
1	1008.6	5.5	539.3	2.2	260.0	28.9
2	846.5	3.7	1882.3	7.7	218.6	43.7
3	1106.4	6.5	99.3	0.95	285.2	19.0
4	733.2	7.6	180.3	1.4	218.4	19.9

5 DISCUSSÃO

As diversas técnicas utilizadas para estudar a interação entre moléculas de β_2 GPI confirmaram dados de literatura, mas acrescentaram detalhes sobre formas de alto peso molecular que ainda não estão descritas. A massa molecular da β_2 GPI observada no SDS-PAGE (Figura 12) corresponde a uma massa estimada um pouco maior que a massa molecular calculada com base na sua seqüência de aminoácidos, que é cerca de 40 kD. Esta variação é discutida por vários autores. A banda única com massa de 45 kDa para Bouma et al. (1999) corresponde à proteína glicosilada. O SDS-PAGE produz bandas correspondentes à proteína nativa entre 50 e 66 kDa, devido à glicosilação extensiva de cinco sítios no segundo, terceiro e quarto domínios (CAI et al., 1996). Sob certas condições, a β_2 GPI pode ainda existir como dímeros e oligômeros (GALAZKA et al., 1998), com peso molecular maior do que 90 kDa. Estas bandas aparecem nos nossos géis, com peso molecular aparente de 115 kDa.

Segundo Horbach et al.(1999) e Sakai et al. (2007) formas clivadas entre 32 kDa e 37 kDa também podem ocorrer. Durante a purificação da β_2 GPI de plasma humano, usando cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-heparina, ocorrem clivagens proteolíticas da β_2 GPI, entre os resíduos Lys317 e Thr318, além disso, o ácido perclórico causa diretamente uma maior flexibilidade e/ou quebra da molécula da β_2 GPI por clivagem da cadeia de açúcar, de pontes dissulfeto, ou até mesmo de pontes peptídicas, diminuindo o peso molecular aparente (CAI et al., 1996). Estas formas foram observadas em alguns lotes de β_2 GPI purificada no laboratório. Foram reconhecidas pelos anticorpos monoclonais do clone K2124 e, com muito menos afinidade, pelo anticorpo comercial 5F7 e pelo clone K2, demonstrando-se a identidade estrutural do antígeno.

Formas de alto peso aparecem nos géis corados pela prata como uma coleção de bandas muito próximas, cujos pesos moleculares não são discrimináveis pelo SDS-PAGE na densidade utilizada neste trabalho. Estas bandas foram reconhecidas por todos os anticorpos monoclonais utilizados. Formas de alto peso molecular não foram estudadas por esta técnica. Géis muito frouxos (<5%) são tecnicamente difíceis de manusear. Além disso, o SDS provoca a desnaturação e a dissociação da proteína, possivelmente modificando o peso molecular aparente dos agregados de forma não controlável. Não é possível saber se a dissociação dos agregados por SDS é

completa, há inclusive relatos na literatura de que o SDS aumenta a agregação da β_2 GPI (HAGIHARA et al., 2002). As outras técnicas utilizadas são, por isto, mais adequadas para estudar os agregados de peso molecular maior do que 115 kDa.

Os resultados de espalhamento de luz sugerem que os agregados possam conter mais do que poucas unidades da proteína, como referido por Galazka et al. (1998), porque o peso molecular calculado a partir de nossas medidas documentou a presença de agregados em solução com dimensões lineares na ordem de micrômetros. Estes agregados são formados por associações reversíveis, visto que as soluções são filtradas em membrana de 0.22 μ m antes de cada experimento, sem perda de concentração. Agregados com peso molecular médio de 680 kDa foram observados por Celli (1997). Entretanto, a presença destes agregados geralmente é ignorada pela literatura e alguns procedimentos técnicos potencialmente eliminam as evidências de sua presença. Por exemplo, Dupuy D'Angeac (2006) centrifuga as amostras antes de realizar as medidas de espalhamento de luz estático para a retirada de grandes agregados, e considera apenas o pico de menor diâmetro médio da distribuição de diâmetros obtida pelo espalhamento de luz dinâmico. Ambas as técnicas são sujeitas a interferência de poeira, o que pode ser uma justificativa para a não utilização de dados que não sejam discrimináveis desta, nas condições em que foi feito o ensaio. Entretanto, é possível demonstrar a existência de agregados de dimensões compatíveis com estes interferentes com o uso de técnicas adequadas de limpeza de amostra, ambiente e vidraria e a consideração de todo o conjunto de resultados, como feito neste trabalho.

Os valores de M_w calculados a partir das medidas de espalhamento de luz estático por duas aproximações diferentes não coincidem em todos os casos, como mostrado na tabela 2. Estas medidas são uma forma direta de obter o M_w de uma substância. Entretanto, a exatidão dos resultados obtidos é limitada por fatores relacionados à dispersidade da população e à relação entre o tamanho das partículas e o comprimento de onda da luz utilizada, além do fato de os agregados da proteína mudarem de tamanho quando a solução é diluída. Pudemos observar que o comportamento de agregação e desagregação da proteína coincidiu em pH 6.8 e 8.5 mas foi oposto ao observado em pH 5.5 (Figura 18).

No espalhamento de luz estático, a β_2 GPI apresentou, em certas condições, agregados com valores de M_w que extrapolam os limites de aplicabilidade desta técnica. A construção do gráfico de Debye utilizando o ângulo de 90° (Figura 16), a partir dos valores de R_θ/Kc medidos

não considerou a dependência angular que grandes partículas (maiores que $\lambda/20$) possuem, portanto é esperado que a medida desvie-se do valor real sempre que este for maior do que 32 nm. Considerando o número de agregação calculado a partir do M_w e assumindo que as moléculas da proteína organizem-se maximizando a dimensão linear dos agregados, é pouco provável que pesos moleculares menores do que 200 kDa estejam fora da condição limite do método. Entretanto, é esperado que agregados com M_w iguais ou maiores do que 200 kDa apresentem dependência angular. O gráfico de Zimm levou em consideração esta dependência, sendo o método mais adequado para estudar o peso molecular aparente de partículas grandes. Contudo, o gráfico de Zimm apresentou-se curvado (Figura 17), indicando que as partículas possuem pesos moleculares que ultrapassam o limite desse método. A curvatura dos gráficos de Zimm implica perda de exatidão para os valores de M_w e R_g , calculados por este método.. Além disso, o tamanho das partículas se modificou com a diluição da amostra nos diferentes valores de pH.

O cálculo da dissimetria e do parâmetro P nos forneceu informações sobre o tamanho e a forma dos agregados e mostraram que estes se modificam com a concentração e o pH das soluções (Tabela 3). Comparando os dados obtidos com as relações descritas na literatura, observamos que em soluções ácidas diluídas os agregados apresentam-se mais próximos da forma esférica e se afastam dessa forma a medida que a concentração aumenta. A forma também depende de pH, numa mesma concentração de proteína, Em pH alcalino os agregados parecem ser mais anisométricos que em pH ácido, de uma forma geral. As mudanças de forma e tamanho foram reversíveis. Considerando os resultados dos gráficos de Debye e Zimm, verificamos que os agregados que se apresentam mais próximos da forma esférica são menores do que os que apresentam P correspondente a formas alongadas ao acaso, mono ou polidispersas. É razoável, portanto, supor que o crescimento dos agregados resulte em formas anisométricas e que seja dependente de pH. Um efeito que não foi considerado durante o trabalho, e que pode resultar em *bias* a ser corrigido futuramente é um provável aumento da viscosidade das soluções de proteína com o aumento da concentração. Este aumento afetaria a medida do $\bar{R}_h$ e consequentemente o cálculo do parâmetro P.

As medidas de espalhamento dinâmico contribuíram com uma informação: as soluções de agregados de β_2 GPI mostram subpopulações de diâmetros médios diferentes que se modificam com o pH e a concentração da proteína (Figura 20). São três ou quatro subpopulações de

diâmetros médios que se distribuem de forma discreta, entre 10 e 2000 nm. Estas subpopulações diferentes podem sugerir a presença de agregados alongados com secções transversais diferentes ou uma polidispersidade.

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo da β_2 GPI forneceu um detalhamento da forma dos agregados observável na população com diâmetros abaixo de 35nm (Figuras 13, 14 e 15). Este é o limite superior para as medidas realizadas por esta técnica no equipamento utilizado, não sendo possível definir a estrutura dos agregados totalmente. Contudo foi possível deduzir a forma destes agregados como sendo a de um elipsóide prolato, que condiz com as estruturas visualizadas pelo AFM (Figura 22). O aspecto da β_2 GPI seca sobre a mica a partir de diferentes soluções sugere que as interações proteína-proteína modificam-se com o pH e que se preservam após a secagem, permanecendo orientada de acordo com a superfície em que está depositada (WANG et al., 2002). Os agregados, vistos à microscopia, apresentam-se, principalmente nos pH 6.8 e 8.5, como duas ou três populações distintas de estruturas alongadas com tamanhos relativamente homogêneos intra-população. Embora as medidas de AFM tenham sido feitas com a amostra seca sobre a superfície de mica, especula-se que a quantidade de água neste tipo de preparação seja suficientemente alta para que a β_2 GPI reflita, de alguma forma, o aspecto da proteína em solução, visto que cristais da proteína apresentam aproximadamente 84% de solvente em sua composição (SCHWARZENBACHER et al., 1999) e o grau de umidade da β_2 GPI liofilizada medido foi de cerca de 46%.

A microgravimetria é uma técnica para a análise direta da adsorção de proteínas sobre superfícies (YANG et al., 2007). A saturação das superfícies de ouro, PC e PS/PC com a proteína mostrou valores equivalentes para as diferentes superfícies (Figuras 23 e 24). A β_2 GPI pode ser removida por fluxo de tampão da superfície de PC, mas não da de PS/PC ou ouro, o que corrobora com a sua maior afinidade por superfícies carregadas negativamente. As propriedades da interação proteína-superfície modificaram-se linearmente durante a adsorção da proteína. A regressão linear das curvas de dissipação em função da frequência indicou que as propriedades viscoelásticas variam com a adsorção de forma semelhante sobre as diferentes superfícies lipídicas (Figura 25). O ouro mostra uma curva bifásica e a adsorção da proteína dependeu da concentração da proteína na solução de alimentação da balança piezoelétrica. Este resultado sugere que as subpopulações de agregados apresentem comportamentos distintos de adsorção.

A β_2 GPI associada à superfície do eletrodo ligou nanopartículas lipídicas (LDE) a partir de uma emulsão. A interação proteína-LDE mostrou-se dependente do pH da suspensão. Quando LDE foi depositada sobre a β_2 GPI associada ao eletrodo, formou-se uma superfície sobre a qual mais β_2 GPI pode ser depositada (Figuras 27 e 28). A velocidade de deposição e as massas de β_2 GPI depositada sobre o eletrodo e de LDE depositada sobre a β_2 GPI foram semelhantes em pH 6.8 e 8.5, mas não em pH 5.5 (Tabelas 6 e 7). Neste caso, a saturação e a velocidade de adsorção variaram bastante entre os ensaios.

Este ensaio é pioneiro, não há precedente na literatura. Os resultados são compatíveis com a hipótese de que os efeitos biológicos da β_2 GPI possam ser mediados pela ligação a superfícies lipídicas e dependentes de interações proteína-proteína em diferentes pH. Segundo esta hipótese, os efeitos da β_2 GPI sobre a ativação da célula endotelial e sobre os fagócitos durante a ingestão de corpos apoptóticos ou partículas opsonizadas em sítios de inflamação poderiam ser mediados por variações reversíveis em estruturas de interação proteína-proteína e proteína-lipídio sem a interferência de receptores. Estas variações podem ocorrer devido às mudanças de pH que ocorrem nestes sítios, o que modifica as propriedades da proteína e seu estado de agregação sinalizando seus efeitos.

6 CONCLUSÕES

A β_2 GPI em solução agrega-se reversivelmente. A forma dos agregados depende do pH e da concentração de proteína, e é anisométrica.

A β_2 GPI seca sobre superfícies de mica forma estruturas alongadas, com dimensões compatíveis às dos agregados observados em solução.

A β_2 GPI deposita-se sobre o ouro da superfície do eletrodo e sobre ouro funcionalizado com fosfatidilcolina de ovo pura ou em mistura com fosfatidilserina. As propriedades da interação proteína-superfície modificam-se de forma linear durante a adsorção da proteína, dependendo da superfície. A β_2 GPI pode ser removida de superfícies de fosfatidilcolina por água ou tampão.

A β_2 GPI associada a uma superfície de ouro liga nanopartículas lipídicas (LDE) a partir de uma emulsão. A interação proteína-LDE depende do pH da suspensão: a velocidade de deposição e a massa depositada foram equivalentes em pH 6.8 e 8.5, mas não em pH 5.5, quando ocorrem grandes variações inter-ensaio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARVIEUX, J., DARNIGE, L., HACHULLA, E., ROUSSEL, B., BENSA, J.C., COLOMB, M.G. Species specificity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.75, p.725-730, 1996.
- AVERNA, M., PARAVIZZINI, G., MARINO, G., EMMANUELE, G., CEFALU, A.B., MAGRO, G. BARTOLONI, G., RAGUSA, M., NOTO, D.E., BARBAGALLO, C.M., CALLARI, D., MAZZARINO, J.C., NOTARBARTOLO, A., TRAVALI, S. β_2 -glycoprotein I is growth regulated and plays a role as survival factor for hepatocytes. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v.36, p.1297-1305, 2004.
- BALASUBRAMANIAN, K., KILLION, J.J., SCHROIT, A.J. Estimation of plasma β_2 -glycoprotein I levels by competitive ELISA. **Thrombosis Research**, Oxford, v.92, p.91-97, 1998.
- BEGALLI, J.H., SCHOW, E., TOBIAS, D., GOMES, L.F. Estudo de interação entre β_2 -Glicoproteína I e superfícies fosfolipídicas por simulações de dinâmica molecular. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 16, Ribeirão Preto, 2008.
- BIASIOLO, A., RAMPAZZO, P., BROCCO, T., BARBERO, F., ROSATO, A., PENGO, V. [Anti- β_2 -glycoprotein I- β_2 -glycoprotein I] immune complexes in patients with antiphospholipid syndrome and other autoimmune diseases. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.121-126, 1999.
- BOUMA, B., GROOT, P.G., ELSSEN, J.M.H., RAVELLI, R.B.G., SCHOUTEN, A., SIMMELINK, J.A., DERKESEN, R.H.W.M., KROON, J., GROS, P. Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.18, n.19, p.5166-5174, 1999.
- BRIGHTON, T.A., CHESTERMAN, C.N. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. **Baillieres Clinical Haematology**, Philadelphia, v.7, p. 541-547, 1994.

- BRIGHTON, T.A., HOGG, P.J., DAY, Y.-P., MURRAY, B., CHONG, B.H., CHESTERMAN, C.N. β_2 -glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.93, p.185-194, 1996.
- BURCHARD, W., RICHTER, W. Dynamic light scattering from polymer solutions. **Progress in Colloid & Polymer Science**, Berlin, v.80, p.151-163, 1989.
- CAI, G.; GUO, Y.; SHI, J. Purification of Apolipoprotein H by Polyethylene Glycol Precipitation. **Protein Expression Purification**, San Diego, v.8, p.341-346, 1996.
- CARREL, R.W., LOMAS, D.A. Conformational disease. **The Lancet**, London, v.350, p.134-138, 1997.
- CELLI, C.M. **Interação de anticorpos antifosfolípidios com seus epitopos e o papel da β_2 -glicoproteína I**. São Paulo, 1997. 135p. [Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo].
- CHONN, A., SEMPLET, S.C., CULLIS, P.R. β_2 -glycoprotein I is a major protein associates with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of non-self particles. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.25845-25849, 1995.
- CONTI, F., SORICE, M., CIRCELLA, A., ALESSANDRI, C., PITTONI, V., CARONTI, B., ALDERARO, C., GRIGG, T. β_2 -glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with tissue factor expression. **Clinical & Experimental Immunology**, Oxford, v.132, p.509-516, 2003.
- DUPUY D'ANGEAC, A., STEFAS, I., GRRAFLAND, H., LAMOTTE, F., RUCHETON, M., PALAIS, C., ERIKSSON, A.K., BOSO, P., ROSÉ, C., CHICHEPORTICHE, R. Biotinylation of glycan chains in β_2 glycoprotein I induces dimerization of the molecule and its detection by the human autoimmune anti-cardiolipin antibody EY2C9. **Biochemistry Journal**, London, v.393, p.117-127, 2006.
- ETIENNE, M.A., EDWIN, N.J., AUCOIN, J.P., RUSSO, P.S., MCCARLEY, R.L., HAMMER, R.P. β -Amyloid Protein Aggregation. **Methods in Molecular Biology**, New Jersey, v.386, p.203-225, 2007.

- FERREIRA, A.A.P., YAMANAKA, H. Microscopia de Força Atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.137-142, 2006.
- FOLTA-STOGNIEW, E., WILLIAMS, K.R. Determination of molecular masses of proteins in solution: implementation of an HPLC size exclusion chromatography and laser light scattering service in a core laboratory. **Journal of Biomolecular Techniques**, Bethesda, v.10, p.51-63, 1999.
- GALAZKA, M., KEIL, L.B., KOHLES, J.D., LI, J., KELTY, S.P., PETERSHEIM, M., DEBARI, V.A. A stable, multi-subunit complex of β_2 -glycoprotein I. **Thrombosis Research**, Oxford, v.90, p.131-137, 1998.
- GHARAVI, A.E., PIERANGELI, S.S., HARRIS, E.N. New developments in viral peptides and APL induction. **Journal of Autoimmunity**, London, v.15, p.227-230, 2000.
- GINSBURG, G.S., SMALL, D.M., ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.257, n.14, p.8216-8227, 1982.
- GOLDSMITH, G.H., PIERANGELLI, L.S., BRANCH, D.W., GHARAVI, A.E., HARES, E.N., Inhibition of prothrombin activation by antiphospholipids antibodies and β_2 -glycoprotein I. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.87, p.548-554, 1994.
- GOMES, L.F., ALVES, A., SEVANIAN, A., PERES, C.A., CENDOROGLO, M.S., MELLO-ALMADA F.C., QUIRINO, L. RAMOS, L.R., JUNQUEIRA, V.B.C. Role of β_2 -glycoprotein, LDL, and Antioxidant Levels in Hypercholesterolemic Elderly Subjects. **Antioxidants & Redox Signaling**, New York, v.6, p.237-244, 2004.
- GROOT, P.G., BOUMA, B., LUTTERS, B.C.H., SIMMELINK, J.A., DERKSEN, R.H., GROS, P. Structure function studies on β_2 -glycoprotein I. **Journal of Autoimmunity**, London, v.15, p.87-89, 2000.
- HAGIHARA, Y., HONG, D.P., HOSHINO, M., ENJOJI, K., KATO, H., GOTO, Y. Aggregation of β_2 -glycoprotein I Induced by Sodium Lauryl Sulfate and Lysophospholipids. **Biochemistry**, Washington, v.41, p.1020-1026, 2002.

- HAMMEL, M., SCHWARZENBACHER, R., GRIES, A. KOSTNER, G.M., LAGGNER, P., PRASSL, R. Mechanism of the interaction of β_2 -glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes. **Biochemistry**, Washington, v.40, p.14173-14181, 2001.
- HIEMENZ, P.C., RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**, 3 ed., New York: Marcel Dekker, 1997. 650p.
- HORBACH, D.A., OORT, E., LISMAN, T., MEIJERS, J.C.M., DERKSEN, R.H.W.M., GROOT, P.G. β_2 -Glycoprotein I is Proteolytically Cleaved *In Vivo* upon Activation of Fibrinolysis. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.81, p.87-95, 1999.
- ITRI, R., AMARAL, L.Q. Micellar-shape anisometry near isotropic-liquid-crystal phase transitions. **Physical Review E**, Washington, v. 47, p. 2551-2557, 1993.
- KASTL, K., ROSS, M., GERKE, V., STEINEM, C. Kinetics and thermodynamics of annexin A1 binding to solid-supported membranes: A QCM study. **Biochemistry**, Washington, v.41, p.10087-10094, 2002.
- KATO, H., ENJOJI, K. Amino Acid Sequence and Location of the Disulfide Bonds in Bovine β_2 -glycoprotein I: The Presence of Five Sushi Domains. **Biochemistry**, Washington, v.30, p.11687-11694, 1991.
- KOBAYASHI, K. MATSUURA, E., LIU, Q., FURUKAWA, J., KAIHARA, K., INAGAKI, J., ATSUMI, T., SAKAIRI, N., YASUDA, T., VOLKER, D.R., KOIKE, T. A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, p.697-709, 2001.
- ICHINOSE, A., BOTTENUS, R.E., DAVIE, E.W. Structure of transglutaminases. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.265, p.13411-13414, 1990.
- LAAT, B., DERKSEN, R.H.W.M., VAN LUMMEL, M., PENNINGS, M.T.T., GROOT, P.G. Pathogenic anti- β_2 -glycoprotein I antibodies recognize domain I of β_2 -glycoprotein I only after a conformational change. **Blood**, Philadelphia, v.107, n.5, p.1916-1924, 2006.
- LAUGHLIN, R.B., PINES, D., SCHMALIAN, J., STOJKOVIC, B.P., WOLYNES, P. The middle way. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.97, p.32-37, 2000.

- LIN, K.Y., PAN, J.P., YANG, D.L., HUANG, K.T., CHANG, M.S., DING, P.Y.A., CHIANG, A.N. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Live Sciences**, Oxford, v.69, p.707-719, 2001.
- LOZIER, J.A., TAKAHASHI, N., PUTNAM, F.W. Complete amino acid sequence of human plasma β_2 -glycoprotein I. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.81, p.3640-3644, 1984.
- LUCAS, E.F., SOARES, B.G., MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**, 1 ed., Rio de Janeiro: e-papers, 2001. 366p.
- MARANHÃO, R.C., CESAR, T.B., PEDROSO-MARIANO, S.R., HIRATA, M.H., MESQUITA, C.H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids**, Berlin, v.28, n.8, 691-696, 1993.
- MATSUURA, E., KOBAYASHI, K., YASUDA, T., KOIKE, T. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis. **Lupus**, Basingstoke, v.7, suppl.2, p.135-138, 1998.
- MERTINS, O. **Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana**. Porto Alegre, 2004. 53p. [Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul].
- NAKAYA, Y., SCHAEFER, J., BREWER, H.B. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.95, p.1168-1174, 1980.
- PEREIRA, E.M., **Modificação induzida por β_2 -glicoproteína I na resposta oxidativa de polimorfonucleares humanos durante a fagocitose**, São Paulo, 2005. 56p. [Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
- POLZ, E., WURM, H., KOSTNER, G.M. Investigations on β_2 -glycoprotein I in the rat: isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions. **International Journal of Biochemistry**, Oxford, v.11, p.265-270, 1980.

- ROACH, P., FARRAR, D., PERRY, C.C. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 127, p.8168-8173, 2005.
- SAKAI, T., BALSUBRAMANIAN, K., MAITI, S., HALDER, J.B., SCHROIT, A. J. Plasmin-cleaved β_2 -glicoprotein I is an inhibitor of angiogenesis. **American Journal of Pathology**, California, v.171, n.5, p.1659-1669, 2007.
- SCHWARZENBACHER, R., ZETH, K., DIEDERICH, K., GRIES, A., KOSTNER, G.M., LAGNER, P., PRASSL, R. Crystal structure of human β_2 -glicoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.18, n.22, p.6228-6239, 1999.
- SEGOTA, S., TEZAK, D., LJUBESIC, N. Formation of vesicles in diluted aqueous solutions of surfactant investigated by direct analysis of light scattering. **Advances in Colloid and Interface Science**, Missouri, v.89-90, p.283-291, 2001.
- SILVA, J.C. **Estudo de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução usando espalhamento de raio-X**. Campinas, 2005. 98p. [Tese de Mestrado, Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas].
- SOTO, C. Alzheimer’s and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v.77, p.412-418, 1999.
- SHULTZ, H.E., HEIDE, K., HAUPT, H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares β_2 -globulin des Humanserums. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.23, p.719, 1961.
- VALSTAR, A., ALMGREN, M., BROWN, W. The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering. **Langmuir**, Washington, v.16, p. 922-927, 2000.
- WANG, F., XIA, X.F., SUI, S.F., Human apolipoprotein H may have various orientations when attached to lipid layer. **Biophysical Journal**, Missouri, v.83, p-985-993, 2002.
- WANG, S.X., CAI, G.P., SUI, S.F., The insertion of human apolipoprotein H into phospholipid membranes: a monolayer study. **Biochemistry Journal**, London, v.335, p.225-232, 1998.

- WANG, S.X., CAI, G.P., SUI, S.F., Membrane-induced conformational change in human apolipoprotein H. **Biochemistry Journal**, London, v.348, p.103-106, 2000.
- WYATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 272, p. 1-40, 1993.
- YANG, Z., SI, S., ZHANG, C., SONG, G. Quartz crystal microbalance studies on bilirubin adsorption on self-assembled phospholipid bilayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, Missouri, v.305, p.1-6, 2007.
- YASUDA, S., TSUTSUMI, A., CHIBA, H., YANAI, H., MIYOSHI, Y., TAKEUCHI, R., HORITA, T., ATSUMI, T., ICHIKAWA, K., MATSUURA, E., KOIKE, T. β_2 -glicoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.152, p.337-346, 2000.
- YOUNG, C.Y., MISSEL, P.J., MAZER, N.A., BENEDEK, G.B., CAREY, M.C. Deduction of micellar shape from angular dissymmetry measurements of light scattered from aqueous sodium dodecyl sulfate solutions at high sodium chloride concentrations. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v.82, n.12, p.1375-1378, 1978.
- ZIMM, B.H. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. **Journal of Chemical Physics**, New York, v.16, n.12, p.1093-1099, 1948.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I - FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5579307/1 - Fernanda Martins Pozzi

Email: fmpozzi@usp.br

Data de Nascimento: 27/04/1981

Cédula de Identidade: RG - MG-12.027.059 - MG

Local de Nascimento: Estado da Bahia

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas - Minas Gerais - Brasil - 2004

Curso: Mestrado

Programa: Farmácia (Análises Clínicas)

Área: Análises Clínicas

Data de Matrícula: 17/07/2006

Início da Contagem de Prazo: 17/07/2006

Data Limite: 17/01/2009

Orientador: Prof(a). Dr(a). Ligia Ferreira Gomes - 17/07/2006 até o presente. E.Mail: lfgomes@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/07/2006

Prazo para Aprovação no Exame de Qualificação Segundo Regimento da Pós da USP: 17/07/2008 (verifique em sua CPG se ela possui um prazo anterior)

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 26/06/2008

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 17/07/2006

Matrícula Regular em 22/07/2008

Situação Atual: Matrícula Regular em 22/07/2008**Impresso em:** 28/11/08 17:10:53**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5579307/1 - Fernanda Martins Pozzi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FAP5753-4	Microscopia de Força Atômica e Tunelamento	07/08/2006	24/11/2006	150	10	100.00	A	N	Concluída
QBQ5707-3	Princípios Físico-Químicos dos Sistemas Biomiméticos	08/08/2006	05/12/2006	180	12	100.00	A	N	Concluída
FBC5748-1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	01/03/2007	10/05/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5793-8	Seminários em Análises Clínicas	14/03/2007	27/06/2007	30	2	100.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	05/06/2007	02/07/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
BTC5721-3	Peptídeos - Obtenção, Purificação e Caracterização das Atividades Biológicas (1)	08/09/2008	12/10/2008	75	5	100.00	A	S	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	37
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		37

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

Observações:

(1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 12 horas de atividade programada.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Situação Atual: Matrícula Regular em 22/07/2008

Impresso em: 28/11/08 17:10:53

8.2 ANEXO II - CURRICULUM LATTES

Fernanda Martins Pozzi

Dados Pessoais

Nome Fernanda Martins Pozzi
Nome em citações bibliográficas POZZI, F. M.

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Estudos de Interação de Beta2-Glicoproteína I em Solução Aquosa e com Interfaces Lipídicas
Orientador: Ligia Ferreira Gomes
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Beta2-Glicoproteína I, Espalhamento de Luz Estático, Espalhamento de Luz Dinâmico, Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo, Microscopia de Força Atômica, Microgravimetria
Áreas do conhecimento : Proteínas
- 2001 - 2005** Graduação em Farmácia Bioquímica.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
Bolsista do(a): Secretaria de Ensino Superior
-

Formação complementar

- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Curso Teórico Prático de Aplicação e Injeções.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em A Comunicação e a Neurolinguística.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Marketing Em Saúde.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Implementação de Uma Política de Gerenciamento de.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Toxicologia Forense.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Garantia e Controle de Qualidade no Laboratório Cl.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Metabolismo de Fármacos e Interações Medicamentosa.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Introdução à Química Farmacêutica Medicinal.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Atenção Farmacêutica.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Montagem de Farmácia Magistral.
Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Alfenas, Brasil

2007 - 2007 Licenciatura em Ciências Biológicas.
Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2006 - Atual Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Mestranda, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

08/2008 - Atual Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Especificação:
Programa de Aperfeiçoamento em Ensino (PAE) em Fisiopatologia

05/2006 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Participação em projetos:
Estudos de Interação de beta2 -glicoproteína I em Solução Aquosa e com Interfaces Lipídicas

2. Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Vínculo institucional

2002 - 2005 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Membro do Programa de Ensino Tutorial , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

04/2005 - 04/2005 Graduação, Comunidade Universitária
Disciplinas Ministradas:
Palestra: Inteligências Múltiplas e Síndrome de Savant

03/2005 - 07/2005 Extensão Universitária, Pró_Diretoria de Pesquisa, Ensino e Extensão
Especificação:
Inclusão Digital

02/2005 - 06/2005 Outra atividade técnico-científica, Departamento de Análises Clínicas, Bioquímica Clínica
Especificação:
Monitoria Voluntária

02/2005 - 06/2005 Estágio, Pró-Diretoria de Graduação
Estágio:
Estágio Supervisionado em Análises Clínicas

2004 - 2005 Projetos de pesquisa, Departamento de Farmácia, Farmacologia
Participação em projetos:
Comparação Entre o Número de Medicamentos que Compõe a Lista da Farmácia Básica do SUS e o IDH de Municípios

2004 - 2004 Projetos de pesquisa, Departamento de Farmácia, Farmacologia
Participação em projetos:

*Principais Medicamentos Dispensados em um Ambulatório de Atenção Básica***10/2004 - 10/2004** Graduação, Comunidade Universitária*Disciplinas Ministradas:**Palestra: DNA forense - investigação de paternidade e criminal***08/2004 - 12/2004** Extensão Universitária, Departamento de Farmácia, Farmacologia*Especificação:**Assistência Farmacêutica***03/2004 - 12/2004** Extensão Universitária, Departamento de Farmácia*Especificação:**Reforçando o Aprendizado***2003 - 2004** Projetos de pesquisa, Departamento de Farmácia, Patologia*Participação em projetos:**Avaliação Histológica da Cura de Feridas com o Uso de *Symphytum officinale* (Confrei) em Ratos***10/2003 - 10/2003** Graduação, Comunidade Universitária*Disciplinas Ministradas:**Palestra: Células Tronco***05/2003 - 05/2003** Graduação, Comunidade Universitária*Disciplinas Ministradas:**Palestra: Distúrbios Alimentares***03/2003 - 12/2003** Extensão Universitária, Departamento de Farmácia, Farmacologia*Especificação:**Atenção Farmacêutica no GRAAL***08/2002 - 12/2002** Outra atividade técnico-científica, Departamento de Farmácia, Química Geral e Inorgânica*Especificação:**Monitoria Voluntária***08/2002 - 08/2002** Graduação, Comunidade Universitária*Disciplinas Ministradas:**Palestra: Alimentos Funcionais***07/2002 - 07/2005** Outra atividade técnico-científica, Pró-Diretoria de Pesquisa, Ensino e Extensão*Especificação:**Programa de Ensino Tutorial - PET***03/2002 - 12/2003** Extensão Universitária, Departamento de Farmácia, Farmacologia*Especificação:**Educação e Saúde no Diabetes Mellitus***3. Hospital das Clínicas Samuel Libânio - HCSL**

Vínculo institucional**2004 - 2004** Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades**01/2004 - 02/2004** Estágio*Estágio:*

Farmácia Hospitalar - 90 horas

4. Sistema Único de Saúde - SUS

Atividades

07/2003 - 07/2003 Estágio, Unidade Básica de Saúde, Central

*Estágio:
Dispensação*

5. Vital Fórmulas Ltda - VF

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

01/2004 - 05/2004 Estágio

*Estágio:
Farmácia Homeopática - 120 horas*

Projetos

2006 - Atual Estudos de Interação de beta2 -glicoproteína I em Solução Aquosa e com Interfaces Lipídicas

Descrição: Este trabalho visa a caracterização da interação entre moléculas de beta2-glicoproteína I (beta2-GPI) e entre a proteína e superfícies lipídicas. Para isso, realizamos e comparamos as técnicas de espalhamento de luz estático, dinâmico e raio-X a baixo ângulo, e microscopia de força atômica, além do uso da microgravimetria.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Integrantes: Fernanda Martins Pozzi (Responsável);

2004 - 2005 Comparação Entre o Número de Medicamentos que Compõe a Lista da Farmácia Básica do SUS e o IDH de Municípios

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa
Integrantes: Fernanda Martins Pozzi/Francine Freitas Fernandes

2004 - 2004 Principais Medicamentos Dispensados em um Ambulatório de Atenção Básica

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa
Integrantes: Fernanda Martins Pozzi/Francine Freitas Fernandes

2003 - 2004 Avaliação Histológica da Cura de Feridas com o Uso de *Symphytum officinale* (Confrei) em Ratos

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa
Integrantes: Fernanda Martins Pozzi/Pablo Gomes Ferreira

Áreas de atuação

1. Proteínas
 2. Polímeros e Colóides
 3. Cicatrização
-

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Pouco, Lê Bem

Prêmios e títulos

2005 Menção Honrosa, Federação de Sociedades de Biologia Experimental

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. POZZI, F. M., Itri, R., Politi, M.J., Rodrigues, F. A., Gomes, L.F.
BETA 2-GLYCOPROTEIN I FORMS WATER SOLUBLE, ANISOMETRIC, AND ELONGATED AGGREGATES In: I Encontro sobre Estruturas Auto-organizadas em Solução e em Interfaces, 2008, São Pedro.

I Encontro sobre Estruturas Auto-organizadas em Solução e em Interfaces. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. POZZI, F. M., Begalli, J. H., Pereira, E.M., Rodrigues, M.A., Politi, M.J., Gomes, L.F.
Interaction Between Beta 2-Glycoprotein I And Phospholipid Surfaces In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Águas de Lindóia.

XXXVII Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3. PEREIRA, E. M., DIAZ, J. L. M., JUNQUEIRA, V. B. C., POZZI, F. M., Gomes, L.F.
Beta 2-Glycoprotein I plasma level increase in response to bacterial translocation through intestinal mucosa is higher than after intravenous injection. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007, Salvador.

XXXVI Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. PEREIRA, E. M., POZZI, F. M., M.PITOMBO, R. N., GIAVAROTTI, K. A. S., JUNQUEIRA, V. B. C., GOMES, L. F.

Beta 2-Glycoprotein I Modification In Long Term Storage Can Be Avoided By Lyophilization In: XXXV reunião da SBBq, 2006, Águas de Lindóia.

XXXV reunião da SBBq. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

5. POZZI, F. M., FERREIRA, P. G., RODRIGUES, M. A., PEREIRA, A. A. C., SILVA, G. A.
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA CURA DE FERIDAS COM O USO DE *Symphytum officinale* (CONFREI) EM RATOS In: X JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DE ALFENAS, 2004, Alfenas.

X JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DE ALFENAS. , 2004.

Áreas do conhecimento : Farmácia

Setores de atividade : Outros

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

6. POZZI, F. M., FERNANDES, F. F., VILAS BOAS, O. M. G. C.
COMPARAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE MEDICAMENTOS QUE COMPÕE A LISTA DA FARMÁCIA BÁSICA DO SUS E O IDH DE MUNICÍPIOS In: XX REUNIÃO ANUAL DA FeSBE, 2004, Águas de Lindóia.

XX REUNIÃO ANUAL DA FeSBE. , 2004.

Áreas do conhecimento : Farmácia

Setores de atividade : Políticas, planejamento e gestão em saúde

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

7. POZZI, F. M., FERNANDES, F. F., VILAS BOAS, O. M. G. C., ALEXANDRE, M. M.
PRINCIPAIS MEDICAMENTOS DISPENSADOS EM UM AMBULATÓRIO DE ATENÇÃO
BÁSICA In: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2004, Águas de
Lindóia.

XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica e Experimental. , 2004. p.309 -

Áreas do conhecimento : Farmácia

Setores de atividade : Políticas, planejamento e gestão em saúde

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Apresentação de Trabalho

1. POZZI, F. M., Begalli, J. H., Pereira, E.M., Rodrigues, M.A., Politi, M.J., Gomes, L.F.
Interaction Between Beta 2-Glycoprotein I And Phospholipid Surfaces, 2008.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Evento: XXXVII Sociedade Brasileira de
Bioquímica e Biologia Molecular

2. PEREIRA, E. M., POZZI, F. M., PITOMBO, R. N. M., GIAVAROTTI, K. A. S., JUNQUEIRA, V.
B. C., GOMES, L. F.

Beta 2 - glycoprotein I modification in long term storage can be avoided by lyophilization,
2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Evento: XXXV Reunião Anual da Sociedade
Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

3. POZZI, F. M.
**Comparação Entre o Número de Medicamentos que Compõe a Lista da Farmácia Básica do
SUS e o IDH de Municípios,** 2005. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Águas de Lindóia; Cidade: Águas de
Lindóia; Evento: FeSBE - Reunião Anual de 2005; Inst.promotora/financiadora: FeSBE

4. POZZI, F. M.
Principais Mediamentos Dispensados em um Ambulatório de Atenção Básica, 2004.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Águas de Lindóia; Cidade: Águas de
Lindóia; Evento: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental; Inst.promotora/financiadora: SBFT

5. POZZI, F. M., Julia Havandjian Begalli, PEREIRA, E. M., Kátia Regina Perez Daghashtanli,
Mario José Politi, Iolanda Midea Cuccovia, GOMES, L. F.

**Agregação de beta 2-glicoproteína I em solução aquosa: efeitos de concentração, pH e
força iônica,** 2007. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: FCF/USP; Cidade: São Paulo; Evento: XII
Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de ciências Farmacêuticas/ Universidade
de São Paulo

6. Julia Havandjian Begalli, POZZI, F. M., Mario José Politi, GOMES, L. F.
Interação entre beta 2-glicoproteína I e superfícies fosfolipídicas, 2007.
(Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro Nacional de Convenções em
Ribeirão Preto/SP; Cidade: Ribeirão Preto; Evento: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP;
Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo

7. POZZI, F. M.
O PET na Formação Acadêmica, 2004. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Hipertexto; Local: EFOA; Cidade: Alfenas; Evento: III
Mostra do Conhecimento:Graduação, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: EFOA

8. POZZI, F. M.
Assistência Farmacêutica nas Unidades Básicas de Saúde (UBS), 2003.
 (Outra, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: EFOA; Cidade: Alfenas; Evento: II Mostra de Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: EFOA

9. POZZI, F. M.
Atenção Farmacêutica no Grupo de Assistência e Alfetização (GRAAL), 2003.
 (Outra, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: EFOA; Cidade: Alfenas; Evento: II Mostra de Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: EFOA

10. POZZI, F. M.
Saúde e Educação no Diabetes Mellitus, 2003. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: EFOA; Cidade: Alfenas; Evento: II Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: EFOA

11. POZZI, F. M.
Educação e Saúde no Diabetes Mellitus, 2002. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: EFOA; Cidade: Alfenas; Evento: Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: EFOA

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. Politi, M.J., POZZI, F. M.
III Curso de Inverno - Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: Espalhamento de Luz Estático
Áreas do conhecimento : Polímeros e Colóides
Referências adicionais : Brasil/Português. 2 semanas. Meio de divulgação: Impresso

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Encontro Sobre Estruturas Auto-Organizadas em e Soluções e Interfaces**, 2008. (Encontro)
 BETA2-GLYCOPROTEIN I FORMS WATER SOLUBLE, ANISOMETRIC, AND ELONGATED AGGREGATES.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXVII Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2008. (Congresso)
 Interaction Between Beta2-Glycoprotein I And Phospholipid Surfaces.

3. **5º Seminário de Pedagogia Universitária**, 2008. (Seminário)

4. **6º Seminário de Pedagogia Universitária**, 2008. (Seminário)

5. **XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2008. (Congresso)

6. **Seminário Internacional Teoria e Aplicação de Espectroscopia Ramam e Infravermelho**, 2008. (Seminário).

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2007. (Seminário)

Agregação de beta2-glicoproteína I em solução aquosa: efeitos de concentração, pH e força iônica.

8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2007. (Congresso)

Beta2-Glycoprotein I plasma level increase in response to bacterial translocation through intestinal mucosa is higher than after intravenous injection.

9. **23º Workshop Temático do CAT/DEPID-FAPESP**, 2007. (Outra)

10. **IV Encontro - Da Macroscopia à Biologia Molecular**, 2007. (Encontro)

11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2006. (Congresso)

Beta 2 - glycoprotein I modification in long term storage can be avoided by lyophilization.

12. **V Sudeste PET - Desafios e Possibilidades do PET no Novo Cenário da Universidade Brasileira**, 2005. (Encontro)

V Sudeste PET - Desafios e Possibilidades do PET no Novo Cenário da Universidade Brasileira.

Áreas do conhecimento : Farmácia

13. **XI Jornada de Iniciação Científica de Alfenas**, 2005. (Congresso)

XI Jornada de Iniciação Científica de Alfenas.

Áreas do conhecimento : Farmácia

14. **III Jornada Científico - Cultural PET - Efoa/Ceufe**, 2004. (Outra)

III Jornada Científico - Cultural PET - Efoa/Ceufe.

Áreas do conhecimento : Farmácia

15. **IV Sudeste PET: Ampliando Fronteiras com a Força do Conhecimento**, 2004. (Encontro)

IV Sudeste PET: Ampliando Fronteiras com a Força do Conhecimento.

Áreas do conhecimento : Farmácia

16. **V Semana da Biologia - Seguindo os Passos da Vida**, 2004. (Outra)

V Semana da Biologia - Seguindo os Passos da Vida.

Áreas do conhecimento : Farmácia

17. **X Escola de Verão em Química Farmacêutica & Química Medicinal**, 2004. (Outra)

X Escola de Verão em Química Farmacêutica & Química Medicinal.

Áreas do conhecimento : Farmácia

18. **X Jornada de Iniciação Científica de Alfenas**, 2004. (Outra)

X Jornada de Iniciação Científica de Alfenas.

Áreas do conhecimento : Farmácia

19. **XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2004. (Congresso)

XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.

Áreas do conhecimento : Farmácia

20. **39ª Semana Farmacêutica da Efoa/Ceufe**, 2004. (Outra)

39ª Semana Farmacêutica da Efoa/Ceufe.

Áreas do conhecimento : Farmácia

21. **II Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão e II Jornada Científico-Cultural do PET**, 2003. (Outra)

II Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão e II Jornada Científico-Cultural do PET.

Áreas do conhecimento : Farmácia

22. III Sudeste PET, 2003. (Encontro)

III Sudeste PET.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***23. 38ª Semana farmacêutica da Efoa/Ceufe, 2003. (Outra)**

38ª Semana farmacêutica da Efoa/Ceufe.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***24. 9ª Jornada de Iniciação Científica de Alfenas, 2003. (Outra)**

9ª Jornada de Iniciação Científica de Alfenas.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***25. Jornada Científico-Cultural do PET, 2002. (Outra)**

Jornada Científico-Cultural do PET.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***26. Mostra do Conhecimento, 2002. (Outra)**

Mostra do Conhecimento.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***27. Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão, 2002. (Encontro)**

Mostra do Conhecimento: Graduação, Pesquisa e Extensão.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***28. 37ª Semana Farmacêutica, 2002. (Outra)**

37ª Semana Farmacêutica.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***29. 5º Encontro de Jovens Cientistas, 2002. (Encontro)**

5º Encontro de Jovens Cientistas.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***30. 7º ENAPET - Encontro Nacional dos Grupos PET'S, 2002. (Encontro)**

7º ENAPET - Encontro Nacional dos Grupos PET'S.

*Áreas do conhecimento : Farmácia***Organização de evento****1. POZZI, F. M.****III Jornada Científico - Cultural PET Efoa/Ceufe, 2004. (Outro, Organização de evento)***Áreas do conhecimento : Farmácia**Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso***2. POZZI, F. M.****Jorna da Científico - Cultural do PET - Efoa/Ceufe, 2002. (Outro, Organização de evento)***Áreas do conhecimento : Farmácia**Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso***3. POZZI, F. M.****37ª Semana Farmacêutica, 2002. (Outro, Organização de evento)***Áreas do conhecimento : Farmácia**Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*

Totais de produção**Produção bibliográfica**

Trabalhos publicados em anais de eventos..... 7

Apresentações de Trabalhos (Congresso)..... 4

Apresentações de Trabalhos (Seminário).....	1
Apresentações de Trabalhos (Simpósio).....	1
Apresentações de Trabalhos (Outra).....	5

Produção Técnica

Curso de curta duração ministrado (outro).....	1
--	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	6
Participações em eventos (seminário).....	4
Participações em eventos (encontro).....	8
Participações em eventos (outra).....	12
Organização de evento (outro).....	3

Outras informações relevantes

1 Participação ativa em todos os setores da estrutura acadêmica, devido ao ingresso e permanência por três anos no PET(Programa de Ensino Tutorial)