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

Obtenção de GFP5-scFv recombinante reativo à LDL(-): possíveis aplicações
na investigação da aterosclerose

Daniel Ferreira Guilherme

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Professora Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

São Paulo

2012

Daniel Ferreira Guilherme

**Obtenção de GFP5-scFv recombinante reativo à LDL(-): possíveis
aplicações na investigação da aterosclerose**

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de mestre em Farmácia –Análises
Clínicas.

Área de concentração:

Farmácia – Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientadora: Prof^a. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Guilherme, Daniel Ferreira
G956o Obtenção de GFP5-scFv recombinante reativo à LDL(-): possíveis
aplicações na investigação da aterosclerose / Daniel Ferreira
Guilherme. -- São Paulo, 2012.
100p.

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

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

1. Química clínica 2. Lipídio : Bioquímica clínica I. T. II.
Abdalla, Dulcinéia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Daniel Ferreira Guilherme

Obtenção de GFP5-scFv recombinante reativo à LDL(-): possíveis aplicações
na investigação da aterosclerose

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
orientadora/presidente

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
1º. examinador

Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund
2º. examinador

São Paulo, 12 de Setembro de 2012.

Dedico esta Dissertação a Deus, fonte de toda ciência e sabedoria. Aos meus Pais José Carlos e Glades, que com muito esforço dedicaram suas vidas na construção da minha educação. Ao meu irmão Gustavo. À Juliana, um dos meus pilares de sustentação.

Agradecimentos

A toda minha família, meus pais e irmão, meus avos, tios e primos.

A Juliana, e família.

Agradeço a Professora Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, pela oportunidade que me foi concedida, e que nos anos de convivência, muito me ensinou. Estou grato pela orientação, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

Ao Vitor, que se envolveu pessoalmente com meu trabalho, colaborando com materiais e conselhos, auxiliando na minha orientação, numa época bastante difícil. Espero poder conviver mais tempo com ele.

A Tanize, pelas importantes sugestões, discussões técnicas e ensinamentos.

A Aldacilene por toda ajuda prestada e pelas valiosas sugestões.

Gostaria ainda de agradecer os colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF: Alejandro, Cristiane, Elaine, Fernanda, Jaqueline, Marcela, Martina, Nicolas e Renila.

Deixo também uma palavra de agradecimento aos amigos do Serviço de Laboratório Clínico do HU-USP: Ana, Ivo (Tio Ivo), Lilian, Lucilene (Luci), Luiz (Luizão), Maria Elisa (Lisa), Marilice (Lisinha), Vanda (Dona Vanda), Thiago (Thiago). A Marlene (Ma) pela ajuda na etapa final.

Não posso deixar de agradecer os amigos Harold (Haroldão), Mario (Mochilão) e Rafael. A Dona Cida e ao Sr. Orlando (*in memorian*).

Finalmente, gostaria de deixar dois agradecimentos muito especiais à tia Neusa e ao tio Cezar, por terem transmitido o interesse pela Farmácia.

A vida me ensinou a nunca desistir
Nem ganhar, nem perder mas procurar evoluir
Podem me tirar tudo que tenho
Só não podem me tirar as coisas boas que eu já fiz
pra quem eu amo
E eu sou feliz e canto e o universo é uma canção e
eu vou que vou

Charlie Brown Jr

Resumo

Guilherme, D. F. **Obtenção de GFP5-scFv recombinante reativo à LDL(-): possíveis aplicações na investigação da aterosclerose.** 2012. 100p. Tese de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Farmácia Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A aterosclerose é a doença de base das principais complicações cardiovasculares. Os produtos de modificação das lipoproteínas de baixa densidade, como a subfração eletronegativa LDL (-), exercem um importante papel na progressão da aterosclerose. O objetivo do presente trabalho foi expressar a proteína de fusão, GFP5-scFv anti-LDL (-), desenvolver um método para detecção de LDL (-), assim como avaliar a possível utilização desta proteína como uma ferramenta para monitorar os ensaios de formação de células espumosas. A proteína GFP5-scFv anti-LDL (-) foi expressa em *E. coli* BL21DE3. Esta proteína de fusão foi desnaturada com 7M de ureia, purificada por cromatografia de afinidade e reenovelada por gradiente de diálise na presença de poliestireno sulfonado. A massa molar da proteína foi confirmada por SDS-PAGE e sua afinidade de ligação à LDL (-) confirmada pelo dot blot e ELISA. O espectro de emissão de fluorescência da GFP5-scFv anti-LDL (-) é qualitativamente equivalente ao da GFP5, porém com intensidade de emissão mais baixa. Na tentativa de superar essa limitação tentou-se realizar a inserção de um peptídeo ligante flexível entre os domínios de ligação da GFP5 e do scFv anti-LDL (-) para melhorar a eficiência de emissão de fluorescência da quimera. Os ensaios *in vitro* com macrófagos RAW 264.7 demonstraram que a GFP5-scFv anti-LDL (-) não apresentou toxicidade significativa e não reduziu a captação de LDL (-) pelos macrófagos. Demonstrou-se por microscopia confocal, que a GFP5-scFv anti-LDL é internalizada pelos macrófagos e pode ser visualizada no interior destas células. Portanto, a proteína recombinante GFP5-scFv anti-LDL (-) é uma ferramenta que poderá ser utilizada em ensaios *in vitro* com macrófagos para o estudo da aterosclerose.

Palavras chave: Aterosclerose, Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa, GFP5-scFv anti-LDL (-), macrófagos, células espumosas.

Abstract

Guilherme, D. F. **Obtaining GFP5-scFv recombinant reactive LDL (-): possible applications in research of atherosclerosis.** 2012. 100p. Master Thesis – Graduate Program in Pharmacy Clinical Analysis. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Atherosclerosis is the most important cause of the cardiovascular diseases. The modifications of low density lipoproteins that induces the formation of modified particles, like the electronegative LDL subfraction, - LDL (-), are know to play a key role in the progression of atherosclerosis. The aim of the present work was to express a fusion protein, GFP5-scFv anti LDL (-), to develop a method to assess LDL (-), as well as to evaluate the use of this protein as a tool for *in vitro* assay in the investigation of atherosclerosis. The protein GFP5-scFv anti LDL (-) was expressed in E. Coli BL21DE3. The fusion protein was denatured with 7M urea, purified by affinity chromatography and refolded by gradient dialysis in the presence of PSS. The molecular mass of the protein was confirmed by SDS-PAGE and its affinity for LDL (-) was confirmed by dot blot and ELISA. The emission spectrum of GFP5-scFv is qualitatively equivalent to that of GFP5, although with a lower fluorescence emission intensity. In an attempt to overcome this limitation we tried to perform the insertion of a flexible linker between the binding domains of GFP5 and scFv was done in order to increase the fluorescence emission of this fusion protein. The *in vitro* assays with RAW 264.7 macrophages showed that the GFP5-scFv anti-LDL (-) has no significant toxicity to these cells and did not decrease the uptake of LDL (-) by these macrophages. It was demonstrated by confocal microscopy that the GFP5-scFv anti-LDL (-) is internalized by macrophages and can be visualized inside these cells. Thus, GFP5-scFv anti-LDL (-) fusion proteins is a useful to that can be used for *in vitro* assays with macrophages in the investigation of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, Electronegative low density lipoproteins, GFP5-scFv anti-LDL (-), macrophages, foam cells.

Lista de abreviaturas e siglas

AP-1	Fator de transcrição AP-1
Apo B	Apolipoproteína B
BHt	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina
CDR	Região de complementaridade
CML	Células Musculares Lisas
DAB	3,3-Diaminobenzidina
DCV	Doenças Cardiovasculares
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
FV	Fragmento variável
GFP	Proteína verde fluorescente
GFP5	Proteína verde fluorescente 5
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
ICAM	Molécula de adesão intercelular-1
IL-8	Interleucina 8
IPTG	Isopropitilo-β-D-galactosídeo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL (-)	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LDLR	Receptor de LDL
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Diidrogeno fosfato de sódio
NFκB	Fator de transcrição NFκB
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PSS	Poliestireno sulfonado
QCM	Microbalança de cristal de quartzo
SFB	Soro Fetal Bovino
SMC	Células musculares
SR	Receptor <i>scavenger</i>
scFv	Fragmento variável de cadeia única
TFB	Tampão de transformação
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UV	Ultravioleta
V_H	Região variável da cadeia pesada
V_L	Região variável da cadeia leve
VCAM-1	Moléculas de adesão vascular-1

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Aterosclerose.....	14
1.2 Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa.....	20
1.3 Proteína verde fluorescente.....	25
1.4 Fragmento variável de cadeia única.....	28
1.5 Impacto biotecnológico da GFP-scFv.....	31
2 OBJETIVOS.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Células.....	33
3.2 Obtenção das frações nativa e eletronegativa da LDL.....	33
3.3 Purificação das frações nativa e eletronegativa da LDL.....	34
3.4 Vetores.....	35
3.5 Preparo das células bacterianas competentes.....	35
3.6 Transformação bacteriana por choque térmico.....	36
3.7 Pré inoculo das células de <i>Escherichia coli</i> BL21DE3.....	37
3.8 Inoculo das células de <i>Escherichia coli</i> BL21DE3.....	37
3.9 Lise bacteriana.....	37
3.10 Solubilização dos corpos de inclusão.....	38
3.11 Purificação da GFP5-scFv anti-LDL (-).....	38
3.12 Reenovelamento da GFP5-scFv anti-LDL (-).....	39
3.13 Análise da GFP5-scFv anti-LDL (-) em SDS-PAGE.....	39
3.14 dot blot.....	41
3.15 Transformação das células bacterianas como o vetor pET-GFP5, expressão e purificação da GFP5 livre.....	42
3.16 Ensaio de fluorescência para determinação de LDL (-).....	43
3.17 Ensaio imunoenzimático para análise da ligação da LDL (-) na placa de alta ligação.....	43

3.18 Ensaio imunoenzimático para análise da ligação da GFP5-scFv anti-LDL(-) ao antígeno adsorvido na placa.....	45
3.19 Desenho dos <i>primers</i>	46
3.20 Digestão do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição PstI-HF...	46
3.21 Digestão de vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição XhoI.....	47
3.22 Defosforilação do vetor pET-GFP5-scFv após digestão com as enzimas restrição PstI-HF e XhoI.....	47
3.23 Eletroforese em gel de agarose.....	47
3.24 Ensaio de viabilidade celular – MTT.....	48
3.25 Ensaio de viabilidade celular – Citometria de fluxo.....	49
3.26 Ensaio de captação de LDL (-) por macrófagos RAW 264.7.....	51
3.27 Ensaio de captação de LDL (-) utilizando um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-).....	52
3.28 Ensaio de captação de LDL (-) marcada com DIL utilizando um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-). Microscopia confocal.....	53
4. RESULTADOS.....	55
4.1 Corpos de inclusão da GFP5-scFv anti-LDL (-) no interior das bactérias <i>Escherichia coli</i> BL21DE3.....	55
4.2 SDS-PAGE da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-).....	56
4.3 Análise da ligação da GFP5-scFv anti-LDL (-). Dot blot.....	57
4.4 Análise da emissão de fluorescência da GFP5-scFv anti-LDL (-).....	58
4.5 Propriedade anômala da GFP5-scFv anti-LDL (-).....	59
4.6 Ensaio de interação entre a GFP5-scFv anti-LDL (-) e a LDL (-).....	60
4.7 Ensaio de fluorescência para determinação da LDL (-).....	61
4.8 Análise da adsorção da LDL (-) na placa de alta ligação.....	62
4.9 Análise da ligação da GFP5-scFv anti-LDL (-) ao antígeno LDL (-) adsorvido na placa de alta ligação.....	63
4.10 Sítio da GFP5-scFv anti-LDL (-) no vetor pET-GFP5-scFv.....	64
4.11 Sítio PstI no vetor pET-GFP5-scFv.....	64
4.12 Digestão do vetor pET-GFP5-scFv.....	65
4.13 Ensaio de viabilidade celular – MTT.....	67

4.14 Ensaio de viabilidade celular – Citometria de fluxo.....	70
4.15 Ensaio de captação de LDL (-) por macrófagos RAW 264.7.....	71
4.16 Ensaio de captação de LDL (-) utilizando um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-).....	72
4.17 Ensaio de captação de LDL (-) marcada com DIL utilizando um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-). Microscopia confocal.....	74
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo. Estima-se que aproximadamente 17,3 milhões de pessoas morreram devido às doenças cardiovasculares em 2008. Mais de 80% destas mortes ocorreram em países de média e baixa renda, sendo os homens e as mulheres igualmente afetados. Embora uma grande proporção das doenças cardiovasculares possa ser prevenida, elas continuam a aumentar, principalmente porque as medidas preventivas são insuficientes. A dieta saudável, atividade física regular e o não uso do tabaco são as chaves para a prevenção deste grupo de doenças (World Health Organization, 2011). Os mapas das figuras 1 e 2 demonstram a distribuição global das taxas de mortalidade por Doenças cardiovasculares em homens e mulheres.

Figura 1: Mapa demonstrando a distribuição global das taxas de mortalidade por DCV em homens. Extraído de www.who.int/cardiovascular_diseases

Figura 2: Mapa demonstrando a distribuição global das taxas de mortalidade por DCV em mulheres. Extraído de www.who.int/cardiovascular_diseases

A aterosclerose é a doença de base das principais complicações cardiovasculares que afetam o homem. Entre as principais complicações podemos destacar: o infarto agudo do miocárdio, a angina instável, os acidentes vasculares cerebrais, as vasculopatias periféricas e o aneurisma (Witztum e Steinberg, 1991).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos na parede das artérias que resulta no espessamento da região subendotelial que se projeta para a luz da artéria (Lusis et al., 2004). O processo de formação da placa aterosclerótica tem início precoce. As lesões iniciais podem ser encontradas nos primeiros anos de vida. Embora as lesões possam ser encontradas na primeira década de vida, o desenvolvimento da aterosclerose é um processo não perceptível e geralmente as complicações aparecem acentuadamente após a terceira década de vida. As manifestações clínicas observadas ocorrem, na maioria dos casos, após a ruptura da placa aterosclerótica (Witztum e Steinberg, 1991). Na figura 3, se observa o desenvolvimento da placa aterosclerótica que se projeta para a luz da artéria.

Figura 3: Estágios da Aterosclerose. A placa aterosclerótica formada leva progressivamente à diminuição do diâmetro do vaso, podendo chegar a obstrução total do mesmo. Imagem extraída e adaptada de Lusis et al., 1999.

Como sugerido por vários investigadores, podemos caracterizar a formação da placa aterosclerótica como um continuum de seis fases (Lusis, 2000; Ross, 1993; Libby, 2002): disfunção endotelial; penetração de LDL, leucócitos T e monócitos para a região subendotelial; oxidação de LDL; formação de células espumosas; migração e proliferação de células musculares lisas vasculares para a camada íntima da artéria; e lesão estrutural do endotélio, com deposição de plaquetas e formação de trombos.

No estágio inicial da aterosclerose ocorre alteração estrutural e funcional do endotélio. O endotélio, por meio de suas funções fisiológicas, constitui uma barreira permeável através da qual ocorrem difusões entre o sangue e tecidos. As alterações morfológicas das células endoteliais geram manifestações iniciais de disfunção endotelial, podendo desencadear interações celulares com monócitos e linfócitos, iniciando-se a formação da placa de ateroma (Lusis et al., 2004). As lesões iniciais têm predominância nas bifurcações arteriais, onde o fluxo laminar sanguíneo está alterado, o que interfere na tensão de cisalhamento e nas características normais do endotélio, com diminuição da

produção de óxido nítrico (NO), que é o principal produto vasodilatador e protetor contra lesão vascular e inflamação (Gimbrone, 1999).

A deposição de monócitos e linfócitos T sobre o endotélio, e sua penetração no espaço subendotelial, é mediada por moléculas de adesão expressas no endotélio e nas células circulantes (Andersson et al., 2010). Entre as moléculas de adesão destacam-se a VCAM-1, a ICAM e a P-selectina (Saha et al., 2009). A expressão dessas moléculas no endotélio pode ocorrer nas regiões de baixa tensão de cisalhamento ou ser induzida por lipídios bioativos como a LDL oxidada que estimula a produção de citocinas, favorecendo assim o recrutamento e a adesão de monócitos e linfócitos T à superfície endotelial. Após a deposição dos monócitos e linfócitos T sobre o endotélio, as células migram para a região íntima do tecido arterial. Os monócitos infiltrados no tecido se diferenciam em macrófagos, que em seguida, têm a expressão de inúmeros receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors*), incluindo os receptores *scavenger* aumentada (Andersson et al., 2010).

Um fator relevante na gênese da aterosclerose é a oxidação da LDL que é transportada para dentro da parede arterial. Uma dos mecanismos envolvidos nesse transporte é a passagem da LDL através das junções das células endoteliais por difusão passiva. A retenção das partículas de LDL na camada íntima arterial envolve a interação da sua apolipoproteína B com a matriz de proteoglicanos do tecido arterial (Lusis, 2000). Na íntima arterial, a LDL pode sofrer modificações por enzimas ou espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, transformando-se inicialmente em LDL minimamente oxidada até a forma extensivamente oxidada, que é considerada uma partícula pró-inflamatória. Vários mecanismos pró-inflamatórios foram atribuídos à presença de LDL modificada na parede arterial. Entre os mecanismos pró-inflamatórios da LDL modificada destacam-se o aumento da adesão de monócitos ao endotélio por indução da expressão de moléculas de adesão, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento (Gleissner et al., 2007) .

Outro fator importante é a formação das células espumosas na íntima arterial. Os macrófagos podem interagir com padrões moleculares presentes na

lipoproteína de baixa densidade modificada, por meio de receptores *scavenger* expressos na superfície das células (Moore e Freeman, 2006). Os receptores *scavenger* estão divididos em oito classes diferentes (classe A à classe H) (Jang et al., 2009). As duas classes mais estudadas são: SRs A, incluindo SR-A I, SR-A II, SR-A III; e SRs B, que consistem de CD 36, SR-B I e SR-B II (Yan et al., 2007). Existem evidências, de que os receptores *scavenger* SR-A I e SR-A II e dois membros da classe B (CD 36 e SR-B I), têm uma relação no desenvolvimento da lesão aterosclerótica (Moore e Freeman, 2006). Quando a LDL modificada é captada via receptor *scavenger*, não ocorre regulação negativa do controle de colesterol intracelular, o que resulta na captação de quantidades excessivas de LDL modificada (Lusis, 2000), diferentemente da que ocorre pelos receptores B/E da LDL nativa (Cobbe e Shepherd, 1993). Desta maneira se formam as células espumosas, características das estrias gordurosas, constituindo assim a lesão inicial da aterosclerose (Lusis, 2000). Na figura 4 é possível visualizar o desenvolvimento das estrias gordurosas.

Figura 4: Desenvolvimento de estria gordurosa. Uma série de eventos favorece o desenvolvimento da estria gordurosa. A oxidação da LDL na íntima, a expressão de moléculas de adesão nas áreas de baixa *tensão de cisalhamento* e por ação de citocinas inflamatórias, associadas ao recrutamento de monócitos que, na íntima diferenciam-se em macrófagos capazes de captar a LDL oxidada via receptor *scavenger*, levando à formação das células espumosas que, constituem a estria gordurosa. Fonte: Saha et al., 2009.

A transição de estrias gordurosas relativamente simples até lesões ateroscleróticas mais complexas, se caracteriza pela apoptose das células espumosas, que têm o seu conteúdo rico em lipídeos, principalmente colesterol e seus ésteres, expostos. Este “centro necrótico” é delimitado por uma capa fibrosa formada por matriz extracelular derivada das células musculares lisas (CMLs), as quais na presença de citocinas e fatores de crescimento secretados a partir da interação entre macrófagos e linfócitos T, migram a partir da camada média, proliferam e produzem matriz extracelular. As lesões fibrosas podem tornar-se altamente avançadas e complexas, com a presença de calcificação, erosão ou ulceração e hemorragia (Lusis, 2000).

Embora as lesões ateroscleróticas avançadas possam se tornar suficientemente grandes até o ponto de bloquear o fluxo sanguíneo, a complicação clínica mais relevante é o rompimento da capa fibrosa que recobre a lesão, com consequente formação de trombos ou coágulos, que poderão obstruir vasos de menor calibre resultando, por exemplo, em infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou acometimento dos membros inferiores. A ruptura da placa é uma complicação importante da aterosclerose e ocorre, principalmente, em lesões que apresentam a capa fibrosa fina, permitindo a exposição do seu conteúdo lipídico e do fator tecidual aos componentes do fluxo sanguíneo. Essa série de eventos promove então a cascata de coagulação, agregação plaquetária e trombose (Lusis, 2000). Na figura 5 é possível visualizar a lesão aterosclerótica mais avançada, bem como a ruptura da placa e formação do trombo.

Figura 5: Progressão da lesão aterosclerótica e ruptura da placa. A interação entre macrófagos e linfócitos T é responsável pela secreção de citocinas que exercem efeitos pró-aterogênicos. As CMLs migram da camada média, proliferam e produzem matriz extracelular que formam a capa fibrosa. A projeção da lesão aterosclerótica causa a ruptura da placa que leva a formação dos trombos. Fonte: Andersson et al., 2009.

1.2 Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa

A LDL é uma partícula esférica constituída por lipídeos e proteína. Os lipídeos correspondem a aproximadamente 75% do peso da lipoproteína enquanto a fração proteica constitui os 25% restantes. De acordo com sua composição, a LDL é isolada do plasma humano entre as densidades de 1,019 e 1,063 g/mL. Em eletroforese, a LDL exibe β -mobilidade e por isso é comumente chamada de β -lipoproteína. A fração proteica da LDL é representada pela apoB 100, que se localiza na superfície da lipoproteína (Goldstein e Brown, 1977). A figura 6 apresenta esquematicamente a partícula de LDL.

Figura 6: Esquema geral da partícula de LDL nativa. No corte da lipoproteína são identificadas as moléculas de colesterol não esterificados, fosfolípidos, ésteres de colesterol e a apoB-100. Fonte: Berg et al., 2002.

O colesterol é necessário para as diferentes funções celulares, como a síntese de hormônios esteroides, esteroides biliares, membrana celular e vitamina D. As LDLs são as principais fornecedoras de colesterol para todos os tecidos (à exceção do cérebro), graças ao seu reconhecimento pelos receptores B-E. As partículas de LDL interagem com os receptores pela interação do sítio do receptor B-E com a sua ApoB100. Quando a célula se enriquece em colesterol, seja a partir da sua síntese ou da captação de LDL pelo receptor B-E, são desencadeados processos de regulação que diminuem a atividade da HMG-CoA redutase e a expressão dos receptores B-E. A redução da síntese de colesterol, e, portanto de seu conteúdo intracelular, leva ao aumento da expressão dos receptores B-E, causando redução da concentração sérica de LDL (Quintão et al., 2011).

Numerosos estudos têm demonstrado que as LDLs do plasma são um grupo heterogêneo de partículas, que podem variar em tamanho, densidade, composição e carga elétrica (Avogaro et al., 1988) . Os estudos que relatam as modificações da LDL nativa propõem diferentes classificações para essa partícula modificada, com base nas suas alterações físico-químicas (Faulin et

al., 2010). Evidências acumuladas ao longo de 20 anos, indicam que as modificações qualitativas da LDL desempenham um papel chave no desenvolvimento da aterosclerose (Sanches-Quesada et al., 2004).

As modificações da LDL as tornam suscetíveis à captação pelos receptores *scavenger*, resultando no acúmulo de lipídios intracelulares, e favorecendo a formação das células espumosas (Kzhyshkowska et al., 2012). O acúmulo de células espumosas na íntima arterial, acompanhado de morte celular produz um núcleo necrótico rico em lipídios. As citocinas continuam o ciclo, estimulando a migração e a proliferação de células musculares lisas que formam a capa fibrosa que envolve a lesão necrótica. Outras modificações levam à calcificação, ruptura e aterotrombose (Quintão et al., 2011).

Avogaro e colaboradores, em 1988, isolaram do plasma humano, pela técnica de cromatografia de troca iônica, uma subfração eletronegativa da LDL. Essa subfração denominada de LDL eletronegativa – LDL (-), pode ser diferenciada na eletroforese em gel de agarose, em função da sua característica de migração, situando-se entre a LDL nativa e a LDL oxidada (De Castellarnau et al., 2000).

As partículas de LDL (-) podem ser formadas *in vivo* por diversos processos, como oxidação, acetilação, glicação não enzimática, enriquecimento com ácidos graxos não esterificados, modificações enzimáticas por fosfolipases, reações cruzadas com a hemoglobina e outros mecanismos ainda não identificados (Faulin et al., 2010). A concentração de LDL oxidada em indivíduos saudáveis é de 0,1 a 0,5% da LDL total, valores consideravelmente mais baixos se comparados à concentração de LDL (-), que varia de 1 a 10% em indivíduos normolipêmicos (Sanches-Quesada et al., 2004). Sabe-se que diabetes, hipercolesterolemia familiar e insuficiência renal estão associadas a maior concentração de LDL (-) no plasma humano (Sánchez-Quesada et al., 1996; Sánchez-Quesada et al., 1999; Lobo et al., 2008).

Acumulam-se na literatura evidências de que as partículas de LDL (-) exercem papéis importantes no desenvolvimento da aterosclerose. Isso ocorre devido à produção de moléculas que são estimuladas pela LDL (-). Entre as

moléculas pró-inflamatórias produzidas destacam-se a IL-8, a MCP-1, e o TNF- α , que atuam como indutoras da expressão de VCAM (Benitez et al., 2006). A produção de IL-8 e MCP-1 pelas células endoteliais funciona como quimiotático para o desenvolvimento da placa. Essa condição pró-inflamatória promove o recrutamento de leucócitos (monócitos, linfócitos T e neutrófilos) para a camada íntima (De castellarnau et al., 2000).

Esse evento que ocorre com as células inflamatórias é dependente de moléculas de adesão, como selectinas, VCAM e ICAM-1 (Saha et al., 2009). Em 2003, Ziouzenkova e colaboradores demonstraram que as partículas de LDL (-) aumentam a expressão de VCAM-1 em células endoteliais induzida pelo TNF- α , através da ativação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1. Outro resultado experimental apoia fortemente a teoria pró-inflamatória da aterosclerose mediada pela LDL eletronegativa. Neste estudo, foi demonstrado que a atividade do fator de ativação das plaquetas acetil hidrolases (PAF-AH) em cultura de células endoteliais, é cinco vezes maior com LDL (-), quando comparado com a da LDL nativa (Benitez et al., 2003).

Sabe-se que a internalização das lipoproteínas modificadas ocorre por ação de uma grande família de receptores *scavenger*, presentes em macrófagos (Quintão et al., 2011). Estudos que reportam a interação da LDL (-) com os receptores macrofágicos são escassos e contraditórios. Entretanto, aqueles em que foi avaliada a afinidade da LDL (-) pelo receptor de LDL, revelaram uma baixa afinidade entre o LDLR e as partículas de LDL (-) (Benítez et al., 2004).

A estrutura da apoB-100 determina a afinidade de ligação das partículas de LDL com os receptores que medeiam a captação da lipoproteína (Ursini et al., 2002). A mudança conformacional na molécula de apoB-100 da LDL (-) diminui a afinidade de ligação da partícula com o receptor de LDL (Bancells et al., 2010). Na figura 7 é possível visualizar os mecanismos da resposta imunológica na aterosclerose em que há o envolvimento da LDL eletronegativa (Benítez et al., 2003).

Figura 7: As partículas de LDL (-) podem ser formadas na corrente sanguínea por diversos processos como: oxidação, glicação, reações cruzadas com a hemoglobina e enriquecimento com ácidos graxos não esterificados. Podem também ser formadas na camada íntima arterial por espécies reativas de oxigênio que atacam a LDL nativa, gerando a LDL (-). Na íntima, as partículas de LDL (-) estimulam a produção de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão que atraem os leucócitos intensificando o processo de oxidação e captação da LDL (-). Esse processo culmina na formação de células espumosas. Nesse contexto, a presença de LDL (-) estimula a produção de anticorpos contra a LDL (-). Imagem extraída de Mello et al., 2011.

Há uma grande quantidade de dados associando a LDL (-) à patogenia da aterosclerose. No entanto, o papel dos anticorpos contra a LDL (-) no desenvolvimento da aterosclerose ainda não foi totalmente elucidado. Um estudo recente demonstrou, que o scFv anti-LDL (-) incubado em cultura de células tratadas com LDL (-), foi capaz de diminuir a formação de células espumosas, além de diminuir a expressão de moléculas (CD36, COX-2 e TLR-4) que estão envolvidas no desenvolvimento da placa aterosclerótica (Kazuma, 2010).

1.3 Proteína Verde Fluorescente 5

Em 2008, os pesquisadores Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien foram agraciados com o Prêmio Nobel de Química, pela descoberta e desenvolvimento de estudos e aplicações da proteína verde fluorescente (GFP). Shimomura, em 1962, isolou a GFP da água-viva *Aequorea Victoria* e identificou na estrutura proteica o cromóforo responsável pelo fenômeno da bioluminescência. A partir do trabalho de Shimomura, M. Chalfie foi pioneiro na aplicação da GFP como marcador biológico em organismos vivos. Em seus primeiros trabalhos nesta área, Chalfie incorporou, por manipulação genética, a GFP no DNA da bactéria *E. coli* tornando-a fluorescente. Com o uso da GFP como marcador biológico, R. Tsien ampliou o campo de utilização desta proteína por substituição de vários aminoácidos da cadeia da GFP. Com isto, obteve diversas proteínas que absorvem e emitem luz em várias outras regiões do espectro (Zimmer, 2009).

A proteína verde fluorescente consiste de uma cadeia monomérica de 238 aminoácidos. O enovelamento desta cadeia leva a uma conformação denominada β -barril (Tsien, 1998). Na figura 8 é possível visualizar a estrutura tridimensional da GFP.

Figura 8: Estrutura cristalina da GFP. O enovelamento da cadeia monomérica leva a uma conformação semelhante a uma lata de cerveja denominada β -barril. Imagem gerada a partir da resolução da estrutura da GFP por cristalografia de raio-X. Extraída de Zimmer, 2009.

Os aminoácidos nas posições 65 (Ser), 66 (Tyr) e 67 (Gly) localizam-se no centro da cadeia e constituem o cromóforo responsável pela emissão da cor verde (Tsien, 1998). Na figura 9 o cromóforo da GFP é ilustrado.

Figura 9: Estrutura do cromóforo da GFP, que se encontra localizado no centro da cadeia proteica. Imagem extraída e adaptada de: Shimomura, 2009.

A formação do cromóforo na proteína GFP provém de uma modificação pós traducional altamente incomum, que se dá espontaneamente, seguindo o enovelamento da proteína e que necessita de oxigênio. Foi demonstrado que o precursor polipeptídeo, sintetizado por meios químicos, é capaz de desenvolver fluorescência após o enovelamento em condições aeróbias. O mecanismo autocatalítico é iniciado pelo fechamento do anel que leva à formação de um grupo cilopentil, a partir dos átomos da cadeia principal do peptídeo precursor (Ser65, Tyr66 e Gly67). A maturação completa do cromóforo e, portanto, o desenvolvimento de fluorescência visível, requer passos adicionais que seguem espontaneamente. Em todas as GFPs caracterizadas até hoje, essas etapas requerem pelo menos um evento oxidativo. Para gerar o cromóforo verde presente na GFP madura, o mecanismo contém uma ciclização, uma desidratação e uma oxidação. O cromóforo completamente conjugado se forma somente na presença de oxigênio (Wachter, 2006). Na figura 10 é possível visualizar a formação do cromóforo na GFP.

Figura 10: Proposta biossintética para a formação do cromóforo da GFP. A ciclização do peptídeo é seguida pela eliminação de uma molécula de água e pela oxidação molecular, que pode ocorrer antes ou depois. O cromóforo maduro da GFP coexiste em dois estados de carga. Esquema extraído de: Wachter, 2006.

Tsien, através de modificações na cadeia peptídica e na estrutura do próprio cromóforo, obteve vários mutantes da GFP causando efeitos pronunciados nas propriedades espectrais (Tsien, 1998).

Melhoramentos na molécula de GFP tem aumentado seu uso em biotecnologia. Dentre as moléculas melhoradas, destaca-se a GFP5 – proteína verde fluorescente 5, que pode ser expressa a 37° C com um enovelamento eficiente e com alto rendimento. A GFP5 contém três mutações: V163A e S175G que beneficiam o enovelamento da proteína a 37 °C e I167T que equaliza a intensidade dos picos de excitação da proteína. A proteína verde fluorescente, GFP5, emite máxima fluorescência (509 nm) quando excitada por luz ultravioleta (395–473 nm) (Siemering et al., 1996).

1.4 Fragmento Variável de Cadeia Única – scFv

As moléculas de anticorpos são formadas por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) idênticas e duas cadeias leves (L) também idênticas. Cada cadeia leve está ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfídica e as duas cadeias pesadas estão ligadas entre si por outras pontes dissulfídicas. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas contêm uma série de unidades homólogas, repetitivas, com cerca de 110 aminoácidos, os chamados domínios, que se apresentam sob a forma de estruturas globulares devido a um dobramento na molécula, produzido por pontes dissulfídicas intracadeias (Porter, 1973).

Tanto as cadeias pesadas quanto as leves possuem uma região aminoterminal variável (V) que participa no reconhecimento dos antígenos, e de regiões constantes (C) carboxiterminais; as regiões C das cadeias pesadas possuem as funções efectoras. As regiões variáveis são assim denominadas porque contêm regiões em que a sequência de aminoácidos é variável. A região variável de uma cadeia pesada (V_H) é justaposta com a região variável de uma cadeia leve (V_L) para formar o local de ligação de antígenos. Como a unidade estrutural central de cada molécula de anticorpo contém duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, ela tem dois locais de ligação de antígenos (Abbas e Lichtman, 2005).

A maior parte das diferenças nas sequências entre os diversos anticorpos está confinada a três pequenas extensões nas regiões V das cadeias pesadas e leves, chamados de segmentos hipervariáveis. Essas regiões hipervariáveis contêm aproximadamente 10 aminoácidos. Na molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis do domínio V_L e do domínio V_H se aproximam, na sua estrutura tridimensional para formar uma superfície de ligação de antígenos. Como essas sequências formam uma superfície que é complementar à estrutura tridimensional do antígeno, podem ser chamadas de região de complementaridade (CDRs) (Abbas e Lichtman, 2005).

Porter, em 1959, observou que a molécula de anticorpo pode ser fragmentada gerando porções denominadas de Fab e Fc. Além da digestão enzimática, fragmentos de anticorpos podem ser obtidos através da clonagem

e da expressão de cDNAs, que codificam para as regiões V_H e V_L (Hoogenboom e Winter, 1992).

Com o advento da tecnologia de hibridoma, que possibilitou a produção de anticorpos humanos com uma elevada afinidade para alvos biologicamente relevantes, fragmentos de anticorpos recombinantes estão sendo preparados, e utilizados no diagnóstico e na terapêutica (Hagemeyer et al., 2009).

Em 1988, os pesquisadores Huston e Bird, desenvolveram independentemente as primeiras moléculas de scFv. Esses fragmentos são constituídos pelos domínios variáveis V_H e V_L do anticorpo, e ainda retém a capacidade de se combinar com o antígeno com alta afinidade de ligação (Weisser e Christopher Hall, 2009). Os genes que codificam para as regiões variáveis podem ser clonados em vetores de expressão de *E. coli*, a fim de produzir fragmentos de anticorpos (Hagemeyer et al., 2009).

Quando expressados em bactérias transformadas com cDNA V_H e V_L , os domínios se associam na mesma conformação que manteriam na molécula íntegra, resultando numa proteína de cadeia única, com cerca de 25 a 28 kDa (Huston et al., 1998). Entretanto, a relativa afinidade que cada domínio apresenta com relação ao outro, depende da sequência particular de seus aminoácidos o que pode resultar na dissociação dos fragmentos (Plunckthun, 1991).

Para evitar a dissociação do scFv, foi criada uma sequência de ligação, de cerca de 10 a 25 resíduos de aminoácidos, tipicamente hidrofílicos, em geral $(Gly_4Ser)_3$, que faz conexão entre os segmentos V_H e V_L . Além de evitar a dissociação dos fragmentos, o polipeptídeo ligante, impede a dimerização da molécula (Weisser e Christopher Hall, 2009). Uma representação esquemática

da molécula de anticorpo e do scFv é encontrada na figura 11.

Figura 11: Estrutura do anticorpo e do scFv. O fragmento variável de cadeia única é o menor fragmento que ainda retém a capacidade de se ligar com o antígeno. Um *linker* de aminoácidos faz a conexão entre os domínios V_H e V_L , evitando a dissociação e a dimerização dos domínios. Imagem extraída de: Hagemeyer et al., 2009.

Os fragmentos variáveis de cadeia única demonstram várias vantagens para aplicações clínicas. Esses fragmentos são minimamente imunogênicos, penetram facilmente nos tecidos e são removidos com rapidez da circulação (Hagemeyer et al., 2009). Vale ressaltar, que os scFvs são moléculas que podem também ser utilizadas no desenvolvimento de métodos diagnósticos. Em 2007, Shen e colaboradores, desenvolveram um piezoimunossensor para detecção da enzima CYP1B1, utilizando o scFv como molécula de reconhecimento. Neste trabalho o scFv foi adsorvido em um transdutor de sinal (microbalança de cristal de quartzo). Os resultados deste biossensor demonstraram excelente sensibilidade e especificidade. Na figura 12 é possível visualizar o piezoimunossensor para detecção da CYP1B1.

Figura 12: Piezoimunosensor scFv-QCM para detecção de CYP1B1. O scFv anti-CYP1B1 foi adsorvido na superfície da microbalança de cristal de quartzo, pela sua cauda de histidina. A enzima CYP1B1, ao interagir com o scFv anti-CYP1B1 adsorvido na microbalança, mudava a frequência de ressonância da microbalança. Esse biossensor exibiu uma resposta altamente sensível e específica a CYP1B1. Imagem extraída de: Shen et al., 2007.

1.5 Impacto Biotecnológico da GFP-scFv

A GFP-scFv tem sido utilizada como uma ferramenta no desenvolvimento de métodos diagnósticos. Em 2010, Sakamoto e colaboradores, desenvolveram um método para determinação de plumbagina, esse método imunodiagnóstico foi desenvolvido utilizando a proteína GFP-scFv anti-plumbagina. Neste estudo, o antígeno plumbagina foi imobilizado em fase sólida (Placa). A adição da proteína quimérica na placa levou a formação do complexo antígeno-anticorpo, essa interação foi avaliada pelo fluorímetro, que determinou a relação entre a emissão de fluorescência e a quantidade do que estava adsorvido na placa. A proteína GFP-scFv, também pode ser utilizada para outras finalidades, dentre elas: localizar outras estruturas, analisar em tempo real a interação com outras proteínas e visualizar o transporte e a função de antígenos intracelulares (Cardinale et al., 2001).

Em 2008, Urukami e colaboradores, obtiveram a proteína de fusão GFP-scFv anti-Giberelina 24. Neste estudo, a GFP fusionada ao scFv contra giberelina 24, um precursor de giberelina, reprimiu no retículo endoplasmático a biossíntese de giberelinas bioativas.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Expressar a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-) em *Escherichia coli* BL21DE3 e avaliar suas possíveis aplicações na investigação da aterosclerose

Objetivos Específicos

- Obter a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-)
- Desenvolver um ensaio de fluorescência para determinação de LDL (-), utilizando a GFP5-scFv anti-LDL (-)
- Investigar a toxicidade da GFP5-scFv anti-LDL (-) sobre os macrófagos RAW 264.7
- Avaliar os efeitos da GFP5-scFv anti-LDL (-) sobre a formação de células espumosas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células

Linhagem bacteriana

As bactéria *Escherichia coli* linhagem *BL21DE3* (Novagen®) foram utilizadas para expressar as proteínas GFP5-scFv anti LDL (-) e a GFP5 livre.

Macrófagos

Nos ensaios de captação de LDL e nos ensaios de viabilidade celular foi utilizada a linhagem de macrófago RAW 264.7.

Plasma humano

O sangue foi obtido de voluntários do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, sendo coletado em tubos contendo EDTA (1mg/mL). Após a coleta, o material foi imediatamente centrifugado a 2500 RPM por 10 minutos, a 4°C para a obtenção do plasma. Ao plasma obtido adicionou-se uma solução contendo o antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT 20 mM) e os inibidores de proteases aprotinina (2µg/mL), benzamidina (2 mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF 1 mM). Após a obtenção e o tratamento do plasma humano formou-se um *pool* para posterior purificação da LDL nativa e eletronegativa.

3.2 Obtenção das frações nativa e eletronegativa da LDL

Isolamento de LDL

O *pool* de plasma humano obtido conforme descrito anteriormente, foi submetido a um processo de ultracentrifugação seqüencial utilizando uma Ultracentrífuga Sorvall® modelo Ultra Pro 80 com rotor Sorvall® de ângulo fixo T-1270. Foram centrifugados 120 mL de plasma a 55.000 RPM por 7 horas, a

4° C, com solução salina de densidade 1,019 g/mL. Depois disto, promoveu-se a remoção da fração do sobrenadante, correspondente a fração da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), em seguida, a densidade do plasma remanescente foi ajustada para 1,063 g/mL com KBr, sendo centrifugado com salina de densidade de 1,063 g/mL, durante 8 horas, 55.000 RPM, a 4° C. A partir daí, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) encontrada no sobrenadante foi isolada e dialisada contra tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4, por 4 horas com trocas a cada 1 hora, a 4° C.

3.3 Purificação das frações nativa e eletronegativa da LDL

A LDL obtida foi filtrada em filtro de 0,22 µm e injetada em uma coluna de troca iônica (Sephacrose UNO Q12, Bio-Rad®); coluna conectada a um sistema FPLC (fast protein liquid chromatography, Bio-Rad®). A fase móvel constituiu um gradiente formado por tampão Tris 20 mM, pH 7,4 na bomba A e tampão Tris 20 mM + NaCl 1 M, pH 7,4 na bomba B. As soluções da bomba A e B foram filtradas com um filtro de 0,22 µm. O tempo de corrida foi de 60 minutos e a taxa de fluxo 4 mL/min como segue-se: 0 a 44 mL: 0% tampão B; 44 a 74 mL: 10% tampão B; 74 a 110 mL: 20% tampão B; 110 a 140 mL: 50% tampão B, 140 a 164 mL: 100% tampão B; 164 a 212 mL: 0% tampão B (Vedie *et al.*, 1991; De Castellarnau *et al.*, 2000). Devido a carga eletronegativa, a LDL (-) foi eluída da coluna após o aumento da concentração de NaCl da fase móvel. Os tempos de eluição para as frações nativa e eletronegativa foram de 28,8 e 37,6 minutos, respectivamente. Os eluentes foram monitorados a 280 nm UV e os picos correspondentes das frações nativa e eletronegativa da LDL foram coletados utilizando um coletor de frações (BioLogic BioFrac Fraction Collector, Bio-Rad®). Os tubos correspondentes a cada uma das frações foram somados e dialisados contra tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e aplicados em uma coluna de cromatografia por afinidade *Hitrap Blue* (Amersham/GE®) para a remoção dos resíduos de albumina. Os elutos de LDL (-) e LDL nativa foram concentrados a vácuo sob refrigeração em um *Speed Vac SC 100 Savant*®. Ambas as frações de LDL foram dialisadas contra PBS pH 7,4 e tiveram suas concentrações protéicas determinadas pelo método

de Lowry. Nas alíquotas de LDL (-) e LDL nativa foi acrescentada a mesma solução utilizada durante a coleta das amostras, solução constituída de antioxidante e inibidores de proteases. Foi realizada eletroforese em gel de agarose (Celmigel, CELM[®]) para a confirmação da efetiva separação entre a LDL (-) e a LDL nativa (Sanches-Quesada *et al.*, 2003). A porcentagem de agarose não é revelada pelo fabricante. Utilizou-se uma fonte de eletroforese (Pharmacia Biotech, modelo EPS 600) programada para 100 volts, durante 30 minutos de corrida com tampão Tris 58 mM pH 9,5. Foram aplicadas 3 µg por poço de LDL nativa e LDL (-) no gel e plasma total diluído 1:5 em Tris 58 mM pH 9,5. Após a corrida, o Gel foi submerso em corante negro de amido por 10 minutos e descorado com ácido acético 5% até visualização das bandas.

3.4 Vetores

O vetor bacteriano que codifica a proteína GFP5-scFv anti LDL (-), foi obtido por Faulin em 2010 e denominado pET-GFP5-scFv. A sequência de DNA que codifica a quimera encontra-se localizada nos sítios de restrição *EcoRI* e *SacI* do vetor bacteriano pET-GFP5-scFv. O sítio de restrição *EcoRI* codifica a GFP5 enquanto o sítio *SacI* codifica o scFv anti-LDL (-). Esse vetor possui um gene de seleção que confere resistência ao antibiótico Kanamicina. O vetor pET-GFP5, assim denominado por Hering em 2007, codifica a proteína GFP5 livre. A sequência de DNA referente à GFP5 encontra-se localizada no sítio de restrição *EcoRI* do vetor bacteriano pET-GFP5. Assim como no vetor pET-GFP5-scFv, o vetor pET-GFP5 também possui um gene de seleção que confere resistência ao antibiótico Kanamicina.

3.5 Preparo das células bacterianas competentes

Uma colônia da bactéria *E. coli* BL21(DE3) (Novagen[®]) foi inoculada em 3 mL de meio LB (Luria-Bertani) sem antibiótico (Pré-inóculo) e posteriormente colocada em um agitador a 37°C por 12 horas. Depois deste período de incubação, foi utilizado 1 mL desse pré-inóculo para inocular 35 mL de meio LB (Luria-Bertani) sem antibiótico. Esta cultura, foi então colocada sob agitação à

37°C e acompanhada até a densidade óptica em 550nm de 0,40 – 0,60. Quando alcançado este ponto o frasco contendo a cultura foi resfriado em gelo por 30 minutos. Quando fria, a cultura foi centrifugada (2000 RPM - 15 minutos 4°C) para sedimentar as células, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 10 mL de meio TFB (*Transformation buffer*) e incubado a 4°C por 30 minutos. Depois disto, a suspensão bacteriana foi centrifugada como na condição anterior, sendo o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensionadas em meio TFB (*Transformation buffer*) a 4°C, sendo a partir daí consideradas competentes. A suspensão foi dividida em alíquotas de 100 µL que foram estocadas a - 80°C.

3.6 Transformação bacteriana por choque térmico

Uma alíquota de 100 µL de células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) armazenadas a - 80°C foi descongelada em gelo por 10 minutos. Logo depois, adicionou-se 0,5 µg do DNA plasmidial pET-GFP5-scFv no microtubo contendo as células competentes. Logo após a adição do cDNA, a transformação foi realizada por choque térmico, incubando o microtubo com as células bacterianas e o cDNA (pET-GFP5-scFv) em gelo por 30 minutos. Em seguida incubou-se a 42°C por 2 minutos, e posteriormente, por 5 minutos no gelo. Após a transformação, adicionou-se 1000 µL de meio LB no eppendorf contendo as células transformadas. Depois disto, as células foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL sendo incubadas à 37°C por 1 hora e 15 minutos a 200 RPM. Depois deste período, semeou-se 100 µL das células transformadas com o vetor pET-GFP5-scFv em placas de Agar LB contendo o antibiótico Kanamicina na concentração de 100 µg/mL. Essas placas foram incubadas à 37°C por 16 horas e ao final desse período foi possível observar o crescimento das colônias (Faulin, 2010).

3.7 Pré-inóculo das células *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas

Das colônias de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pET-GFP5-scFv e crescidas na placa de Agar LB, retirou-se diretamente da placa com a alça microbiológica estéril uma única colônia isolada. Esta colônia única retirada da placa, foi inoculada em um tubo cônico de 50 mL contendo 5 mL de meio LB (Luria-Bertani) acrescido de 100 µg/mL do antibiótico Kanamicina, depois disto, o pré-inóculo foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação (200 RPM) (Faulin, 2010).

3.8 Inóculo das células de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas e expressão da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-)

Transferiu-se 2 mL do pré-inóculo para um Erleymeyer contendo 200 mL de meio LB (Luria-Bertani) acrescido de kanamicina (100 µg/mL). O erleymeyer contendo as células transformadas com o vetor pET-GFP5-scFv foi submetido à agitação (200 RPM), a 37°C por aproximadamente 2 horas. Depois deste período de incubação, a densidade óptica em 600 nm foi acompanhada até atingir 0,4 – 0,6. Assim que foi alcançado este ponto adicionou-se 1 mM de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosideo, Fermentas®). Depois disto, incubou-se a cultura a 25°C por 18 horas sob baixa agitação (40 RPM) para a expressão da proteína. Após a expressão da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-), o meio de cultura foi centrifugado a 4500 RPM por 20 minutos, a 4°C. Logo após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, sendo o sedimento bacteriano armazenado em freezer a uma temperatura de - 20°C (Faulin, 2010).

3.9 Lise bacteriana

O sedimento bacteriano contendo as células com a proteína GFP5-scFv anti LDL (-) expressa armazenado a - 20°C foi descongelado em temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após, adicionou-se 5 mL de solução lise (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 200 mM, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, lisozima 150 µg/mL em pH 7,4), incubando-se em gelo. Esperou-se 30 minutos para a ação

da lisozima e depois deste período, as células foram submetidas a um processo de sonicação em um sonicador Branson Sonifier 250 (3 pulsos de 20 segundos em 30% de potência, com intervalo de 1 minuto a cada pulso). Após a sonicação, procedeu-se à centrifugação (4500 RPM) por 18 minutos a 4°C. O sedimento, contendo a quimera, foi aproveitado e o sobrenadante descartado (Faulin, 2010).

3.10 Solubilização dos corpos de inclusão

Após a lise bacteriana, o sedimento aproveitado, contendo a quimera, foi ressuspensionado em 10 mL de tampão (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 30 mM) e centrifugado a 4500 RPM por 15 minutos. Repetiu-se este procedimento por mais duas vezes para lavar o sedimento. Depois disto, o sedimento, foi então ressuspensionado em 20 mL de solução (NaH_2PO_4 , NaCl 200 mM, imidazol 30 mM, uréia 7 M, β -mercaptoetanol 20 mM). O sedimento, contendo a GFP5-scFv anti-LDL (-) em corpos de inclusão, ressuspensionado com a solução desnaturante de uréia e β -mercaptoetanol, ficou a temperatura ambiente, *por 12 horas*, protegido da luz, para desnaturação da proteína recombinante.

3.11 Purificação da GFP5-scFv anti-LDL (-)

Procedeu-se à purificação da GFP5-scFv anti-LDL (-) solubilizada a partir das caudas de histidina da proteína. Utilizou-se o método de cromatografia por afinidade utilizando uma resina carregada com níquel (nº cat. 17-5268-01, Amershan/GE®). A solução de uréia e β -mercaptoetanol contendo a quimera deixada *overnight*, foi centrifugada a 4500 RPM por 10 minutos para confirmação da solubilização da molécula GFP5-scFv anti-LDL (-). Após a confirmação da solubilização, a solução de uréia e β -mercaptoetanol, contendo a molécula solubilizada, foi incubada com a resina de níquel por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação (*batch*). Depois deste período de incubação, o eluato foi descartado e posteriormente aplicou-se 10 mL do tampão de eluição (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 500 mM, uréia 7

M) para retirar a GFP5-scFv anti LDL (-) grudada na resina. O eluato, contendo a proteína foi coletado.

3.12 Reenovelamento da GFP5-scFv anti-LDL (-)

O reenovelamento da molécula de GFP5-scFv anti LDL (-) foi realizado através do método de diálise. Transferiu-se 10 mL do eluato contendo a proteína previamente purificada, para uma membrana de diálise com cutoff de 50 kDa, e a ela adicionou-se 5 μ M de PSS (poliestireno sulfonado). A membrana foi então colocada em um béquer que continha 250 mL de solução (NaCl 200 mM, NaH_2PO_4 20 mM, uréia 7 M, água destilada q.s.p 250 mL) em pH 8,5. Depois disto, uma bomba peristáltica foi conectada ao béquer que continha a membrana emergida na solução com 7 M de uréia e ao béquer com 560 mL de solução (NaCl 200mM, NaH_2PO_4 20mM, água destilada q.s.p 560 mL) em pH 8,5. A partir daí, a solução isenta de uréia foi colocada gradativamente no béquer com a membrana até que a concentração de uréia atingisse 2,5 M (aproximadamente 24 horas). Em seguida, a diálise foi continuada com 600 mL da mesma solução (NaCl 200mM, NaH_2PO_4 20mM, água destilada q.s.p 600 mL), mas acrescida de arginina 400 mM e glutatona oxidada 500 μ M em pH 7,4 até que a solução contendo a membrana com a proteína atingisse a concentração de 0,5 M de uréia (aproximadamente 24 horas). Quando alcançada a concentração de 0,5 M de uréia na membrana com a GFP5-scFv anti-LDL (-), a solução do béquer foi trocada por tampão PBS em pH 7,4. O tampão PBS foi trocado por 3 vezes, num período de intervalo de aproximadamente 1 hora entre cada troca. Depois disto, a solução no interior da membrana isenta de uréia e com a GFP5-scFv anti-LDL (-) reenovelada foi aliquoteada e congelada a -20°C (Faulin, 2010).

3.13 Análise da GFP5-scFv anti-LDL (-) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para o preparo do gel de poliacrilamida a 12 %, foram utilizadas as seguintes soluções:

- Solução A: Acrilamida 30 %
 N,N- metileno-bisacrilamida 0,8 %
 Água destilada q.s.p 100 mL

- Solução B: Trizma base 18,17 %
 SDS 0,4 %
 Água destilada q.s.p 100 mL

- Solução C: Trizma base 6,06 %
 SDS 0,4 %
 Água destilada q.s.p 100 mL

O gel separador a 12 % foi preparado da seguinte maneira:

Solução A _____ 12 %

Solução B _____ 2,5 %

Água destilada _____ q.s.p

onde adicionou-se 0,01 % de persulfato de amônia e 0,003 % de TEMED, agitando-se suavemente. A solução de separação foi colocada na placa montada (80 % do volume da placa) e esperou-se por aproximadamente 20 minutos para precipitação do gel. Para completar os 20 % restante da placa montada preparou-se o gel de empilhamento:

Solução A _____ 13 %

Solução C _____ 25,2 %

Água destilada _____ q.s.p

onde foram adicionados persulfato de amônia a 0.01 % e TEMED a 0,003 %, agitando-se suavemente, derramou-se esta na placa com o gel de separação pela extremidade e o pente de formação de poços foi introduzido, esperou-se 30 minutos para polimerizar. Com o gel pronto aplicou-se o marcador de peso molecular pré-corado *PagerRuler Plus* (Fermentas[®], nº cat. SM1811) no

primeiro poço e as amostras de GFP5-scFv anti-LDL (-) nos demais poços. Após a aplicação do marcador e das amostras procedeu-se à corrida em cuba vertical (Bio-Rad®) com TBE 1x a 100V (*Pharmacia Biotech*®, modelo EPS 600) por cerca de duas horas. No fim da corrida, o gel foi retirado da placa e o mesmo foi colocado na solução de *coomassie blue* (coloração da GFP5-scFv anti-LDL (-)) por 30 minutos. Em seguida o gel foi lavado em água destilada, e descorado com a solução (Etanol 30 % e Ácido acético 10 %), para retirar o excesso de corante.

3.14 dot blot

Adicionou-se LDL nativa e LDL eletronegativa a uma membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL Nitrocelulose*, Amershan/GE®), ambas na concentração de 1 µg/mL. Bloqueou-se a membrana, para evitar sítios livres de reação, com uma solução de PBS com 5 % de leite desnatado (Molico, Nestle®), *overnight*, a 4 ° C. Em seguida, lavou-se a membrana três vezes com tampão PBS-Tween 0,05 % em pH 7,4 e adicionou-se a proteína GFP5-scFv anti LDL (-) na concentração de 10 µg/mL diluída em solução de PBS com 1 % de leite desnatado (Molico, Nestle®), e incubou-se por 1h e 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Depois desse período, lavou-se a membrana com PBS-Tween 0,05 % e adicionou-se anticorpo IgG ant-histidina (GE®) diluído 1:1000 em tampão PBS com 1 % de leite desnatado (Molico, Nestle®), incubou-se por 1 h e 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação e posteriormente adicionou-se o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase diluído 1:2000, e incubou-se por 1 hora. A revelação da reação foi realizada com uma solução DAB (3,3 – Diaminobenzidina – Sigma Chemical) na presença de 0,015 % de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens de água destilada e a membrana foi seca e fotografada.

3.15 Transformação das células bacterianas com o vetor pET-GFP5, expressão e purificação da GFP5 livre

A transformação das células de *Escherichia coli* BL21(DE3) foi realizada por choque térmico. Uma alíquota de 100 µL de células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) foi inoculada com 0,5 µg do DNA plasmidial pET-GFP5 e mantidas em gelo por 30 minutos. As células foram submetidas à temperatura de 42° C por 2 minutos e depois mantidas em gelo por mais 5 minutos. Foram adicionados 1000 µL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e a solução foi mantida a 37° C por 1 hora e 15 minutos, quando então foram semeados 100 µL da solução na placa de Agar LB contendo kanamicina na concentração de 100 µg/mL. A placa foi mantida em estufa a 37° C por 12 horas. Depois deste período, retirou-se da placa uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o vetor pET-GFP5 e inoculou-se em 5 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) acrescido de Kanamicina na concentração de 100 µg/mL, a solução foi deixada a 37° C por 16 horas sob agitação à 200 RPM. 2 mL desta solução foram transferidos para um erlenmeyer com 200 mL de meio LB contendo Kanamicina (100 µg/mL) e submetidos à agitação, 200 RPM, sob a temperatura de 37° C. Após a densidade óptica desta solução atingir entre 0,4 – 0,6 (2 horas aproximadamente), induziu-se a expressão da GFP5 livre adicionando 1 mM de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosideo, Fermentas®). 6 horas depois da indução a 37° C as bactérias foram colhidas após a centrifugação a 4500 RPM durante 20 minutos e solubilizadas em 5 mL de tampão lise (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 200 mM, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, lisozima 150 µg/mL, pH 7,4) onde deixou-se incubando no gelo por 30 minutos, sendo posteriormente sonicadas em um sonicador Branson Sonifier 250 (3 pulsos de 20 segundos em 30% de potência, com intervalo de 1 minuto a cada pulso). Após a sonicação procedeu-se a centrifugação a 4500 RPM por 18 minutos a 4° C, sendo descartada a fração insolúvel (*pellet*). Submeteu-se a fração solúvel ao procedimento de purificação, através do método de cromatografia por afinidade utilizando uma resina carregada com níquel (n° cat. 17-5268-01, Amershan/GE®). A fração solúvel foi incubada com a resina por 1 hora, e posteriormente eluída com a solução (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 500 mM) para retirar a GFP5 livre ligada na resina.

3.16 Ensaio de Fluorescência para determinação de LDL (-)

Para o desenvolvimento do ensaio de fluorescência foi utilizada uma placa de poliestireno preta com fundo reto e transparente (high binding, Corning/Costar® nº cat. 3601). Para a adsorção do antígeno na placa utilizou-se LDL (-) na concentração de 10 µg/mL, sendo esta diluída em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6. A mistura de tampão carbonato bicarbonato e LDL (-) na concentração de 10 µg/mL foi colocada nos poços da placa (100 µl/poço) e incubada a 4° C por 16 horas, protegida da luz. Depois deste período de incubação, os poços da placa com o antígeno adsorvido foram submetidos à lavagem com uma solução de PBS-Tween 0,05% em pH 7,4. A lavagem foi realizada por três vezes, com 200 µl/poço. Depois disto, promoveu-se o bloqueio dos poços para evitar sítios livres de reação, com uma solução de PBS-Tween 0,01% com 2 % de leite desnatado (Molico, Nestle®), onde deixou-se incubando a 37° C por 1 hora e 30 minutos. Após o bloqueio, os poços da placa foram lavados novamente como descrito anteriormente, sendo depois adicionado 75 µl de GFP5-scFv anti LDL (-) em diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 10, 5 e 1µg/mL) diluído em tampão PBS, deixou-se incubando a 37° C por 1 hora e 30 minutos, posteriormente os poços foram novamente lavados por 3 vezes com a solução de PBS-Tween 0,05% (200 µl/poço). Ao término da lavagem adicionou-se PBS (100 µl/poço). As placas a serem analisadas foram colocadas no fluorímetro. O fluorímetro foi ajustado (λ_{ex} = 395nm e λ_{em} = 508nm), com a finalidade de detectar a emissão de fluorescência. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.17 Ensaio imunoenzimático para análise da ligação da GFP5-scFv anti-LDL(-) ao antígeno adsorvido na placa

Para a adsorção da LDL (-) na placa de alta ligação preta de fundo reto e transparente (high binding, Corning/Costar® nº cat. 3601) diluiu-se a LDL (-) em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M, pH 9,6; essa diluição foi realizada para que a concentração da lipoproteína atingisse 10 µg/mL. Logo após a diluição da LDL (-) no tampão carbonato bicarbonato (10 µg/mL), adicionou-se 100 µL desta solução em cada poço da placa (100 µL/poço) e deixou-se incubando em

geladeira (4° C) por um período de 16 horas. Após a sensibilização da placa com o antígeno, os poços da placa foram submetidos ao procedimento de lavagem com uma solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A lavagem foi realizada por três vezes, com 200 µl/poço da solução de PBS-Tween. Depois disto, promoveu-se o bloqueio dos poços para evitar sítios livres de reação, com um tampão de PBS-Tween 0,01% com 2 % de leite desnatado (Molico, Nestle®), onde deixou-se incubando a 37° C por 1 hora e 30 minutos. Depois deste período de incubação, procedeu-se a lavagem dos poços da placa com a solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A lavagem foi realizada por três vezes, com 200 µL/poço. Em seguida adicionou-se 100 µL/poço da solução contendo o anticorpo monoclonal 2C7 anti-LDL (-) na concentração de 10 µg/mL, para que a concentração do anticorpo atingisse 10 µg/mL realizou-se a diluição do mesmo em tampão PBS-Tween 0,01% com 1% de leite desnatado, depois da diluição e da adição do anticorpo monoclonal 2C7 anti-LDL (-) nos poços da placa deixou-se incubando por 1 hora e 30 minutos em temperatura de 37° C. Posteriormente procedeu-se a lavagem dos poços da placa com a solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A lavagem também foi realizada por três vezes, com 200 µL/poço. Após a lavagem adicionou-se anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Invitrogen-Zimed®) diluído 1:2000 em 1 % de leite desnatado (Molico, Nestle®) em tampão PBS-Tween 0,01%. Depois disto deixou-se incubando a 37 ° C por 1 hora e 15 minutos. A seguir, a placa foi lavada, por 4 vezes com a solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A reação foi revelada com solução de substrato TMB (3,3,5,5 – tetrametilbenzidina), adicionou-se 75 µL/poço de TMB e deixou-se incubando por aproximadamente 10 minutos a 37° C. Interrompeu-se a reação adicionando-se 75 µL/poço de H₂SO₄ a 0,5 M. Mediu-se a densidade óptica em uma leitora de espectrofotometria utilizando o comprimento de onda em 450 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.18 Ensaio imunoenzimático para análise da ligação da GFP5-scFv anti-LDL(-) ao antígeno adsorvido na placa

A placa de poliestireno preta de fundo reto e transparente com 96 poços (high binding, Corning/Costar[®] n° cat. 3601) foi sensibilizada com a LDL (-). Adicionou-se a LDL (-) em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 para que a concentração da lipoproteína atingisse 10 µg/mL. Depois que alcançada esta concentração, adicionou-se 100 µL em cada poço da placa. Depois disto, deixou-se incubando em geladeira (2 – 8°C) por 16 horas. Após a sensibilização, os poços da placa foram lavados com uma solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A lavagem foi realizada por três vezes, com 200 µL/poço. Já com os poços da placa sensibilizados com a LDL (-) (10µg/mL) e lavados, promoveu-se o bloqueio para evitar sítios livres de reação. Este bloqueio foi realizado com tampão PBS-Tween 0,01% com 2 % de leite desnatado (Molico, Nestle[®]) 150 µL/poço, com um período de incubação de 1 hora e 30 minutos a 37° C. Posteriormente lavou-se os poços da placa, com 200 µL/poço da solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A lavagem foi realizada por três vezes. Em seguida, adicionou-se 75 µL/poço de tampão PBS-Tween 0,01% com 1% de leite desnatado (Molico, Nestle[®]) contendo a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 50 µg/mL. Depois disto, a placa foi incubada em estufa a 37 ° C por 1 hora e 30 minutos. Novamente os poços da placa foram submetidos à lavagem com a solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4. A lavagem foi realizada por três vezes, com 200 µL/poço. Após esta etapa adicionou-se o anticorpo IgG anti-histidina (GE[®]) diluído 1:1000 em tampão PBS-Tween 0,01% com 1% de leite desnatado (Molico, Nestle[®]), onde deixou-se incubando em estufa a 37° C por 1 hora e 30 minutos. Logo depois, procedeu-se a lavagem por três vezes com a solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4 (200 µL/poço). Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo (Invitrogen-Zimed) conjugado a peroxidase diluído 1:2000 em tampão PBS-Tween a 0,01% com 1% de leite desnatado (Molico, Nestle[®]) e incubou-se a 37° C por 1 hora e 30 minutos. Após este período, promoveu-se a lavagem dos poços por quatro com a solução de PBS-Tween 0,05% pH 7,4 (200 µL/poço). Ao término desta etapa adicionou-se 75 µL/poço da solução de TMB e deixou-se incubando por aproximadamente 10 minutos a 37° C. Interrompeu-se a reação adicionando-se

75 µL/poço de H₂SO₄ a 0,5 M. Mediu-se a densidade óptica em uma leitora de espectrofotometria utilizando o comprimento de onda em 450 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.19 Desenho dos *primers* para inserção no sítio *Pst*I do vetor pET-GFP5-scFv.

Foram desenhados os *primers* codificantes para a sequência de 15 aminoácidos (Gly₄Ser)₃.

F 3' GGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCACTGCA 5'

R 5' GTGAGCCGCCGCCGCCGGAGCCGCCGCCGCCGGAGCCGCCGCCGCCCTGCA 3'

Estes primers não apenas codificam a sequência de interesse como também, em se tratando de sítio único de clonagem, quando inserido na orientação oposta a almejada, codificam uma sequência de parada de expressão (stop códon) que permitiria selecionar clones positivos não apenas através de sequenciamento, mas também em função do peso molecular da proteína expressa.

3.20 Digestão do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição *Pst*I-HF.

O vetor pET-GFP5-scFv foi colocado em um eppendorf contendo a enzima de restrição *Pst*I-HF (New England BioLabs[®], nº cat. R3140S) 5 vezes em excesso em relação ao padrão (1 U de enzima/ µg de DNA), o tampão próprio para a enzima (tampão 4 - New England BioLabs[®], nº cat. R3140S) e água miliQ estéril. Esta solução foi então incubada a 37° C por 16 horas. Depois deste período de incubação promoveu-se a inativação da enzima de restrição submetendo a solução (DNA, enzima, tampão e água) a uma temperatura de 80° C por 30 minutos.

3.21 Digestão do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição *Xho*I.

Como realizado no processo de digestão do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição *Pst*I-HF, colocou-se em um eppendorf o vetor pET-GFP5-scFv, a enzima de restrição *Xho*I (New England BioLabs®, nº cat. R0146S) 5 vezes em excesso em relação ao padrão (1 U de enzima/ µg de DNA), o tampão próprio para a enzima (tampão 4 - New England BioLabs®, nº cat. R0146S) e água miliQ estéril. Após o preparo da solução (DNA, enzima, tampão e água), deixou-se incubando a 37 ° C por 2 horas. Depois disto, a solução foi aquecida até 65° C. Assim que alcançada esta temperatura deixou-se incubando por 30 minutos para inativação da enzima de restrição *Xho*I (New England BioLabs®, nº cat. R0146S).

3.22 Defosforilação do vetor pET-GFP5-scFv após digestão com as enzimas *Pst*I-HF e *Xho*I.

Para proceder a defosforilação do vetor após digestão com as enzimas de restrição *Pst*I-HF e *Xho*I preparou-se uma solução composta de: 0,5 µg do vetor pET-GFP5-scFv (digerido pela enzima de restrição adequada), 1 µL da enzima Antarctic Phosphatase e 5 µL do tampão específico da enzima. Cada eppendorf, contendo o vetor pET-GFP5-scFv digerido pela enzima adequada e defosforilado pela Antarctic Phosphatase, foram mantidos a 65° C por 20 minutos, para ocorrer a inativação da Antarctic Phosphatase, e em seguida preparou-se o gel de agarose para a corrida dos vetores.

3.23 Eletroforese em gel de agarose

A agarose (0,8%) foi fundida em TAE 1x. Após a completa dissolução da agarose foi adicionado gelRed (Biotium®, cat. 41003) alcançando um volume final de 5 µL de gelRed/ 25 mL de TAE. O gel foi polimerizado em cuba de eletroforese a temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Para a corrida

dos vetores circulares e lineares aplicou-se uma voltagem de 60 V (*Pharmacia Biotech*[®], modelo EPS 600).

Solução utilizada:

TAE 1x: Tris-acetato 0,04 M

0,001 M de EDTA.

3.24 Ensaio de viabilidade celular – MTT

Para avaliar o efeito da GFP5-scFv anti-LDL (-), GFP5 livre e do PSS sobre a viabilidade celular, utilizou-se o ensaio de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium). Para proceder o ensaio de viabilidade celular, as células (macrófagos RAW 264.7) foram cultivadas em garrafas de cultura celular (Corning[®] Flask, nº cat. 430641), com meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Transferiu-se para cada poço da placa (Corning/Costar[®] nº cat. 3599) 1×10^4 células. Estas células foram plaqueadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (100µL/poço) por um período de aproximadamente 5 horas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. Depois deste período, o meio de cultura foi trocado por meio RPMI suplementado apenas com 1% de soro fetal bovino (100µL/poço). As placas foram então incubadas em estufa a 37° C com 5% de CO₂ *overnight*. Depois disto, promoveu-se o tratamento com a GFP5-scFv anti-LDL (-), a GFP5 livre e o PSS em diferentes concentrações (25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09; 0,04 µg/mL). Adicionou-se 100 µL/poço de meio RPMI com 1% de soro fetal bovino acrescido de GFP5-scFv anti-LDL (-), GFP5 livre e PSS nas concentrações citadas anteriormente, e em seguida deixou-se incubando em estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 24 horas. Ao término do tratamento, o meio foi removido e adicionou-se 50 µL/poço de meio RPMI sem vermelho de fenol com MTT na concentração de 1 mg/mL. A placa foi deixada em temperatura ambiente sob agitação por 3 horas. Ao final deste período, descartou-se o sobrenadante e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos com 100 µL/poço de DMSO. Deixou-se em temperatura ambiente, por 30 minutos, sob agitação. Logo após

procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 580 nm. Foram feitas triplicatas de cada concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-), GFP5 livre e PSS.

3.25 Ensaio de viabilidade celular – Citometria de fluxo

A análise de morte celular por necrose ou apoptose foi efetuada no *FACS* do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP. Para este procedimento utilizamos macrófagos RAW 264.7 que haviam sido cultivados em garrafa de cultura (Corning® Flask, nº cat. 430641) em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. Após o cultivo, as células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio RPMI com soro fetal bovino a 10% sendo posteriormente transferidas para os poços da placa (Corning/Costar® nº cat. 3548) (500 µL/poço), o número total de células foi 2×10^5 células/poço. Após o plaqueamento, a placa com as células foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37° C por aproximadamente 6 horas. Depois deste período, o meio RPMI com soro fetal bovino a 10% foi trocado por meio RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino (500 µL/poço). Após a troca do meio, incubou-se a placa em estufa com 5% de CO₂ a 37° C por 12 horas. Logo após, promoveu-se o tratamento com a GFP5-scFv anti-LDL (-) utilizando as seguintes concentrações:

- Grupo 1: Só as células em meio RPMI com 1% de soro fetal bovino
- Grupo 2: GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 50 µg/mL
- Grupo 3: GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 25 µg/mL
- Grupo 4: GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 10 µg/mL
- Grupo 5: GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 5 µg/mL
- Grupo 6: GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 1 µg/mL
- Grupo 7: DMSO a 5%

Após adicionar o tratamento, a placa foi incubada em estufa com CO₂ a 37° C por 24 horas. Ao término deste período, o meio com as células tratadas (500

μL/poço) foi transferido para o tubo de citometria e, em seguida, procedeu-se a lavagem dos poços da placa com solução de PBS 1x gelada (500 μl/poço). A solução de PBS 1x foi trocada por duas vezes sendo aspirada e transferida para o tubo de citometria contendo as células tratadas. Os tubos de citometria com a suspensão de células foram centrifugados (1500 RPM – 5 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 μL de PBS 1x gelado e centrifugados novamente nas mesmas condições. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado mais uma vez com a solução de PBS, sendo novamente centrifugado (1500 RPM – 5 minutos). O sedimento, contendo as células, foi ressuspensionado em 200 μL de tampão de reação (Sigma[®], nº cat. B9796) 1x diluído em água miliQ. Para proceder à análise da morte celular adicionou-se 0,625 μg/mL de Anexina (Sigma[®], nº cat. A9210) e 2,5 μg/mL de Iodeto de Propídio (Sigma[®], nº cat. P2667) nos tubos correspondentes.

Grupo controle:

- 1- Só as células
- 2- Células com anexina
- 3- Células com Iodeto de Propídio
- 4- Células com anexina e Iodeto de Propídio
- 5- Células com 5% de DMSO
- 6- Células com 5% de DMSO e anexina
- 7- Células com 5% de DMSO, anexina e Iodeto de Propídio

Grupo tratado:

- 1- Células tratadas com 50 μg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) com anexina e Iodeto de Propídio.
- 2- Células tratadas com 25 μg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) com anexina e Iodeto de Propídio
- 3- Células tratadas com 10 μg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) com anexina e Iodeto de Propídio
- 4- Células tratadas com 5 μg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) com anexina e Iodeto de Propídio

5- Células tratadas com 1 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) com anexina e Iodeto de Propídio

Após a adição da anexina-FITC e do Iodeto de Propídio, deixou-se incubando em temperatura ambiente, protegido da luz por 10 minutos e posteriormente as células foram passadas no *FACS* (BD FACSCanto II). Os histogramas foram analisados pelo software *FlowJo*. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.26 Ensaio de captação de LDL (-) por macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em garrafa de cultura (Corning® Flask, nº cat. 430641) em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Estas células foram cultivadas na estufa a 37° com 5% de CO₂. Após o cultivo das células transferiu-se para cada poço da placa de 48 poços (Corning/Costar® nº cat. 3548) 1x10⁵ células diluídas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% (500 µL/poço) e deixou-se incubando em estufa a 37° C com 5% de CO₂ por aproximadamente 3 horas. Depois deste período, promoveu-se o carenciamento substituindo o meio RPMI com 10% de soro fetal bovino por meio RPMI suplementado apenas com 1% de soro fetal bovino. Depois disto, deixou-se incubando a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 12 horas. Para proceder o tratamento com LDL eletronegativa e LDL nativa dilui-se as lipoproteínas em meio RPMI com 1% de soro fetal bovino.

Concentrações utilizadas:

- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL nativa
- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL eletronegativa

Como controle deixaram-se três poços da placa com as células em meio RPMI com 1% de soro fetal bovino sem tratamento algum. Após a etapa de carenciamento, realizou-se o tratamento nas condições acima citadas com um volume de 500 µL/poço por um período de 16 horas a 37° C com 5% de CO₂. Ao término do tratamento, o meio foi retirado e posteriormente adicionou-se

solução de PBS com 10% de formaldeído por um período de 30 minutos em temperatura ambiente para fixação das células. Em seguida, os poços da placa foram lavados com água destilada. A partir daí procedeu-se a coloração das células fazendo uso do corante *oil red* (Sigma[®]). Após 1 hora o corante foi removido e as células foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante precipitado. A análise foi realizada por microscópio óptico e as imagens foram obtidas através do programa Motic Images versão 2.0.

3.27 Ensaio de captação de LDL (-) utilizando-se um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-)

Este procedimento foi realizado em uma placa de 48 poços. Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em garrafa. Estas células foram contadas e posteriormente transferidas para a placa de 48 poços diluídas em meio RPMI com soro fetal bovino a 10%. Transferiu-se para cada poço da placa 1×10^5 células (500 µl/poço), e incubou-se a 37° com 5% de CO₂ por aproximadamente 3 horas. Depois deste período, o meio RPMI com soro fetal bovino a 10% foi trocado por meio RPMI suplementado apenas com 1% de soro fetal bovino e deixou-se a placa incubando a 37° C com 5% de CO₂ por 12 horas. Após o carenciamento promoveu-se o tratamento das células com LDL (-) e GFP5-scFv anti-LDL (-). A LDL (-) e a GFP5-scFv foram diluídas em meio RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino. As concentrações utilizadas foram as seguintes:

- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL (-) e 50 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL(-) por poço.
- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL (-) e 25 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) por poço.
- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL (-) e 10 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) por poço.
- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL (-) e 5 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) por poço.
- Células incubadas com 37,5 µg/mL de LDL (-) e 1 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) por poço.

Após a adição do tratamento (500 µL/poço) a placa foi incubada em estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 16 horas. Depois disto, o meio contendo o tratamento foi retirado e posteriormente adicionou-se solução de PBS com 10% de formaldeído por um período de 30 minutos em temperatura ambiente para fixação das células. Em seguida, promoveu-se a lavagem dos poços da placa com água destilada. A partir daí procedeu-se a coloração das células fazendo uso do corante *oil red* (Sigma®). Após 1 hora o corante foi removido e as células foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante precipitado. A análise foi realizada por microscópio óptico e as imagens foram obtidas através do programa Motic Images versão 2.0.

3.28 Ensaio de captação de LDL (-) marcada utilizando-se um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-). Microscopia confocal

Este procedimento foi realizado em uma placa de 6 poços (Corning/Costar® nº cat. 3516). Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em garrafa. Estas células foram contadas e diluídas em meio RPMI com soro fetal bovino a 10%, para que o número dessas chegasse a 2×10^5 . Transferiu-se para cada poço da placa 2000µl de meio com células (2×10^5 células/poço). Cada poço da placa continha uma lamínula estéril sobre o fundo. Após o plaqueamento, incubou-se a 37° com 5% de CO₂ por aproximadamente 3 horas. Depois deste período, o meio RPMI com soro fetal bovino a 10% foi trocado por meio RPMI suplementado apenas com 1% de soro fetal bovino (2000µl/poço). Depois disto, deixou-se a placa incubando a 37° C com 5% de CO₂ por 12 horas. Após o carenciamento, promoveu-se o tratamento das células com LDL (-) marcada com 3 µM de Dil (1,1-dioctadecyl-3,3-tetramethylindocarbocyanine, *Invitrogen*) e GFP5-scFv anti-LDL (-). A LDL (-) marcada e a GFP5-scFv foram adicionadas na placa com meio RPMI suplementado com 1% de SFB na seguinte concentração:

- Células incubadas com LDL (-) marcada com Dil 37,5 µg/mL e GFP5-scFv anti-LDL (-) 50µg/mL.

Após a adição da LDL (-) marcada e da GFP5-scFv anti-LDL (-), a placa foi incubada a 37° C em estufa de CO₂ por 1 hora. Depois deste período, o meio contendo o tratamento, foi removido e as células foram lavadas com solução de PBS 1x. Posteriormente procedeu-se a fixação das células nas lamínulas com uma solução de PBS com 10% de formaldeído. Após a adição do fixador, deixou-se a placa incubando em temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Ao termino deste período, as laminulas foram retiradas dos poços da placa e colocadas sobre uma lamina de vidro. Depois disto, as laterais das lamínulas foram vedadas com esmalte e levadas para a análise no microscópio confocal (LSM 510 da Zeiss) do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do Instituto de Ciências Bimédicas da USP.

4. RESULTADOS

4.1 Corpos de inclusão da proteína GFP5-scFv anti LDL (-) no interior da *Escherichia coli* BL21DE3.

Após induzir a expressão da GFP5-scFv, utilizando o vetor pET-GFP5-scFv verificou-se que proteína se concentra nos corpos de inclusão da *E. coli*, observando-se estruturas pontuais fluorescentes visíveis no interior do citoplasma bacteriano. A figura 13 mostra a imagem obtida em microscópio de fluorescência evidenciando os corpos de inclusão no interior da bactéria após a indução da expressão da proteína com IPTG.

Figura 13: Foto da microscopia de fluorescência da cultura de E.coli BL21DE3 mostrando a presença de corpos de inclusão.

4.2 SDS-PAGE da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-)

A presença da proteína recombinante no extrato obtido da cultura de *E. coli* foi confirmada empregando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. A proteína foi dialisada, realizando-se SDS-PAGE com gel a 12%. Observou-se que a amostra de proteína dialisada com a membrana com cutoff de 50 kDa (linha 3) estava mais pura, quando comparada à amostra dialisada com a membrana com cutoff de 30 kDa (linha 2). Verificou-se, ainda, a diminuição da degradação da proteína quando armazenada em geladeira por 30 dias (linha 4).

Figura 14: SDS-PAGE 12% da GFP5-scFv anti-LDL(-). A eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou uma proteína de peso molecular de 58 kDa, que coincide com o peso molecular da quimera GFP5-scFv anti LDL(-). Linha 1: padrão de massa molar. Linha 2: purificação utilizando uma membrana de diálise com poro até 30 kDa. Linha 3: purificação utilizando uma membrana de diálise com poro até 50kDa; Linha 4: mesmo lote do poço 3, após armazenamento a temperatura de 2 a 8°C por um período de 30 dias.

4.3 Análise da ligação da GFP5-scFv anti-LDL (-)

Para confirmar a ligação da GFP5-scFv anti LDL (-) no antígeno, foi realizado um dot blot em uma membrana de nitrocelulose. Nesse ensaio foi possível observar que a GFP5-scFv reagiu especificamente com a LDL (-) adsorvida na membrana, ou seja, a proteína ligou-se à LDL (-) e não se ligou à LDL nativa (figura 15).

Figura 15: dot blot; a primeira seta aponta a ligação da GFP5-scFv na LDL (-) adsorvida na membrana, a segunda seta aponta que não houve ligação da GFP5-scFv anti LDL (-) na LDL nativa adsorvida na membrana.

4.4 Análise da emissão de fluorescência da GFP5-scFv anti-LDL (-)

Após a expressão da proteína e a confirmação da ligação na LDL (-), analisou-se o espectro de emissão de fluorescência de uma solução de GFP5-scFv contendo 100 µg/mL em solução de PBS, na faixa de emissão entre 450 a 600 nm e excitação em 395 nm. A proteína apresentou um pico de emissão em 508 nm, perfil de emissão característico da GFP5. A figura 16 ilustra o perfil de emissão obtido pela proteína GFP5-scFv anti-LDL (-).

Figura 16: Espectro de emissão da GFP5-scFv anti-LDL (-) após excitação em 395 nm.

Na figura 17 mostra-se a intensidade de emissão de fluorescência da químera GFP5-scFv anti-LDL (-) comparada a solução de PBS, utilizada como branco.

Figura 17: Análise da emissão de luz da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-). Na coluna 1: solução de PBS. Na coluna 2: GFP5-scFv anti-LDL (-) na concentração de 100 µg/mL.

4.5 Propriedades anômalas da GFP5-scFv anti LDL (-)

Após a expressão, solubilização e renaturação da proteína recombinante, comparou-se o espectro de emissão da GFP5-scFv anti-LDL (-) com o espectro de emissão da GFP5 livre. Observou-se que a GFP5-scFv anti-LDL (-) apresenta uma baixa emissão quando comparada à GFP5 livre. Foi possível visualizar que a emissão de fluorescência da GFP5-scFv é da ordem de cem vezes menor quando comparada à emissão da GFP5 livre (figura 18).

Figura 18: Espectro de emissão das proteínas GFP5 e GFP5-scFv anti LDL (-) ambas na mesma concentração de 36nM pH 7,4.

4.6 Ensaio de interação entre a GFP5-scFv anti LDL (-) e a LDL (-)

O domínio scFv da proteína recombinante GFP5-scFv anti-LDL (-) possui em sua composição 6 triptofanos. Esses aminoácidos são excitáveis a 280 nm e apresentam emissão em 330 nm. A interação da GFP5-scFv anti-LDL (-) com o ligante poderia gerar algum sinal que evidenciasse a interação entre antígeno (LDL-) e anticorpo (scFv). Através da excitação em 280 nm buscamos investigar o perfil de emissão na presença ou ausência de LDL (-). Como podemos visualizar na figura 19, foi possível acompanhar a evolução espectral da GFP5-scFv anti LDL(-) na presença de LDL (-) (G+L d0 e G+L d3) e na ausência de LDL(-) (G d0 e G d3) durante três dias. Após três dias de incubação com a LDL (-), podemos observar o surgimento de uma intensa banda em 460nm.

Figura 19: Evolução do espectro de fotoluminescência da proteína GFP5-scFv anti LDL(-), em complexos GFP5-scFv anti LDL (-) e LDL(-) ao longo de três dias e controle negativo. Excitação em 280 nm, pH 7,4.

4.7 Ensaio de Fluorescência para determinação de LDL (-)

Com o intuito de desenvolver um método para detecção de LDL (-) utilizando a GFP5-scFv anti-LDL (-) foram realizados ensaios de fluorescência. Observamos uma baixa sensibilidade, ou seja, não se observou emissão de fluorescência em λ_{em} 508nm nas faixas de concentração utilizadas (200 μ g/mL a 1 μ g/mL), como mostra a figura 20.

Figura 20: Espectro de emissão do complexo GFP5-scFv anti-LDL (-) nos ensaios de fluorescência para detecção de LDL (-). Excitação a λ_{ex} 395nm, emissão λ_{em} 508nm.

4.8 Análise da adsorção da LDL (-) na placa de alta ligação

Para verificar se a baixa intensidade de emissão do complexo GFP5-scFv anti-LDL (-) seria devido a falta de adsorção da LDL (-) à microplaca, durante a realização do ensaio investigamos a adsorção da LDL (-) na placa de alta ligação. Verificou-se uma densidade óptica aproximadamente 8 vezes mais elevada nos poços que continham LDL (-), em comparação ao controle contendo PBS. Na figura 21, é possível observar a adsorção da LDL (-) na placa de alta ligação.

Figura 21: Ensaio imunoenzimático para a análise da adsorção da LDL (-) na microplaca de alta ligação, utilizando-se o anticorpo monoclonal 2C7 anti-LDL (-) na concentração de 10 µg/mL.

4.9 Análise da ligação da GFP5-scFv anti LDL (-) ao antígeno LDL (-) adsorvido na placa

Para confirmar a ligação da GFP5-scFv anti LDL (-) no antígeno LDL (-) adsorvido na placa foi realizado um ensaio imunoenzimático. Nesse ensaio foi observada uma densidade óptica aproximadamente 7 vezes mais elevada nos poços com GFP5-scFv anti-LDL(-) quando comparados aos poços com PBS. Na figura 22 é possível confirmar a ligação da GFP5-scFv anti-LDL (-) ao antígeno LDL (-) adsorvido na placa.

Figura 22: Ensaio imunoenzimático para confirmar a ligação da quimera na LDL (-) adsorvida na placa, utilizando-se o anticorpo IgG anti-histidina diluído 1:1000. A concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-) utilizada no ensaio foi de 50 µg/mL.

Tendo em vista que os resultados obtidos com o vetor pET-GFP5-scFv para a expressão da GFP5-scFv anti-LDL (-) não foram satisfatórios devido à baixa emissão de fluorescência desta proteína, foi adotada uma nova estratégia para obtenção da proteína recombinante. Assim, tentou-se a construção do vetor pET-GFP5-scFv modificado pela inserção de uma sequência codificadora para os aminoácidos (Gly₄Ser)₃ entre os sítios *EcoRI* e *SacI* do vetor pET-GFP5-scFv. Conforme indicado a seguir a sequência codificadora para o linker de (Gly₄Ser) poderia ser inserida no sítio *PstI* do vetor pET-GFP5-scFv. A inserção desta sequência no vetor pET-GFP5-scFv resultaria na obtenção de uma proteína com um *linker* entre os domínios da GFP5 e do scFv.

4.10 Sítio da GFP5-scFv anti LDL (-) no vetor pET-28a(+).

O plasmídeo pET-GFP5-scFv, apresenta dois sítios, onde encontram-se localizadas as sequências que codificam a GFP5-scFv anti-LDL (-). O sítio *EcoRI* codifica a GFP5, enquanto o sítio *SacI* codifica o scFv anti-LDL (-). Nessa representação esquemática, é possível observar o sítio de restrição *PstI* que encontra-se localizado no início do sítio *SacI*.

Figura 23: Representação esquemática do vetor pET-GFP5-scFv

4.11 Sítio de restrição *PstI*.

Nesta sequência é possível observar o único sítio de restrição *PstI* do vetor pET-GFP5-scFv flanqueado pelas bases guanina e citosina. Como o sítio *PstI* do vetor pET-GFP5-scFv foi escolhido para a inserção da sequência codificadora para o linker de (Gly₄Ser)₃, foi fundamental a análise das bases que se localizam aos flancos deste sítio. Armstrong e Bauer, em 1982 demonstraram que a enzima *PstI* pode apresentar resistência ao corte quando as bases de Guanina e Citosina encontram-se localizadas nos flancos do sítio *PstI*.

Figura 24: Sequência do sítio de restrição *PstI* do vetor pET-GFP5-scFv em amarelo.

4.12 Digestão do vetor pET-GFP5-scFv anti LDL (-)

Após a incubação do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição *Pst*I-HF, comparou-se os perfis eletroforéticos do vetor circularizado incubado com a enzima e do vetor circularizado não incubado com a enzima de restrição. Na figura 25 nota-se uma diferença na migração do vetor incubado com a enzima *Pst*I-HF quando comparada com a migração do vetor pET-GFP5-scFv intacto não incubado com *Pst*I-HF.

Figura 25: Gel de agarose a 0,8%. Em M: marcador de peso molecular. Em 1: vetor pET-GFP5-scFv incubado com *Pst*I-HF. Em 2: vetor pET-GFP5-scFv incubado com *Pst*I-HF. Em 3: vetor pET-GFP5-scFv circularizado não incubado com *Pst*I-HF.

Após a incubação do vetor pET-GFP5-scFv circularizado, com as enzimas de restrição *Pst*I-HF e *Xho*I, foi visualizado um perfil eletroforético diferente entre os vetores, ou seja, o vetor pET-GFP5-scFv intacto incubado com *Pst*I-HF apresentou uma migração eletroforética sugestiva de vetor parcialmente digerido. Já o vetor incubado com *Xho*I apresentou uma migração característica de vetor totalmente digerido. Na figura 26, foi possível observar a digestão parcial do vetor pET-GFP5-scFv quando incubado com a enzima *Pst*I-HF.

Figura 26: Gel de agarose a 0,8%. Em M: marcador de peso molecular. Em 1: vetor pET-GFP5-scFv incubado com *Pst*I-HF. Em 2: vetor pET-GFP5-scFv incubado com *Xho*I, produzindo padrão de corrida correspondente ao número de pares de base esperado para o vetor linearizado (7 Kbp).

4.13 Ensaio de viabilidade celular – MTT

Com o objetivo de avaliar se a proteína recombinante poderia ser utilizada como uma ferramenta em ensaios celulares para o monitoramento da interação de LDL (-) com macrófagos, investigou-se os efeitos da GFP5-scFv anti-LDL (-), da GFP5 livre e do poliestireno sulfonado (PSS) sobre a viabilidade de macrófagos linhagem RAW 264.7, utilizando-se o ensaio de viabilidade celular com o MTT.

O ensaio de viabilidade celular, ilustrado na figura 27, demonstrou que na faixa de concentração, de 0,04 $\mu\text{g/mL}$ a 25 $\mu\text{g/mL}$, as células tratadas com a GFP5 livre estavam viáveis, com mais de 90% de viabilidade celular.

Figura 27: Gráfico de viabilidade celular em macrófagos com o ensaio de MTT, utilizando a GFP5 livre. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados com GFP5 livre diluída em meio RPMI com 1 % de soro fetal bovino. A faixa de concentração utilizada foi, de 25 a 0,04 $\mu\text{g/mL}$. Cada coluna representa a porcentagem de viabilidade celular com o desvio padrão.

Quanto ao efeito do PSS sobre as células, o ensaio de viabilidade celular demonstrou que as concentrações, de 5 a 20 μM , de PSS são tóxicas. As células tratadas com 20 μM de PSS estavam com menos de 75 % de viabilidade, as células tratadas com 10 μM estavam com aproximadamente 85 % de viabilidade e as células tratadas com 5 μM estavam com

aproximadamente 90 % de viabilidade. A partir da concentração de 2,5 μM as células tratadas com PSS estavam viáveis, com mais de 95 % de viabilidade celular (figura 28). Para o ensaio de captação de LDL (-) utilizando um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-), variando de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$, o PSS (5 μM) adicionado no processo de produção da GFP5-scFv anti-LDL (-) foi diluído, sendo que a diluição foi realizada no momento do tratamento das células com a quimera. A concentração de PSS à qual as células foram expostas durante o tratamento com a GFP5-scF anti-LDL (-) não alcançou 1,0 μM . Portanto, para o ensaio de captação de LDL (-) utilizando a GFP5-scFv anti-LDL (-) nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$, as concentrações de PSS não foram tóxicas (figura 28).

Figura 28: Gráfico com a porcentagem das células viáveis utilizando o ensaio de MTT após o tratamento com PSS puro. Os macrófagos RAW 264.7 foram tratados com PSS puro diluído em meio RPMI com 1 % de soro fetal bovino. A faixa de concentração utilizada foi, de 20 $\mu\text{g/mL}$ a 0,04 $\mu\text{g/mL}$. Cada coluna representa a porcentagem de viabilidade celular com o desvio padrão.

Após o tratamento das células com GFP5-scFv anti-LDL (-), verificou-se que a quimera não apresentou efeito tóxico sobre os macrófagos RAW 264.7. Nesse ensaio, como podemos visualizar na figura 29, foi possível observar que as células incubadas com a GFP5-scFv anti-LDL (-) estavam viáveis, com mais de 95 % de viabilidade.

Figura 29: Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 após o tratamento com GFP5-scFv anti-LDL (-) pelo teste com MTT. Avaliação do efeito tóxico da GFP5-scFv anti-LDL (-) em macrófagos RAW 264.7 incubados por 24 horas com a proteína. Como controle negativo foram utilizados macrófagos não tratados. As concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-) utilizadas no tratamento das células variaram de 25 µg/mL a 0,04 µg/mL. Cada coluna representa a média da porcentagem de viabilidade celular com o respectivo desvio padrão.

4.14 Ensaio de viabilidade celular – Citometria de Fluxo

Para a confirmação dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular com a GFP5-scFv anti-LDL (-) utilizando a técnica de redução do MTT, foi realizado um ensaio de viabilidade utilizando o método de citometria de fluxo. Nesse ensaio, foi demonstrado que a GFP5-scFv anti-LDL (-) não apresentou toxicidade para macrófagos RAW 264.7. As células estavam viáveis, com mais de 90 % de viabilidade celular em todas as concentrações estudadas, que variaram de 1 a 50 µg/mL (figura 30).

Figura 30: Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 após o tratamento com a GFP5-scFv anti-LDL (-) pela citometria de fluxo. Avaliação do efeito tóxico da GFP5-scFv anti-LDL (-) em macrófagos RAW 264.7 incubados por 24 horas com a proteína. Como controle negativo foram utilizados macrófagos não tratados. As concentrações de GFP5-scFv anti-LDL (-) utilizadas no tratamento das células foram, de 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL. Cada coluna representa a média da porcentagem de viabilidade celular com o respectivo desvio padrão.

4.15 Ensaio de captação de LDL (-) por macrófagos RAW 264.7

Após o plaqueamento e o careciamento das células, procedeu-se o tratamento dos macrófagos com LDL nativa ou LDL eletronegativa. Como controle, foram deixados três poços sem tratamento contendo apenas as células no meio de cultura. Na figura 31A, nota-se que as células sem tratamento mantiveram as características morfológicas preservadas. Na figura 31B é possível visualizar que as células tratadas com LDL nativa não acumularam lipídeos intracelularmente. Já na figura 31C observa-se o acúmulo de lipídeos (LDL eletronegativa) no interior das células, observando que a intensidade da coloração arroxeada localizada no citoplasma demonstra o acúmulo de lipídeos nos macrófagos RAW 264.7.

Figura 31: Macrófagos RAW 264.7. Imagem obtida no microscópio óptico. As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino sem tratamento (figura A), células tratadas com 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de LDL nativa (figura B), células tratadas com 37,5 $\mu\text{g/mL}$ de LDL eletronegativa (figura C). As células foram fixadas com solução de PBS com 10 % de formaldeído e coradas com *Oil Red* e as imagens capturadas pelo programa *Motic Images Plus*. A imagem obtida foi visualizada no aumento de 20x.

4.16 Ensaio de captação de LDL (-) utilizando-se um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-)

Com o ensaio de captação de LDL (-) padronizado, foi possível analisar a captação da lipoproteína modificada pelos macrófagos, utilizando um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-). No tratamento das células com a proteína recombinante nas concentrações, de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL e 1 µg/mL, foi demonstrado que as células mantiveram sua morfologia normal. Nesse ensaio observamos que a GFP5-scFv anti-LDL (-) nas concentrações, de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL e 1 µg/mL não reduziu a captação de LDL (-) pelos macrófagos. Foi possível observar as gotículas de lipídeos no interior das células incubadas com LDL (-) e GFP5-scFv anti-LDL (-), em todas as concentrações utilizadas.

GFP5-scFv 50 µg/mL

GFP5-scFv 50 µg/mL + LDL (-) 37,5 µg/mL

GFP5-scFv 25 µg/mL

GFP5-scFv 25µg + LDL (-) 37,5 µg/mL

Figura 32: Efeito da GFP5-scFv anti-LDL (-) no ensaio de captação de LDL (-) em macrófagos. Os macrófagos RAW 264.7 foram expostos a GFP5-scFv anti-LDL (-) nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL durante 16 horas. Os macrófagos foram tratados com 37,5 µg/mL de LDL (-) e 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) por 16 horas. As células foram fixadas e coradas com *Oil Red O* e as imagens foram capturadas através do programa *Motic Images Plus* versão 2.0. As imagens foram visualizadas em microscópio óptico com objetiva no aumento de 20x.

4.17 Ensaio de captação de LDL (-) marcada com DIL utilizando-se um gradiente de concentração de GFP5-scFv anti-LDL (-) em microscopia confocal

Com o objetivo de estabelecer se o complexo GFP5-scFv anti-LDL (-) é internalizado pelos macrófagos realizamos um ensaio de captação de LDL (-) em células RAW 264.7 na presença de GFP5-scFv anti-LDL (-). Nesse ensaio utilizamos 37,5 µg/mL de LDL (-) ligada ao marcador fluorescente Dil e visualizamos a captação dessa partícula na presença da GFP5-scFv anti-LDL (-). Na figura 33 é possível visualizar a captação da LDL (-) e da GFP5-scFv anti-LDL (-). Nesse ensaio, foi observado que os dois componentes (LDL e GFP5-scFv) foram captados pelos macrófagos RAW 264.7 após 1 hora de incubação e estão colocalizados no interior da célula. Estes dados demonstram que a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-) pode ser uma ferramenta útil nos ensaios de interação da LDL (-) com macrófagos nos estudos da aterogênese, dentre outras possíveis aplicações.

Figura 33: Imagem de microscopia confocal mostrando a colocalização da LDL eletronegativa (em vermelho - A), e do complexo GFP5-scFv anti-LDL (-) (em verde - B). A figura C apresenta a sobreposição de imagens obtidas no microscópio confocal. Os macrófagos foram tratados com 37,5 µg/mL de LDL (-) marcada com Dil e 50 µg/mL de GFP5-scFv anti-LDL (-) por 1 hora. As células foram fixadas em uma lamínula e a imagem foi obtida no microscópio confocal. A imagem foi visualizada pelo programa LSM *Image Browse*.

5. DISCUSSÃO

As bactérias *Escherichia coli* têm sido o vetor de escolha para a expressão de proteínas recombinantes devido à facilidade de seu manuseio, rápido crescimento e pelo alto rendimento de produção. Apesar das vantagens desse sistema de expressão, a proteína pode ser produzida em corpos de inclusão, o que afeta a sua conformação (Skerra e Plunckthum, 1998). Entretanto, o emprego dos procedimentos de renaturação permite a recuperação da conformação da proteína na forma ativa (Chen et al., 2006).

A primeira fase deste trabalho foi dedicada à expressão de GFP5-scFv anti LDL (-) na bactéria *Escherichia coli* BL21DE3. A expressão da molécula de GFP5-scFv anti-LDL (-) foi induzida por IPTG sendo possível sua detecção após 18 horas de incubação. Os extratos obtidos após a indução da expressão, continham moléculas de GFP5-scFv anti LDL (-) detectadas por microscopia de fluorescência. Em 2010, Faulin demonstrou que a GFP5-scFv anti LDL (-) obtida após a sonicação das células de *E. coli* é quase que integralmente expressa na forma de corpos de inclusão, presentes na fração insolúvel do extrato bacteriano, sendo assim, necessária a solubilização da proteína recombinante. A solubilização completa da GFP5-scFv anti-LDL (-) foi realizada com uma solução de uréia, na concentração de 7 M. Após a solubilização da molécula, procedeu-se a purificação, a partir das caudas de histidina que o vetor pET-GFP5-scFv incorpora à proteína recombinante. A GFP5-scFv anti-LDL (-) pôde ser purificada com um nível satisfatório de pureza. O método de purificação, bastante simples e rápido, envolveu a afinidade da molécula recombinante por íons metálicos (níquel), adsorvidos a uma resina pré-tratada e sua posterior eluição com um tampão competidor (Faulin, 2010).

Após a purificação da proteína recombinante desnaturada, procedeu-se a sua renaturação através de gradiente de diálise com o auxílio de uma bomba peristáltica que impunha um fluxo de tampão isento de uréia por cerca de 24 horas até que a concentração desse agente denaturante chegasse a cerca de 2,5 M. A diálise prosseguia com o mesmo tampão, mas acrescido de 400 mM de L-arginina e 500 μ M de glutathiona oxidada até que a solução da proteína atingisse concentração de uréia de 0,5 M. A partir daí, com a proteína já

reenovelada, foi realizada a diálise final contra tampão PBS pH 7,4. É importante ressaltar que mesmo nas condições de diálise descritas, ocorria a agregação da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-), isto é, mesmo sob as condições graduais da diálise, não foi possível impedir a agregação desta proteína quimérica. A utilização do polímero aniônico PSS, poliestirenosulfonato, na concentração de 5 µM, foi capaz de manter a proteína solúvel, evitando a perda do material por agregação (Faulin, 2010).

Após os procedimentos de expressão, solubilização, purificação e renaturação da molécula de GFP5-scFv anti LDL (-), realizou-se uma análise por SDS-PAGE a 12% para confirmar a presença dessa proteína. Na análise de eletroforese observou-se uma proteína com massa molar de 58 kDa, que coincide com a massa molar da quimera. A partir de 1 L de meio de cultura foi possível obter 6 mg/L de GFP5-scFv anti-LDL (-), quantificada pelo método de BCA. A GFP5-scFv anti-LDL (-) com a conformação ativa, reagiu especificamente com a LDL (-) imobilizada em suportes sólidos (ELISA) ou em membrana de nitrocelulose (dot blot).

A proteína recombinante manteve as características individuais das proteínas fusionadas, emitindo a fluorescência característica da GFP5 e interagindo com a LDL (-) assim como o scFv anti-LDL (-). Porém a emissão de fluorescência da GFP5-scFv anti-LDL (-) não se mostrou tão intensa quando comparada com a emissão da GFP5 livre.

A diferença na intensidade de fluorescência possivelmente deve-se à reduzida qualidade de enovelamento do scFv (Didier et al., 2008) que repercute sobre o enovelamento geral da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-), implicando na redução significativa de sua emissão de fluorescência. Tal efeito poderia ser reduzido, provavelmente, pela inserção de um linker de aminoácidos (Gly₄Ser)₂ entre os domínios da proteína recombinante (Sakamoto et al., 2010). A inserção do peptídeo permitiria o distanciamento entre a porção carboxi-terminal de um domínio e a porção N-terminal do outro, o que, possivelmente melhoraria a qualidade do enovelamento da quimera.

A segunda fase do trabalho foi dedicada ao desenvolvimento do ensaio de fluorescência para determinação de LDL (-) utilizando a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-). A utilização dos scFvs para fins diagnósticos, apresenta algumas

vantagens em relação aos anticorpos inteiros. A principal delas refere-se à alta especificidade do scFv (Shen *et al.*, 2008). A utilização dos ensaios de fluorescência é vantajosa devido à sua elevada sensibilidade, que é da ordem de 100 a 1000 vezes acima da obtida nas análises baseadas na medida de absorção. Para aplicações em que é necessária alta sensibilidade e para as quais as propriedades espectrais do fluoróforo são conhecidas, a fluorimetria pode ser uma ótima abordagem (Andy *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos nos experimentos para a montagem do ensaio de fluorescência, utilizando a proteína fusionada GFP5-scFv anti-LDL (-), demonstraram a adsorção do antígeno LDL (-) na placa de alta ligação e a ligação da GFP5-scFv anti-LDL (-) nele. Dessa forma, foi possível confirmar a adsorção da LDL (-) na placa e a ligação da quimera no antígeno adsorvido. Porém, devido à baixa emissão de fluorescência da GFP5-scFv anti-LDL (-) que é inferior à da GFP5 livre, o ensaio desenvolvido com base nessa propriedade não apresentou sensibilidade na faixa de concentração utilizada.

Diante desses resultados, buscou-se centrar esforços no desenvolvimento de uma nova proteína. Em 2010, Sakamoto e colaboradores desenvolveram uma proteína recombinante fluorescente, a GFP-scFv anti-plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), com os domínios amino e carboxi terminais separados pelo peptídeo (Gly₄Ser)₂. Esta proteína apresentou uma emissão de fluorescência significativa, o que viabilizou o desenvolvimento de um método imunodiagnóstico para determinação de plumbagina. Com base nesse resultado, caminhamos no sentido de desenvolver a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-) com um linker entre os domínios da GFP5 e do scFv anti-LDL (-).

O estudo realizado por Faulin em 2010, revelou que a sequência do vetor pET-GFP5-scFv que codifica a proteína GFP5-scFv anti LDL (-) encontra-se localizada entre os sítios de restrição *EcoRI* e *SacI* do vetor bacteriano pET-28a(+) (Novagen®) que codificam respectivamente a GFP5 e o scFv anti – LDL (-).

Com o objetivo de inserir o linker de (Gly₄Ser)₃ entre os domínios da quimera, buscou-se localizar um sítio de restrição no plasmídeo pET-GFP5-scFv, que possibilitasse a inserção da sequência codificadora para o peptídeo.

Este sítio deveria localizar-se entre as regiões *EcoRI* e *SacI* ou no início do sítio *SacI*. Após o mapeamento do vetor, foi possível localizar um sítio de *PstI* no início do sítio *SacI*. A partir daí, foram iniciados os procedimentos para a digestão do plasmídeo no sítio de *PstI*.

O resultado apresentado no processo de digestão do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima de restrição *PstI*-HF demonstrou uma digestão parcial do vetor no sítio de *PstI*. Armstrong e Bauer, em 1982, observaram que a endonuclease *PstI* pode apresentar uma resistência significativa para clivar o sítio de restrição *PstI*. Nesse estudo, foi demonstrado que a enzima apresenta uma certa resistência ao corte em sítio de restrição flanqueado pelas bases guanina e citosina. É sabido que o sítio de *PstI* do vetor pET-GFP5-scFv é flanqueado pelas bases guanina e citosina, e possivelmente a presença dessas bases nessa posição, interferiram na ação da endonuclease *PstI*.

Para confirmar a resistência ao corte no sítio de *PstI* do vetor pET-GFP5-scFv quando incubado com a enzima de restrição *PstI*-HF realizou-se uma digestão com a enzima *XhoI*. Essa estratégia resultou na digestão completa do plasmídeo. Assim, após a incubação do vetor pET-GFP5-scFv circularizado com as endonucleases *PstI* e *XhoI*, foi observada uma diferença nos seus perfis eletroforéticos, havendo uma migração anômala do vetor incubado com *PstI*. O vetor incubado com esta enzima apresentou uma migração eletroforética sugestiva de vetor parcialmente digerido. Já o vetor incubado com *XhoI* apresentou uma migração eletroforética característica de vetor totalmente digerido (linearizado). Este resultado reforça a hipótese de que as bases de guanina e citosina localizadas aos flancos do sítio de restrição *PstI*, possivelmente interferiram na ação da enzima *PstI*-HF.

A etapa final do trabalho foi dedicada à avaliação dos efeitos da GFP5-scFv anti-LDL (-) sobre os macrófagos. A proteína verde fluorescente – GFP possui várias propriedades favoráveis ao seu uso, incluindo baixa toxicidade, fácil visualização e quantificação (Chalfie et al., 1994). Diante deste achado na literatura, buscou-se investigar se a proteína recombinante GFP5-scFv anti-LDL (-) seria segura para uso *in vitro* nos estudos com macrófago. Através dos resultados obtidos com macrófagos RAW 264.7 observou-se inicialmente que a GFP5 livre, nas concentrações, de 25 µg/mL a 0,04 µg/mL, não provocou morte celular após ser incubada com estas células. Este experimento permitiu

identificar a baixa toxicidade da GFP5, de forma parecida à de outro estudo descrito na literatura (Person et al., 1998). Kazuma, em 2010, demonstrou que macrófagos RAW 264.7 expostos ao fragmento variável de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scFv anti-LDL-) permaneceram viáveis, utilizando-se a técnica de redução do MTT.

Neste trabalho estudamos o efeito do PSS sobre a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7. Tivemos um interesse em particular pelo PSS, pois uma característica fundamental deste material é evitar a agregação da GFP5-scFv anti-LDL (-) durante o processo de produção da proteína. A avaliação da toxicidade do PSS sobre as células demonstrou que o PSS foi tóxico nas concentrações, de 20 a 5 μ M, não apresentando toxicidade nas concentrações, de 2,5 a 0,04 μ M. Assim utilizou-se a concentração de PSS igual a 1,0 μ M nos quais os macrófagos foram expostos a solução de GFP5-scFv anti-LDL (-).

O estudo de segurança do uso da GFP5-scFv anti-LDL (-) incluiu a análise de viabilidade celular pelo método de redução do MTT e pela técnica de citometria de fluxo. Utilizando o método de redução do MTT investigamos o efeito da proteína GFP5-scFv anti-LDL (-) em diferentes concentrações (0,04 μ g/mL a 25 μ g/mL). Neste ensaio, os resultados demonstraram que a quimera não é citotóxica. No ensaio de citometria de fluxo, semelhante aos resultados encontrados no ensaio de redução do MTT, a presença da GFP5-scFv anti-LDL (-), nas diferentes concentrações estudadas (50 μ g/mL a 1 μ g/mL), não reduziu a viabilidade dos macrófagos quando comparado ao controle. Vale ressaltar, que o presente estudo é importante porque ainda não se tem trabalhos publicados que avaliem a citotoxicidade da GFP fusionada ao fragmento variável de cadeias única.

A partícula de LDL (-) exerce um papel importante na iniciação e na progressão da placa aterosclerótica (Mello et al., 2011). Os experimentos envolvendo os efeitos da LDL (-) e LDL nativa sobre a formação de células espumosas demonstraram que os macrófagos RAW 264.7 quando tratados apenas com LDL (-) apresentaram aumento do acúmulo intracelular de lipídeos em relação àqueles tratados com a LDL nativa.

Através da padronização do ensaio de captação de LDL (-) foi possível demonstrar que partículas de LDL (-) poderiam formar células espumosas. Sendo assim, buscou-se avaliar o efeito da GFP5-scFv anti-LDL(-) em cultura

de células incubadas com LDL (-). Com esse experimento, foi comprovado que a quimera nas concentrações, de 1 µg/mL a 50 µg/mL, não é capaz de inibir a formação das células espumosas.

Diante dos resultados obtidos, tentou-se investigar se a GFP5-scFv anti-LDL (-) era capaz de ser internalizada pelo macrófago estando ligada à LDL (-), uma vez que a GFP5-scFv anti-LDL (-) não impedia a captação da LDL (-) isolada e a formação da célula espumosa. Em nossos experimentos com microscopia confocal, pode-se comprovar que os dois componentes, tanto a LDL (-) como a GFP5-scFv anti-LDL (-), foram captados pelas células RAW 264.7.

Os receptores *scavenger* são moléculas de reconhecimento padrão, expressas na superfície dos macrófagos, que se ligam e medeiam a endocitose de alguns microrganismos bem como das partículas modificadas de LDL (Moore e Freeman, 2006). A confirmação da captação de LDL (-) pelos macrófagos tratados com GFP5-scFv anti-LDL (-) é um resultado de difícil interpretação, porém pode estar relacionado à interação do complexo antígeno-anticorpo com os receptores *scavenger*. Se for este o caso, ter-se-ia uma ferramenta de investigação para avaliar e monitorar a captação de LDL (-) pelos macrófagos. Outra hipótese para a internalização da LDL (-) e da GFP5-scFv anti-LDL (-), seria a fagocitose destas partículas pelos macrófagos.

Devido aos problemas de enovelamento da GFP5-scFv anti-LDL (-), estamos trabalhando com a proposta de substituição da GFP da quimera pelo marcador proteico chamado SNAP-tag. O SNAP-tag tem 20 kDa, sendo derivado da proteína humana de reparo de DNA O⁶-alquilguanine-DNA alquiltransferase que reage específica e rapidamente com derivados de benzilguanina, levando à marcação covalente do SNAP-tag a sondas sintéticas, aí incluídas uma variedade de fluoróforos (Cole e Donaldson, 2012). Esta tecnologia tem sido aplicada numa variedade de sistemas experimentais, como: marcador fluorescente no desenvolvimento de biossensores e em algumas estratégias terapêuticas (Kampmeier et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

A GFP5-scFv anti-LDL (-) foi expressa em corpos de inclusão na *E. coli* BL21DE3. O emprego dos procedimentos de renaturação recuperou esta proteína recombinante na forma ativa. Além disso, a purificação por cromatografia de afinidade e o procedimento de diálise, permitiram obter a químera com um nível satisfatório de pureza.

A GFP5-scFv anti-LDL (-) apresentou reatividade pela LDL (-) sem apresentar reatividade cruzada pela LDL nativa.

O ensaio de fluorescência para determinação de LDL (-) utilizando a proteína GFP5-scFv anti-LDL (-), não apresentou sensibilidade na faixa de concentração utilizada.

A avaliação dos efeitos da GFP5-scFv anti-LDL (-) sobre os macrófagos demonstrou baixa toxicidade desta proteína recombinante em células RAW 264.7.

A GFP5-scFv anti-LDL (-) não inibiu a formação de células espumosas a partir de macrófagos RAW 264.7.

Resultados preliminares permitiram identificar a captação da LDL (-) e da GFP5-scFv anti-LDL (-) pelos macrófagos, o que justifica a continuidade destes estudos.

Referências bibliográficas

ABBAS, A. K. e LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSON, G. K. Adaptative immunity and atherosclerosis. **Clinical Immunology**, v.134, p. 33-46, 2010.

ANDY, N.D. et al. Principles of Instrumentation. Em: HENRY, J.B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**, 20º ed. New York, 2008. p. 70-90.

ARMSTRONG, K. e BAUER, W.R. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease PstI. **Nucl. Acids Res.**, v.10, p. 993-1006, 1982.

AVOGARO, P.; GB, BON; CAZZALATO, G. Presence of a Modified Low Density Lipoprotein in humans. **Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 8, p.79-87, 1988.

BANCELLES, C. et al. Immunochemical analysis of the electronegative LDL subfraction shows that abnormal N-terminal apolipoprotein B conformation is involved increased binding to proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p.1125-1133, 2010.

BENÍTEZ, S. et al. Platelet activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low density lipoprotein subfraction. **Circulation**, v.108, p. 92-96, 2003.

BENÍTEZ, S. et al. Impaired binding affinity of electronegative low density lipoprotein to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. **Biochemistry**, v.43, p.15863-15872, 2004.

BENÍTEZ, S. et al. Wide proinflammatory effect of electronegative low density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. **Biochim. Biophys. Act.**, v.1761, p. 1014-1021, 2006.

BERG, J. M. et al. **Biochemistry**, 5º ed. New York: W H Freeman, 2002.

CARDINALE, A.; FILESI, I.; BIOCCA S. Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments. **Eur. J. Biochem.**, v.288, p. 268-277, 2001.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHEN, L. et al. Expression, purification, and in vitro refolding of a humanized single-chain Fv antibody against human CTLA4 (CD152). **Protein. Expr. Purif.**, v.46, p. 495-502, 2006.

COBBE, S.M. e SHEPHERD, J. Cholesterol reduction in the prevention of coronary heart disease: therapeutic rationale and guidelines. **Br. Heart J.**, v.69, p.63-69, 1993.

COLE, N. B. e DONALDSON, J. G. Releasable SNAP-tag probes for studying endocytosis and recycling. **ACS Chem. Biol.**, v. 7, p. 464-469, 2012.

DE CASTELLARNAU, C. et al. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 2281-2287, 2000.

DIDIER, P. et al. Femtosecond spectroscopy probes the folding quality of antibody fragments expressed as GFP fusions in the cytoplasm. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.366, p.878–884, 2008.

FAULIN, T. E. S. **Desenvolvimento de imunoensaios e biossensores para determinação de LDL eletronegativ**, 134 f. Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAULIN, T. E.S. et al. Role of electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin. Lipidol.**, v.5, p.1-11, 2010.

GIMBRONE, M. A. Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. **Thromb. Haemost.**, v.82, p. 722-726. 1999.

GLEISSNER, C. A.; LEITINGER, N.; LEY, K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. **Hypertension**, v.50, p.276-283, 2007.

GOLDSTEIN, J. L e BROWN, M.S. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v.46, p.897-930, 1977.

HAGEMEYER, C. E et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. **Thromb. Haemost.**, v.101, p.1012-1019, 2009.

HOOGENBOOM, H.R. & WINTER, G. By-passing immunization human antibodies from synthetic repertoires of germeline VH gene segments rearranged *in vitro*. **J. Mol. Biol.**, v. 227, p.381-388, 1992.

HUSTON, J.S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v.85, p.5879, 1988.

JANG, S. et al. Scavenger Receptor Collectin Placenta 1 (CL-P1) Predominantly Mediates Zymosan Phagocytosis by Human Vascular Endothelial Cells. **J. Biol. Chemistry.**, v.284, p.3956-3965, 2009.

KAMPMEIR, F. et al. Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-Alkylguanine DNA Alkyltransferase. **Bioconjugate Chem.**, v. 20, p. 1010-1015, 2009.

KAZUMA, S. M. **Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (scFv) em *Pichia pastoris* e seu efeito sobre a formação de células espumosas**, 125 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KZHYSHKOWSKA, J.; NEYEN, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. **Immunobiology**, v. 217, p.492-502, 2012

LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature Medicine**, v. 420, P.19-26, 2002.

LOBO, J. et al. Electronegative LDL and lipids abnormalities in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. **Nephron. Clin. Pract.**, v.108, n.4, p.289-304, 2008.

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

LUSIS, A. J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of Atherosclerosis. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v.5. P.89-218, 2004.

MELLO, Q. PA. et al. Electronegative low density lipoprotein: origin and impact on health and diseases. **Atherosclerosis**, v. 215, p. 257-265, 2011.

MOORE, K. J e FREEMAN, M. W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis. **Atheroscler Thromb Vasc Biol.**, v.26, p. 1702-1711, 2006.

PERSON, D. A. et al. Use of the green fluorescent protein as a marker to identify and track genetically modified hematopoietic cells. **Nature Medicine**, v. 4, p. 1201-1205, 1998.

PLUNCKTHUN, A. Antibody engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. **Biotechnology**, v.9, p.545-550, 1991.

PORTER, R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. **Biochem. J.**, v.73, p. 119-126, 1959.

PORTER, R. R. Estrutural studies of immunoglobulins. **Science**, v. 180, p. 713-716, 1973.

QUINTÃO, E. C. R. et al. **Lípidos do metabolismo à aterosclerose**, 1^o ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature Medicine**, v.362, p. 801-809, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis an inflammatory disease. **New England Journal Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

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

SAKAMOTO, S. et al. Development of sensitivity-improved fluorescence-linked immunosorbent assay using a fluorescent single-domain antibody against the bioactive naphthoquinone, plumbagin. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 396, p. 2955-2963, 2010.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. **Diabetologia**, v. 39, p. 1469-1476, 1996.

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

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L.; BENÍTEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. **Current Opinion in Lipidology**, v. 15, p. 329-335, 2004.

SHEN, Z. et al. Recombinant antibody piezoimmunosensors for the detection of cytochrome P450 1B1. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 1283-1289, 2008.

SHIMOMURA, O. Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture). **Angew. Chem.**, v.48, p. 5590 – 5602, 2009.

SIEMERING, K. R. et al. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. **Current Biology**, v.6, p.1653-1663, 1996.

SKERRA, A. e PLUNCKTUN, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. **Science**, v.240, p. 1038, 1988.

TSIEN, R, Y. The green fluorescent protein. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p.509-544, 1998.

URAKAMI, E. et al. Immunomodulation of gibberellins biosynthesis using an anti-precursor gibberellins antibody confers gibberellins-deficient phenotypes. **Planta**, v. 228, p.863-873, 2008.

URSINI, F. et al. Atherosclerosis: another protein misfolding disease?. **Trends Mol Med.**, v. 8, p. 370-374, 2002.

ZIMMER, M. GFP: fro, jellyfish to the Nobel prize and beyond. **Chem. Soc. Rev.**, v.38, p. 2823-2832, 2009.

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

WACHTER, R, M. The family of GFP-Like proteins: Structure, Function, Photophysics and Biosensor applications. Introduction and Perspective. **Photochem. Photobiol.**, v.82, p. 339-344, 2006.

WEISSER, N. E e CHRISTOPHER HALL, J. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnol. Adv.**, v.27, p. 502-520, 2009.

WITZTUM, J.L e STEINBERG, D. Role of oxidized low denisity lipoprotein in atherogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1785-1792, 1991.

WORLD-HEALTH-ORGANIZATION–WHO.<http://www.who.int/ncd/cvd/index.htm>.

Anexo

Soluções utilizadas no isolamento de LDL eletronegativa

Tampão A

Tris-HCl 10 mmol/L

EDTA 1 mmol/L

O pH foi ajustado para 7,4

Tampão B

Tris-HCl 10 mmol/L

NaCl 1 mmol/L

EDTA 1 mmol/L

O pH foi ajustado para 7,4

Meios de cultura para *Escherichia coli*

Meio LB

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

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

NaCl 1,0% (p/v)

Água miliQ q.s.p

Após solubilização, o pH foi ajustado para 7,0

Meio TFB

KCl 0,745% (p/v)

CaCl₂ 0,73% (p/v)

Acetato de potássio 0,98% (p/v)

Glicerol 10% (v/v)

Água miliQ q.s.p

Após solubilização, o pH foi ajustado para 6,2

Meio ágar LB

Ágar bacteriológico 1,4% (p/v)

Ágar LB q.s.p

Solução para lise da *E.coli*

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 200 mM

PMSF 1 mM

EDTA 5 mM

Lisozima 150 µg/mL

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 7,4

Soluções para desnaturação e renaturação da GFP5-scFv anti-LDL (-)**Solução desnaturante**

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 200 mM

Imidazol 30 mM

Uréia 7 M

β-mercaptoetanol 20 mM

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 8,5

Soluções renaturante**Solução 1**

NaCl 200mM

NaH₂PO₄ 20mM

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 7,4

Solução 2

NaCl 200mM

NaH₂PO₄ 20mM

Arginina 400 mM

Glutathiona oxidada 500 μM

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 7,

Soluções para purificação da GFP5-scFv anti-LDL (-) em resina de níquel**Tampão de ligação**

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 200 mM

Imidazol 30 mM

Uréia 7 M

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 7,4

Tampão de eluição

NaH₂PO₄ 20 mM

NaCl 200 mM

Imidazol 500 mM

Uréia 7 M

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 7,4

Soluções utilizadas em eletroforese de gel SDS-PAGE**Tampão de corrida**

Tris Base 3,03% (p/v)

Glicina 1,44% (p/v)

SDS 1,0% (p/v)

Água miliQ q.s.p

O pH foi ajustado para 8,3

Tampão de amostra 2x

Tris pH 6,8

SDS 4%

Glicerol 20%

Bromofenol 2%

B-mercaptoetanol 5%

Soluções para coloração de gel por *Comassie Brilliant Blue*

Solução corante

Etanol 30% (p/v)

Ácido Acético 10% (v/v)

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

Solução descorante

Etanol 30% (v/v)

Ácido Acético 10% (v/v)

Soluções utilizadas nos ensaios imunológicos

Tampão PBS 10x

Na₂HPO₄.H₂O 1,32% (p/v)

KH_2PO_4 0,2%

NaCl 1,6%

KCl 0,2 %

O pH foi ajustado para 7,4

*Concentração de uso 1x

PBST (PBS-Tween 0,01%)

PBS 1x contendo 0,01% de Tween

O pH foi ajustado para 7,4

PBST (PBS-Tween 0,05%)

PBS 1x contendo 0,05% de Tween

O pH foi ajustado para 7,4

Solução utilizada em eletroforese de gel de agarose

Tampão de corrida para gel de agarose (TAE 50x)

Tris Base 2,42% (p/v)

Ácido Acético Glacial 5,71% (v/v)

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

*Concentração de uso 1x

Solução para o cultivo das células RAW 264.7**Meio RPMI**

NaHCO₃ 2 gramas

HEPES 4,68 gramas

RPMI 1 envelope

Anti-anti 10 mL

Água miliQ q.s.p 1L

Após preparo a solução foi filtrada (filtro 0,22µM)

Solução para coloração de células por Oil Red**Solução estoque de Oil Red**

Oil Red 0,5%

Diluído em isopropanol

Solução de trabalho de Oil Red

Solução estoque 6 mL

Diluído em 6 mL de água destilada. Após o preparo a solução foi filtrada em papel filtro Whatman®.

Solução de fixação das células

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

Fls. nº 65
CEP/HU-USP

São Paulo, 16 de julho de 2010.

Il^{ma}(a), S^{ra}(a).

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Desenvolvimento de biosensor com nanocompósitos funcionalizados com anticorpos recombinantes para detecção de LDL eletronegativa” - **Pesquisador(a), Responsável:** Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla - **Co-Investigador(es):** Daniel Ferreira Guilherme - **Registro CEP-HU/USP:** 1016/10 – **SISNEP CAAE:** 0047.0.198.000-10.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 16 de julho de 2010, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra “c”.

O primeiro relatório está previsto para 16 de julho de 2011.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Desenvolvimento de Biossensor com nanocompósitos funcionalizados com anticorpos recombinantes para detecção de LDL eletronegativa

Prezado(a) participante:

Sou aluno do curso de Pós-graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estou realizando uma pesquisa sob supervisão da professora Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, cujo objetivo é desenvolver uma técnica que possa ser utilizada para dosar uma fração modificada do colesterol sanguíneo (LDL-), uma vez que já foi demonstrado que existe uma correlação direta entre os níveis dessa fração (LDL-) e o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Sua participação envolve a coleta de sangue.

A participação nesse estudo é voluntária e se você decidir não participar ou quiser desistir de continuar em qualquer momento, tem absoluta liberdade de fazê-lo.

Na publicação dos resultados desta pesquisa, sua identidade será mantida no mais rigoroso sigilo. Serão omitidas todas as informações que permitam identificá-lo(a).

Mesmo não tendo benefícios diretos em participar, indiretamente você estará contribuindo para a compreensão do fenômeno estudado e para a produção de conhecimento científico.

Quaisquer dúvidas relativas à pesquisa poderão ser esclarecidas pela pesquisadora Dulcinéia Saes Parra Abdalla fone (11) 30913637 ou pelo aluno Daniel Ferreira Guilherme (11) 30919297.

Atenciosamente

Nome e assinatura do(a) estudante
Matrícula:

Local e data

Nome e assinatura do(a) professor(a) supervisor(a)/orientador(a)
Matrícula:

Consinto em participar deste estudo e declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento.

Nome e assinatura do participante

Local e data

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

Of.CIBio/0372010/FCF

São Paulo, 02 de setembro de 2010

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Produção de GFP5-scFv para desenvolvimento de um imunossensor para determinação de LDL(-) baseado no rompimento de FRET entre nanocristais semicondutores e GFP5-scFv".

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

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

Atenciosamente,

YARA MARIA LIMA MARDEGAN
Membro da CIBio

Ilma. Sra.

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

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

Ministério da Ciência e Tecnologia

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 2.538/2010

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 134ª Reunião ordinária da CTNBio, realizada em 24 de junho de 2010, a CTNBio aprovou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.003570/1998-08

Requerente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

CQB: 090/98

Assunto: Solicitação de Extensão de CQB / NB-1

Data de Protocolo: 27/04/10

Préto: 16151/10

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

Decisão: DEFERIDO

O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da instituição solicitou a extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança nº 090/98, para credenciar o Laboratório de Bioquímica Clínica - Nível de Biossegurança I para pesquisa em regime de contenção, transporte, descarte, ensino e armazenamento de microrganismos geneticamente modificados da classe de risco I. Foi enviada na documentação a declaração do responsável legal, planta baixa, descrição pormenorizada das instalações e informações relativas à biossegurança. Trata-se de anexação de uma área de 35,61 m², constituindo o Laboratório referido acima, de nível NB 1, nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, para extensão do CQB. Será destinada no momento à realização de 3 projetos envolvendo o estudo da expressão de uma proteína recombinante denominada GFP5-actv em bactéria que será usada para estudo imunológico do LDM. eletrocardiográfico, que pode ser útil na terapêutica da aterosclerose, entre outras alternativas. Foi anexada planta física do local, bem como a extensa lista de equipamentos que serão utilizados.

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

A CTNBio esclarece que este caso não exige o cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis no objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares em solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria Executiva da CTNBio.

EDILSON PAIVA

II - Processo n.º 01200.003570/98-08.

Interessado: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP.

CGC: 63.025.530/0015-00.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", CEP: 05508-900, São Paulo - SP. Telefone: (011) 818-3678; Fax: (011) 211-8986.

Assunto: Solicitação de Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB.

Decisão: Deferido, ficando atestada a idoneidade técnico-científica da Instituição requerente, assim como suas instalações, para as atividades de pesquisa em regime de contenção, ensino, transporte, armazenamento e descarte com microrganismos geneticamente modificados, definidos pela requerente de acordo com o Anexo I, da Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, como organismos do Grupo I. A CTNBio esclarece que, para as atividades de pesquisa em regime de contenção com microrganismos geneticamente modificados, a requerente deverá observar as normas estabelecidas pela Instrução Normativa nº 7, da

CTNBio, publicada no Diário Oficial da União de 09.06.97, Seção 1, páginas 11.827 a 11.833. A CTNBio esclarece, ainda, que a realização de atividades com OGM do Grupo II ficará na dependência de visita prévia, efetuada pela CTNBio, às instalações onde o trabalho deverá ser executado.

CQB nº 0090/98.