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

**Amilóide sérica A (SAA): produção da proteína recombinante
humana SAA1 e SAA4 e sua expressão nativa em células do
tecido adiposo submetidas à hipóxia**

Edson Mendes de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Campa

São Paulo
2011

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

**Amilóide sérica A (SAA): produção da proteína recombinante
humana SAA1 e SAA4 e sua expressão nativa em células do
tecido adiposo submetidas à hipóxia**

Edson Mendes de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Campa

São Paulo
2011

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

O48a	<p>Oliveira, Edson Mendes de</p> <p>Amilóide sérica A (SAA): produção da proteína recombinante humana SAA1 e SAA4 e sua expressão nativa em células do tecido adiposo submetidas à hipóxia / Edson Mendes de Oliveira. -- São Paulo, 2011.</p> <p>133p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Ana, Campa</p> <p>1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Obesidade : Fisiologia : Doenças metabólicas I. T. II. Ana, Campa, orientador.</p> <p style="text-align: right;">616.0756 CDD</p>
------	---

Edson Mendes de Oliveira

Amilóide sérica A (SAA): produção da proteína recombinante
humana SAA1 e SAA4 e sua expressão nativa em células do tecido
adiposo submetidas à hipóxia

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Ana Campa
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Escolhe um trabalho de que gostes, e não
terás que trabalhar nem um dia na tua vida.
Confúcio.

Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.

Aristóteles.

Dedico esse estudo à minha querida mamãe,
que sem dúvida alguma, é a pessoa que mais
sentiria orgulho de mim.

Ao meu pai, obrigado por nem ao menos
titubear ao falar:

- Se é isso o que você quer, então eu apoio.

Obrigado pelo apoio incondicional.

Ao meu grande amor, obrigado por caminhar
ao meu lado nessa jornada, juntos, um
ajudando o outro quando necessário, e
buscando sempre.....
mais dinheiro para pagar as contas no final do
mês!

A Professora Ana Campa, pela oportunidade, pela orientação, pela amizade, pelas risadas dadas, por ser um exemplo em que me espelho, e acima de tudo, pelosinhos concedidos.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Bioquímica Clínica, pela ajuda dada, a risada estampada e a espada empunhada. Somos como uma família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Irene Soares e todos do laboratório de Parasitologia Clínica, por sempre me receberem tão bem e me ajudarem.

À todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por permitirem que o nosso trabalho do dia a dia aconteça.

À todos os meus amigos da UEL, que sempre me apoiaram e me fizeram acreditar que sou capaz.

Aos meus amigos mais antigos, Marcus, Julia e Lucas, que também estão na batalha e que me apóiam sempre.

Ao Professor Water Okano e Wainy Okano, por acreditarem no meu sonho e fazerem de tudo para que se torne real, e acima de tudo, acreditarem na Educação.

À minha família, tios, tias, primos, parentes distantes e agregados, que me dão o apoio necessário para continuar apostando nessa carreira que escolhi.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Amilóide sérica A (SAA).....	23
2.2 Importância biológica da proteína amilóide sérica A (SAA)	25
2.3 Tecido adiposo, inflamação e SAA	28
2.4 Hipóxia e obesidade	32
2.5 Proteínas recombinantes	33
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Escolha do plasmídeo.....	42
4.2 Transformação para DH5- α	43
4.3 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (“medium prep”)	44
4.4 Análise de integridade do DNA.....	45
4.5 Sequenciamento	45
4.6 Expressão da proteína recombinante	46
4.7 Solubilização da proteína recombinante	46
4.8 Purificação da proteína recombinante humana A-SAA1 e C-SAA4.....	47
4.9 Western Blotting para A-SAA1 e C-SAA4.....	48
4.10 Casuística	49
4.11 Coleta do material.....	50
4.12 Otimização do processo de isolamento de adipócitos	50
4.13 Cultivo celular de pré-adipócitos 3T3-L1.....	52
4.14 Ensaio de estimuação de adipócitos humanos por A-SAA.....	53
4.15 Determinações de citocinas.....	54
4.16 Citometria de fluxo	54
4.17 Ensaio de MTT	55
4.18 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)	56
4.19 Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	57
4.19.1 Sistema de detecção SYBR [®] Green	57
4.19.2 Sistema de amplificação TaqMan [®]	58
4.20 Ensaio de Hipóxia	59
4.21 Análise Estatística	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Produção da proteína recombinante humana amilóide sérica A (SAA) 1 e 4.....	64
5.1.1 Resultados.....	64
5.1.2 Discussão	74
5.1.3 Conclusão	75
5.2 Avaliação da expressão e produção da amilóide sérica A (SAA) em pré-adipócitos 3T3-L1 e adipócitos humanos submetidos à hipóxia.	77
5.2.1 Resultados.....	77
5.3 Papel da amilóide sérica A (SAA) na liberação de proteínas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β) em adipócitos humanos.....	101
5.3.1 Resultados.....	101

5.4 Discussão	104
5.5 Conclusão.....	110
6. BIBLIOGRAFIA	113
7. ANEXOS	122

LISTA DE ABREVIATURAS

aP2	proteína ligadora de ácidos graxos
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
CCL20	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CCR2	<i>chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
CD36	receptor <i>scavenger</i>
cDNA	DNA complementar
CS	soro de bezerro (<i>calf serum</i>)
Ct	ciclo de <i>threshold</i>
DEX	dexametasona
DMEM	<i>dulbecco's modified Eagle's</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
ELISA	<i>enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FPR2	<i>formyl-peptide receptor 2</i>
GLUT-1	transportador de glicose 1
GLUT-4	receptor de glicose tipo 4
GST	glutathione S-transferase
HDL	lipoproteína de alta densidade
HIF-1	fator induzível por hipóxia 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> – peroxidase de raiz de rábano

IBMX	isobutilmetilxantina
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	receptor do IGF-1
IL	interleucina
IL-1 β	interleucina-1 β
IL-1	interleucina-1
IL-1ra	receptor antagonista para interleucina 1
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IMC	índice de massa corporal
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactosidase
LB	meio <i>Luria Broth</i>
LPS	lipopolissacarídeo
M1	macrófagos classicamente ativados
M2	macrófagos residentes
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDI	meio de diferenciação
MIF	fator de inibição de migração de monócitos
MMP	metaloproteinases
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NF κ B	fator nuclear κ B
NO	óxido nítrico
NOS2	óxido nítrico sintase 2
PAI-1	inibidor de ativação de plasminogênio 1
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	phenylmethysulfonyl fluoride
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio
rSAA	SAA recombinante
RT	transcriptase reversa
SAA	amilóide sérica A
SFB	soro fetal bovino
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TLR	receptor <i>Toll-Like</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
VEGF	fator de crescimento de endotélio vascular

OLIVEIRA, Edson Mendes. **Amilóide sérica A (SAA): produção da proteína recombinante humana SAA1 e SAA4 e sua expressão nativa em células do tecido adiposo submetidas à hipóxia**. 2011. 133p. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Área Análises Clínicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RESUMO

Visando novos estudos com a proteína amilóide sérica A (SAA), propusemos a produção de seu recombinante humano em *Escherichia coli*, mais especificamente, a isoforma encontrada na fase aguda (A-SAA1) e da constitutivamente expressa (C-SAA4). Realizamos a expressão, identificação e purificação das proteínas recombinantes. Concomitantemente, também avaliamos o efeito da hipóxia na expressão e produção da proteína SAA nativa em linhagens de pré-adipócitos murinos 3T3-L1, não diferenciados e diferenciados e adipócitos humanos. Aparentemente quanto maior o grau de diferenciação celular, maior a expressão e produção da proteína. Para os adipócitos humanos, o perfil de expressão de mRNA da SAA mostra que SAA1>SAA2>SAA4 nas relações 500:150:1. Na hipóxia, há um aumento na expressão de SAA, entretanto não associamos esta expressão a um aumento da concentração da proteína. A importância do reconhecimento de que SAA pode ser umas das proteínas induzidas pela hipóxia em adipócitos é discutida em relação ao seu papel pró-inflamatório.

Palavras chaves: Adipócito. Hipóxia. Pré-adipócito 3T3-L1. Proteína recombinante. SAA.

OLIVEIRA, Edson Mendes. **Serum amyloid A (SAA): production of recombinant human protein SAA1 and SAA4 and its native expression on adipose tissue cells submitted to hypoxia.** 2011. 133p. Dissertation (Master Degree in Clinical Chemistry) – University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2011.

ABSTRACT

In order to provide more complex studies with the protein serum amyloid A (SAA), this study proposed the production of its human recombinant in bacteria (*Escherichia coli*), more specifically, the synthesis of the main isoform found in the acute phase (A-SAA1) and the constitutively expressed (C-SAA4). The expression, identification and purification of the recombinants proteins was performed. Concurrently, we also did a study evaluating the effect of hypoxia in the expression and protein production of native SAA in undifferentiated and differentiated murine preadipocytes 3T3-L1 and humans adipocytes. Apparently, the protein expression and production increases with the cell differentiation degree. For human adipocytes, we demonstrated the mRNA expression profile of SAA, in which SAA1 > SAA2 > SAA4 (500:150:1). In hypoxia, there is an increased expression of SAA, but we could not link it to an increase of protein concentration. The importance of recognizing that SAA may be one of the proteins induced by hypoxia in adipocytes is discussed in relation to the proinflammatory role of this protein.

Key words: SAA. 3T3-L1 preadipocytes. Recombinant protein. Adipocyte. Hypoxia.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Até a década de 70, o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado. Sua sequência de nucleotídeos de enorme tamanho e monotonia química eram geralmente analisadas por meios indiretos como a sequência de proteínas e análise genética. Novas técnicas foram desenvolvidas permitindo o isolamento e o uso de genes específicos num processo chamado de clonagem gênica.

As técnicas de clonagem gênica trouxeram vários avanços na ciência e tecnologia. Uma de interesse especial neste estudo é a tecnologia do DNA recombinante. Nosso objetivo foi obter recombinantes humanos da proteína amiloide sérica A (SAA). Nestes últimos anos a SAA tem sido associada com diversos processos fisiológicos e doenças, entretanto, até o momento, somente uns poucos trabalhos descrevem sua obtenção através da tecnologia de proteínas recombinantes. Comercialmente, o que temos a disposição é uma proteína heteróloga sintetizada em bactéria (*Escherichia coli*). O custo excessivo da proteína comercial (US\$1.400,00, por 1 mg de SAA recombinante), disponibilizada apenas por um produtor/fornecedor (Peprtech[®]), é uma limitação importante para os estudos a cerca das atividades biológicas da proteína. Além disso, a única SAA comercializada é a de fase aguda (A-SAA), não sendo disponível a C-SAA4, isoforma dada como constitutiva, que permanece sem função biológica conhecida.

Visando aumentar a viabilidade de propostas mais complexas de estudo com SAA, o projeto propôs a produção de seu recombinante humano em bactéria (*Escherichia coli*). Mais especificamente, a produção da principal isoforma encontrada na fase aguda (A-SAA1) e da constitutiva (C-SAA4).

Concomitantemente à produção da proteína recombinante humana amiloide sérica A (SAA) 1 e 4, também realizamos um estudo avaliando o efeito da hipóxia na expressão e produção da proteína SAA nativa em linhagens de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 não diferenciados e diferenciados e de adipócitos humanos. As razões para este estudo foram: o reconhecimento da hipóxia como um dos elementos da obesidade e a associação existente entre obesidade e aumento da produção de SAA pelo adipócito.

A hipótese deste trabalho foi a de que modificações na expressão e produção de SAA estivessem entre as modificações induzidas pela hipóxia. Dada a característica pró-inflamatória desta proteína, ela poderia ser um elemento de associação entre hipóxia no tecido adiposo e inflamação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Amilóide sérica A (SAA)

A proteína amilóide sérica A (SAA) pertence a família das apolipoproteínas produzidas em todos os vertebrados estudados até o momento, especialmente inúmeras espécies de mamíferos incluindo o homem, camundongo, hamster, cachorro, coelho, vaca, ovelha e cavalo. O alto grau de conservação dos genes SAAs, que vem sendo mantido através da evolução dos mamíferos placentários, se estendendo a outros vertebrados incluindo marsupiais e peixes, corroboram com a evidência de possuírem importantes funções biológicas.

Em humanos, a família das SAAs inclui uma série de genes que são intimamente relacionados, mas diferentemente regulados, apresentando quatro genes distintos, localizados no braço curto do cromossomo 11p15.1 (Sellar, Jordan *et al.*, 1994; Sellar, Oghene *et al.*, 1994), como observado na figura abaixo (Figura 01).

Figura 01. Desenho esquemático da localização dos genes SAA1, SAA2, SAA3 e SAA4. Os genes citados estão localizados no braço curto do cromossomo 11p15.1, representado pela seta amarela.

Os genes induzíveis *SAA1* e *SAA2* especificam as duas SAAs de fase aguda (A-SAA1 e A-SAA2), cuja expressão e síntese são induzidas em resposta a um estímulo pró-inflamatório (Jensen e Whitehead, 1998), codificando 104 aminoácidos, moldada numa proteína de 12,5 KDa e de 93% de identidade em sua sequência de aminoácidos. Um terceiro gene, chamado de *SAA3*, que apresenta 71% de identidade com *SAA1* e *SAA2*, é conhecido tanto como um pseudogene ou como gene cuja condição de indução e/ou tipo celular para a expressão de *SAA3* ainda não foram testadas (Sellar e Whitehead, 1994). Há um único relato na literatura da expressão do gene *SAA3* por células epiteliais da glândula mamária após indução por prolactina (PRL) ou lipopolissacarídeo (LPS) (Larson, Wei *et al.*, 2003). A SAA constitutiva (C-SAA) é mais um membro da família das SAAs (Whitehead, Debeer *et al.*, 1992), sendo o produto do gene *SAA4* (Steel, Sellar *et al.*, 1993). A C-SAA4 se difere das A-SAA (fase aguda) no que se diz respeito à cadeia peptídica, sendo oito aminoácidos mais longa, e mostrando uma identidade de apenas 55% em comparação as A-SAAs. Além disso, C-SAA4 provavelmente possui uma modificação pós-traducional, uma glicosilação em um único ponto, no aminoácido asparagina (N), número 76 na cadeia polipeptídica da proteína (Whitehead, Debeer *et al.*, 1992). Ainda, a *SAA4* representa cerca de 90% do total da SAA em situações de homeostase (Steel, Sellar *et al.*, 1993).

Apesar de a SAA ter sido seqüenciada em várias espécies, não há um número considerável de estudos referentes à sua estrutura. Sabe-se que a SAA apresenta uma região α -hélice amino terminal, o que permite sua ligação com a lipoproteína de alta densidade (HDL) (Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000). Além da associação da SAA com a HDL ser uma forma de transporte

plasmático, acredita-se que esta ligação seja importante para manter a SAA inativa durante o seu transporte. A SAA dissociada da HDL atua como um potente estímulo para as células inflamatórias (Furlaneto, Ribeiro *et al.*, 2002), caracterizando a HDL como um transportador seguro da SAA para sítios específicos.

2.2 Importância biológica da proteína amilóide sérica A (SAA)

A SAA de fase aguda é produzida pelo fígado em resposta a um evento inflamatório (Gabay e Kushner, 1999). Os hepatócitos produzem a SAA a partir de estímulos de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (Steel, Sellar *et al.*, 1993; Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000). A resposta aguda gera uma seqüência de reações inflamatórias que contribuem para a proteção do hospedeiro por conta de danos teciduais, infecções ou trauma. Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de SAA é menor que 1 $\mu\text{g/mL}$, podendo aumentar 1000 vezes em 24 horas em resposta a algum dano tecidual ou infecção (Gabay e Kushner, 1999). Concentrações permanentemente altas são observadas em situações de doença crônica como o diabetes (Kumon, Suehiro *et al.*, 1994), artrite reumatóide (Hilliquin, 1995), câncer (Biran, Friedman *et al.*, 1986) e aterosclerose (Fyfe, Rothenberg *et al.*, 1997).

A meia-vida da SAA no plasma é de cerca de 1 dia (Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000), sendo que seu catabolismo também acontece no fígado. A capacidade do fígado em degradar a SAA durante a fase aguda é diminuída, ou mesmo anulada, o que mantém as altas concentrações da proteína no plasma de indivíduos nesta situação (Gollaher e Bausserman, 1990). A SAA

também é sintetizada em tecidos extra-hepáticos, além de células como monócitos/macrófagos, células endoteliais e células do músculo liso (Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000). Adipócitos humanos também expressam e secretam SAA, caracterizando o tecido adiposo como uma importante fonte desta proteína além do fígado (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005).

A SAA livre é encontrada somente em tecidos inflamados, sugerindo um papel importante de resposta inflamatória localizada (O'hara, Murphy *et al.*, 2000). Diversos trabalhos sugerem diferentes tipos de receptores para a SAA: (i) o FPR-2 (*formyl-peptide receptor 2*), um receptor transmembrana associado à proteína Gi, sensível a toxina pertussis (He, Sang *et al.*, 2003); (ii) o CD36, receptor *scavenger* de HDL expresso por monócitos/macrófagos (Baranova, Vishnyakova *et al.*, 2005; Cai, De Beer *et al.*, 2005); (iii) o RAGE, receptor multiligante encontrado em células mononucleares (Cai, Song *et al.*, 2007); (iv) *Tanis* (ou selenoproteína S), um receptor expresso pelo fígado e regulado por concentrações de glicose (Walder, Kantham *et al.*, 2002) e (v) receptores *Toll-like 2* (TLR2) (He, Zhou *et al.*, 2009) e 4 (TLR4) (Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008). A tabela 01 lista outros receptores e proteínas ligantes da SAA.

Tabela 01. Receptores e proteínas ligantes para a SAA

Moléculas ligantes e receptores para a SAA		Referência	rSAA ¹
SELS	Homeostase da glicose, estresse de RE	(Walder, Kantham <i>et al.</i> , 2002)	Não
ABCA1	Efluxo de colesterol	(Abe-Dohmae, Kumon <i>et al.</i> , 2006)	Sim
ABCA7	Efluxo de colesterol	(Abe-Dohmae, Kumon <i>et al.</i> , 2006)	Sim
SR-BI	Sinalização inflamatória	(Van Der Westhuyzen, Cai <i>et al.</i> , 2005)	Sim
CD36	Sinalização inflamatória	(Baranova, Vishnyakova <i>et al.</i> , 2005)	Sim
TLR2	Sinalização inflamatória	(He, Zhou <i>et al.</i> , 2009)	Sim
TLR4	Sinalização inflamatória	(Sandri, Rodriguez <i>et al.</i> , 2008)	Sim
CST3	Sinalização inflamatória	(Bokarewa, Abrahamson <i>et al.</i> , 2007)	Sim
FPR2	Quimiotaxia, ativação imune	(Dufton, Hannon <i>et al.</i> , 2010)	Sim
RAGE	Células mononucleares	(Yan, Zhu <i>et al.</i> , 2000)	Sim
OmpA	Opsonização	(Shah, Hari-Dass <i>et al.</i> , 2006)	Sim

¹ Trabalhos que utilizaram a proteína recombinante SAA (rSAA). SELS, Selenoproteína S; ABCA1, ATP-binding cassette, subfamília A (ABC1), membro 1; ABCA7, ATP-binding cassette, subfamília A (ABC1), membro 7, SR-BI, receptor *scavenger* classe B, membro 1; CD36, receptor *scavenger* CD36; TLR2, receptor *toll-like* tipo 2; TLR4, receptor *toll-like* tipo 4, CST3, cistatina C; FPR2; receptor *formyl peptide* 2; RAGE, receptor de produtos de glicação; OmpA, *outer membrane protein* A, RE, retículo endoplasmático.

Diante dos efeitos biológicos da SAA no foco inflamatório e da perspectiva de elucidar estes efeitos sobre células do sistema imune, o nosso grupo de pesquisa tem descrito alguns desses efeitos. Sobre células do sistema imune, a SAA promoveu a expressão de mRNA e liberação de citocinas importantes na resposta inflamatória, como a TNF- α , IL-1 β , IL-1ra e IL-8 (Furlaneto e Campa, 2000; Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003; Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004). Ainda, a SAA induziu a produção de óxido nítrico (NO) em células monocíticas (Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008). Neutrófilos e monócitos de indivíduos diabéticos responderam mais eficientemente à SAA aumentando tanto a produção de citocinas como a migração destas células (Hatanaka, Monteagudo *et al.*, 2007). Em linhagens celulares de gliomas, a SAA promoveu maior proliferação, migração e invasão celular, bem como induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da síntese e

atividade de metaloproteinases (MMPs), sugerindo um papel relevante da SAA na progressão tumoral (Knebel, 2010).

A Figura 02 resume as principais atividades biológicas descritas pelo grupo.

Figura 02. Principais atividades biológicas da SAA descritas pelo nosso grupo de pesquisa. Nos trabalhos, foi utilizada a rSAA humana (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ). Interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 1β (IL-1β), 1 ra (IL-1ra) e 8 (IL-8); fator de necrose tumoral alfa (TNF-α); óxido nítrico (NO); espécies reativas de oxigênio (ROS). (Furlaneto e Campa, 2000; Furlaneto, Ribeiro *et al.*, 2002; Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003; Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004; Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008; Knebel, 2010)

2.3 Tecido adiposo, inflamação e SAA

A obesidade é uma doença que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura subcutânea e visceral. Sua gravidade pode ser medida por suas complicações tais como dislipidemia e doenças cardiovasculares, diabetes melito tipo 2, certos tipos de câncer, dificuldades respiratórias, problemas

dermatológicos e distúrbios do aparelho locomotor (Laake, Thune *et al.*, 2010; Leitzmann, Brenner *et al.*, 2010; Samolis, Papastefanou *et al.*, 2010). Atualmente, a obesidade é um grave problema de saúde pública nos países desenvolvidos e um crescente problema nos países em desenvolvimento (Bornstein, Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2008; Melnyk, Small *et al.*, 2008).

Em mamíferos existem dois tipos distintos de gordura, o tecido adiposo branco (TAB) e o marrom (TAM). O primeiro é predominante responsável por armazenar lipídeos em situação de alta disponibilidade de nutrientes, enquanto que o segundo gera calor via oxidação lipídica. Sem dúvida o TAB é um órgão com características endócrinas secretando inúmeros hormônios, conhecidos como adipocinas e estão envolvidos na regulação metabólica (Cinti, 2009; Seale, Kajimura *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da obesidade é caracterizado pelo aumento no número de células do tecido adiposo (hiperplasia) e acúmulo de lipídeos intracelulares (hipertrofia), resultado da proliferação e diferenciação celular. Estes processos são regulados por fatores endócrinos, genéticos, metabólicos, neurológicos, farmacológicos, ambientais e nutricionais (Kopelman e Albon, 1997; Kopelman, 1999). Apesar da capacidade dos pré-adipócitos em proliferar, o número de adipócitos no tecido permanece constante, pois assim como pré-adipócitos são recrutados para tornarem-se células maduras, adipócitos maduros, que não são capazes de proliferar, sofrem apoptose na mesma proporção (Arner e Spalding, 2010).

Ao longo dos últimos anos, a resposta inflamatória tem sido exaustivamente associada ao ganho de peso, às complicações relacionadas à resistência à insulina e ao risco cardiovascular (Ross, 1999; Bastard, Maachi *et*

et al., 2006; Yang, Lee *et al.*, 2006; Faintuch, Marques *et al.*, 2008; Sjöholm, Lundgren *et al.*, 2009). Além disso, a inflamação tem sido proposta como elo entre a obesidade e as demais complicações (Yang, Lee *et al.*, 2006). Os ensaios bioquímicos utilizados na detecção desta resposta, geralmente crônica e branda, focam na detecção plasmática da proteína C reativa (PCR) e na amiloide sérica A (SAA). Ambas as proteínas são classicamente liberadas pelo fígado durante a fase aguda e são indicativos dos vários estágios da doença inflamatória.

Apesar dos mecanismos celulares e moleculares que associam o aumento do tecido adiposo com complicações como a síndrome metabólica e a disfunção cardiovascular não estarem bem elucidados, esta associação é bem documentada clínica e epidemiologicamente (Gomez-Ambrosi, Azcona *et al.*, 2008; Jylhava, Haarala *et al.*, 2009). Segundo Yang e colaboradores (Yang, Lee *et al.*, 2006), a SAA derivada do tecido adiposo (tanto a proteína como a sua expressão gênica), foi associada com o IMC dos indivíduos, bem como com o tamanho de seu adipócito.

Diante do cenário de resposta inflamatória associada à hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo e obviamente o recrutamento de macrófagos para o mesmo, diversas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na patogênese da obesidade, caracterizado principalmente por um estado de inflamação crônica branda. Em animais obesos, a expressão de TNF- α e SAA estão aumentadas, se relacionando à resistência à insulina e à síndrome metabólica. Ainda, a secreção de SAA pelo tecido adiposo de humanos apresenta-se aumentada em condições de hipertrofia e inflamação (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005; Poitou, Coussieu *et al.*, 2006; Yang, Lee *et al.*, 2006).

Além da grande quantidade de adipócitos, outras células podem contribuir com a produção de mediadores inflamatórios no tecido adiposo (Rocha e Libby, 2008). Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado uma participação efetiva dos macrófagos nos aspectos inflamatórios da obesidade (Weisberg, Mccann *et al.*, 2003). Os fagócitos mononucleares no tecido adiposo apresentam uma grande heterogeneidade, onde macrófagos infiltrados e residentes coexistem contribuindo para a manutenção da homeostase (Lumeng, Bodzin *et al.*, 2007). Considerando que os macrófagos residentes, tipo predominante no tecido adiposo magro, apresentam marcadores de ativação alternativa (M2) como a arginase, os macrófagos infiltrados, presentes em grande número no tecido adiposo hipertrofiado, apresentam marcadores de ativação clássica (M1), ou seja, expressão elevada de IL-6, óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e CCR2 (Gordon, 2007).

A relevância dos macrófagos no desenvolvimento de complicações metabólicas na obesidade está relacionada a sua capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo assim, necessária a migração desses fagócitos para o tecido. Nesse contexto, há estudos mostrando a importância de mediadores inflamatórios como a MCP-1 (proteína quimiotática para monócito 1) e seu receptor CCR2, evidenciando uma diminuição na infiltração de macrófagos (M1) no tecido adiposo em animais deficientes de CCR2 (Kanda, Tateya *et al.*, 2006; Weisberg, Hunter *et al.*, 2006). Entretanto, outras publicações importantes, não observaram influência do MCP-1 e CCR2 na infiltração de macrófagos no tecido adiposo ou na resistência insulínica (Inouye, Shi *et al.*, 2007; Kirk, Sagawa *et al.*, 2008). Dessa maneira, podemos considerar que existam diversos mecanismos existentes que contribuem para a

migração de macrófagos para o tecido adiposo, ou seja, outros mediadores inflamatórios, como a SAA, podem contribuir para a migração tecidual de macrófagos.

2.4 Hipóxia e obesidade

A hipóxia é um elemento importante na hipertrofia do tecido adiposo. A transmissão da resposta à hipóxia se dá na maioria das vezes, através de fatores de transcrição indutores de hipóxia (*hypoxia-inducible transcription factors*), particularmente o HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) (Semenza, 2001; Hopfl, Ogunshola *et al.*, 2004). O HIF-1 é composto por duas subunidades, o HIF-1 β , que é constitutivo, e o HIF-1 α , que é recrutado em resposta à baixa tensão de O₂ para a produção do fator de transcrição funcional (Wenger, 2002; Cummins e Taylor, 2005). A presença de HIF-1 α está comprovada para adipócitos murinos e humanos quando submetidos à hipóxia. HIF-1 α também foi identificado em tecido adiposo, bem como seu aumento em pessoas obesas (Cancello, Henegar *et al.*, 2005). Esse evento que ocorre devido a hiperplasia e/ou hipertrofia da célula adiposa, tem mostrado que induz o aumento na expressão de diversos genes, como o da leptina e do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (Lolmede, De Saint Front *et al.*, 2003). Recentemente, a hipóxia também tem sido reportada como um indutor de produção de PAI-1 e inibidor de síntese de adiponectina por adipócitos da linhagem 3T3-L1 (Chen, Lam *et al.*, 2006), além de indutor de expressão de visfatina nessas células (Segawa, Fukuhara *et al.*, 2006). Foi descrito também, que adipócitos humanos submetidos à baixa tensão de O₂ ou tratados

quimicamente por CoCl_2 , tem a expressão do GLUT-1 sensível a hipóxia, além do aumento do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) (Wang, Wood *et al.*, 2007). Para outros dois genes característicos de adipócitos, os genes PPAR γ e a aP2, houve uma diminuição significativa da expressão de seu mRNA em pré-adipócitos diferenciados e adipócitos humanos submetidos à hipóxia por um período de 24 horas (Trayhurn, Wang *et al.*, 2008). Outro ensaio mostrou que adipócitos oriundos de células troncos tiveram uma perda de função sob hipóxia em contraste com células mesenquimais derivados de células-tronco da medula óssea submetidas à mesma condição (Lee e Kemp, 2006). Esta evidente associação entre obesidade e hipóxia nos leva a considerar que além do HIF, outras proteínas contribuem para a definição do rumo da obesidade.

2.5 Proteínas recombinantes

Muitos dos estudos de caracterização das atividades biológicas da SAA foram feitos com a proteína recombinante. Esta técnica tem permitido a obtenção de proteína em quantidade necessária aos estudos de atividade. Faz-se uma revisão a seguir que permite compreender o impacto que esta técnica trouxe, assim como suas variáveis, vantagens e desvantagens.

Comparado a outros sistemas de expressão de proteína recombinante (Baneyx e Mujacic, 2004), o uso da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* oferece inúmeras vantagens, incluindo crescimento rápido em fontes de carbono, utilizando um meio de cultura barato e de fácil preparo e manuseio, além disso, oferece um acúmulo de biomassa rápida, favorecendo processos

de expressão em grande escala. Por conta da longa história do uso desse sistema de expressão, o microorganismo (*E.coli*), está muito bem caracterizado e muitas ferramentas foram desenvolvidas para a engenharia genética, facilitando a clonagem e a expressão de proteínas.

Um número grande de elementos é essencial no desenvolvimento de um sistema de expressão de proteínas recombinantes (Baneyx, 1999; Jonasson, Liljeqvist *et al.*, 2002). A expressão é normalmente induzida a partir de um plasmídeo introduzido em um sistema genético compatível, como por exemplo, a *E.coli*. Os elementos genéticos necessários nos plasmídeos para a expressão de recombinantes incluem uma origem de replicação (*ori*), um marcador de resistência a antibiótico, promotores transcricionais, regiões iniciadores da tradução (*TIRs*), bem como códons de terminação para a transcrição e tradução.

A origem de replicação nos plasmídeos é encontrada na região conhecida como *replicon* (Baneyx, 1999). A maioria dos vetores plasmidiais usados em sistemas de expressão de proteínas recombinantes possuem o *replicon* ColE1 ou o p15A. O número de cópias do plasmídeo é controlada pela origem de replicação, que no *replicon* ColE1 é derivada do pBR322 (número de cópias 15-20) ou do pUC (número de cópias 500-700), já no *replicon* p15A, é derivado do pACYC184 (número de cópias 10-12). A replicação desses plasmídeos é estável sendo mantida sob condições específicas, caracterizado pelo raro aparecimento de células filhas livres do plasmídeo (Summers, 1998).

Para a identificação de colônias isoladas que apresentam o plasmídeo de interesse para expressão de recombinantes, utilizam-se marcadores de resistência a antibióticos, dentre os quais os mais utilizados são os que

conferem resistência a ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. É devido à expressão de β -lactamase a partir do gene *bla* que os plasmídeos apresentam resistência a ampicilina. Essa enzima é secretada para o periplasma, onde catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico, degradando a ampicilina, permitindo o crescimento do microorganismo.

Para a expressão de recombinantes, os plasmídeos também requerem um forte promotor de transcrição, para o controle do alto nível de expressão gênica. A indução dos promotores pode acontecer de maneira térmica ou química, sendo o mais difundido e utilizado, o uso do isopropyl β -D-thiogalactosidase (IPTG) (Hannig e Makrides, 1998).

A iniciação da tradução protéica se dá a partir da região de iniciação de tradução (*TIR*), presente no mRNA transcrito, dependente do sítio de ligação ao ribossomo, incluindo a sequência de Shine-Dalgrano e o códon de iniciação. A sequência de Shine-Dalgrano (UAAGGAGG) está localizada próxima e anteriormente ao códon de iniciação (AUG) (Ringquist, Shinedling *et al.*, 1992), e é dada como uma sequência de nucleotídeos em uma molécula de mRNA procariótica que propicia a união do RNA ao ribossomo, possibilitando o início da tradução protéica. Para a sua finalização, a tradução necessita de um códon de terminação, conhecido como *stop codon*, esses códons de terminação podem ser UGA, UAG ou UAA. Uma maior eficiência para o término da tradução pode ser atingida inserindo consecutivos códons de terminação ou o uso do códon de terminação prolongado (UGAU, UAGU ou UAAU) (Poole, Brown *et al.*, 1995).

Uma grande quantidade de sistemas de expressão desenvolvidos para aplicações diversas e inúmeras compatibilidades estão disponíveis. Em 2003,

aproximadamente 80% das proteínas usadas para o estudo da sua determinação estrutural, submetido ao banco de dados internacional de proteínas (PDB), foram preparadas em sistemas de expressão para *E.coli*, utilizando principalmente o sistema de expressão pET (Novagen[®]), além do uso de diversos promotores como o λ PL/cL (Invitrogen pLEX[®]), Trc (Amersham Biosciences pTrc[®]), Tac (Amersham Biosciences pGEX[®]), e o híbrido *lac*/T5 (Quiagen pQE[®]).

Como citado acima, além da escolha do mais apropriado sistema de expressão em *E.coli*, também se deve ter cuidado na escolha da cepa a ser utilizada. As cepas para expressão de recombinantes devem ser deficientes da maioria das proteases naturais que são nocivas a proteína de interesse, serem capazes de manter o plasmídeo de expressão estável e conferir os elementos genéticos necessários para o sistema de expressão. Cepas vantajosas com inúmeras aplicações individuais estão disponíveis. No entanto, a *E.coli* BL21 é a cepa mais comumente utilizada como hospedeiro, e tem-se revelado excelente em aplicações padrão de expressão de recombinantes. A BL21 é a cepa mais robusta de *E.coli* B, capaz de crescer vigorosamente em uma quantidade pequena de meio de cultura, sem se apresentar patogênica ao ser humano (Chart, Smith *et al.*, 2000). A cepa BL21 é deficiente em ompT e lon, duas proteases que interferem na estabilidade e integridade da proteína expressa. Atualmente, há cepas derivadas da BL21 incluindo a cepa *recA* negativa, utilizada para estabilização de plasmídeos que contêm sequências repetitivas, mutantes *trxB/gor* negativas, que favorecem a formação de pontes dissulfetos, mutantes *lacY*, permitindo níveis ajustáveis de expressão da

proteína, além de mutantes que contribuem para a solubilização de corpos de inclusão e proteínas de membrana, as cepas C41 e C43.

Para proteínas recombinantes que não necessitam de modificações pós-traducionais complexas, e que sua expressão seja na forma solúvel em meio aquoso, a *E.coli* é usualmente utilizada como primeira escolha na obtenção de quantidades suficientes para estudos bioquímicos e estruturais, além de uma subsequente produção em larga escala de inúmeros produtos gênicos. Entretanto, em alguns casos, a expressão de proteínas recombinantes pode ser mal sucedida, devido, por exemplo, à falta de conformação correta da proteína, efeito de uma degradação proteolítica ou mesmo da formação de agregados insolúveis de proteínas inativas, conhecidas como corpos de inclusão (Baneyx e Mujacic, 2004).

Para as proteínas heterólogas, a incapacidade de se obter rapidamente uma proteína em sua conformação nativa ou interagir com os moduladores de dobramento em tempo hábil têm duas possíveis consequências: a sua deposição parcial ou total em corpos de inclusão ou degradação protéica. A probabilidade de uma proteína expressa não estar em sua conformação terciária correta é aumentada com o uso de indutores potentes de expressão, obtendo altas concentrações de proteínas recombinantes, em geral, excedendo a 50% do total de proteínas celulares. Sobre essas condições, a quantidade de agregação protéica é geralmente muito maior do que a taxa de proteína com conformação apropriada, além da rápida saturação dos moduladores de conformação (Van Den Berg, Ellis *et al.*, 1999). Um segundo fator que contribui para a formação dos corpos de inclusão é a inabilidade da bactéria em

promover todas as modificações pós-traducionais que a proteína possa necessitar para a obtenção de uma estrutura tridimensional correta.

Os corpos de inclusão podem se acumular no citoplasma ou no periplasma da bactéria. Entretanto, a agregação protéica em sistemas de expressão de recombinantes, pode ser minimizada através do controle de parâmetros como a temperatura, taxa de expressão, metabolismo do microorganismo hospedeiro, além do uso de tecnologias de expressão de proteínas associadas as caudas (*tag*), e sistemas de co-expressão de chaperonas (Jonasson, Liljeqvist *et al.*, 2002). Os agregados também podem ser solubilizados com o uso de detergentes como a uréia e guanidina. A proteína nativa pode ser obtida *in vitro* a partir do *refolding* da proteína solubilizada, oriunda dos corpos de inclusão, utilizando técnicas como a diluição, diálise ou métodos de *refolding* em coluna (Middelberg, 2002; Sorensen, Sperling-Petersen *et al.*, 2003). Estratégias de *refolding* talvez possam ser aperfeiçoadas com o uso de chaperonas moleculares (Mogk, Mayer *et al.*, 2002).

Outro aspecto a se considerar no uso de sistemas de expressão de proteínas recombinantes em *E.coli* é a presença de lipopolisacarídeo (LPS), oriunda da parede celular bacteriana, que possivelmente se apresenta, na qualidade de contaminante e em concentrações baixas, mesmo após a completa purificação da proteína recombinante sendo expressa. Muitos pesquisadores, incluindo o nosso próprio grupo de pesquisa, que utiliza proteínas recombinantes para ensaios biológicos, têm a preocupação de se validar e comprovar que os efeitos observados em seus ensaios são decorrentes da proteína recombinante usada, e não de seu contaminante, LPS.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a produção das proteínas recombinantes humanas A-SAA1 e C-SAA4, de modo a possibilitar propostas mais complexas de estudo acerca dessa proteína e reconhecer possíveis novas funções biológicas para a isoforma constitutiva desta proteína (C-SAA4).

Também foi proposto avaliar o efeito da hipóxia (1% de O₂), evento recorrente no processo da obesidade, sobre a produção de SAA em células do tecido adiposo. Finalmente foi estudada a possibilidade da SAA ser capaz de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos.

Diante disso, os nossos objetivos específicos foram:

- i. Produção das proteínas recombinantes SAA de fase aguda (A-SAA1) e constitutiva (C-SAA4), em bactéria (*Escherichia coli*).
- ii. Verificar a expressão gênica e produção de SAA3 em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 submetidos à hipóxia.
- iii. Verificar a expressão gênica e produção de SAA3 em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados submetidos à hipóxia.
- iv. Verificar a expressão gênica e produção de A-SAA1, A-SAA2 e C-SAA4 em adipócitos humanos submetidos à hipóxia.
- v. Verificar o efeito da A-SAA sobre a liberação de citocinas (IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β) de adipócitos humanos maduros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Escolha do plasmídeo

Os plasmídeos pGEX-2T (GE Healthcare), contendo as sequencias de A-SAA1 e C-SAA4 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alexander S. Whitehead (Department of Genetics and Biotechnology Institute, Trinity College, Dublin, Ireland) (McCormack, Hobson *et al.*, 1996). O plasmídeo pGEX-2T apresenta-se fechado, circular, com DNA dupla fita, além de replicação extracromossomal, com origem de replicação presente. Apresenta também, sítios de restrição como o EcoRI e BamHI, os quais foram utilizados para a construção do vetor de expressão (Figura 03). Em destaque os sítios de restrição das enzimas BamHI e EcoRI, além do sítio de clivagem da proteína chamado trombina.

Figura 03. Desenho esquemático de vetor de expressão pGEX-2T, utilizado na expressão da proteína recombinante humana SAA1 e 4.

O plasmídeo pGEX-2T apresenta ainda o gene de resistência *amp^r*, o que confere às células resistência ao antibiótico ampicilina.

Segundo o Dr. Whitehead, as regiões codificadoras de A-SAA1 e C-SAA4 foram amplificadas a partir de seus cDNAs e clonadas por PCR (reação em cadeia da polimerase) com a concomitante inserção da sequência que especifica o sítio de restrição *BamHI* na posição final do sentido 5' (sequência do primer não informada), e o sítio de restrição *EcoRI* na posição final do sentido 3' (sequência do primer não informada). O produto de PCR foi digerido, purificado e ligado a glutathione S-transferase (GST) do vetor de expressão pGEX-2T (GE Healthcare). Uma análise da sequência gênica resultante, pGEX-(A-SAA1) e pGEX-(C-SAA4), confirmaram que as sequências corretas foram introduzidas na posição *downstream* a região de codificação do GST e que não houveram mutações nas sequências resultantes do processo de PCR.

4.2 Transformação para DH5- α .

Um microlitro (1 μ L) do plasmídeo pGEX-2T(A-SAA1) e pGEX-2T(C-SAA4) foram incubados separadamente com 20 μ L de células competentes *E. Coli* DH5- α por 30 minutos em gelo para que a transformação ocorresse. Em seguida a solução foi colocada por 2 minutos a 42°C. Acrescentamos 400 μ L de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 10 mM de MgCl₂ e 20 mM de glicose), e incubamos novamente a 37°C por 1 hora. Plaqueamos todo o volume em meio ágar *Luria Broth* (LB) (10 g de triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g de NaCl; 2.5 mL de NaOH 1 N; água q.s.p. 1000 mL),

contendo 100 µg/mL de ampicilina. Deixamos crescer “overnight” a 37°C em estufa e observamos o crescimento de colônias isoladas. As colônias isoladas são as colônias cujas bactérias incorporaram o vetor de expressão.

4.3 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (“medium prep”)

Para uma maior quantidade de DNA plasmidial, uma colônia da bactéria DH5- α transformada com o plasmídeo contendo os insertos de SAA1 ou SAA4 foi inoculada em 70 mL de meio caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e deixamos crescer “overnight”. A cultura de bactéria é então transferida para 2 tubos de centrífuga com tampa de rosca (35 mL cada) e centrifugamos os tubos a 6000 rpm por 10 minutos à 4°C. Após a centrifugação, desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos o precipitado em 3,0 mL de solução A (glicose 50 mM, tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Adicionamos 6,0 mL da solução B (NaOH 0,2 M e SDS 1%) e deixamos incubando no gelo por 10 minutos. Adicionamos ainda 4,5 mL da solução C (KAc 3 M e HAc 5 M) e incubamos no gelo por mais 15 minutos. Centrifugamos os tubos à 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Resgatamos o sobrenadante e acrescentamos mais 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente e incubamos por 10 minutos. Centrifugamos os tubos a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C, desprezamos o sobrenadante e deixamos o precipitado secar a temperatura ambiente. Redissolvemos esse precipitado em 200 µL de TE (Tris-EDTA) e transferimos para microtubos. Adicionamos 2 µL de NaCl 5 M e 20 µL de RNase (10 mg/mL) e incubamos à 37°C por 30 minutos. Adicionamos 4 µL de SDS 10% e 2 µL de proteinase K e

incubamos novamente por 30 minutos a 37°C. Extraímos uma vez com fenol: clorofórmio (1:1), agitamos bastante e centrifugamos a 13.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Retiramos a fração superior, e desta fração, extraímos uma vez com clorofórmio (1:1). Agitamos novamente e centrifugamos a 13.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Retiramos novamente a fração superior. Adicionamos 100 µL de NH₄Ac 7,5 M, 600 µL de etanol absoluto gelado e centrifugamos a 12.500 rpm por 15 minutos a 4°C. Acrescentamos 500 µL de etanol 70% gelado e agitamos até o precipitado desgrudar do fundo do tubo. Centrifugamos novamente a 12.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Deixamos o precipitado secar a temperatura ambiente e ressuspendemos o precipitado em 50 µL de tampão Tris-EDTA.

4.4 Análise de integridade do DNA

Para se analisar a qualidade do DNA plasmidial, observar se houve ou não degradação do DNA, foi feito um gel de agarose 1% (0,6 g de agarose, 1,2 mL de tampão Tris-EDTA, água qsp. 60 mL).

4.5 Sequenciamento

Para nos certificarmos que no processo de inserção da sequência nucleotídica da A-SAA1 e C-SAA4 no plasmídeo, bem como nos processos realizados subsequentemente, não houve qualquer mutação ou degradação do DNA, as amostras de DNA plasmidial (vetor + DNA) foram submetidas ao

processo de sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano (IB-USP). Os primers utilizados para o sequenciamento são: Forward – 5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG 3', Reverse – 5' CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG 3', oriundos da GE Healthcare.

4.6 Expressão da proteína recombinante

Os plasmídeos pGEX-2T(A-SAA1) e pGEX-2T(C-SAA4) foram transformados em *E. coli* BL21 competentes, seguindo protocolo semelhante ao de transformação em DH-5 α descrito anteriormente, com crescimento *overnight* à 37°C em meio *Luria Broth* (LB) contendo 100 μ g/mL de ampicilina. Os clones selecionados na placa foram semeados novamente em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) e colocados para crescimento em agitador até uma leitura de OD₆₀₀ de 1,0. Nesse momento, foram induzidos com 0.1 mM de isopropyl β -D-thiogalactosidase (IPTG) por 5 (cinco) horas à 37°C para expressão das isoformas A-SAA1 e C-SAA4.

4.7 Solubilização da proteína recombinante

Realizamos testes de solubilização das proteínas recombinantes. As células foram ressuspensas em duas soluções de lise/solubilização distintas:

a) PBS pH 7,3 (Gibco), 0,2 mg/mL lisozima (Sigma), 5 mM de EDTA (Merck), 0,1% (v/v) de Triton X-100 (BDH), 50 mM de benzamidina (Sigma), 0,1 mM de PMSF (Sigma) e 0,5 mg/mL de iodoacetamida (GE Healthcare); b) 20 mM de

Tris-HCl pH 8,0 (Sigma), 200 mM de NaCl (Merck), 10 mM de EDTA (Merck), 1 mg/mL de lisozima (Sigma) e 2 mM de PMSF (Sigma).

Incubamos as suspensões por 1 (uma) hora em temperatura ambiente. Em seguida, o processo de sonicação em gelo (3 ciclos de 20 segundos) foi realizado para garantir a completa lise celular, com posterior centrifugação à 8.000 rpm por 15 minutos e a 4°C. Alíquotas do sobrenadante e do precipitado foram analisadas por SDS-PAGE (12%).

4.8 Purificação da proteína recombinante humana A-SAA1 e C-SAA4

A purificação das A-SAA1 e C-SAA4 ocorreu em coluna de glutathione, a Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare®), que tem alta afinidade com o GST.

No processo ensaiado, a resina é colocada em contato com a solução que contém a proteína recombinante expressa e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação leve. Nessa etapa, o complexo GST-SAA1 e GST-SAA4 interagem com a resina, ligando-se a ela. Logo após, centrifuga-se a amostra e o sobrenadante é reservado. Deve-se lavar a amostra por pelo menos quatro (4) vezes para que contaminantes não ligados a resina sejam totalmente retirados.

Para a eluição da proteína expressa, adiciona-se a amostra uma solução tampão contendo 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 120 mM de NaCl e 20 mM de glutathione redutase. Incubamos novamente em temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação leve para que o complexo GST-SAA1 e GST-SAA4 seja eluído. Nessa etapa, a glutathione presente na coluna é reduzida pela glutathione

redutase, promovendo o fim da afinidade do GST pela coluna, liberando assim, a proteína expressa. A etapa de eluição pode ser repetida quantas vezes forem necessárias para que toda proteína ligada a resina seja retirada.

Para a clivagem do complexo GST-SAA1 e GST-SAA4, foi utilizado a enzima trombina bovina (SIGMA®), uma serino-protease que cliva seletivamente pontes de Arg-Gly, que possibilita o desligamento do complexo, deixando assim, a proteína recombinante A-SAA1 e C-SAA4 livres. Como protocolo, deve-se adicionar a enzima trombina (1,62 ng / µg de GST-proteína) no próprio meio onde se encontra o complexo GST-SAA1 e GST-SAA4. Incuba-se então por 16 horas a 22°C.

A purificação da proteína recombinante após a clivagem do complexo GST-proteína se dá através de maneira semelhante àquela acima citada, em coluna de glutathione, a Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare®), que tem alta afinidade com o GST. Dessa maneira, a resina é colocada em contato com a solução que contém a proteína recombinante expressa novamente e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação leve. Nessa etapa, somente o GST interage com a resina, ligando-se a ela. Logo após, centrifuga-se a amostra e o sobrenadante é recuperado, pois é nessa solução que se encontra a proteína recombinante expressa livre (McCormack, Hobson *et al.*, 1996).

4.9 Western Blotting para A-SAA1 e C-SAA4

Realizamos a imunodeteção das proteínas A-SAA 1 e C-SAA 4 através do *Western blot*. Para esta análise utilizamos anticorpo policlonal específico

anti-SAA (Abcam®). Este anticorpo não diferencia as isoformas 1 da 4, podendo ser devido a sua homologia de 54% entre si. O gel de poliacrilamida utilizado foi de 12%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm de poro. A transferência ocorreu sob uma corrente elétrica de 250 mA e tensão de 100V, durante uma hora e meia (1,5 hora). Bloqueamos a membrana com 5% de albumina sérica bovina em TBS-Tween 0,1%, por 2 horas em temperatura ambiente e a lavagem da membrana foi realizada com PBS e Tween 20 a 0,05% por 3 vezes e 5 minutos cada em temperatura ambiente. A reação com o anticorpo primário deu-se *overnight* a 4°C e a reação com o anticorpo secundário ocorreu durante 2 horas a temperatura ambiente. Como método de revelação, utilizamos o método de quimiluminescência, o *Amersham ECL Western Blotting System* (GE Healthcare).

4.10 Casuística

Foram recrutados homens e mulheres com idade entre 18 e 60 anos com IMC entre 25 e 35 kg/m² submetidos à cirurgia plástica eletiva de lipoaspiração e/ou abdominoplastia para a doação de tecido adiposo voluntariamente. Para este estudo foram utilizados oito (08) amostras de tecido adiposo subcutâneo para padronização da extração dos adipócitos maduros, bem como para a realização dos experimentos propostos. Foram excluídos pacientes com (1) diabetes, (2) doenças metabólicas, (3) neoplasias e (4) que fizeram uso de glicocorticóides nos últimos 6 meses.

4.11 Coleta do material

O tecido adiposo subcutâneo fora coletado de material desprezado de cirurgia de lipoaspiração e/ou abdominoplastia. Foram utilizados aproximadamente 10g de tecido, armazenados em frascos de cultura contendo solução fisiológica para posterior processamento em laboratório. O procedimento não acarretou prejuízo aos pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os experimentos realizados com o tecido adiposo foram exclusivamente desenvolvidos *in vitro*.

4.12 Otimização do processo de isolamento de adipócitos

Para a padronização do isolamento e cultura dos adipócitos humanos, foram necessários as extrações de material obtido de três (3) cirurgias independentes. A maior dificuldade foi ajustar a melhor maneira de manusear o material biológico, de forma que não ocorresse lise celular, ocasionada por choques mecânicos (como na centrifugação e filtração) ou por ação enzimática (colagenase tipo II). Nesse sentido, após três ensaios realizados e algumas modificações no protocolo descrito por Rodbell em 1964 e amplamente difundida pela literatura especializada (Rodbell, 1964; Arner, 1995).

Resumidamente, o tecido é cortado em pequenos fragmentos e colocados em frascos com meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contendo 20 mM de HEPES, 5 mM glicose, 4 % de albumina bovina (BSA), 10.000 U/mL penicilina, 10.000 mg/mL estreptomicina e 1 mg/mL de colagenase tipo II, pH 7,4. A mistura é incubada sob agitação (120 rpm) a

37°C por 30 minutos. Após a digestão, a enzima collagenase é inativada com a adição de soro fetal bovino (SFB). Filtra-se em filtro de 100 mm de poro, para que todo e qualquer material não digerido ou frações de estroma vascular fique retido. Após a centrifugação, o material é centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, para a completa separação do material (Figura 04).

Após a centrifugação os adipócitos permanecem na parte superior do tubo como mostra a figura abaixo.

Figura 04. Isolamento e cultivo celular de adipócitos humanos. **A.** Microscopia óptica dos adipócitos humanos isolados (aumento de 40X). **B.** Material biológico oriundo de cirurgias plásticas em solução tampão PBS (pH 7,4), pode-se observar que, por diferença de densidade, temos a separação do material coletado em camadas, onde a superior é formada por adipócitos, a intermediária composta pelo meio de digestão do material, e a camada inferior, na base do tubo, está a fração contendo estroma vascular e células do sistema imune. **C.** Representação da lise celular ocorrida após o processo completo de isolamento dos adipócitos humanos, pode-se observar uma camada lipídica formada na porção superior do material.

Os adipócitos devem ser mantidos em meio de cultura DMEM-F12 contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C.

4.13 Cultivo celular de pré-adipócitos 3T3-L1

Os pré-adipócitos 3T3-L1 (CL-173, ATCC[®]) foram cultivados e mantidos em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado com 10% de soro de bezerro (SB) mantidos em estufa 5% CO₂ a 37 °C. Para os ensaios com células 3T3-L1 diferenciadas, as células confluentes foram estimuladas a se diferenciarem mediante o tratamento com coquetel composto por 0,5mM de isobutilmetilxantina (IBMX), um inibidor de cAMP fosfodiesterase, 1µM de dexametasona (DEX), que ativa receptores glicocorticóides e 1,67 µM de insulina, que ativa o receptor IGF-1R, em DMEM suplementado com 10% SFB. Este coquetel é conhecido como meio de diferenciação (MDI) (Madsen, Petersen *et al.*, 2003; Madsen, Petersen *et al.*, 2005; Petersen, Madsen *et al.*, 2008). Após 48 horas, o meio foi trocado para DMEM contendo somente 10% SFB e 1,67 µM de insulina e trocado a cada dois dias. As células foram coradas com Oil Red O 0,5%, específico para lipídeos intracelulares, processo representado na Figura 05.

A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo altamente controlado. Durante a fase de proliferação, os pré-adipócitos são morfológicamente similares a fibroblastos. Na confluência, a indução da diferenciação com tratamento hormonal apropriado, leva a uma significativa alteração na morfologia celular. O pré-adipócito torna-se esférico, acumula lipídeos em pequenas gotículas e progressivamente adquire características bioquímicas e morfológicas de um adipócito maduro, conforme demonstrado na Figura 06 (Soukas, Socci *et al.*, 2001; Longo, Kennell *et al.*, 2002; Ross, Erickson *et al.*, 2002).

Figura 05. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. (A) Protocolo experimental de diferenciação de pré-adipócitos murinos em adipócitos. (B) Células subconfluentes em meio de propagação. (C) Células confluentes foram estimuladas com MDI por 24 horas. (D) Adipócitos já diferenciados após 8 dias de estímulo e (E) adipócitos diferenciados com corante específicos para lipídeos intracelulares *Oil Red O*. Isobutilmetilxantina (IBMX); dexametasona (DEX); CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP α), (C/EBP β); peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ).

4.14 Ensaio de estimuação de adipócitos humanos por A-SAA

Para avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos humanos estimulados por A-SAA, foi plaqueado 2×10^6 células em placas de 24

poços, em meio de cultura DMEM-F12, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de albumina séria bovina, 100µg/mL de estreptomicina, 100UI de penicilina e 0,25µg/mL de anfotericina B.

Essas células foram incubadas e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por duas (02) horas, para que todo e qualquer efeito hormonal induzido *in vivo* possa cessar. Essas células foram então estimuladas por 5 e 10 µg/mL de A-SAA e incubadas por 24 horas. Obviamente, um grupo controle sem indução por A-SAA também foi ensaiado.

4.15 Determinações de citocinas

As determinações de IL-6, IL-8, TNF α , IL-1 β e SAA, respeitando as espécies (humano e camundongo), foram feitas através de placa de ELISA de poliestireno (Corning®), as quais foram montadas e padronizadas a partir do Kit DuoSet da R&D System minneapolis, MN, USA.

4.16 Citometria de fluxo

Para caracterizar e quantificar a porcentagem de células diferenciadas obtida do processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros foram feitas marcações específicas para moléculas hidrofóbicas, incluindo lipídios neutros intracelulares, utilizando o fluoróforo *Nile Red* (9-diethylamino-5*H*-benzo[*a*]phenoxazine-5-one) (Sigma®). Os adipócitos maduros oriundos do processo de diferenciação descrito previamente foram tratados

com *Nile Red* (20 µg/mL) por 5 minutos e logo após, lavados com PBS. Nesse momento as amostras são analisadas em citômetro de fluxo *FACSCantoII*[®] *Flow Cytometer* (Becton Dickinson, San Juan, CA), onde o *Nile Red* sofre excitação em 488-525 nm e sua fluorescência emitida mensurada em 570-600 nm. Os histogramas foram analisados pelo software *FlowJo*[®].

Para distinguir células autofluorescentes de células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície, utilizou-se a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (Roederer, 2001). Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados limite FMO, e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados verdadeiros positivos. O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal no qual será medido um determinado marcador revelará a auto-fluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto-fluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo/marcador fluorescente usado para detectá-lo (Herzenberg, Tung *et al.*, 2006).

4.17 Ensaio de MTT

Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazan, intensamente coloridos, no interior das células. Estes

podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo, o DMSO, permitindo sua quantificação através da espectrometria. Em placa de cultura de 35 mm, as culturas celulares de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros foram tratadas com 200µL de solução aquosa de MTT (10 mg/L) para cada 2 mL de meio de cultura, deixando-se incubar durante 3 horas a 37⁰C. Retira-se então o meio de cultura e adiciona-se 2 mL de DMSO e, após 10 minutos, é feita a leitura a 550 nm, em um leitor de ELISA.

4.18 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA total das células foi realizada pelo *Kit Rneasy* (Qiagen Laboratories, Uniscience do Brasil, São Paulo), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. Para as amostras de adipócitos humanos, foi utilizado o *Rneasy Lipid Tissue Kit* (Qiagen Laboratories, Uniscience do Brasil, São Paulo), também de acordo com o fabricante. Durante o procedimento, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a 260 nm e sua pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm. As amostras de RNA foram diluídas para posterior síntese da primeira fita de DNA complementar (SuperScriptTM First-Strand synthesis System for RT-PCR - Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

4.19 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

4.19.1 Sistema de detecção SYBR® Green

Foram quantificadas a expressão de mRNA de SAA de camundongo e SAA1, SAA2 e SAA4 da espécie humana, além dos controles internos β -actina e ciclofilina.

Para a reação de PCR em tempo real das amostras de linhagens celulares oriundas de camundongo (pré-adipócitos 3T3-L1 e 3T3-L1 diferenciados em adipócitos), os cDNAs foram diluídos na concentração de 1ng/ μ L. As reações foram feitas para um volume final de 12 μ L, contendo 3 μ L da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) de cada gene, 3 μ L de cDNA e 6 μ L de SYBR®-Green Universal PCR Master Mix. As reações foram conduzidas separadamente com os seguintes oligonucleotídeos:

Genes	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Ciclofilina	5' - ATGGTCAACCCACCGTGT - 3'	5' - TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC - 3'
SAA1	5' - CCTGGGCTGCAGAAGTGATCAGCA - 3'	5' - AGTCCTCCGCACCATGGCCAAAGAA - 3'
SAA2	5' - CTGGGCCGCAGAAGTGATCAGCA - 3',	5' - GAGTCCTCCGCACCATGGCCTGT - 3'
SAA4	5' - GTTCGTTTTTCAAGGAGGCTCTCAA - 3'	5' - GGATATCATTATGTCCCAATAGGCTCT - 3'

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado no equipamento ABI Prism® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystem, New Jersey, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C para término do processo de desnaturação e

por fim anelamento e alongação dos *primers* a 60 °C por 1 minuto. Para todos os experimentos foi utilizado *threshold* de 0.1 e realizada triplicata das amostras com duplicata de poços.

Para análise da expressão de mRNA através de PCR em tempo real foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Para utilizarmos o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi necessário comparar a eficiência de amplificação dos genes. Os valores de CT do gene alvo foram subtraídos do CT do gene (constitutivo). Foi feito um gráfico da diferença contra o logaritmo da diluição do cDNA. A inclinação da reta (slope) menor que 0,1 foi levada em consideração para a eficiência de amplificação, justificando-se assim a utilização deste método de análise de expressão gênica.

4.19.2 Sistema de amplificação TaqMan®

Para a reação de PCR em tempo real das amostras oriundas de material humano (adipócitos), foi utilizado o método Taqman®. Os cDNAs foram diluídos na concentração de 9 ng/ μL . As reações foram feitas para um volume final de 10 μL , contendo 0,5 μL da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com a sonda FAM-NFQ de cada gene, 2 μL de cDNA, 5 μL de 2XTaqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem, Warrington, UK) e 2,5 μL de água livre de Rnase.

Para o ensaio, os *primers* utilizados são chamados de inventoriados pelo fabricante (Applied Biosystem, Warrington, UK), que não especificam a sequência nucleotídica, entretanto, garantem a especificidade e funcionalidade

do ensaio. Como controle, temos apenas os códigos do produto fornecido, Mm00441203_m1, para o gene SAA3 de camundongo e, 4552933E, para β -actina de camundongo.

O ensaio de PCR em tempo real pelo método Taqman[®] também foi realizado no equipamento ABI Prism[®] 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystem, New Jersey, EUA), nas seguintes condições: ativação da enzima *AmpErase*[®]*UNG* a 50°C por 2 minutos, seguida da desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e elongação dos *primers* e sonda a 60°C por 1 minuto. Para todos os experimentos foram realizadas triplicatas das amostras com duplicata de poços.

4.20 Ensaio de Hipóxia

Para o ensaio de hipóxia, as células com seus respectivos meios de cultura e suplementação, foram colocadas numa câmara normobárica (*design* próprio), e submetidas a uma atmosfera de baixa concentração de oxigênio, contendo 1% de O₂ (oxigênio), 94% de N₂ (nitrogênio) e 5% de CO₂ (dióxido de carbono). Para o controle do experimento, um medidor de concentração de oxigênio ambiental (Dräger Pac[®] 5000 O₂), fora utilizado. Para manter a umidade adequada, 5 mL de água foi colocado dentro da câmara, além de ter sido mantida numa estufa de CO₂ para cultura celular (Thermo Scientific), para manutenção da temperatura a 37°C. Além disso, as amostras controle foram mantidas sob uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ (normóxia), numa estufa de CO₂ para cultura celular (Thermo Scientific), pelo mesmo período das

amostras submetidas à hipóxia: 06, 12 e 24 horas. Após o ensaio, o sobrenadante das culturas celulares foi reservado para a dosagem SAA por ELISA, bem como o RNA extraído para a avaliação dos padrões de expressão dos genes SAA1, SAA2 e SAA4 por *Real Time PCR*.

Figura 06. Representação dos equipamentos utilizados para o ensaio de hipóxia. A. Câmara normobárica para manutenção da hipóxia. **B.** Cilindro de gás, contendo 95% de CO_2 e 5% de O_2 para criação do ambiente com baixa concentração de O_2 , placa de petri contendo água para manutenção da umidade atmosférica e um oxímetro para controle da concentração de oxigênio durante o experimento. **C.** Estufa de CO_2 para cultura celular para a manutenção da temperatura ideal (37°C).

4.21 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através de análises de colunas, utilizando o teste não paramétrico *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de comparação múltipla de Newman Keuls com o software Graphpad Prism4[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando o melhor entendimento do leitor, os resultados e suas respectivas discussões foram organizados em dois capítulos:

- I. Produção da proteína recombinante humana amilóide sérica A (SAA) 1 e 4.
- II. Efeitos da hipóxia na expressão de SAA em células do tecido adiposo e avaliação da liberação de citocinas pró-inflamatórias quando estimuladas por SAA.

CAPÍTULO I:

PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA AMILÓIDE SÉRICA A (SAA) 1 E 4.

5.1 Produção da proteína recombinante humana amilóide sérica A (SAA) 1 e 4.

5.1.1 Resultados

Como um dos objetivos deste estudo, a expressão das proteínas recombinantes A-SAA1 e C-SAA4 está sendo realizada com sucesso.

Para garantirmos a integridade do DNA cedido, o plasmídeo pGEX-2T, realizamos um gel de agarose (Figura 07) para avaliar o material genético. Verificamos que DNA plasmidial tanto de A-SAA1 quanto de C-SAA4 estavam íntegros e do tamanho esperado.

Figura 07. Eletroforese de DNA plasmidial. Gel de agarose (1%) evidenciando o DNA plasmidial íntegro. Os números expressos na figura indicam o volume de amostra aplicada no gel, bem como a quantidade de DNA que cada alíquota contém, onde 10µL de amostra corresponde a 1µL de amostra DNA pura, 5µL de amostra corresponde a 0,5µL de DNA, 2,5µL de amostra a 0,250µL e 1,25µL de amostra a 0,125µL de DNA.

Uma vez que o DNA plasmidial das sequência de interesse estavam em boas condições, realizamos um sequenciamento para confirmar se as sequências da A-SAA1 e C-SAA4 cedidas estavam corretas e correspondiam a sequência humana. Verificamos que há uma homologia de 100% para a A-SAA1, e de 99% de identidade para C-SAA4 quando comparados com a sequência descrita no NCBI. Analisando-se o eletroferograma da C-SAA4, observa-se um pico discreto, porém característico da adenina, nucleotídeo que não aparece na sequência formada, caracterizando um “gap”. Dessa maneira,

consideramos como um erro de leitura a falta da adenina, e a consideramos como existente na sequência original. Portanto, tanto o DNA para a A-SAA1 (Figura 08-A), quanto o da C-SAA4 (Figura 08-B) mostram-se completos e íntegros.

Figura 08-A. Sequencia nucleotídica da A-SAA1 adquirida no processo de sequenciamento em comparação à aquela considerada como referência (BLAST – NCBI).

Figura 08-B. Sequencia nucleotídica da C-SAA4 adquirida no processo de sequenciamento em comparação à aquela considerada como referência (BLAST – NCBI).

representação da sequência de aminoácidos da A-SAA1 (Figura 08-C) e C-SAA4 (Figura 08-D).

SAA1

```

001 cga agc ttc ttt tcg ttc ctt ggc gag gct ttt gat ggg gct cgg
    R  S  F  F  S  F  L  G  E  A  F  D  G  A  R

046 gac atg tgg aga gcc tac tct gac atg aga gaa gcc aat tac atc
    D  M  W  R  A  Y  S  D  M  R  E  A  N  Y  I

091 ggc tca gac aaa tac ttc cat gct cgg ggg aac tat gat gct gcc
    G  S  D  K  Y  F  H  A  R  G  N  Y  D  A  A

136 aaa agg gga cct ggg ggt gcc tgg gct gca gaa gtg atc agc gat
    K  R  G  P  G  G  A  W  A  A  E  V  I  S  D

181 gcc aga gag aat atc cag aga ttc ttt ggc cat ggt gcg gag gac
    A  R  E  N  I  Q  R  F  F  G  H  G  A  E  D

226 tcg ctg gct gat cag gct gcc aat gaa tgg ggc agg agt ggc aaa
    S  L  A  D  Q  A  A  N  E  W  G  R  S  G  K

271 gac ccc aat cac ttc cga cct gct ggc ctg cct gag aaa tac tga
    D  P  N  H  F  R  P  A  G  L  P  E  K  Y  stop

```

Figura 08-C. Sequência genica da proteína A-SAA1. Representação do inserto introduzido no plasmídeo pGEX-2T, para a síntese de A-SAA1 obtida no processo de sequenciamento.

SAA4

```

001 gaa agc tgg cgt tcg ttt ttc aag gag gct ctc caa ggg gtt ggg
    E  S  W  R  S  F  F  K  E  A  L  Q  G  V  G

046 gac atg ggc aga gcc tat tgg gac ata atg ata tcc aat cac caa
    D  M  G  R  A  Y  W  D  I  M  I  S  N  H  Q

091 aat tca aac aga tat ctc tat gct cgg gga aac tat gat gct gcc
    N  S  N  R  Y  L  Y  A  R  G  N  Y  D  A  A

136 caa aga gga cct ggg ggt gtc tgg gct gct aaa ctc atc agc cgt
    Q  R  G  P  G  G  V  W  A  A  K  L  I  S  R

181 tcc agg gtc tat ctt cag gga tta ata gac tac tat tta ttt gga
    S  R  V  Y  L  Q  G  L  I  D  Y  Y  L  F  G

226 aac agc agc act gta ttg gag gac tcg aag tcc aac gag aaa gct
    N  S  S  T  L  V  E  D  S  K  S  N  E  K  A

271 gag gaa tgg ggc cgg agt ggc aaa gac ccc gac cgc ttc aga cct
    E  E  W  G  R  S  G  K  D  P  D  R  F  R  P

316 gac ggc ctg cct aag aaa tac tga 339
    D  G  L  P  K  K  Y  stop

```

Figura 08-D. Sequência genica da proteína C-SAA4. Representação do inserto introduzido no plasmídeo pGEX-2T, para a síntese de C-SAA4 obtida no processo de sequenciamento. Em negrito, o aminoácido asparagina, que sofre uma glicosilação pós-traducional.

Realizamos a expressão das A-SAA1 e C-SAA4 com a indução com 0,1 mM de IPTG. Após 5 horas de expressão avaliamos a expressão protéica tanto do meio de cultura quanto das células centrifugadas. Verificamos um aumento da banda próxima a 35 KDa (Figura 09), altura essa compatível com a soma das massas atômicas da proteína SAA (12KDa) e GST (27KDa).

Este resultado nos permite concluir que a proteína de fusão SAA-GST não se encontra no meio de cultura, permanecendo intracelular.

Figura 09. Eletroforese de proteína para as amostras SAA1 e SAA4. SDS-PAGE (12%) evidenciando a expressão da proteína SAA 1 e 4 na altura dos 35 KDa, lembrando que a proteína de interesse se mantém ligada ao GST (pGEX-2T – *E. coli* BL21). A figura evidencia também a totalidade da proteína expressa no precipitado..

Realizamos testes de rendimento do processo de expressão da proteína recombinante, para assim se obter o máximo possível de eficiência no processo. Sendo assim, para uma melhor qualidade e quantidade de proteína expressa, foram testadas condições diferentes de temperatura (de 37°C para 30°C) e tempo de indução (de 5h para “overnight”). Entretanto, nenhuma das condições testadas até o momento se mostrou mais vantajosa.

Considerando ainda o rendimento de expressão da proteína recombinante, para obtermos a maior quantidade de proteína expressa, decidimos testar diferentes concentrações de IPTG para a indução da expressão. Foram testadas as concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1,0 mM de IPTG.

O processo de expressão se deu exatamente como descrito nos materiais e métodos (5 horas de indução a 37⁰C), e para a solubilização do precipitado formado foi utilizado a solução que contém o detergente (Triton X-100).

Em análise por SDS-PAGE (12%), podemos verificar que não houve diferença de indução nas concentrações de IPTG testadas (Figura 10), uma vez que todas as bandas apresentam-se de mesma área, evidenciando uma concentração de proteína expressa muito semelhante entre elas. Sendo assim, optamos por utilizar como indutor padrão o IPTG na menor concentração (0,1 mM), obtendo máxima eficiência com menor custo e gasto de reagente possível.

Figura 10. Eletroforese de proteína das amostras SAA1 e SAA4. SDS-PAGE (12%) evidenciando níveis semelhantes de expressão da proteína recombinante (SAA1 e SAA4), com diferentes concentrações do indutor de expressão IPTG (0,1mM, 0,5mM e 1,0mM).

Como previamente descrito, os métodos para produção de proteínas recombinantes exigem muitas vezes, o uso de agentes caotrópicos como a uréia ou a guanidina, para se obter o máximo de proteína solúvel. O uso de agentes desnaturantes tão potentes, por vezes, dificulta que a proteína recombinante tenha atividade. Como não está claramente estabelecido as funções biológicas da SAA, é impossível prever quanto o uso de desnaturantes podem comprometer, ou mesmo suprimir, a atividade da proteína SAA. Detergentes não-iônicos aparentemente são menos agressivos quanto a quebra de interações proteína-proteína e têm-se demonstrado extremamente útil para se isolar proteínas funcionais.

Realizamos então, um teste de solubilização das proteínas de interesse em tampões contendo ou não detergente, o Triton X-100. Foi observada uma solubilização mais acentuada naquela onde a solução de lise continha Triton X-100 (Figura 11).

Figura 11. Teste de solubilização da proteína expressa (SAA 1 e SAA 4). **A.** Solução de lise em PBS pH 7,3, contendo 0,2mg/mL lisozima, 5mM de EDTA, 0,1% (v/v) de Triton X-100, 50mM de benzamidina, 0,1mM de PMSF e 0,5mg/mL de iodoacetamida. **B.** Solução de lise contendo 20mM de Tris-HCl pH 8,0, 200mM de NaCl, 10mM de EDTA, 1mg/mL de lisozima e 2mM de PMSF.

Para confirmar se a proteína de interesse estava sendo realmente expressa, realizamos o *Western blot* tanto para A-SAA1 quanto para a C-SAA4 (Figura 12). Para isto padronizamos as condições das reações imunológicas. Concentrações diferentes dos anticorpos primário e secundário foram testados para as proteínas de interesse, para isso utilizamos os anticorpos anti-SAA

humano produzidos em coelho e anticorpo secundário anti IgG de coelho, produzido em cabra e marcado com HRP.

Para o anticorpo primário, testamos as diluições de 1:250, 1:500 e 1:800 de uma solução estoque de 0,5mg/mL, e para o anticorpo secundário, foram testadas as diluições de 1:500, 1:1000 e 1:2000 de uma solução estoque de 1mg/mL, sendo o melhor resultado obtido utilizando-se o anticorpo primário na diluição de 1:800, e para o secundário de 1:2000. outros parâmetros para uma melhor qualidade do ensaio de *Western blot* também foram testadas, como o tempo de incubação dos anticorpos, a temperatura das reações, as concentrações de tampão bloqueador de sítios inespecíficos, o tempo e temperatura de bloqueio e de lavagem da membrana.

As melhores condições do ensaio se deram com o bloqueio sendo realizado com 5% de albumina sérica bovina em TBS-Tween 0,1%, em temperatura ambiente, a lavagem da membrana foi realizada com PBS e Tween 20 a 0,05% por 3 vezes e 5 minutos cada em temperatura ambiente, e as reações com os anticorpos foram realizadas por duas (2) horas, sendo a reação com o anticorpo primário a 4⁰C, e a do secundário a temperatura ambiente, sempre sob agitação constante. Como método de revelação, utilizamos o método de quimiluminescência (Figura 12).

Figura 12. *Western Blot* das proteínas A-SAA1 e C-SAA4 recombinantes sintetizadas em nosso laboratório. SDS Page evidenciando inúmeras proteínas e Western Blot mostrando a imunodeteção das isoformas 1 e 4 da proteína recombinante SAA, na altura próxima a 35 KDa, correspondente ao peso molecular do complexo GST-SAA.

Com todos os parâmetros de expressão e identificação da A-SAA1 e C-SAA4 padronizados, realizamos uma expressão em média escala e purificamos as proteínas de interesse por coluna de afinidade.

Observamos que a purificação das proteínas recombinantes se deu de maneira satisfatória. Em ambas as purificações realizadas, mais especificamente nas corridas que representam as eluições da proteína, conseguimos ver além da banda de interesse do complexo GST-SAA1 (Figura 13) e GST-SAA4 (Figura 14) (cerca de 35 KDa), uma banda inespecífica na altura dos 27KDa, que acreditamos ser característica da proteína GST pura. Consideramos que há clivagem espontânea ou ação de proteases sobre o complexo GST-SAA. Uma vez livre na amostra, o GST também se ligará a resina de purificação e também eluirá no mesmo momento que o complexo GST-SAA.

Figura 13. SDS-PAGE para análise da purificação da SAA 1.1. Padrão de peso molecular. **2.** Primeira lavagem da resina para retirada de resíduos não ligantes a resina. **3.** Segunda lavagem. **4.** Terceira lavagem. **5.** Quarta lavagem. **6.** Primeira eluição da amostra. **7.** Segunda eluição. **8.** Terceira eluição. **9.** Fração não ligada a resina no início do processo de purificação.

Figura 14. SDS-PAGE para análise da purificação da SAA 4.1. Padrão de peso molecular. **2.** Primeira lavagem da resina para retirada de resíduos não ligantes a resina. **3.** Segunda lavagem. **4.** Terceira lavagem. **5.** Quarta lavagem. **6.** Primeira eluição da amostra. **7.** Segunda eluição. **8.** Terceira eluição. **9.** Fração não ligada a resina no início do processo de purificação.

Nesse momento, com a purificação realizada e tendo em solução aquosa o complexo GST-SAA1 e GST-SAA4, se faz necessário a clivagem do complexo para se obter as proteínas recombinantes livres. Dessa maneira, como detalhado em materiais e métodos, o complexo fora clivado pela ação da

enzima trombina (Sigma®). Após a clivagem, utilizamos a coluna de glutatona novamente para o isolamento da A-SAA1 e C-SAA4 em solução aquosa. Isso porque o GST livre, também solúvel no meio, se liga fortemente a coluna de purificação, ao contrário das proteínas recombinantes, que não se ligam. Dessa maneira, recuperando-se a fração não ligada por centrifugação, temos as proteínas A-SAA1 e C-SAA4 livres e purificadas, como pudemos observar por análise em SDS-PAGE, uma única banda na altura do 14KDa, altura compatível com a da amilóide sérica A.

Ainda para a verificação da eficácia da clivagem do complexo GST-SAA e a posterior purificação, ou seja, para a confirmação da presença das proteínas na solução adquirida, foi realizado um ensaio de *Western Blot*, como descrito previamente e observado na figura abaixo (Figura 15):

Figura 15. SDS-PAGE para análise da expressão, purificação e imunodeteção das isoformas A-SAA1 e C-SAA4.1. **Expressão.** Visualização da expressão da recombinante, complexo GST-SAA na altura compatível de 40KDa. **2. Purificação.** Visualização das proteínas A-SAA1 e C-SAA4 livres na altura compatível dos 14KDa. **3. Imunodeteção.** Verificação da presença da proteína recombinante na solução purificada.

5.1.2 Discussão

Com a expressão dos recombinantes, há a potencialidade de conseguirmos quantidades expressivas das SAAs no nosso laboratório. Questões futuras envolverão uma análise de endotoxina nas amostras das SAAs, ou seja, contaminantes oriundos da bactéria utilizada. Esse ensaio já está previsto, em parceria com a Professora Terezinha de Jesus Andreolli Pinto, do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (CONFAR – FCF/USP) Para tal, será realizado um teste padrão para determinação de endotoxina, o *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Em caso positivo para o teste de endotoxina, utilizaremos, para a remoção de endotoxina contaminante, o método de separação por duas fases com Triton-X, que consiste na ligação da endotoxina presente na amostra ao detergente, formando um complexo que pode ser retirado por centrifugação (Aida e Pabst, 1990).

Após a análise e possível retirada de endotoxina contaminante, realizaremos os testes de função biológica da proteína. Como estratégia, utilizaremos o teste de produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais de camundongo. O aumento da produção de NO induzido por SAA é uma das atividades biológicas que o nosso laboratório descreveu (Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008). Esse teste permitirá verificar a atividade biológica da proteína produzida em nosso laboratório. Ressaltamos que haverá a necessidade de verificar se uma possível contaminação por LPS estará presente ocasionando a produção de NO. Nesse ensaio, para a indução da produção de NO, será utilizado a proteína recombinante SAA1 e o LPS como controle positivo. Além disso, realizaremos um pré-tratamento da SAA

recombinante com polimixina B (Poly B), um lipopeptídeo cíclico que se liga de forma estequiométrica ao lípide A do LPS e bloqueia seus efeitos (Biragyn, Ruffini *et al.*, 2002), e com proteinase K (PK), uma serina protease que cliva ligações peptídicas em sítios carboxílicos de aminoácidos (Palliser, Huang *et al.*, 2004), inativando a proteína recombinante SAA1.

5.1.3 Conclusão

Por fim, temos como objetivo central, obter as proteínas em quantidade e pureza suficientes para iniciarmos ensaios biológicos comparativos.

CAPÍTULO II:

EFEITOS DA HIPÓXIA NA EXPRESSÃO DE SAA EM CÉLULAS DO TECIDO ADIPOSEO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS QUANDO ESTIMULADAS POR SAA

5.2 Avaliação da expressão e produção da amiloide sérica A (SAA) em pré-adipócitos 3T3-L1 e adipócitos humanos submetidos à hipóxia.

5.2.1 Resultados

Para a validação de um ensaio de hipóxia (atmosfera a 1% de O₂), há a necessidade de padronização, para que se garanta que todos os ensaios realizados se mantenham constantes, garantindo a sua reprodutibilidade, ou seja, que em todos os ensaios individuais realizados, as células testadas fossem submetidas ao mesmo processo, sem variações como, por exemplo, de pressão, temperatura, umidade, e principalmente, da atmosfera desejada. Com a padronização do ensaio realizada (descrita nos materiais e métodos), iniciamos os testes primários com culturas celulares, avaliando principalmente suas funções vitais, de maneira a se padronizar tempos específicos para o ensaio de hipóxia.

Primeiramente, avaliamos a eficácia do processo realizado, ou seja, avaliamos se realmente as culturas celulares expostas ao experimento, estavam sendo submetidas à hipóxia (1% de oxigênio). Para tal, avaliamos a expressão de um gene classicamente induzido pela hipóxia, via HIF-1 α , o gene GLUT-1 (Figura 16).

Figura 16. Verificação da expressão de GLUT-1 por RT-PCR em adipócitos humanos submetidos à hipóxia. Células (2×10^6) foram submetidas à hipóxia pelo período de 24 horas. Como controle endógeno, a expressão de ciclofilina.

Como observado na figura acima, a expressão do gene GLUT-1 se eleva em condição de hipóxia, como já demonstrado na literatura (Ebert 1995, Wood glut 2007), que é diretamente regulado pela proteína HIF-1 α , que por sua vez, também se mostra aumentada em situações de baixa tensão de O₂, e desempenha um papel de extrema importância nas alterações celulares/moleculares oriundas de um evento de hipóxia, como já mencionada na revisão bibliográfica.

Comprovando a funcionalidade do sistema utilizado para geração de uma atmosfera a 1% de O₂, realizamos testes visuais para verificação da viabilidade celular das culturas testadas. Dessa maneira, fotografamos as diferentes culturas celulares submetidas à hipóxia, evidenciando que não há diferença entre o grupo controle e grupo testado, considerando principalmente o número de células aderidas e a manutenção da monocamada celular na placa de cultura, evidenciado na figura 17 para os pré-adipócitos 3T3-L1 e na figura 18 para os pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados. Para os adipócitos humanos, verificamos que não houve lise celular, evidenciada pela presença de células íntegras e não aderentes na cultura celular (Figura 19).

Figura 17. Efeito da hipóxia em cultura de pré-adipócitos murinos 3T3-L1. A. Visualização do grupo controle de pré-adipócitos murinos 3T3-L1. **B.** Grupo teste de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 submetidos à hipóxia por um período de 24 horas (Aumento de 400x).

Figura 18. Efeito da hipóxia em cultura de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros. A. Visualização do grupo controle de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros. **B.** Grupo teste de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros, submetidos à hipóxia por um período de 24 horas (Aumento de 800x).

Figura 19. Efeito da hipóxia em cultura de adipócitos humanos. A. Visualização do grupo controle de adipócitos humanos. **B.** Grupo teste de adipócitos humanos submetidos à hipóxia por um período de 24 horas (Aumento de 400x).

Além da visualização das culturas celulares submetidas à hipóxia, também realizamos testes de viabilidade celular nas mesmas. O teste de azul de trypan foi aplicado às culturas de pré-adipócitos 3T3-L1, e o ensaio de MTT às culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados. Observamos então, que pela técnica de exclusão por azul de trypan, independente do tempo de

exposição à baixa tensão de oxigênio, não observamos diferença na porcentagem de células vivas entre o grupo controle e o grupo testado, evidenciando que culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 permanecem viáveis até mesmo após um período de 24 horas sob hipóxia (Figura 20).

Figura 20. Avaliação da viabilidade celular de pré-adipócitos 3T3-L1. Ensaio de exclusão de *Trypan Blue* para pré-adipócitos 3T3-L1 em confluência submetidos a hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3). Análise estatística em relação ao controle (**p<0,01).

Entretanto, não foi possível realizar o mesmo teste de viabilidade celular (azul de trypan) para os pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados, isso porque, sob ação de tripsina, usada para destacar as células da placa de cultura, essas células formam grumos celulares, que inviabilizam a contagem em câmara de Neubauer. Também tentamos retirar as células da placa de cultura utilizando um *cell scraper* (rodinho), entretanto este manuseio provocou danos a estrutura celular que resultou num erro no teste de exclusão de azul de trypan. Sendo assim, optamos pelo ensaio de MTT, que avalia a atividade metabólica da célula. Observamos, portanto, uma diminuição em torno de 15% na atividade

metabólica dos pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados submetidos à hipóxia, independentemente do tempo (06, 12 ou 24 horas) (Figura 21).

Figura 21. Avaliação da viabilidade celular de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados. Ensaio de MTT para pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$). Análise estatística em relação ao controle (** $p < 0,01$).

Também verificamos qual o impacto da hipóxia sobre o pH das culturas. A verificação do pH do meio de cultura identifica alterações no metabolismo, uma vez que, sob uma atmosfera deficiente de oxigênio, células eucarióticas, incluindo adipócitos, são capazes de promover a respiração anaeróbia para produção de energia (ATP), obtendo metabólitos ácidos (West, Prinz *et al.*, 1987; Semenza, 2001), que são capazes de promover a diminuição do pH do meio de cultura celular. Dessa maneira, considerando os diferentes tempos de incubação das culturas celulares sob uma atmosfera de 1% de oxigênio, temos diferentes concentrações de ácidos e, dependente da eficácia do sistema tampão do meio de cultura utilizado, diferentes pH para as amostras. A figura 23 mostra as alterações de pH das culturas 3T3-L1, não diferenciadas e diferenciadas e de adipócitos humanos. As variações de pH não são

comparáveis entre as 3 culturas, uma vez que as condições de meio e número de células são diferentes. De qualquer modo observamos que a alteração de pH não foi importante para as culturas 3T3-L1 não diferenciadas (Figura 22-A) e para adipócitos (Figura 22-C), entretanto para 3T3-L1 diferenciadas o pH atingiu valores de até 6.5 o que pode ter contribuído para a perda parcial de viabilidade desta cultura (Figura 22-B).

Figura 22. Avaliação do pH do meio de cultura de diferentes culturas celulares submetidas à hipóxia. A. Pré-adipócitos 3T3-L1 em confluência submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. **B.** Pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. **C.** Adipócitos humanos submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3). Análise estatística em relação ao controle (*p<0,05, **p<0,01).

Outro ponto considerável no ensaio de hipóxia foi a avaliação da integridade das gotículas de lipídios armazenadas pelos pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados. Primeiramente, esta verificação foi visual (Figura 18). Adicionalmente, realizamos a coloração das partículas de lipídio com *Oil Red O* evidenciando que tanto nas culturas controle, como nas culturas testes de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados não houve diferença na quantidade de corante absorvido (Figura 23). Além da constatação visual (microscopia óptica) fizemos leitura do corante solubilizado em solvente orgânico em espectrofotômetro (Figura 24).

Figura 23. Coloração por Oil Red O de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados. A. Visualização do grupo controle de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros. **B.** Grupo teste de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros, submetidos à hipóxia por um período de 24 horas (Aumento de 800x).

Figura 24. Coloração por Oil Red O de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados. Avaliação do conteúdo lipídico intracelular de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$). Análise estatística em relação ao controle (** $p < 0,01$).

Com a padronização do ensaio de hipóxia realizado, e todos os controles efetivados, começamos a explorar o verdadeiro interesse de nossa pesquisa, avaliar a expressão e produção da proteína amiloide sérica A (SAA) na condição de hipóxia.

Observamos primeiramente a liberação de SAA em culturas celulares em condições controle, ou seja, verificamos o perfil de liberação da proteína SAA em pré-adipócitos 3T3-L1, pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados e adipócitos humanos em culturas submetidas a uma atmosfera de 21% de oxigênio, dada como normóxia. Para compararmos a liberação de SAA nas diferentes culturas celulares realizadas, tivemos que normalizar os resultados obtidos de concentração de SAA em sobrenadante celular, e para isso, foi necessário conhecer o número de células utilizadas em cada ensaio.

Para as culturas de adipócitos humanos não houve complicação, pois se tratando de uma célula sem capacidade proliferativa, o número de células

plaqueadas (2×10^6 células) para o experimento se mantém constante durante todo o ensaio. Entretanto, para as culturas de pré-adipócitos murinos 3T3-L1, que trabalhamos na condição de confluência celular, fizemos a contagem das células, em câmara de Neubauer, no momento do ensaio, sendo elas diferenciadas ou não.

Com a contagem realizada, observamos que em cada experimento de hipóxia foram utilizados, em média, 6×10^5 pré-adipócitos 3T3-L1 e 15×10^5 pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados (Figura 25). Lembrando que, para todos os ensaios utilizados, o volume de sobrenadante foi constante (2 mL).

Figura 25. Número de células utilizadas em cada ensaio de hipóxia. Pré-adipócitos 3T3-L1 em confluência, mantidos em meio DMEM, suplementado com 10% de soro de bezerro (SB). Pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados mantidos em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Todas as células foram mantidas em estufa de cultura celular, sob uma atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C até o momento do ensaio de hipóxia e contagem em câmara de Neubauer. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$).

Sabendo-se o número de células utilizadas para cada ensaio, além do volume de sobrenadante presente, pudemos verificamos o perfil de liberação da proteína SAA em pré-adipócitos 3T3-L1, adipócitos diferenciados e

adipócitos humanos em culturas submetidas a uma atmosfera de 21% de oxigênio (normóxia) (Figura 26).

Figura 26. Perfil de liberação da proteína SAA em situação controle de diferentes culturas celulares. Pré-adipócitos 3T3-L1 em confluência, mantidos em meio DMEM, suplementado com 10% de soro de bezerro (SB). Pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros mantidos em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Adipócitos humanos mantidos em DMEM-F12, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Todas as culturas celulares mencionadas foram mantidas em estufa de cultura celular, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$), normalizando o número de células para 6.10^5 células por ensaio (** $p < 0,001$).

Observamos que a liberação de SAA para o meio de cultura está vinculada ao seu “estado de diferenciação celular”, ou seja, quanto mais diferenciadas e hipertrofiadas as células, maior a liberação de SAA, como visto no ensaio de ELISA realizado, onde no sobrenadante dos pré-adipócitos 3T3-L1, não foi detectado a presença de SAA, já para os pré-adipócitos diferenciados, detectamos concentrações próxima a 0,18 ng/mL, e finalmente, para a célula dada como a mais hipertrofiada, o adipócito humano, concentrações de 8,5 ng/mL.

Observado o perfil de liberação de SAA nos três modelos de cultura celulares em situação controle, submetemos as mesmas células a uma

atmosfera de 1% de oxigênio (hipóxia), por tempos diversificados (06, 12 e 24 horas) para avaliarmos novamente o perfil de liberação de SAA por essas células. Os resultados abaixo mostram a expressão de mRNA de SAA para as culturas de células de camundongo (3T3-L1) e humanas (adipócitos), respeitando a diversidade genética existente entre as espécies, avaliando a isoforma SAA3 para as células murinas e, três isoformas humanas da proteína em questão (SAA1, SAA2 e SAA4).

Além da expressão gênica, a liberação da proteína SAA também foi avaliada através de ensaios de ELISA, lembrando apenas que utilizando essa metodologia, não foi possível identificar as isoformas específicas da SAA no sobrenadante das culturas celulares. Por esse motivo, a quantificação da proteína é nomeada apenas de SAA (amilóide sérica A).

Com o ensaio realizado, observamos que não há diferença na expressão de SAA em culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 submetidas à hipóxia (Figura 27). Entretanto, vemos que, apesar de não se configurar a presença da proteína SAA no sobrenadante dessa cultura celular, bem como a ausência da proteína SAA em meio intracelular (ensaio também realizado), observamos a expressão do gene SAA, evidenciando uma transcrição gênica presente. Dessa maneira, podemos supor que a expressão de SAA seja muito baixa e, consequentemente, concentrações indetectáveis por técnicas de ELISA da proteína. Além disso, também devemos considerar que o processo de tradução possa estar prejudicado, ou mesmo que a proteína gerada possa estar sendo degradada de maneira rápida e eficaz.

Figura 27. Efeito da hipóxia na expressão de mRNA de SAA em pré-adipócitos 3T3-L1. Expressão relativa de SAA em relação ao gene controle β -actina (ACTB) utilizando o ensaio de *Real Time PCR* (método TaqMan[®]) de pré-adipócitos 3T3-L1 em confluência, submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$), sempre em relação ao controle (normóxia), representada pelo valor de 1,0.

É importante salientar, que para o ensaio acima mostrado, e para todos os outros mostrados a seguir, os controles foram realizados, ou seja, para cada experimento de hipóxia realizado, considerando os tempos de 06, 12 e 24 horas, uma amostra controle também foi efetuada. Entretanto, como todos os controles foram equivalentes, nos gráficos mostramos apenas um controle.

Para os pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados, submetidas aos tempos de 12 e 24 horas, observamos um aumento na expressão de mRNA da SAA em torno de 100% (Figura 28-A). Entretanto, em relação à proteína produzida, não observamos diferença nas concentrações obtidas nos ensaios de ELISA com o sobrenadante celular (Figura 28-B) e dosagem de proteína intracelular (Figura 28-C). Como hipótese, há de se considerar que o tempo do ensaio pode ter sido insuficiente para a síntese da proteína.

Figura 28. Efeito da hipóxia na expressão de mRNA de SAA, liberação da proteína para o meio de cultura e quantidade de SAA intracelular em pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros. **A.** Expressão relativa de SAA em relação ao gene controle β -actina (ACTB) utilizando o ensaio de *Real Time PCR* (método TaqMan[®]) de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros, submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$), sempre em relação ao controle (normóxia), representada pelo valor de 1,0. **B.** Concentração de SAA (ng/mL) em sobrenadante de culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. **C.** Quantidade relativa de SAA intracelular de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos maduros submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$).

Considerando os valores de desvio padrão elevados obtidos nos ensaios de ELISA para SAA em culturas de pré-adipócitos diferenciados (Figuras 28-B e 28-C), resolvemos avaliar a homogeneidade celular dessas amostras quando colocadas em teste. Dessa maneira, houve a preocupação de se avaliar o processo de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1, isso porque a cada processo de diferenciação, obtivemos taxas diferentes de células diferenciadas, ou seja, do total de pré-adipócitos estimulados pelo coquetel de diferenciação, somente uma porcentagem dessas células de fato se diferenciaram, o que justifica a dispersão dos resultados.

Para caracterizar e quantificar a porcentagem de células diferenciadas obtida do processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 foram feitas marcações específicas para moléculas hidrofóbicas, incluindo lipídios neutros intracelulares, utilizando o fluoróforo *Nile Red*[®].

Como controle negativo, uma população de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados (sem a adição do fluoróforo), foi caracterizada por citometria de fluxo quanto a sua auto-fluorescência, evidenciando que apenas 0,22% das células emitiam fluorescência no mesmo comprimento de onda que a sonda *Nile Red*[®] emite (Figura 29).

Figura 29. Caracterização de uma população de pré-adipócitos diferenciados em adipócitos maduros sem a adição da sonda Nile Red como controle amostral. Análise realizada por citometria de fluxo (FACSCantoll[®] Flow Cytometer Becton Dickinson, San Juan, CA) e analisadas pelo software FlowJo[®]. **A.** Representação da população heterogênea considerando os parâmetros FSc e SSc (tamanho e complexidade). **B.** Seleção do grupo mais homogêneo, excluindo-se grumos e *debris* celulares. **C.** Verificação da fluorescência emitida pela amostra na ausência de Nile Red.

Para as amostras analisadas por citometria de fluxo, na presença de *Nile Red*[®], de pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados, evidenciaram taxas diferentes de diferenciação celular. Observamos uma porcentagem de 97,9% de células diferenciadas para a primeira amostra (Figura 30), 91,4% e 82,9% para as amostras 2 e 3, respectivamente (Figuras 31 e 32).

Figura 30. Amostra 1. Análise percentual de diferenciação celular de uma população de pré-adipócitos murinos diferenciados em adipócitos maduros (Nile Red⁺). Análise realizada por citometria de fluxo (FACSCantol[®] Flow Cytometer Becton Dickinson, San Juan, CA) e analisadas pelo software FlowJo[®]. **A.** Representação da população heterogênea considerando os parâmetros FSc e SSc (tamanho e complexidade). **B.** Seleção do grupo mais homogêneo, excluindo-se grumos e *debris* celulares. **C.** Verificação da fluorescência emitida pela amostra complexado ao Nile Red. **D.** Histograma representativo do total de células diferenciadas (Nile Red⁺ - 97,9%) (n=1).

Figura 31. Amostra 2. Análise percentual de diferenciação celular de uma população de pré-adipócitos murinos diferenciados em adipócitos maduros (Nile Red⁺). Análise

realizada por citometria de fluxo (*FACSCantoll*[®] *Flow Cytometer Becton Dickinson, San Juan, CA*) e analisadas pelo *software FlowJo*[®]. **A.** Representação da população heterogênea considerando os parâmetros FSc e SSc (tamanho e complexidade). **B.** Seleção do grupo mais homogêneo, excluindo-se grumos e *debris* celulares. **C.** Verificação da fluorescência emitida pela amostra complexado ao Nile Red. **D.** Histograma representativo do total de células diferenciadas (Nile Red⁺ - 91,4%) (n=1).

Figura 32. Amostra 3. Análise percentual de diferenciação celular de uma população de pré-adipócitos murinos diferenciados em adipócitos maduros (Nile Red⁺). Análise realizada por citometria de fluxo (*FACSCantoll*[®] *Flow Cytometer Becton Dickinson, San Juan, CA*) e analisadas pelo *software FlowJo*[®]. **A.** Representação da população heterogênea considerando os parâmetros FSc e SSc (tamanho e complexidade). **B.** Seleção do grupo mais homogêneo, excluindo-se grumos e *debris* celulares. **C.** Verificação da fluorescência emitida pela amostra complexado ao Nile Red. **D.** Histograma representativo do total de células diferenciadas (Nile Red⁺ - 82,9%) (n=1).

Como bem observado acima, em nossas culturas celulares há diferentes porcentagens de diferenciação, o que certamente causa uma variedade na resposta celular aos testes realizados (hipóxia), o que pode explicar valores de desvio padrão elevados, que são incomuns quando se trata de culturas celulares imortalizadas.

Também como objeto de estudo, avaliamos a expressão e liberação de SAA em culturas de adipócitos humanos submetidos á hipóxia. Para tal ensaio,

verificamos primeiramente o perfil de expressão das isoformas A-SAA1, A-SAA2 e C-SAA4 em culturas controles, numa atmosfera de 21% de oxigênio.

Como evidenciado na figura abaixo, a isoforma A-SAA1 é mais expressa em relação às outras isoformas, sendo aproximadamente 3 vezes mais expressa que a A-SAA2 e 500 vezes mais expressa que a C-SAA4 (Figura 33).

Figura 33. Expressão de mRNA das diferentes isoformas de SAA em adipócitos humanos em situação controle. Expressão relativa de SAA em relação ao gene controle ciclofilina, utilizando o ensaio de *Real Time PCR* (método SYBR®-Green) de adipócitos humanos mantidos em DMEM-F12, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), em estufa de cultura celular, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n = 3), (**p<0,01).

Realizamos então, os ensaios de submissão de culturas de adipócitos humanos à hipóxia, para avaliar a resposta celular em relação a expressão e síntese da proteína SAA nesse evento em particular. Como resultado, observamos um aumento na expressão da isoforma A-SAA1 para os tempos de 12 e 24 horas (Figura 34-A). Para a isoforma A-SAA2, já observamos um aumento da expressão gênica com 6 horas, mantendo-se elevada até o último tempo testado (24 horas em hipóxia) (Figura 34-B). Por fim, observou-se

também um aumento para a isoforma C-SAA4, dada como constitutiva, no tempo ensaiado de 24 horas (Figura 34-C).

Figura 34. Efeito da hipóxia na expressão de mRNA de SAA1, SAA2 e SAA4 em adipócitos humanos. **A.** Expressão relativa de SAA1 em relação ao gene controle ciclofilina, utilizando o ensaio de *Real Time PCR* (método SYBR[®]-Green) de adipócitos humanos, submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. **B.** Expressão relativa de SAA2 em relação ao gene controle ciclofilina, utilizando o ensaio de *Real Time PCR* (método SYBR[®]-Green) de adipócitos humanos, submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. **C.** Expressão relativa de SAA4 em relação ao gene controle ciclofilina utilizando o ensaio de *Real Time PCR* (método SYBR[®]-Green) de adipócitos humanos, submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes ($n = 3$), sempre em relação ao controle (normóxia), representada pelo valor de 1,0.

Sendo assim, apesar de constatararmos um aumento significativo de expressão para os três genes testados, pudemos observar três padrões temporais distintos de expressão gênica. Para as isoformas classicamente caracterizadas como induzíveis (em relação a expressão gênica), há diferença na indução de expressão, onde 6 horas em hipóxia são suficientes para alterar a expressão de A-SAA2 e somente após 12 horas para a alteração da isoforma A-SAA1.

Além da expressão gênica, avaliamos também a liberação de SAA no sobrenadante das culturas de adipócitos humanos submetidos à hipóxia, bem como a quantidade intracelular de SAA presente.

Não observamos alteração na concentração de SAA intracelular em adipócitos submetidos à hipóxia (Figura 35-B). Entretanto, verificamos uma diminuição na concentração de SAA no sobrenadante dessas culturas celulares, já evidente no ensaio de 6 horas de hipóxia (Figura 35-A).

Figura 35. Efeito da hipóxia na liberação de SAA para o meio de cultura e quantidade de SAA intracelular em adipócitos humanos. A. Concentração de SAA (ng/mL) em sobrenadante de culturas de adipócitos humanos submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. **B.** Quantidade relativa de SAA intracelular em adipócitos humanos submetidos à hipóxia por 06, 12 ou 24 horas. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três

experimentos independentes (n = 3). Análise estatística em relação ao controle (**p<0,01, ***p<0,001).

Em suma, obtivemos resultados semelhantes nos ensaios realizados com os pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados e adipócitos humanos, caracterizadas acima como efetivas produtoras de SAA, verificando um aumento na expressão de mRNA da SAA quando submetidas à hipóxia.

5.3 Papel da amiloide sérica A (SAA) na liberação de proteínas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β) em adipócitos humanos.

5.3.1 Resultados

Após incubação por 24 horas dos adipócitos maduros isolados de tecido adiposo humano com a SAA (5 e 10 μ g/mL), foi verificado, no sobrenadante, a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. Na figura 36-A, observamos que a A-SAA estimulou a produção de TNF- α nas concentrações de 5 e 10 μ g/mL (aumento de 7 vezes), sendo que a liberação de TNF- α não foi dose-dependente. Para IL-1 β , IL-6 e IL-8, a SAA não serviu como estímulo (Figuras 36-B, 36-C e 36-D, respectivamente).

É possível que a ausência de um efeito observável da SAA sobre a produção de algumas das citocinas estudadas, especialmente IL-6 e IL-1 β , deva-se a grande variação entre os experimentos, fruto de heterogeneidade da população de estudo. Há ainda que se considerar que outros tempos de incubação ou concentrações de SAA poderiam ser mais efetivas.

Figura 36. A. Efeito da A-SAA na estimulação de expressão de TNF- α em adipócitos humanos. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de cinco experimentos independentes ($n = 5$), (** $p < 0.01$). **B.** Efeito da A-SAA na estimulação de expressão de IL-1 β em adipócitos humanos. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de quatro experimentos independentes ($n = 4$), $p > 0.05$. As células foram mantidas em cultura com DMEM-F12 e estimuladas com 5 e 10 μ g/mL de SAA por 24 horas.

Figura 36. C. Efeito da A-SAA na estimulação de expressão de IL-6 em adipócitos humanos. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes ($n = 3$), $p > 0.05$. **D.** Efeito da A-SAA na estimulação de expressão de IL-8 em adipócitos humanos. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de quatro experimentos independentes ($n = 4$), $p > 0.05$. As células foram mantidas em cultura com DMEM-F12 e estimuladas com 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de SAA por 24 horas.

5.4 Discussão

No intuito de contribuir para a compreensão da relação existente entre a proteína SAA e hipóxia no tecido adiposo, simulamos esse evento que frequentemente ocorre na hipertrofia e hiperplasia de adipócitos no processo da obesidade. Para tal, utilizamos culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 murino e adipócitos humanos submetidas a baixas concentrações de oxigênio. Nos ensaios de hipóxia, é importante citar que a concentração de oxigênio para o experimento (1%) é compatível com a pressão parcial de 7,6 mmHg, que é aproximadamente a mesma encontrada no tecido adiposo branco de camundongos *ob/ob* (Trayhurn, Wang *et al.*, 2008).

Já foram descritos alguns genes sensíveis a baixas tensões de O₂, muitos deles relacionados ao processo inflamatório, como o aumento de angPI4, IL-6, leptina, MIF, PAI-1, VEGF e MCP-1 (Kanda, Tateya *et al.*, 2006; Weisberg, Hunter *et al.*, 2006; Wang, Wood *et al.*, 2007) em pré-adipócitos murinos e adipócitos humanos. É interessante citar que a produção das proteínas IL-6, leptina, MIF, PAI-1, VEGF e MCP-1 também se encontram elevadas em situações de hipóxia. Entretanto, para algumas proteínas, como o TNF- α , angPI4, IL-1 β , GLUT-3 e GLUT-5, ainda não há a associação entre o aumento da expressão gênica e o aumento da concentração da proteína. Para esses genes, ainda não há uma conclusão definitiva (Ye, Gao *et al.*, 2007). Entretanto, para a proteína HIF-1 α , extremamente importante na sinalização celular frente à hipóxia, sua concentração é rápida e substancialmente aumentada em cultura de adipócitos (aproximadamente 8 vezes em 4 horas), (Yu, Frid *et al.*, 1998; Catron, Mendiola *et al.*, 2001; Lolmede, De Saint Front *et*

al., 2003; Chen, Lam *et al.*, 2006; Segawa, Fukuhara *et al.*, 2006), enquanto que sua expressão gênica não se altera (Wang, Wood *et al.*, 2007).

Nesse contexto, nosso resultado acrescenta à lista de proteínas, que tem um aumento de sua expressão gênica induzida por hipóxia, a SAA. Observamos um aumento na expressão de SAA, sem alteração em seu conteúdo protéico (Figura 37). Deve-se observar que o aumento na expressão de SAA, em adipócitos murinos ou humanos submetidos à hipóxia, se manteve em torno de 2 (duas) vezes, dado que vai a favor da literatura que aponta que a maioria dos genes sensíveis à hipóxia se alteram em 1,5 à 4 vezes em média nos adipócitos, quando comparado aos seus controles (Wang, Wood *et al.*, 2007).

Figura 37. Hipóxia altera a expressão gênica em adipócitos. O diagrama mostra os genes cuja expressão é aumentada ($\uparrow$) ou diminuída ($\downarrow$) em adipócitos (murino ou humano) submetidos à hipóxia. Os estudos que também demonstraram a alteração na concentração (ou atividade) da proteína estão evidenciados em vermelho. Os resultados que ainda são conflitantes, como o TNF- α e SAA, estão representados em preto. Legenda: Angptl4, proteína angiopoietina-like 4; Hemox, haeme oxygenase 1; MIF, fator inibitório de migração de macrófagos; MMP, metaloproteínase de matriz; MT-3, metallothionein-3; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio-1; PDK, piruvato desidrogenase kinase1; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular.

O aumento da expressão de SAA no tecido adiposo pode ter grande impacto na obesidade. De acordo com resultados recentes do nosso grupo de pesquisa, a SAA promove a proliferação e diminui a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, aumenta a lipólise dessas células visualizada através da diminuição da expressão da perilipina, e ainda diminui a captação de glicose, via diminuição de expressão do receptor GLUT4, de células já diferenciadas (Monteiro, 2010). Sendo assim, associando-se a hipóxia, o processo de

obesidade e a proteína SAA, temos como resultante um maior contingente de células capazes de se diferenciarem à adipócitos num momento seguinte ao evento de hipóxia. Essa relação é apoiada por pesquisas existentes que demonstram que o nível de expressão dos genes adipogênicos aP2 e o PPAR γ estão reduzidos para pré-adipócitos e adipócitos quando submetidos à hipóxia (Yun, Maecker *et al.*, 2002; Kim, Song *et al.*, 2005; Hosogai, Fukuhara *et al.*, 2007). Dessa maneira, além de HIF, podemos apontar a SAA como sendo outro fator que favorece a diminuição da diferenciação celular em um evento de hipóxia.

Estes efeitos que atribuímos a SAA indicam uma ação tanto parácrina como autócrina da proteína, uma vez que essa adipocina apresenta ação sobre os mesmos adipócitos e pré-adipócitos que a produzem, bem como nas células adjacentes (Figura 38). Além disso a SAA produzida pelo fígado na fase aguda poderia alcançar o tecido adiposo e afetá-lo.

A SAA no tecido adiposo parece ter diversas funções, os resultados dos ensaios de estimulação de adipócitos humanos com SAA, promovendo uma maior liberação de TNF- α , indica um papel de extrema importância na manutenção de um perfil pró-inflamatório do tecido adiposo. Resultados similares foram encontrados com ensaios utilizando pré-adipócitos murinos em processo de diferenciação celular, onde na presença da proteína amilóide sérica A, aumentou a liberação de TNF- α e IL-6 (Monteiro, 2010). Esse efeito observado pode ser derivado de diversos fatores: hipertrofia do adipócito, hipóxia e processos infecciosos ou inflamatórios agudos. Todos estes levam ao aumento local ou sistêmico de citocinas pró-inflamatórias. (Figura 38).

Figura 38. Hipótese de ação parácrina/autócrina da SAA no tecido adiposo. A figura representa a estimulação de liberação de TNF- α por adipócitos humanos quando estimulados por SAA, independente de seu sítio de produção (fígado ou tecido adiposo).

Aliado à manutenção da inflamação local, a proteína amilóide sérica A (SAA) aparentemente poderia ainda desempenhar outros papéis na fisiopatologia da obesidade, como a promoção do recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (Figura 39). A indicação da proteína SAA como possível fator estimulatório de migração de fagócitos é baseada em um estudo do nosso grupo de pesquisa que aponta a SAA como fator quimiotático para neutrófilos e monócitos, possivelmente via receptor FPR-2 (Hatanaka, Monteagudo *et al.*, 2007). Outra publicação ainda evidencia o aumento de expressão e liberação de IL-8 por neutrófilos e monócitos quando estimulados por SAA, citocina que também está relacionada a efeitos quimiotáticos para neutrófilos e outros fagócitos (Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003).

Figura 39. Representação da hipótese da infiltração de monócitos/macrófagos, mediada pela SAA, para o tecido adiposo. Figura adaptada (Rocha e Libby, 2009).

Neste contexto de maior presença de SAA no tecido adiposo na vigência da obesidade, hipóxia ou fase aguda, apostamos em estudos que avaliem a ação da SAA no processo migratório de monócitos/macrófagos, bem como efeitos do aumento de IL-8 no tecido, pois talvez efeitos sinérgicos de quimioatração poderiam ser observados.

A expansão da massa adiposa que ocorre na obesidade, sem o devido aumento na vascularização, provoca a diminuição acentuada da concentração de oxigênio, que por sua vez, altera a expressão de uma variedade de genes. A estimulação de alguns destes genes contribui de maneira efetiva com a

manutenção local de um estado pró-inflamatório e o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo. Este fato favorece a geração de uma inflamação sistêmica que está associada à resistência insulínica e risco cardiovascular (Weisberg, Mccann *et al.*, 2003; Kanda, Tateya *et al.*, 2006). Dados deste estudo e de estudos anteriores do grupo apontam a proteína SAA como uma das mediadoras do processo acima descrito.

5.5 Conclusão

Neste estudo avaliamos a expressão e liberação da proteína amilóide sérica A (SAA) em culturas celulares de adipócitos submetidos à hipóxia. Como contribuição, verificamos que há um aumento na expressão de mRNA de SAA em culturas de adipócitos (murinos ou humanos) quando submetidos a baixas concentrações de oxigênio (Figura 40). Além disso, verificamos que a proteína SAA atua como estimuladora de liberação de TNF- α em adipócitos maduros.

Figura 40. Esquema dos resultados obtidos nessa etapa do trabalho. Avaliação da expressão de mRNA de SAA em culturas de pré-adipócitos 3T3-L1, pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados e adipócitos humanos submetidos à hipóxia.

Como atividades futuras, pretendemos verificar a produção da proteína SAA em ensaios de submissão de pré-adipócitos 3T3-L1 e adipócitos humanos à hipóxia por um tempo mais longo (48 horas). Dessa maneira, pretendemos comprovar se há ou não alteração na síntese protéica de SAA nessas culturas.

Nosso intuito com o trabalho é servir de base para futuras pesquisas que visem desvendar a função dessa proteína no contexto de inflamação e obesidade.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

ABE-DOHMAE, S. *et al.* Serum amyloid a generates HDL in an ABCA1-or ABCA7-dependent manner. *Atherosclerosis Supplements* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 539-539, 2006.

AIDA, Y.; PABST, M. J. REMOVAL OF ENDOTOXIN FROM PROTEIN SOLUTIONS BY PHASE-SEPARATION USING TRITON X-114. *Journal of Immunological Methods* [S.I.], v. 132, n. 2, p. 191-195, Sep 1990.

ARNER, P. TECHNIQUES FOR THE MEASUREMENT OF WHITE ADIPOSE-TISSUE METABOLISM - A PRACTICAL GUIDE. *International Journal of Obesity* [S.I.], v. 19, n. 7, p. 435-442, Jul 1995.

ARNER, P.; SPALDING, K. L. Fat cell turnover in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 396, n. 1, p. 101-104, May 2010.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology* [S.I.], v. 10, n. 5, p. 411-421, Oct 1999.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nature Biotechnology* [S.I.], v. 22, n. 11, p. 1399-1408, Nov 2004.

BARANOVA, I. N. *et al.* Serum amyloid a binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 9, p. 8031-8040, 2005.

BASTARD, J. P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BIRAGYN, A. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* [S.I.], v. 298, n. 5595, p. 1025-1029, Nov 2002.

BIRAN, H. *et al.* SERUM AMYLOID-A (SAA) VARIATIONS IN PATIENTS WITH CANCER - CORRELATION WITH DISEASE-ACTIVITY, STAGE, PRIMARY SITE, AND PROGNOSIS. *Journal of Clinical Pathology* [S.I.], v. 39, n. 7, p. 794-797, 1986.

BOKAREWA, M. *et al.* Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties. *Journal of Rheumatology* [S.I.], v. 34, n. 6, p. 1293-1301, 2007.

BORNSTEIN, S. R. *et al.* Is the Worldwide Epidemic of Obesity a Communicable Feature of Globalization? *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* [S.I.], v. 116, p. S30-S32, 2008.

CAI, H. *et al.* Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 178, n. 3, p. 1852-1860, 2007.

CAI, L. *et al.* Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 4, p. 2954-2961, 2005.

CANCELLO, R. *et al.* Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery induced weight loss. *Diabetes* [S.I.], v. 54, n. 8, p. 2277-2286, Aug 2005.

CATRON, T. *et al.* Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1 alpha mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 282, n. 2, p. 602-607, Mar 2001.

CHART, H. *et al.* An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5 alpha and EQ1. *Journal of Applied Microbiology* [S.I.], v. 89, n. 6, p. 1048-1058, Dec 2000.

CHEN, B. Y. *et al.* Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 341, n. 2, p. 549-556, Mar 2006.

CINTI, S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* [S.I.], v. 297, n. 5, p. E977-E986, 2009.

CUMMINS, E. P.; TAYLOR, C. T. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* [S.I.], v. 450, n. 6, p. 363-371, Sep 2005.

DUFTON, N. *et al.* Anti-Inflammatory Role of the Murine Formyl-Peptide Receptor 2: Ligand-Specific Effects on Leukocyte Responses and Experimental Inflammation. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 184, n. 5, p. 2611-2619, 2010.

FAINTUCH, J. *et al.* Systemic inflammation and cardiovascular risk factors: Are morbidly obese subjects different? *Obesity Surgery* [S.I.], v. 18, n. 7, p. 854-862, 2008.

FURLANETO, C. J.; CAMPA, A. A novel function of serum amyloid A: A potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 268, n. 2, p. 405-408, 2000.

FURLANETO, C. J. *et al.* Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. *Lipids* [S.I.], v. 37, n. 9, p. 925-928, 2002.

FYFE, A. I. *et al.* Association between serum amyloid a proteins and coronary artery disease - Evidence from two distinct arteriosclerotic processes. *Circulation* [S.I.], v. 96, n. 9, p. 2914-2919, 1997.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GOLLAHER, C. J.; BAUSSERMAN, L. L. HEPATIC CATABOLISM OF SERUM AMYLOID-A DURING AN ACUTE PHASE RESPONSE AND CHRONIC INFLAMMATION. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* [S.I.], v. 194, n. 3, p. 245-250, 1990.

GOMEZ-AMBROSI, J. *et al.* Serum amyloid A concentration is increased in obese children and adolescents. *Journal of Pediatrics* [S.I.], v. 153, n. 1, p. 71-75, 2008.

GORDON, S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 89-93, Jan 2007.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 54-60, Feb 1998.

HATANAKA, E. *et al.* Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human neutrophils. *Immunology Letters* [S.I.], v. 91, n. 1, p. 33-37, 2004.

_____. Interaction between serum amyloid A and leukocytes - A possible role in the progression of vascular complications in diabetes. *Immunology Letters* [S.I.], v. 108, n. 2, p. 160-166, 2007.

HE, R. *et al.* Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* [S.I.], v. 101, n. 4, p. 1572-1581, 2003.

HE, R. L. *et al.* Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* [S.I.], v. 113, n. 2, p. 429-437, 2009.

HERZENBERG, L. A. *et al.* Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature Immunology* [S.I.], v. 7, n. 7, p. 681-685, Jul 2006.

HILLIQUIN, P. Biological markers in inflammatory rheumatic diseases. *Cellular and Molecular Biology* [S.I.], v. 41, n. 8, p. 993-1006, 1995.

HOPFL, G. *et al.* HIFs and tumors - causes and consequences. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* [S.I.], v. 286, n. 4, p. R608-R623, Apr 2004.

INOUE, K. E. *et al.* Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* [S.I.], v. 56, n. 9, p. 2242-2250, Sep 2007.

JENSEN, L. E.; WHITEHEAD, A. S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 334, p. 489-503, 1998.

JONASSON, P. *et al.* Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* [S.I.], v. 35, p. 91-105, Apr 2002.

JYLHAVA, J. *et al.* Serum amyloid A is independently associated with metabolic risk factors but not with early atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Journal of Internal Medicine* [S.I.], v. 266, n. 3, p. 286-295, 2009.

KANDA, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 116, n. 6, p. 1494-1505, Jun 2006.

KIM, K. H. *et al.* Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 333, n. 4, p. 1178-1184, Aug 2005.

KIRK, E. A. *et al.* Macrophage chemoattractant protein-1 deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. *Diabetes* [S.I.], v. 57, n. 5, p. 1254-1261, May 2008.

KNEBEL, F. H. *Ação da Amilóide Sérica A em Linhagens Celulares de Glioma Humano*. (2010). (Mestrado) - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KOPELMAN, P. G. Is the hypothalamic-pituitary-adrenal axis really hyperactivated in visceral obesity? *Journal of Endocrinological Investigation* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 76-79, 1999.

KOPELMAN, P. G.; ALBON, L. Obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *British Medical Bulletin* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 322-340, 1997.

KUMON, Y. *et al.* SERUM AMYLOID-A PROTEIN IN PATIENTS WITH NON-INSULIN-DEPENDENT DIABETES-MELLITUS. *Clinical Biochemistry* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 469-473, 1994.

LAAKE, I. *et al.* A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Cancer in the Proximal and Distal Colon. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [S.I.], v. 19, n. 6, p. 1511-1522, 2010.

LARSON, M. A. *et al.* Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 301, n. 4, p. 1030-1037, Feb 2003.

LEE, J. H.; KEMP, D. M. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 341, n. 3, p. 882-888, Mar 2006.

LEITZMANN, M. F. *et al.* Prospective study of body mass index, physical activity and thyroid cancer. *International Journal of Cancer* [S.I.], v. 126, n. 12, p. 2947-2956, 2010.

LOLMEDE, K. *et al.* Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *International Journal of Obesity* [S.I.], v. 27, n. 10, p. 1187-1195, Oct 2003.

LONGO, K. A. *et al.* Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 277, n. 41, p. 38239-38244, 2002.

LUMENG, C. N. *et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 175-184, Jan 2007.

MADSEN, L. *et al.* Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* [S.I.], v. 1740, n. 2, p. 266-286, 2005.

_____. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 375, p. 539-549, 2003.

MCCORMACK, C. C. *et al.* Generation of soluble recombinant human acute phase serum amyloid A2 (A-SAA2) protein and its use in development of a A-SAA specific ELISA. *Journal of Immunological Methods* [S.I.], v. 198, n. 1, p. 101-110, Oct 1996.

MELNYK, B. M. *et al.* The worldwide epidemic of child and adolescent overweight and obesity: Calling all clinicians and researchers to intensify efforts in prevention and treatment. *Worldviews on Evidence-Based Nursing* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 109-112, 2008.

MIDDELBERG, A. P. J. Preparative protein refolding. *Trends in Biotechnology* [S.I.], v. 20, n. 10, p. 437-443, Oct 2002.

MOGK, A. *et al.* Mechanisms of protein folding: Molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chembiochem* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 807-+, Sep 2002.

O'HARA, R. *et al.* Acute-phase serum amyloid - A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Research* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 142-U4, 2000.

PALLISER, D. *et al.* A role for toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8+T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 172, n. 5, p. 2885-2893, Mar 2004.

PETERSEN, R. K. *et al.* Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Molecular and Cellular Biology* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 3804-3816, 2008.

POITOU, C. *et al.* Serum amyloid A: A marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obesity* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 309-318, 2006.

_____. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 519-528, 2005.

POOLE, E. S. *et al.* THE IDENTITY OF THE BASE FOLLOWING THE STOP CODON DETERMINES THE EFFICIENCY OF IN-VIVO TRANSLATIONAL TERMINATION IN ESCHERICHIA-COLI. *Embo Journal* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 151-158, Jan 1995.

RIBEIRO, F. P. *et al.* mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Mediators of Inflammation* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 173-178, 2003.

RINGQUIST, S. *et al.* TRANSLATION INITIATION IN ESCHERICHIA-COLI - SEQUENCES WITHIN THE RIBOSOME-BINDING SITE. *Molecular Microbiology* [S.I.], v. 6, n. 9, p. 1219-1229, May 1992.

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. The multiple facets of the fat tissue. *Thyroid* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 175-183, Feb 2008.

_____. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 399-409, Jun 2009.

RODBELL, M. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS .I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM + LIPOLYSIS. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 239, n. 2, p. 375-&, 1964.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* [S.I.], v. 45, n. 3, p. 194-205, Nov 2001.

ROSS, R. Atherosclerosis - An inflammatory disease - Reply. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 340, n. 24, p. 1929-1929, 1999.

ROSS, S. E. *et al.* Microarray analyses during adipogenesis: Understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Molecular and Cellular Biology* [S.I.], v. 22, n. 16, p. 5989-5999, 2002.

SAMOLIS, S. *et al.* Relation between first trimester maternal serum leptin levels and body mass index in normotensive and pre-eclamptic pregnancies - Role of leptin as a marker of pre-eclampsia: A prospective case-control study. *Gynecological Endocrinology* [S.I.], v. 26, n. 5, p. 338-343, 2010.

SANDRI, S. *et al.* Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *Journal of Leukocyte Biology* [S.I.], v. 83, n. 5, p. 1174-1180, 2008.

SEALE, P. *et al.* Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function-of mice and men. *Genes & Development* [S.I.], v. 23, n. 7, p. 788-797, 2009.

SEGAWA, K. *et al.* Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1 alpha-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 349, n. 3, p. 875-882, Oct 2006.

SELLAR, G. C. *et al.* THE HUMAN SERUM AMYLOID A PROTEIN (SAA) SUPERFAMILY GENE-CLUSTER - MAPPING TO CHROMOSOME 11P15.1 BY PHYSICAL AND GENETIC-LINKAGE ANALYSIS. *Genomics* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 221-227, Jan 1994.

_____. ORGANIZATION OF THE REGION ENCOMPASSING THE HUMAN SERUM AMYLOID-A (SAA) GENE FAMILY ON CHROMOSOME-11P15.1. *Genomics* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 492-495, Sep 1994.

SELLAR, G. C.; WHITEHEAD, A. S. THE PUTATIVE 5TH HUMAN SERUM AMYLOID A PROTEIN (SAA)-RELATED GENE SAA5 IS DEFINED BY SAA3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 200, n. 1, p. 202-205, Apr 1994.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology* [S.I.], v. 13, n. 2, p. 167-171, Apr 2001.

SHAH, C. *et al.* Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* [S.I.], v. 108, n. 5, p. 1751-1757, 2006.

SJOHOLM, K. *et al.* Association of serum amyloid A levels with adipocyte size and serum levels of adipokines: Differences between men and women. *Cytokine* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 260-266, 2009.

SORENSEN, H. P. *et al.* Dialysis strategies for protein refolding: preparative streptavidin production. *Protein Expression and Purification* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 149-154, Sep 2003.

SOUKAS, A. *et al.* Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 276, n. 36, p. 34167-34174, 2001.

STEEL, D. M. *et al.* A CONSTITUTIVELY EXPRESSED SERUM AMYLOID-A PROTEIN GENE (SAA4) IS CLOSELY LINKED TO, AND SHARES STRUCTURAL SIMILARITIES WITH, AN ACUTE-PHASE SERUM AMYLOID-A PROTEIN GENE (SAA2). *Genomics* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 447-454, 1993.

SUMMERS, D. Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Molecular Microbiology* [S.I.], v. 29, n. 5, p. 1137-1145, Sep 1998.

TRAYHURN, P. *et al.* Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition* [S.I.], v. 100, n. 2, p. 227-235, Aug 2008.

URIELI-SHOVAL, S. *et al.* Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Current Opinion in Hematology* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 64-69, 2000.

VAN DEN BERG, B. *et al.* Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *Embo Journal* [S.I.], v. 18, n. 24, p. 6927-6933, Dec 1999.

VAN DER WESTHUYZEN, D. R. *et al.* Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 43, p. 35890-35895, 2005.

WALDER, K. *et al.* Tanis: A link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes* [S.I.], v. 51, n. 6, p. 1859-1866, 2002.

WANG, B. *et al.* Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* [S.I.], v. 455, n. 3, p. 479-492, Dec 2007.

WEISBERG, S. P. *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 116, n. 1, p. 115-124, Jan 2006.

_____. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec 2003.

WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb Journal* [S.I.], v. 16, n. 10, Aug 2002.

WEST, D. B. *et al.* ADIPOCYTE BLOOD-FLOW IS DECREASED IN OBESE ZUCKER RATS. *American Journal of Physiology* [S.I.], v. 253, n. 2, p. R228-R233, Aug 1987.

WHITEHEAD, A. S. *et al.* IDENTIFICATION OF NOVEL MEMBERS OF THE SERUM AMYLOID-A PROTEIN SUPERFAMILY AS CONSTITUTIVE APOLIPOPROTEINS OF HIGH-DENSITY-LIPOPROTEIN. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 267, n. 6, p. 3862-3867, Feb 1992.

YAN, S. D. *et al.* Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nature Medicine* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 643-651, 2000.

YANG, R. Z. *et al.* Acute-phase serum amyloid A: An inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *Plos Medicine* [S.I.], v. 3, p. 884-894, 2006.

YE, J. P. *et al.* Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American*

Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism [S.I.], v. 293, n. 4, p. E1118-E1128, Oct 2007.

YU, A. Y. *et al.* Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [S.I.], v. 275, n. 4, p. L818-L826, Oct 1998.

YUN, Z. *et al.* Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: A mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Developmental Cell* [S.I.], v. 2, n. 3, p. 331-341, Mar 2002.

7. ANEXOS

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

5.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

6. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 01/2006

São Paulo, 26 de janeiro de 2006.

Ilma. Sra.
Kátia Aparecida de Almeida
Orientadora. Profª. Ana Campa
FBC

Prezada Senhora,

Vimos informar o projeto "Efeitos da proteína amilóide sérica A no tecido adiposo: Papel dessa proteína na manutenção de um estado proinflamatório na obesidade" (Protocolo CEP nº 333), apresentado por Vossa Senhoria, foi **APROVADO** "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Sendo o que nos cumpre, apresentamos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Ursula Maria Lanfer Marquez
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Edson Mendes de Oliveira

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Edson Mendes de Oliveira
Nascimento 10/02/1985 - São Paulo/SP - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Amilóide sérica A (SAA): produção da proteína recombinante humana SAA1 e SAA4 1 e 4 e sua expressão nativa em células do tecido adiposo submetidas à hipóxia.
Orientador: Ana Campa

2007 - 2008 Graduação em Habilitação em Farmácia Bioquímica.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

2004 - 2007 Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

2000 - 2002 Ensino Médio (2o grau).
Instituto Tecnológico de Barueri, ITB, Brasil

1992 - 1999 Ensino Fundamental (1o grau).
Escola Municipal de Ensino Fundamental da Vila Boa Vista, EMEF BOA VISTA, Brasil

Formação complementar

2009 - 2009 Curso de curta duração em Cultura de células normais e tumorais.
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, São Paulo, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Amilóide Sérica A como uma proteína inflamatória..
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Procedimentos básicos em atenção ao paciente..
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Achatina fulica.
Prefeitura Municipal de Cambé, PMC, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Gestão Em Análises Clínicas.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Oncologia e Imunidade.
Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

2. Universidade Estadual de Londrina - UEL

Vínculo institucional

2004 - 2008
Regime: Parcial

Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Estudante,

Atividades

2008 - 2008 Projetos de pesquisa, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia Aplicada, Análise Clínicas e Toxicológicas

Participação em projetos:

EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA EM CASO CLÍNICO: CÂNCER DE COLO UTERINO. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, UEL, BRASIL.

04/2008 - 06/2008 Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia Aplicada, Análise Clínicas e Toxicológicas

Estágio:

ESTÁGIO EM COLETA DE MATRIZES BIOLÓGICAS NO SETOR DE COLETAS DO AMBULATÓRIO HOSPITAL DAS CLÍNICAS (AHC).

01/2008 - 07/2008 Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia Aplicada, Análise Clínicas e Toxicológicas

Estágio:

MONITORIA ACADÊMICA NA DISCIPLINA 3LAC025 - EXAMES HEMATOLÓGICOS A - TENDO COMO ATIVIDADE A PREPARAÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO PARA ATIVIDADE PRÁTICA; ORGANIZAÇÃO DE ARQUIVO DE LÂMINAS E DOS RESPECTIVOS LAUDOS; REUNIÃO DE DISCUSSÃO DE CASOS SELECIONADOS

10/2007 – 12/2008 Estágio, Centro de Controle de Intoxicações

Estágio:

ESTAGIÁRIA PLANTONISTA DO CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES (CCI) LOCALIZADO NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DO NORTE DO PARANÁ. ORIENTAÇÃO DE CONDUITA MÉDICA EM CASOS DE INTOXICAÇÃO EXÓGEA E ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. LEVANTAMENTO BIBLIO

08/2007 - 08/2008 Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia Aplicada, Análise Clínicas e Toxicológicas

Estágio:

ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE URGÊNCIAS DO HOSPITAL REGIONAL NORTE DO PARANÁ. DESENVOLVIMENTO DE EXAMES LABORATORIAIS DE HEMATOLOGIA (HEMOGRAMA, PLAQUETAS, VHS), BIOQUÍMICA (GLICOSE, NA, K, URÉIA, CREATININA, BILIRRUBINA TOTAL E FRAÇÕES, GASOMETRIA, URIN

04/2005 - 12/2005 Projetos de pesquisa, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia Aplicada, Análise Clínicas e Toxicológicas

Participação em projetos:

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E CONTROLE DAS ENTEROPARASIToses NA POPULAÇÃO DE BAIRROS PERIFÉRICOS DA CIDADE DE LONDRINA - PARANÁ

Projetos

2009 - Atual

Síntese da proteína recombinante humana amiloide sérica A (SAA) 1 e 4 e

seus efeitos sobre adipócitos humanos

Descrição: Através desse projeto será possível obter uma proteína recombinante livre de endotoxina e mais próxima da conformação nativa. Além disso, reconhecer os efeitos da SAA4 sobre os adipócitos humanos e a expressão da SAA em adipócitos humanos mantidos em condições de hipóxia.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Edson Mendes de Oliveira (Responsável); ; Ana Campa; Talita Iacovella

Financiador(es):

2009 - 2010 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo: marcadores inflamatórios e impacto na obesidade

Descrição: Nosso objetivo é avaliar os efeitos da SAA na proliferação de células tronco mesenquimais e na sua diferenciação. Visto que adipócitos hipertrofiados expressam SAA de forma bastante intensa e que a hipóxia é um elemento importante na fisiopatologia da obesidade, verificaremos se a hipóxia acarreta modificações na expressão de SAA e se esta por sua vez pode ser responsável pela liberação de fatores pró-angiogênicos, como exemplo o VEGF. Avaliaremos também se SAA pode ser um elemento da interação de adipócitos maduros com células estromais, induzindo ou inibindo processos de proliferação e diferenciação das células tronco mesenquimais. Este último objetivo mimetizaria a condição presente na obesidade que é a convivência de células tronco mesenquimais com adipócitos hipertrofiados num território pró-inflamatório

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Edson Mendes de Oliveira; Ana Campa; Fabiola Branco Filippin Monteiro (Responsável)

Financiador(es):

2008 - 2008 EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA EM CASO CLÍNICO: CÂNCER DE COLO UTERINO. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, UEL, BRASIL.

Descrição: Projeto de pesquisa em ensino realizado com alunos que encontram-se matriculados no 4º e/ou 5º ano do curso de Farmácia, habilitação em Análises Clínicas. Esse projeto objetiva incentivar o aluno a visualizar as análises clínicas como uma área interdisciplinar através de estudos de casos clínicos.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (40);

Integrantes: Edson Mendes de Oliveira; Egídio Tesser (Responsável)

Financiador(es): Universidade Estadual de Londrina-UEL

2005 - 2005 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E CONTROLE DAS ENTEROPARASIToses NA POPULAÇÃO DE BAIROS PERIFÉRICOS DA CIDADE DE LONDRINA - PARANÁ

Descrição: Este trabalho é parte de um conjunto de ações que vêm sendo desenvolvidas entre a Universidade Estadual de Londrina e a Secretaria Municipal de Saúde de Londrina e que tem como objetivo conhecer a prevalência dos parasitas intestinais na população de bairros carentes da cidade de Londrina- Paraná, visando avaliar as condições de saneamento básico e subsidiar ações de controle e programas de educação sanitária, que irá proporcionar melhor qualidade de vida destas populações. O trabalho permanece em execução em mais de 27 bairros periféricos da Grande Londrina, constituindo um projeto de extensão junto a PROEX/UEL.

Situação: Concluído Natureza: Extensão

Alunos envolvidos: Graduação (6); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Edson Mendes de Oliveira; Bruna Miglioranza; Claudia Santiago Dias Barbosa; Juliana de Lima Santoro; Valter Abou Murad (Responsável)

Financiador(es): Prefeitura Municipal de Londrina-P/LONDRINA, Universidade Estadual de Londrina-UEL

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ANDREGUETTI, D., FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., OLIVEIRA, E. M., CAMPA, A., COLEPICOLO, P.
Avaliação de potencial citotóxico e fototóxico de análogos de micosporinas In: XIII Congresso Brasileiro de Ficologia - CBFIC, 2010, Paraty.
Anais do XIII Congresso Brasileiro de Ficologia - CBFIC. , 2010.
2. FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., OLIVEIRA, E. M., IACOVELLA, T., ALBUQUERQUE, R. C., CAMPA, A.
Poster Presentations In: 11th International Congress on Obesity, 2010, Estocolmo.
Obesity Reviews. , 2010. v.11. p.121 - 121
3. OLIVEIRA, E. M., FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., SANDRI, S., CAMPA, A.
SAA: impact on the adipokine network In: XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.
4. FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., OLIVEIRA, E. M., IACOVELLA, T., ALBUQUERQUE, R. C., CAMPA, A.
3T3-L1 AdipocyteS Biology Is Affected By Serum Amyloid A (SAA): Effects on Cell Cycle, Proliferation and Death In: Keystone Symposia, 2010, Keystone CO.
Adipose Tissue Biology. , 2010. p.138 - 138
5. OLIVEIRA, E. M., OKADA, S. S., FRANCO, K. S., SOARES, I. S., CAMPA, A.
Síntese da proteína recombinante humana amiloide sérica A (SAA) 1, 2 e 4 In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2009, Águas de Lindóia.
XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE - Anais. , 2009.
6. OLIVEIRA, E. M., BERNARDES, S. S., AMORIM, R. S., BARBOSA, C. S. D., JUSTINO, C. P., TURINI, C.
Importância de exames laboratoriais no diagnóstico e acompanhamento de acidentes ofídicos In: XI Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina, 2008, Londrina - PR.
Anais da XI Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina. Londrina - PR: Universidade Estadual de Londrina, 2008.
7. OLIVEIRA, E. M., BARBOSA, C. S. D., AMORIM, R. S., LIMA, J.
Prevalência dos microrganismos isolados em culturas de pacientes queimados do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná In: XI Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina, 2008, Londrina - PR.
Anais da XI Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina. Londrina - PR: Universidade Estadual de Londrina, 2008.
8. BARBOSA, C. S. D., OLIVEIRA, E. M., SANTORO, J. L., MIGLIORANZA, B., CARVALHO, MENEZES, M. C. N. D.
Determinação da prevalência de casos de infecção parasitária por *Schistosoma mansoni* na população de bairros da cidade de Londrina In: VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia industrial, 2005, Londrina - PR.
Anais da VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia industrial. Londrina - PR: Universidade Estadual de Londrina, 2005.
9. SANTORO, J. L., OLIVEIRA, E. M., BARBOSA, C. S. D., MIGLIORANZA, B., CARVALHO,

MENEZES, M. C. N. D.

Determinação da prevalência de casos de infecção parasitária por *Schistosoma mansoni* na população de bairros da cidade de Londrina, Estado do Paraná. In: : I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana de Integração da Farmácia, 2005, Maringá - PR.

Anais do I Congresso Internacional de Saúde. Maringá - PR: Universidade Estadual de Londrina, 2005.

10. MIGLIORANZA, B., OLIVEIRA, E. M., SANTORO, J. L., BARBOSA, C. S. D., MURAD, V. A. Determinação da prevalência de enteroparasitoses na população de bairros da cidade de Londrina, Estado do Paraná In: I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana de Integração da Farmácia, 2005, Maringá - PR.

Anais do I Congresso Internacional de Saúde. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005.

11. OLIVEIRA, E. M., BARBOSA, C. S. D., MIGLIORANZA, B., SANTORO, J. L., CARVALHO, MURAD, V. A.

Determinação da prevalência de enteroparasitoses na população de bairros da cidade de Londrina, Estado do Paraná In: VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia industrial, 2005, Londrina - PR.

Anais da VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia industrial. Londrina - PR: Universidade Estadual de Londrina, 2005.