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

Desenvolvimento de imunoensaios e biossensores para
determinação de LDL eletronegativa

Tanize do Espírito Santo Faulin

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2010

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

Desenvolvimento de imunoensaios e biossensores para
determinação de LDL eletronegativa

Tanize do Espírito Santo Faulin

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2010

Tanize do Espirito Santo Faulin

Desenvolvimento de imunoenaios e biossensores para determinação
de LDL eletronegativa

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª Drª Dulcinéia Saes Parra Abdalla
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010.

Dedico este trabalho:

*Ao meu marido **Edson José Bernardi Faulin**, que esteve ao meu lado em todos os momentos sempre com enorme dedicação, carinho e companheirismo.*

*À minha mãe **Luzia Gianini do Espirito Santo**, que sempre acreditou na minha capacidade, pelo amor incondicional e incentivo.*

*Ao meu pai **Roque Vaz do Espirito Santo**, exemplo de caráter e motivo de orgulho para mim, por todo amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pelas bênçãos durante a trajetória desta pesquisa e em toda minha vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Dulcineia Abdalla pelo apoio e pelas preciosas oportunidades de crescimento profissional que me ofereceu.

Ao Prof. Dr Mario José Politi do Instituto de Química pela colaboração e auxílio. Agradeço imensamente ao Dr. Vitor Hering pela inestimável parceria e enorme dedicação nessa pesquisa, com admirável seriedade e comprometimento.

Agradeço à colaboração de todos os amigos do Laboratório de Bioquímica: à Karine, Débora, Andréia, Daniela e Elaine pela amizade e pela ajuda na realização dos imunoensaios; à Soraya, Cristina e Alejandro pela amizade e pela ajuda nas técnicas de biologia molecular; à Luciane, Martina, Tiago, Julio, Marcela, Daniel, Fernanda, Fernanda César, Cristiane e Bianca pela amizade, prestatividade e sugestões.

À solicitude dos técnicos de laboratório, Katia Françoso, Alberto Iha e Maurício dos Santos e à atenção dos funcionários da secretaria da faculdade: Ana, Edna, Sueli, Dora, Elaine e Jorge.

Ao Prof. Dr. Sandro Almeida e à Dr^a Karen Ferreira pelo uso dos equipamentos e materiais do Laboratório de Micologia.

Às professoras Dr^a Kioko Takei (Laboratório de Imunologia) e Dr^a Irene Soares (Laboratório de Parasitologia) pelas valiosas sugestões neste trabalho, além do uso de seus laboratórios e equipamentos.

Aos professores Dr. Marco Antonio Stephano, Dr. Adalberto Pessoa Jr., Dr^a Nágila Damasceno e Dr^a Ligia Gomes pelas correções e sugestões que contribuíram com este trabalho.

À ajuda dos pesquisadores do Instituto Butantan: Dr^a Irene Fernandes, Dr. Paulo Lee Ho e Dr. Geraldo Magalhães.

À Capes, CNPq e Fapesp pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE EQUAÇÕES.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aterosclerose.....	1
1.2 Modificações da LDL.....	2
1.2.1 LDL eletronegativa.....	5
1.3 Resposta imunológica na aterosclerose.....	6
1.3.1 Anticorpos anti-LDL(-).....	7
1.3.2 Imunocomplexos de LDL.....	9
1.4 Imunoensaios para determinação das formas modificadas de LDL e seus anticorpos.....	10
1.5 Biossensores.....	14
1.5.1 Anticorpos fluorescentes.....	17
1.5.2 Nanopartículas.....	19
1.6 Validação de ensaios.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
PARTE I	
3.1 Plasma humano.....	23
3.2 Obtenção das frações nativa e eletronegativa da LDL.....	23
3.2.1 Isolamento de LDL.....	23
3.2.2 Purificação das frações nativa e eletronegativa de LDL.....	24
3.3 Anticorpos monoclonais.....	25
3.3.1 Cultura dos hibridomas.....	25
3.3.2 Congelamento dos hibridomas.....	25
3.3.3 Produção de líquido ascítico.....	26

3.3.4 Purificação dos MAbs.....	26
3.3.5 Biotinilação do MAb 2C7D5F10.....	27
3.3.6 Fragmentação do MAb 2C7D5F10.....	27
3.3.7 Reatividade dos MAbs.....	28
3.3.8 Constante de afinidade dos MAbs.....	29
3.4 Desenvolvimento e padronização dos imunoenaios.....	31
3.4.1 Imunoensaio para determinação de LDL(-).....	31
3.4.2 Imunoensaio para determinação de anticorpos anti-LDL(-).....	32
3.4.3 Imunoensaio para determinação de imunocomplexos de LDL(-).....	33
3.5 Validação dos imunoenaios.....	34
3.5.1 Limites de detecção e quantificação.....	35
3.5.2 Precisão intra e inter-ensaios.....	36
3.5.3 Exatidão (recuperação).....	36
3.5.4 Linearidade da diluição.....	37
3.5.5 Estabilidade do analito.....	38
3.5.6 Estudo de interferentes.....	38
3.5.7 Robustez.....	38
3.5.8 Análise estatística.....	39

PARTE II

3.6 Clonagem molecular.....	40
3.6.1 Vetores.....	40
3.6.2 Preparo de células competentes.....	41
3.6.3 Transformação bacteriana por choque térmico.....	41
3.6.4 Purificação dos plasmídios.....	41
3.6.5 Digestão dos plasmídios com enzima de restrição.....	42
3.6.6 Desfosforilação do vetor pET-GFP5.....	42
3.6.7 Purificação dos fragmentos de scFv anti-LDL(-).....	43
3.6.8 Ligação dos fragmentos de DNA.....	43
3.6.9 Triagem dos clones recombinantes.....	44
3.6.10 Remoção da sequência gênica da proteína A.....	44
3.6.11 Seqüenciamento do DNA.....	45
3.6.12 Análise do seqüenciamento.....	46
3.7 Expressão da proteína recombinante.....	46
3.7.1 Predição da estrutura proteica.....	46

3.7.2 Expressão da GFP5-scFv.....	47
3.7.3 Lise bacteriana.....	47
3.7.4 Solubilização dos corpos de inclusão.....	48
3.7.5 Purificação da GFP5-scFv.....	48
3.7.6 Reenovelamento da GFP5-scFv.....	48
3.8 Caracterização da GFP5-scFv.....	49
3.8.1 SDS-PAGE e Western Blot.....	49
3.8.2 Dot Blot.....	50
3.8.3 ELISA.....	50
3.8.4 Estabilidade da GFP5-scFv.....	51
3.9 Síntese de nanopartículas.....	51
3.9.1 Síntese de nanocristais de seleneto de zinco/sulfeto de zinco ZnSe/ZnS.....	51
3.9.2 Síntese de nanopartículas de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).....	52
3.9.3 Síntese de nanopartículas de prata.....	52
3.9.4 Síntese de nanopartículas de ouro.....	53
3.10 Interação entre nanopartículas e GFP5-scFv.....	53
4. RESULTADOS.....	55
PARTE I	
4.1 Obtenção das subfrações de LDL.....	55
4.2 Obtenção dos MABs.....	55
4.3 Reatividade dos MABs.....	56
4.4 Constante de afinidade.....	57
4.5 Imunoensaio para determinação de LDL(-).....	57
4.5.1 Limites de detecção e quantificação.....	58
4.5.2 Curva-padrão.....	58
4.5.3 Precisão intra e inter-ensaios	60
4.5.4 Recuperação.....	61
4.5.5 Linearidade da diluição.....	62
4.5.6 Testes de estabilidade.....	62
4.5.7 Estudo de interferentes.....	64
4.6 Imunoensaio para determinação de anticorpos anti-LDL(-).....	65
4.6.1 Limites de detecção e quantificação.....	65
4.6.2 Curva-padrão.....	65

4.6.3 Precisão intra e inter-ensaios.....	67
4.6.4 Recuperação.....	68
4.6.5 Linearidade da diluição.....	69
4.6.6 Testes de estabilidade.....	69
4.6.7 Estudo de interferentes.....	71
4.7 Imunoensaio para determinação de IC-LDL(-).....	71
4.7.1 Limites de detecção e quantificação.....	71
4.7.2 Curva-padrão.....	72
4.7.3 Precisão intra e inter-ensaios	74
4.7.4 Recuperação.....	75
4.7.5 Linearidade da diluição.....	76
4.7.6 Testes de estabilidade.....	76
4.7.7 Análise de interferentes.....	78
PARTE II	
4.8 Construção do vetor de expressão.....	79
4.9 Predição da estrutura tridimensional da proteína.....	82
4.10 Expressão, purificação e reenovelamento da GFP5-scFv.....	82
4.11 Caracterização da GFP5-scFv.....	83
4.12 Interação das nanopartículas com GFP5-scFv.....	85
5. DISCUSSÃO.....	90
6. CONCLUSÃO.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo aterosclerótico.....	2
Figura 2. Metodologia dos ensaios para determinação de LDL-oxi.....	12
Figura 3. Esquema do ensaio para determinação de anti-LDL-oxi.....	14
Figura 4. Componentes dos biossensores.....	15
Figura 5. Biossensor de nanopartículas de ouro e nanocristais de CdS.....	16
Figura 6. Biossensor de nanopartículas de ouro e AgCl/polianilina.....	17
Figura 7. Representação esquemática da IgG, F(ab') ₂ , Fab e scFv.....	18
Figura 8. Anticorpo digerido com papaína.....	28
Figura 9. Representação esquemática do ELISA para LDL(-).....	32
Figura 10. Representação esquemática do ELISA para anti-LDL(-).....	33
Figura 11. Representação esquemática do ELISA para IC-LDL(-).....	34
Figura 12. Vetores utilizados na clonagem molecular.....	40
Figura 13. Cromatograma do fracionamento por FPLC das subfrações nativa e eletronegativa de LDL de plasma humano.....	55
Figura 14. SDS-PAGE 12% do MAb 2C7D5F10 fragmentado.....	56
Figura 15. Reatividade dos MAbs	57
Figura 16. Diluição seriada do padrão de LDL(-) de 160 até 0,078 mg/L.....	58
Figura 17. Curva-padrão típica do ELISA para determinação de LDL(-) com faixa de trabalho de 0,625 a 20 mg/L de LDL(-).....	60
Figura 18. Quantificação de LDL(-) de uma amostra de plasma armazenada por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C (B).....	63
Figura 19. Quantificação do padrão de LDL(-) armazenado por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C (B).....	64
Figura 20. Diluição seriada do MAb 2C7D5F10 de 1 até 0,0002 mg/L.....	65
Figura 21. Curva-padrão típica do imunoensaio para determinação de anticorpos anti-LDL(-) com faixa de trabalho de 0,004 a 0,125 mg/L de MAb 2C7D5F10.....	67

Figura 22. Quantificação de anticorpo anti-LDL(-) em uma amostra de plasma armazenada por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C.....	70
Figura 23. Diluição seriada de um <i>pool</i> de plasma de 8 até 0,002 g/L de IgG.....	72
Figura 24. Curva-padrão típica do imunoensaio para determinação de IC-LDL(-) com faixa de trabalho de 0,06 a 4 g/L de IgG.....	73
Figura 25. Quantificação de IC-LDL(-) de uma amostra de plasma armazenada por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C (B).....	77
Figura 26. Digestão dos vetores pPIgLE Z22 e pET-GFP5.....	79
Figura 27. Confirmação da ligação do inserto.....	80
Figura 28. Confirmação da orientação do inserto.....	81
Figura 29. Remoção da proteína A.....	81
Figura 30. Predição da estrutura tridimensional da GFP5-scFv.....	82
Figura 31. Expressão e purificação da GFP5-scFv.....	83
Figura 32. SDS-PAGE 12% e Western blot da GFP5-scFv.....	84
Figura 33. Caracterização da proteína recombinante.....	84
Figura 34. Interação entre nanocristais de ZnSe/ZnS e GFP5-scFv.....	85
Figura 35. Interação entre nanocristais de ZnSe/ZnS, GFP5-scFv e LDL(-).....	86
Figura 36. Interação entre nanopartículas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e GFP5-scFv.....	87
Figura 37. Interação entre nanopartículas de prata e GFP5-scFv.....	87
Figura 38. Sobreposição da absorção das nanopartículas de ouro com a emissão da GFP5-scFv.....	88
Figura 39. Interação entre nanopartículas de ouro e GFP5-scFv.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na reação de seqüenciamento.....	46
Tabela 2. Constante de afinidade dos MAbs anti-LDL(-) determinada por ELISA....	57
Tabela 3. CV% da absorbância do padrão de LDL(-) em diferentes concentrações.	59
Tabela 4. Precisão intra-ensaio do ELISA para LDL(-).....	60
Tabela 5. Precisão inter-ensaios do ELISA para LDL(-).....	61
Tabela 6. Recuperação de LDL(-).....	62
Tabela 7. Linearidade da diluição de amostras de plasma no ELISA para LDL(-)....	62
Tabela 8. Concentração de LDL(-) em uma amostra de plasma e no padrão de LDL(-) após os ciclos de congelamento/descongelamento.....	64
Tabela 9. CV% da absorbância do MAb 2C7D5F10 utilizado como padrão do ensaio em diferentes concentrações.....	66
Tabela 10. Precisão intra-ensaio do ELISA para anti-LDL(-).....	67
Tabela 11. Precisão inter-ensaios do ELISA para anti-LDL(-).....	68
Tabela 12. Recuperação do anticorpo anti-LDL(-).....	69
Tabela 13. Linearidade da diluição de amostras de plasma no ELISA para anti-LDL(-).....	69
Tabela 14. Concentração de anti-LDL(-) em uma amostra de plasma após os ciclos de congelamento/descongelamento.....	70
Tabela 15. CV% da absorbância do <i>pool</i> de plasma utilizado como padrão do ensaio em diferentes concentrações.....	73
Tabela 16. Precisão intra-ensaio do ELISA para IC-LDL(-).....	74
Tabela 17. Precisão inter-ensaios do ELISA para IC-LDL(-).....	75
Tabela 18. Recuperação de IC-LDL(-).....	76
Tabela 19. Linearidade da diluição de amostras de plasma no ELISA para IC-LDL(-).....	76
Tabela 20. Concentração de IC-LDL(-) em uma amostra de plasma após os ciclos de congelamento/descongelamento.....	77

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da constante de afinidade.....	30
Equação 2. Cálculo do limite de detecção.....	35
Equação 3. Cálculo do limite de quantificação.....	35
Equação 4. Cálculo do coeficiente de variação.....	36
Equação 5. Cálculo da recuperação.....	37
Equação 6. Cálculo do erro relativo.....	37
Equação 7. Cálculo para ligação de fragmentos de DNA.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABTS:** ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]
- Apo B:** apolipoproteína B
- BSA:** albumina sérica bovina
- DAB:** 3,3'-diaminobenzidina
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA:** enzyme linked immunosorbent assay
- Fab:** fragmento de ligação ao antígeno
- Fc:** fragmento cristalizável
- FPLC:** fast protein liquid chromatography
- FRET:** transferência ressonante de energia de fluorescência
- GFP:** proteína verde fluorescente
- GM-CSF:** fator estimulador de colônia granulócito macrófago
- HNE:** 4-hidroxi-2-nonenal
- HUAEC:** células endoteliais isoladas de artéria umbilical humana
- HUVEC:** células endoteliais isoladas de veia umbilical humana
- IC-LDL(-):** imunocomplexos de LDL eletronegativa
- IgG:** imunoglobulina G
- IPTG:** isopropiltio- β -D-galactosídeo
- IUPAC:** international union of pure and applied chemistry
- LB:** luria-bertani
- LD:** limite de detecção
- LDL:** lipoproteína de baixa densidade
- LDL(-):** LDL eletronegativa
- LDL(n):** LDL nativa
- LDL-oxi:** LDL oxidada
- LQ:** limite de quantificação
- MAb:** anticorpo monoclonal
- MCP-1:** proteína-1 quimiotática para monócitos
- MDA:** malondialdeído
- MHC:** complexo de histocompatibilidade principal
- NEFA:** ácidos graxos não esterificados

OPD: ortofenilenodiamino

PAF-AH: fator de ativação plaquetária acetil hidrolase

PAMPs: padrões moleculares associados à patógenos

pET: plasmid for expression by T7 RNA polymerase

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PDGF-B: fator de crescimento derivados de plaquetas B

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PSS: poliestirenosulfonato de sódio

SacI: *Streptomyces achromogenes*

SAP: fosfatase alcalina de camarão

scFv: fragmento variável de cadeia única

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TFB: tampão de transformação

TLR: receptor do grupo *toll*

TMB: 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

VCAM: moléculas de adesão de células vasculares

Xhol: *Xanthomonas holcicola*

RESUMO

FAULIN, T.E.S. **Desenvolvimento de imunoensaios e biossensores para determinação de LDL eletronegativa.** 2010.118p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL-) é um importante antígeno envolvido na patogênese da aterosclerose. A LDL(-) provoca resposta inflamatória e imunológica, levando à produção de autoanticorpos anti-LDL(-) e a formação subsequente de imunocomplexos (IC-LDL-), os quais também contribuem com o processo aterosclerótico. Diante disso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de imunoensaios para quantificação plasmática de LDL(-), anti-LDL(-) e IC-LDL(-), assim como o desenvolvimento de ferramentas aplicáveis em um biossensor para LDL(-). Após a padronização de cada ELISA, foram avaliadas as características de desempenho dos métodos: limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão intra e inter-ensaios, exatidão, linearidade de diluição e interferentes. Os LD e LQ do ELISA para LDL(-) foram 0,423 mg/L e 0,517 mg/L de LDL(-), respectivamente. As concentrações plasmáticas de LDL(-) apresentaram linearidade quando os plasmas foram diluídos 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000. Os LD e LQ do ELISA para anti-LDL(-) foram 0,0028 mg/L e 0,0032 mg/L de anti-LDL(-), respectivamente. Os plasmas apresentaram linearidade na diluição quando diluídos 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. Os LD e LQ do ELISA para IC-LDL(-) foram 0,023 g/L e 0,034 g/L de IC-LDL(-), respectivamente. Os plasmas apresentaram linearidade quando diluídos 1:12,5, 1:25, 1:50 e 1:100. Os três ELISAs apresentaram precisão intra e inter-ensaios e recuperação dentro dos limites requeridos para imunoensaios. Para o desenvolvimento de um biossensor para LDL(-), uma proteína recombinante, denominada GFP5-scFv, foi expressa em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3). Para obtenção dessa proteína foi realizada a inserção da sequência de DNA de um fragmento variável de cadeia única (scFv) anti-LDL(-) em um vetor bacteriano com a sequência de DNA da proteína verde fluorescente (GFP5). Dessa forma, a GFP5-scFv é fluorescente e tem afinidade pela LDL(-). Também foram sintetizadas nanopartículas de ouro, as quais podem ser eficientemente utilizadas na supressão da emissão da fluorescência de GFP5-scFv. Portanto, os imunoensaios validados e os aplicativos desenvolvidos para o biossensor são ferramentas que tem potencial para serem utilizadas na avaliação da patogênese da aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose. Anticorpos. ELISA. Validação. Nanopartículas.

ABSTRACT

FAULIN, T.E.S. **Development of immunoassays and biosensors for electronegative LDL quantification.** 2010.118p. PhD Thesis – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The electronegative low-density lipoprotein (LDL) is an important antigen involved in the pathogenesis of atherosclerosis. The LDL(-) causes inflammatory and immune response, leading to production of autoantibodies anti-LDL(-) and the subsequent formation of immune complexes (IC-LDL), which also contribute to the atherosclerotic process. Thus, this study aimed to develop and validate immunoassays for quantification of plasma LDL(-), anti-LDL(-) and LDL-IC(-) as well as developing tools applicable to a biosensor for LDL(-). After the standardization of each ELISA, were evaluated the performance characteristics of methods: limits of detection (LD) and quantification (LQ), intra- and inter-assays precision, accuracy, linearity of dilution and interferences. The LD and LQ of LDL(-) ELISA were 0.423 mg/L and 0.517 mg/L of LDL(-), respectively. Plasmas showed linearity when diluted 1:1000, 1:2000, 1:4000 and 1:8000. The LD and LQ of anti-LDL(-) ELISA were 0.0028 mg/L and 0.0032 mg/L of anti-LDL(-), respectively. Plasmas showed linearity when diluted 1:100, 1:200, 1:400 and 1:800. The LD and LQ of IC-LDL(-) ELISA were 0.023 g/L and 0.034 g/L of LDL-IC(-), respectively. Plasma showed linearity when diluted 1:12.5, 1:25, 1:50 and 1:100. The three ELISAs showed good intra- and inter-assays precision and recovery within the limits required for immunoassays. To develop a biosensor for LDL(-), a recombinant protein, called GFP5-scFv was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) strain. The obtainment of this protein was performed inserting the DNA sequence of an anti-LDL(-) single chain variable fragment (scFv) in a bacterial vector with a DNA sequence of green fluorescent protein (GFP5). Thus, the scFv-GFP5 is fluorescent and has affinity for LDL(-). Were also synthesized gold nanoparticles, which can be efficiently used for quenching the fluorescence emission of GFP5-scFv. Therefore, immunoassays validated and developed applications for the biosensor are tools that have potential to be used in evaluating the pathogenesis of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis. Antibodies. ELISA. Validation. Nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo (Gersh *et al.*, 2010). Dados do Ministério da Saúde mostram que no Brasil mais de 2 milhões de pessoas morreram na última década em decorrência de doenças cardiovasculares (Datasus, 2010). Os desfechos clínicos de doença cardíaca coronariana, doença cardiovascular e doença vascular-cerebral são atribuídos à aterosclerose.

A aterosclerose é uma doença crônica que compreende uma complexa disfunção endotelial induzida por acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas, radicais livres, microorganismos patogênicos, estresse de cisalhamento, hipertensão arterial, toxinas do tabaco ou a combinação desses e outros fatores que levam a uma resposta inflamatória compensatória (Stoll *et al.*, 2006). Essa doença se desenvolve silenciosamente na infância e adolescência e as sequelas clínicas geralmente não são evidentes até os 45 anos de idade. Entre os fatores de risco para aterosclerose estão: idade, sexo masculino, histórico familiar, hábito alimentar, níveis séricos aumentados de colesterol total e lipídios oxidados, hipertensão arterial, tabagismo, diabetes mellitus, obesidade e sedentarismo (Wilson, 2005).

O acúmulo de LDL modificada na camada íntima das artérias atrai os monócitos da circulação, os quais aderem à superfície do endotélio. Os monócitos migram através da monocamada endotelial para a íntima, onde eles se proliferam, diferenciam-se em macrófagos e capturam as lipoproteínas modificadas, através dos receptores *scavenger*, formando células espumosas (Figura 1). Com o tempo, as células espumosas morrem por apoptose, contribuindo com o conteúdo lipídico do centro necrótico da lesão. Células musculares lisas da camada média migram para a camada íntima das artérias e, subsequentemente, proliferam-se e começam a secretar elementos da matriz extracelular (Stocker *et al.*, 2004). As lesões aumentam em direção à adventícia até atingir um ponto crítico, depois se expandem em direção ao lúmen. O desenvolvimento da aterosclerose estreita o lúmen das artérias e reduz

o fluxo sanguíneo. Quando o fluxo sanguíneo nas artérias torna-se completamente obstruído, pelo ateroma ou pela formação de trombo devido à ruptura da placa aterosclerótica, ocorrem danos severos e fatais como o infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular-cerebral, dependendo da artéria afetada (Insull, 2009).

Figura 1. Processo aterosclerótico. As lipoproteínas modificadas, retidas na íntima arterial, recrutam monócitos circulantes para o subendotélio (A), onde se diferenciam em macrófagos. A LDL modificada inibe o egresso de macrófagos da lesão (B), os quais capturam a LDL modificada transformando-se em células espumosas (C). A LDL modificada causa injúria e disfunção endotelial (D) e a necrose das células espumosas contribui com o desenvolvimento da lesão (E) (Adaptado de Stocker *et al.*, 2004).

1.2 Modificações da LDL

As LDLs são partículas esféricas com aproximadamente 22 nm de diâmetro que contém um núcleo apolar de ésteres de colesterol e triglicérides cercado por uma monocamada anfipática de fosfolípidos e colesterol não esterificado na qual está localizada uma única molécula de apolipoproteína B-100 (apo B, 4536 aminoácidos) (Prassl *et al.*, 2009). Entretanto, as partículas de LDL formam um grupo heterogêneo, podendo variar em tamanho, carga elétrica, composição e

estrutura (Hevonoja *et al.*, 2000). Modificações na LDL nativa (LDL_n) são capazes de induzir agregação e/ou fusão dessas partículas e são um pré-requisito para o início do acúmulo de lipídios na íntima arterial (Pentikäinen *et al.*, 2000; Jayaraman *et al.*, 2007). A LDL nativa sofre endocitose pelo receptor de LDL enquanto que a LDL modificada é internalizada por macrófagos através de fagocitose mediada por receptores *scavenger*. Ao contrário do receptor de LDL, a expressão de receptores *scavenger* não é regulada pelo nível de colesterol intracelular, e por isso os macrófagos permanecem incorporando LDL oxidada, transformando-se em células espumosas (Steinberg *et al.*, 1997).

Lipoproteínas modificadas pela oxidação, glicação, alquilação e nitração, entre outras reações, são geradas por estresse oxidativo durante inflamação, diabetes e suprimento inadequado de antioxidantes na dieta (Berliner *et al.*, 1996). As formas modificadas de LDL desempenham um importante papel na aterogênese e progressão da aterosclerose (Steinberg *et al.*, 1989), induzindo complexos mecanismos inflamatórios e imunológicos. As modificações da LDL vêm sendo estudadas por vários enfoques metodológicos, resultando em diversas classificações e numa nomenclatura complexa para expressar as diferentes alterações físico-químicas que a partícula pode sofrer.

A oxidação afeta tanto os componentes lipídicos quanto protéicos da LDL (Virella *et al.*, 2005). A LDL oxidada (LDL-oxi) é uma mistura de partículas heterogêneas modificadas com vários produtos de oxidação. A LDL-oxi gerada *in vivo* foi detectada em plasma e lesões ateroscleróticas de camundongos, coelhos e humanos (Ylä-Herttuala *et al.*, 1989; Palinski *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 2007). A LDL-oxi é quimioatraente para monócitos e linfócitos T e é avidamente capturada por receptores *scavenger* de vários tipos, aumentando o acúmulo de colesterol intracelular e formação de células espumosas (Zingg *et al.*, 2000). Alguns estudos têm sugerido que a LDL-oxi seja um marcador prognóstico do desenvolvimento de aterosclerose subclínica em indivíduos clinicamente saudáveis (Hulthe *et al.*, 2002; Wallenfeldt *et al.*, 2004; Meisinger *et al.*, 2005), e já foi demonstrado que níveis plasmáticos elevados de LDL-oxi circulantes estão presentes em indivíduos com doença arterial coronariana (Toshima *et al.*, 2000; Holvoet *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2004) e síndrome coronariana aguda, como infarto agudo do miocárdio e angina instável (Ehara *et al.*, 2001). A LDL-oxi pode se ligar a

glicoproteína I β 2 (GPI β 2), um cofator plasmático, e formar complexos LDL-oxi/GPI β 2. Esses complexos também têm propriedades aterogênicas e estão presentes na circulação sanguínea de pacientes com doenças auto-imunes e inflamatórias, como lúpus eritematoso e síndrome anti-fosfolípidos (Matsuura *et al.*, 2006).

A LDL também pode ser modificada por glicação não enzimática através de ligação covalente de aldeídos ou grupos cetonas de açúcares redutores à grupos amino da apo B-100, formando uma base de Schiff que posteriormente se rearranja formando produto de Amadori (Basta *et al.*, 2004). Em situações de estresse oxidativo e hiperglicemia, proteínas com meia-vida suficientemente longa, podem sofrer reações adicionais levando à formação de adutos de açúcares-aminoácidos chamados de produtos finais da glicação avançada (advanced glycation end products - AGE), os quais podem oxidar ou reagir com a LDL (Virella *et al.*, 2004). A LDL glicada e a LDL modificada por AGE podem ser capturadas por receptores *scavenger* de macrófagos resultando na formação de células espumosas na íntima arterial (Brown *et al.*, 2007).

Produtos aldeídicos da degradação de ácidos graxos polinsaturados na LDL, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), são capazes de se ligar covalentemente aos grupos ϵ -amino de resíduos de lisina da apo-B, formando respectivamente LDL-MDA e LDL-HNE. Essas formas modificadas de LDL também podem ser capturadas pelos receptores *scavenger*, colaborando com o processo aterosclerótico (Holvoet *et al.*, 1999; Tanaga *et al.*, 2002; Negre-Salvayre *et al.*, 2003; Leonarduzzi *et al.*, 2005).

Uma fração minimamente modificada de LDL foi identificada no plasma humano por Avogaro e colaboradores em 1988, utilizando cromatografia de troca iônica. Essa fração de LDL, com carga elétrica negativa aumentada em relação a LDL nativa, foi denominada LDL eletronegativa [LDL(-)]. A LDL(-) desempenha um papel chave na patogênese da aterosclerose, e suas propriedades aterogênicas serão descritas a seguir.

1.2.1 LDL eletronegativa

As partículas de LDL(-) podem ser formadas por diversos processos, como oxidação, acetilação, glicação não-enzimática, enriquecimento em ácidos graxos não-esterificados, modificações enzimáticas por fosfolipases, reações cruzadas com hemoglobina e outros mecanismos ainda não identificados (Sánchez-Quesada *et al.*, 2004; Asatryan *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2009). Em indivíduos normolipêmicos a concentração plasmática de LDL(-) é de 1 a 10% da LDL total (Benítez *et al.*, 2004). No entanto, a LDL(-) encontra-se aumentada na hipercolesterolemia familiar (Sánchez-Quesada *et al.*, 1999), diabetes tipo I e II (Sánchez-Quesada *et al.*, 1996 e 2001; Apolinário *et al.*, 2006), doença arterial coronariana documentada angiograficamente (Tomasik *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006) e pacientes em hemodiálise (Ziouzenkova *et al.*, 1999; Lobo *et al.*, 2008).

Diferenças na composição da LDL nativa e LDL(-) podem explicar a sua eletronegatividade aumentada. A eletronegatividade da LDL pode estar associada com o conteúdo aumentado de ácido siálico, apolipoproteínas E e C-III e ácidos graxos não esterificados (NEFA) (Sánchez-Quesada *et al.*, 2003). As partículas de LDL(-) também têm alto conteúdo de hidroperóxidos (Sevanian *et al.*, 1997), dienos conjugados, óxidos de colesterol (Chang *et al.*, 1997), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo diminuído de α -tocoferol em relação à LDL nativa (Cazzolato *et al.*, 1991).

Conforme estudo de Parasassi *et al.* (2001), a superfície da LDL(-) é significativamente mais polar do que a LDL nativa e a LDL oxidada *in vitro* pelo cobre. A hidratação da LDL(-) indica uma desordem relevante da estrutura lipídica, sugerindo a presença de agregação micelar. Uma mudança conformacional na apo B-100 também foi observada, com alteração da estrutura secundária. A estrutura da LDL determina sua afinidade de ligação aos receptores. A perda da estrutura da apo B-100 diminui a afinidade de ligação da LDL(-) com o receptor de LDL e aumenta sua captura por receptores alternativos (Ursini *et al.*, 2002; Benítez *et al.*, 2004).

A LDL(-) é citotóxica para células endoteliais (Demuth *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a LDL(-) diminui a transcrição do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), o que pode contribuir para a diminuição da angiogênese e aumento da apoptose endotelial (Chen *et al.*, 2003). Adicionalmente, experimentos com células endoteliais isoladas de veia (HUVEC) e de artéria (HUAEC) de cordão

umbilical humano, demonstraram que a LDL(-) apresenta propriedades inflamatórias, induzindo a liberação de interleucina 6 (IL-6), IL-8, proteína 1 quimiotática para monócitos (MCP-1), fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B), fator estimulador de colônia granulócito macrófago (GM-CSF), oncogene relacionado ao crescimento (GRO) (Benítez *et al.*, 2006; De Castellarnau *et al.*, 2007) e aumenta a expressão de moléculas de adesão de células vasculares (VCAM) induzida pelo fator de necrose tumoral-alfa (Ziouzenkova *et al.*, 2003). Benítez *et al.* (2003) mostraram que a atividade do fator de ativação de plaquetas acetil hidrolase (PAF-AH) é 5 vezes maior na LDL(-) do que na LDL nativa, sugerindo que isso possa estar relacionado à atividade inflamatória da LDL(-) em cultura de células endoteliais, uma vez que a PAF-AH gera lisofosfatidilcolina e cadeias curtas ou oxidadas de NEFA, os quais são mediadores inflamatórios.

Esse conjunto de observações reforça a hipótese de que a LDL(-) contribui com a aterogênese uma vez que ela estimula as células endoteliais a produzirem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que desempenham importantes papéis em vários estágios do desenvolvimento da aterosclerose como o recrutamento leucocitário para a íntima arterial, proliferação celular e indução de estado pró-inflamatório sistêmico.

1.3 Resposta imunológica na aterosclerose

A resposta imune, inata e adaptativa, está amplamente envolvida na patogênese das lesões ateroscleróticas. A imunidade inata, uma rápida linha de defesa que pode se mobilizar em minutos ou horas, frequentemente representa o início da aterosclerose, através da resposta ao acúmulo de lipoproteínas modificadas na íntima da artéria. Vários tipos celulares estão envolvidos, sendo a linhagem de fagócitos mononucleares a mais importante (Packard *et al.*, 2009). Essa primeira linha de defesa imune é baseada na detecção de padrões moleculares associados à patógenos (do inglês PAMPs), os quais estão presentes na LDL modificada (Chou *et al.*, 2009). Os macrófagos expressam em suas membranas receptores específicos para vários PAMPs, como os receptores *scavenger* e receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*).

Os receptores *scavenger* na superfície dos macrófagos, como os da classe A tipo I e II, classe B (CD36), classe D (CD68) e classe E (LOX-1, receptor de LDL oxidada semelhante à lecitina 1) assim como os receptores CD14, reconhecem a LDL modificada e a internalizam (Podrez *et al.*, 2000; Kunjathoor *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003; Shashkin *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2009). O TLR4 na superfície dos macrófagos reconhece LDL modificada e ativa diversas vias de sinalização intracelular levando a síntese e liberação de citocinas inflamatórias e outras moléculas (Choi *et al.*, 2009). Embora a remoção de LDL modificada possa ser protetora sob algumas condições, a excessiva captura de lipoproteínas modificadas via receptor *scavenger* acelera a aterosclerose. Recentemente, foi demonstrado que a LDL(-) induz o aumento da expressão dos receptores *scavenger* CD36 em macrófagos de camundongos, com consequente aumento da captura de LDL modificada por esses receptores e formação de células espumosas (Pedrosa *et al.*, 2010).

A captura da LDL modificada pelos macrófagos, através de seus receptores, representa o elo entre a imunidade inata e adaptativa, pois esse processo leva à apresentação dos ligantes processados às células T específicas. Os epítomos formados na molécula de LDL, devido à modificação oxidativa, são apresentados pelas proteínas MHC classe II (Complexo de Histocompatibilidade Principal) dos macrófagos para reconhecimento às células T CD4⁺ específicas. Uma vez que as células T encontram seus antígenos específicos em uma molécula MCH classe II, uma resposta imune adaptativa é ativada, incluindo proliferação clonal das células T e produção de citocinas pelas mesmas, com consequente produção de anticorpos anti-LDL modificada pelas células B (Nilsson *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2010).

1.3.1 Anticorpos anti-LDL(-)

Anticorpos contra vários epítomos de lipoproteínas modificadas têm sido encontrados em plasmas e lesões ateroscleróticas de humanos e coelhos (Yla-Hertuala *et al.*, 1994; Virella *et al.*, 2004). No entanto, a importância clínica desses anticorpos, se são pró-aterogênicos ou anti-aterogênicos, ainda não foi totalmente elucidada. Recentes evidências começam a elucidar essa controvérsia, mostrando que anticorpos das classes IgG e IgM não refletem processos fisiopatológicos

similares. Em geral, a preponderância de evidências sugere que anticorpos IgG para LDL-oxi estão principalmente associados com propriedades pró-aterogênicas por mediar a captura dos imunocomplexos de LDL-oxi através do receptor Fc nos macrófagos e pela ativação do complemento, enquanto que autoanticorpos IgM podem ser associados com propriedades ateroprotetoras, pois se ligam à LDL-oxi, mas não se ligam aos receptores Fc de macrófagos (Karvonen *et al.*, 2003; Gounopoulos *et al.*, 2007). Teoricamente, o papel fisiológico de anticorpos contra LDL modificada é a remoção da mesma da circulação e da parede arterial, sendo este papel confirmado por estudos como o de Shoji *et al.* (2000) e Radulescu *et al.* (2004), que demonstraram uma relação inversa entre anticorpos anti-LDL-oxi e níveis de LDL-oxi em indivíduos saudáveis.

Altos níveis de IgG anti-LDL(-) foram detectados em pacientes com diabetes ou tolerância diminuída à glicose quando comparados a indivíduos saudáveis (Apolinário *et al.*, 2006). Anticorpos anti-LDL(-) também foram correlacionados com o grau de aterosclerose e sua progressão, demonstrando que pacientes com síndrome coronariana aguda têm níveis mais elevados de anticorpos anti-LDL(-) quando comparados com sujeitos com síndrome coronariana crônica ou saudáveis, o que sugere que tais anticorpos sejam preditores não somente de síndrome coronariana, mas também sejam marcadores de instabilidade da placa (Oliveira *et al.*, 2006).

Níveis de anticorpos formados contra um antígeno específico são altamente variáveis, dependendo de variações individuais na resposta imune. Além do mais, a avididade do anticorpo ao seu respectivo antígeno também é altamente variável. Por isso, a quantificação de anticorpos livres circulantes depende não somente da magnitude da resposta do anticorpo, mas também da avididade do anticorpo e da quantidade de antígeno presente na circulação. Se a média da avididade de anticorpos circulantes é suficientemente alta e os antígenos estão presentes na circulação, imunocomplexos solúveis são formados e o anticorpo contido no complexo não será quantificado como anticorpo livre (Virella *et al.*, 2002). Diante disso torna-se importante também a avaliação dos imunocomplexos.

1.3.2 Imunocomplexos de LDL

As lipoproteínas modificadas contribuem com o desenvolvimento da aterosclerose por diversos mecanismos. Um deles é a sua habilidade de induzir acúmulo intracelular de ésteres de colesterol em macrófagos via receptor *scavenger*, levando a transformação dos macrófagos em células espumosas. Outro mecanismo é a habilidade das lipoproteínas modificadas em desencadear uma resposta imune levando à produção de autoanticorpos e subsequentemente a formação de imunocomplexos (Mironova *et al.*, 2000).

O envolvimento de imunocomplexos de LDL (IC-LDL) na patogênese da aterosclerose foi sugerido há mais de uma década por Yla-Herttuala e colaboradores (1994) ao encontrarem LDL-oxi e seus correspondentes anticorpos IgG em lesões ateromatosas de humanos e coelhos Watanabe hiperlipidêmicos (Yla-Herttuala *et al.*, 1994). Estudos anteriores já haviam mostrado que a incubação de macrófagos com IC-LDL, preparado com LDL humana e anticorpos anti-LDL de coelho, induzem a formação de células espumosas *in vitro* mais eficientemente que qualquer outro mecanismo (Lopes-Virella *et al.*, 1991).

Os anticorpos anti-LDL-oxi purificados de plasma humano são predominantemente das subclasses IgG1 e IgG3, indicando seu potencial pró-inflamatório (Virella *et al.*, 2002), dado que essas imunoglobulinas ao se ligarem à LDL modificada formam IC, ativam a via clássica do sistema complemento, interagem com alta afinidade com receptores Fc γ de macrófagos humanos e induzem sua ativação (Saad *et al.*, 2006). Os macrófagos expressam três classes de receptores Fc γ (Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII), e os IC-LDL são predominantemente capturados via Fc γ RI. Essa captura resulta em ativação celular, liberação de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases e espécies reativas de oxigênio, acúmulo de ésteres de colesterol, e regulação positiva da expressão de receptores de LDL. O acúmulo massivo de ésteres de colesterol e superexpressão de receptores de LDL são especificamente induzidos pelos imunocomplexos contendo LDL modificada, mas não por nenhum outro tipo de imunocomplexo (Lopes-Virella *et al.*, 1997).

Não há até o momento nenhum estudo sobre imunocomplexos de LDL(-), mas alguns trabalhos demonstram que há uma correlação positiva entre níveis de

LDL-oxi e IC-LDL e ambos estão aumentados em pacientes com doença cardíaca coronariana (Orehov *et al.*, 1995; Bing *et al.*, 2004). Também foi demonstrado que níveis elevados de imunocomplexos de LDL modificada estão associados com a progressão da espessura das camadas íntima e média da carótida em pacientes com diabetes tipo I, o que sugere que a formação ou deposição de imunocomplexos contendo lipoproteínas modificadas na parede vascular pode ajudar a induzir ou agravar os componentes inflamatórios da aterosclerose, contribuir para eventos vasculares agudos e promover o desenvolvimento de nefropatia diabética (Lopes-Virella *et al.*, 2007).

1.4 Imunoensaios para determinação das formas modificadas de LDL e seus anticorpos

As modificações da LDL são pós-traducionais, portanto técnicas genéticas não têm aplicação na detecção de LDL modificada, mas os imunoensaios tornam-se muitos úteis. O uso de anticorpos monoclonais (MAbs) nos imunoensaios trouxe grandes avanços na pesquisa, uma vez que os MAbs são poderosas ferramentas na identificação de estruturas específicas. Alguns pesquisadores desenvolveram MAbs para determinar as lipoproteínas modificadas na circulação sanguínea, as quais estão correlacionadas com doenças cardiovasculares.

Na Bélgica, Holvoet e colegas, geraram o MAb 4E6 por imunização de camundongo com LDL oxidada *in vitro* pelo cobre. Dos 4536 aminoácidos da apo B-100, 356 são resíduos de lisina. O MAb de murino, 4E6, se liga com LDL-MDA e/ou LDL-oxi que tenha de 60 a 240 resíduos de lisina por molécula de apo B substituídos ou modificados por aldeídos (como o malondealdeído), gerados pela oxidação dos lipídios da LDL ou por outros mecanismos (Holvoet *et al.*, 2006). Utilizando o MAb 4E6, eles desenvolveram dois tipos de imunoensaios, um sanduíche e um competitivo, ambos para quantificar LDL-MDA e/ou LDL-oxi no plasma. O ensaio tipo sanduíche utiliza o MAb 4E6 para captura e um anticorpo anti-apo B como secundário, marcado com peroxidase (Figura 2a). No ensaio competitivo uma amostra de plasma diluída é pré-incubada com concentração conhecida de MAb 4E6 e posteriormente transferido a uma placa sensibilizada com LDL-oxi. Quanto mais LDL-oxi presente no plasma, mais MAb 4E6 é consumido na pré-incubação e menor

será a densidade óptica (Figura 2b). O padrão dos ensaios é LDL-MDA e os resultados são apresentados em mg/dL. (Holvoet *et al.*, 1998). A empresa sueca Mercodia Inc., usando o MAb 4E6, disponibiliza comercialmente para uso em pesquisa os dois tipos de imunoensaios, sanduíche e competitivo para quantificar LDL-oxi em plasma humano. As concentrações de LDL-oxi pelo kit Mercodia são expressos em unidades arbitrárias/L (<http://www.mercodia.se>).

No Japão, Itabe e colegas, geraram o MAb DLH3 por imunização de camundongos com homogenato de ateroma humano. Este MAb de murino, tipo IgM, se liga fortemente com LDL-oxi, mas não com LDLn, LDL acetilada, LDL glicada ou LDL-MDA (Itabe *et al.*, 1994; 1996). O DLH3 reconhece fosfatidilcolina oxidada, incluindo fosfatidilcolina contendo aldeídos e é usado em ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para quantificar LDL-oxi em plasma humano (Itabe *et al.*, 1996). No ELISA tipo sanduíche utiliza-se o MAb DLH3 anti-fosfatidilcolina oxidada e um anticorpo policlonal anti-apo B humana, dessa forma o antígeno detectado são partículas que contém apo B e fosfatidilcolina oxidada (Figura 2c). Nesse método, a fração de LDL deve ser separada de cada plasma previamente por ultracentrifugação sequencial para realizar o ensaio, o que evita a interferência de formas oxidadas de VLDL, IDL e quilomícrons. De cada amostra são aplicados 5 µg de proteína de LDL/poço da placa e os resultados são expressos como ng de LDL-oxi/µg de proteína de LDL. Os dados não representam diretamente a concentração de LDL-oxi presente no plasma, mas a relação de partículas modificadas oxidativamente na fração de LDL. A empresa Kyowa Medex Inc. de Tóquio (Japão), utilizando o MAb DLH3 desenvolveu um kit de ELISA disponível comercialmente para uso em pesquisa, que utiliza amostra de plasma diluída, sem ultracentrifugação prévia, e fornece a concentração de LDL-oxi em unidades arbitrárias/mL de plasma (Itabe *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos, Witztum *et al.* (1999), para quantificar LDL-oxi em plasma humano, utilizam o MAb E06 gerado de clones de células B de camundongos não imunizados, knockout para apolipoproteína E. O MAb E06 de murino é um anticorpo natural da classe IgM e reconhece fosforilcolina, a porção hidrofílica da fosfatidilcolina (Witztum *et al.*, 1999). Dois ELISAs sanduíches são realizados em paralelo com as amostras de plasma. Em um poço é feita a sensibilização da placa de ELISA com um anticorpo monoclonal de murino

denominado MB47 que captura apo B-100. Posteriormente fosfolípidos oxidados da apo B da amostra são detectados com o MAb E06 biotinilado (Figura 2d). Outro poço é sensibilizado com o MB47, o qual captura apo B da amostra e esta é detectada com outro anti-apo B (MB24). Dessa forma o ensaio determina a razão fosfolípidos oxidados/apo B. A leitura é por quimiluminescência e os resultados são expressos como unidades relativas de luz (URL). Nenhum ensaio utilizando o MAb E06 está disponível comercialmente (Fraley *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos publicados relacionando a LDL-oxi com doenças cardiovasculares foram realizados utilizando os três MAbs citados, 4E6, DLH3 e E06. Cada um desses MAbs detecta epitopos diferentes na partícula de LDL, e os imunoenaios têm diferentes esquemas e unidades de medida, portanto, não são necessariamente comparáveis entre si.

Figura 2. Metodologia dos ensaios para determinação de LDL-oxi. Esquema do ELISA utilizando o MAb 4E6, no formato sanduíche (a) e competição (b); ELISA com MAb DLH3 (c); ELISA com MAb E06 (d). (Reproduzido de Fraley *et al.*, 2006).

Para a detecção de anticorpos anti-LDL modificada também não há uma metodologia padronizada, os trabalhos publicados utilizam diferentes antígenos, curvas de calibração, anticorpos secundários e sistemas de detecção. Anticorpos anti-LDL-oxi são geralmente quantificados no plasma com técnicas de ELISA utilizando antígenos como LDL-MDA ou LDL oxidada *in vitro* pelo cobre para

sensibilizar as placas. O plasma diluído é adicionado e então os anticorpos livres circulantes que se ligam aos antígenos da placa, são detectados com anticorpo secundário, específico para anticorpos IgG ou IgM. A unidade usada para descrever os níveis de autoanticorpos pode ser apresentada como títulos ou diluição seriada, unidades relativas de luz, unidades internacionais, densidade óptica ou razão de ligação do antígeno desejado *versus* a ligação à LDL não modificada (Virella *et al.*, 2003). Esses ensaios refletem os níveis de anticorpos livres circulantes e não detectam autoanticorpos ligados a LDL, os imunocomplexos. Trabalhos publicados por Virella *et al.* (EUA) utilizam imunoensaio do tipo competitivo para determinar anticorpos anti-LDL-oxi (Koskinen *et al.*, 1998; Lopes-Virella *et al.*, 2000). Para a sensibilização da placa é utilizada LDL oxidada *in vitro* pelo cobre e para a curva de calibração é utilizada uma diluição seriada de anticorpos humanos anti-LDL-oxi purificados. A leitura é por espectrofotometria com cromógeno ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]) e os resultados são expressos em mg/L.

Erkkilä e colaboradores (2000; Finlândia), também publicaram trabalhos sobre anticorpos anti-LDL-oxi utilizando um ELISA desenvolvido pelo grupo. Nesse ensaio metade da placa é sensibilizada com LDL oxidada *in vitro* pelo cobre e outra metade com LDL nativa. A leitura é por espectrofotometria com cromógeno TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) e os resultados são expressos como a razão de ligação à LDL-oxi pela ligação a LDL nativa (LDL-oxi/LDLn). Até o momento, no mundo são comercializados 2 diferentes kits para quantificar anti-LDL-oxi sem finalidade diagnóstica, apenas para uso em pesquisa (Figura 3). Um deles foi desenvolvido pela empresa Biomedica Gruppe de Viena (Áustria) e também é vendido pela Alpco Diagnostics de Salem (EUA); outro foi desenvolvido pela Kamiya Biomedical Company, em Seattle (EUA). Estes dois kits expressam a concentração de anticorpos em mU/mL, baseado numa curva de calibração com um soro de referência.

As informações sobre a determinação de imunocomplexos de LDL modificada são escassas na literatura. Os trabalhos baseiam-se na detecção e caracterização dos IC-LDL de duas maneiras diferentes: por precipitação com polietilenoglicol (PEG), o mais antigo ensaio para IC circulantes (Harkiss *et al.*, 1979; Virella *et al.*, 1981) e por ELISA de captura (Boullier *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999). O ELISA de captura geralmente envolve a imobilização de anticorpos para LDL

modificada e a detecção de imunoglobulinas co-capturadas com anticorpos conjugados a enzimas.

Figura 3. Esquema do ensaio para determinação de anti-LDL-oxi. Sensibilização da placa com LDL-oxi (1), adição da amostra de plasma (2), anticorpos anti-IgG humana marcado com peroxidase (3), cromógeno TMB (4), solução de parada (5) e mudança de cor catalizada pela enzima (6). (Reproduzido do manual do kit de ELISA da Biomedica Gruppe).

1.5 Biossensores

O teste ELISA é empregado na detecção de antígenos ou anticorpos em um número muito grande de sistemas devido às suas características de elevada sensibilidade e especificidade, bem como de rapidez, baixo custo, simplicidade técnica, versatilidade, objetividade de leitura e possibilidade de adaptação a diferentes graus de automação. A recente proliferação dos testes de ELISA pode ser atribuída à grande disponibilidade de anticorpos monoclonais, bem como ao desenvolvimento de antígenos específicos (Sanchez *et al.*, 2001). Nos últimos 10 anos, o teste de ELISA substituiu o radioimunoensaio em vários laboratórios, pois além de possuir sensibilidade comparável, não apresenta os problemas decorrentes da utilização de radioisótopos, uma vez que as moléculas radiomarcadas restringem sua manipulação, armazenamento e eliminação. Concomitantemente aos ELISAs, outros imunoensaios começaram a ser descritos na literatura baseados na tecnologia dos biossensores.

Biossensor é um dispositivo analítico que integra um material biológico e um transdutor, para produzir um sinal quantificável que é proporcional à concentração do analito. De modo geral, os biossensores são constituídos de: (I) um elemento de reconhecimento, geralmente um anticorpo, para reconhecer e se ligar ao analito de interesse; (II) um elemento de transdução, que converte a interação de biomoléculas, como antígeno e anticorpo, em um sinal quantificável; e (III) um sistema de leitura (Healy *et al.*, 2007) (Figura 4).

O elemento de reconhecimento interage com o analito a ser detectado e, desta forma, ocorre uma mudança em uma de suas propriedades físico-químicas, como massa, índice de refração, absorvância da luz, potencial de redução, etc. Entre os elementos de reconhecimento disponíveis, os anticorpos são os mais utilizados devido à excelente seletividade e sensibilidade. Se os elementos biológicos aplicados são anticorpos ou fragmentos de anticorpos, o dispositivo é chamado de imunossensor. Atualmente os imunossensores são o maior desenvolvimento no campo imunoquímico e do diagnóstico clínico. Os imunossensores combinam a inerente especificidade das imunorreações com a sensibilidade dos transdutores, além de apresentar rapidez de análise e a possibilidade de serem portáteis (Luppa *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005).

Figura 4. Componentes dos biossensores. Os materiais biológicos podem ser usados como elemento de reconhecimento em combinação com uma ampla variedade de transdutores eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos. Isso permite diversas combinações e estratégias de desenvolvimento de biossensores para análise nas mais variadas áreas de atuação. (Figura baseada nas informações de Reilly *et al.*, 2010).

Na área de diagnóstico clínico há alguns biossensores sendo comercializados, como é o caso dos biossensores para glicose, lactato, creatinina, uréia e colesterol (Detry *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1999; Arya *et al.*, 2008; Luong *et al.*, 2008). No entanto, não há patentes ou publicações sobre biossensores para determinação de LDL(-) ou outras formas modificadas de LDL.

Recentemente foram publicados dois trabalhos sobre desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para determinação de LDL nativa. Em um deles (Jie *et al.*, 2007) foi desenvolvido um biossensor para detecção de LDL por eletroquimiluminescência (ECL) utilizando nanocristais de sulfeto de cádmio (CdS) e nanopartículas de ouro. As nanopartículas de ouro foram montadas numa camada de cisteamina na superfície do eletrodo de ouro. O eletrodo coberto com as nanopartículas de ouro foi tratado com cisteína e então reagiu com nanocristais de CdS formando um complexo eletrodo-cristais de CdS. Finalmente, anticorpos anti-apo B-100 foram conjugados covalentemente ao complexo (Figura 5). A concentração de LDL foi medida pela diminuição da intensidade de ECL resultante da ligação específica da LDL ao anti-apo B-100. A intensidade do pico de ECL do biossensor diminuiu linearmente com a concentração de LDL num intervalo de 0,025 a 16 ng/mL, com um limite de detecção de 0,006 ng/mL.

Figura 5. Biossensor de nanopartículas de ouro e nanocristais de CdS. Os nanocristais de CdS e anti-apo B-100 foram firmemente imobilizados na superfície do eletrodo por forte interações entre grupos amino e carboxil (Adaptado de Jie *et al.*, 2007).

Yan *et al.* (2008) também desenvolveram um imunossensor para determinação de LDL por eletroquimiluminescência. Para isso adsorveu-se anticorpo

anti-apo B-100 em um eletrodo de carbono vítreo modificado com um material híbrido constituído de nanopartículas de ouro e cloreto de prata/polianilina. Os sítios livres do biossensor foram saturados com BSA e a LDL ligou-se à superfície do eletrodo através da imunorreação específica entre a apo B-100 da LDL e o anti-apo B-100 da superfície do eletrodo (Figura 6). A quantificação foi realizada por espectroscopia de impedância eletroquímica.

Figura 6. Biossensor de nanopartículas de ouro e AgCl/polianilina. Esse imunossensor exibiu uma resposta altamente sensível à LDL com um limite de detecção de 0,34 pg/mL (Adaptado de Yan *et al.*, 2008).

1.5.1 Anticorpos fluorescentes

Um importante passo no desenvolvimento de um biossensor é a seleção de biomoléculas que formem um complexo específico com o analito de interesse. A engenharia de anticorpos fornece excelentes ferramentas para se usufruir das propriedades dos anticorpos em relação à afinidade, especificidade e performance para diferentes aplicações. Fragmentos ativos de anticorpos, como o Fab (fragmento de ligação ao antígeno) e scFv (fragmento variável de cadeia única) expressos em bactérias (*Escherichia coli*) ou leveduras (*Pichia pastoris*), têm sido utilizados na construção de imunossensores (Shen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2007; Saerens *et al.*, 2008, Ibii *et al.*, 2010). Os scFv são formados pelas frações variáveis da cadeia leve e pesada do anticorpo, unidas por um peptídeo hidrofílico e flexível com cerca de 10 a 25 resíduos de aminoácidos (Figura 7). Os scFvs representam o menor domínio funcional do anticorpo necessário para atividade de ligação ao antígeno, têm as mesmas especificidades e afinidades aos seus antígenos como os anticorpos monoclonais dos quais as sequências da região variável da cadeia leve e pesada

foram usadas para construir os genes recombinantes que foram expressos na bactéria ou levedura (Bird *et al.*, 1988).

Alguns grupos têm utilizado anticorpos fluorescentes resultantes da fusão genética de scFv com a proteína verde fluorescente (GFP) para aplicação em uma ampla gama de estudos biológicos como avaliação de tumores, rastreamento de drogas, localização de receptores celulares ou proteínas, ou para uso como imunorreagentes (Lu *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008). A GFP, originalmente isolada da água-viva *Aequorea victoria* é estável em uma ampla faixa de pH, temperatura, além de ser resistente a fotodegradação. A GFP é uma proteína de 238 aminoácidos com massa molecular de 27 Kda, em formato de cilindro com um comprimento de 4,2 nm, diâmetro de 2,4 nm e apresenta pico de emissão de fluorescência em 508 nm (Tsien, 1998). Para adaptar a GFP ao sistema de expressão bacteriano, Siemering *et al.* (1996) fizeram modificações na GFP nativa e a denominaram GFP5 (NCBI - GenBank: AAB47998.1). A GFP5 contém três substituições em relação à GFP nativa: V163A e S175G que beneficiam o enovelamento da proteína a 37°C e I167T que equaliza a intensidade dos picos de excitação em 395 e 473 nm. Anticorpos fluorescentes resultantes da fusão de scFv e GFP são biomoléculas muito úteis para o desenvolvimento de biossensores.

Figura 7. Representação esquemática da IgG, F(ab')₂, Fab e scFv. V_H: região variável da cadeia pesada; V_L: região variável da cadeia leve; C_H: região constante da cadeia pesada; C_L: região constante da cadeia leve. As linhas vermelhas representam as pontes de dissulfeto e a linha azul do scFv representa o peptídeo ligante (Peterson *et al.*, 2006).

1.5.2 Nanopartículas

Para o desenvolvimento de um biossensor também é fundamental a escolha de um componente para interação com as biomoléculas que se ligam ao analito de interesse. Recentes avanços na bioengenharia, resultantes da integração da nanotecnologia com biologia e medicina, levaram ao desenvolvimento de nanopartículas funcionais (eletrônicas, ópticas, magnéticas ou estruturais) que podem ser ligadas às biomoléculas (Willner *et al.*, 2007).

As nanopartículas podem ser sintetizadas a partir de diversos materiais, como ouro, diamante e sílica (Douma *et al.*, 2009), podendo ser usadas em uma variedade de formatos bioanalíticos (Penn *et al.*, 2003). As nanopartículas de ouro, também chamadas de ouro coloidal, são muito estáveis e têm sido utilizadas como supressoras de fluorescência em sistemas bioanalíticos (Maxwell *et al.*, 2002; Ao *et al.*, 2006; Lapiene *et al.*, 2010). A habilidade de supressão de fluorescência, resultante do alto coeficiente de extinção das nanopartículas de ouro, depende do tamanho e do formato das nanopartículas, da distância entre as nanopartículas com o fluoróforo e da sobreposição do espectro de emissão do fluoróforo com o espectro de absorção das nanopartículas (Dulkeith *et al.*, 2002). Desta forma, a aplicação de nanopartículas de ouro com anticorpos fluorescentes é uma alternativa atraente no desenvolvimento de um biossensor.

Nanocristais ou *quantum dots* são nanopartículas semicondutoras compostas por algumas centenas de átomos, dispostos ordenadamente de acordo com uma estrutura cristalina. As pequenas dimensões dos nanocristais (diâmetro em torno de 1 a 20 nm) resultam em alterações significativas nas propriedades ópticas, eletrônicas e mecânicas em relação àquelas encontradas em seu material macrocristalino. Os nanocristais apresentam alta eficiência quântica e fotoestabilidade, podendo ser sintetizados a partir de vários tipos de materiais semicondutores como seleneto de cádmio, sulfeto de cádmio, telureto de cádmio, seleneto de zinco, sulfeto de zinco, sulfeto de chumbo, ou outros materiais. Os nanocristais podem ser conjugados a moléculas biológicas, como anticorpos, e usados para imagem *in vivo*, detecção e reconhecimento molecular (Pickett *et al.*, 2001; Ghasemi *et al.*, 2009).

Recentemente foi caracterizado o FRET (transferência ressonante de energia de fluorescência) entre nanocristais fluorescentes e GFP (Hering *et al.*,

2007). O FRET se tornou uma ferramenta amplamente utilizada em aplicações envolvendo fluorescência, incluindo diagnósticos médicos, análise de DNA e visualização óptica (Lakowicz, 2006). FRET é um fenômeno eletrodinâmico que ocorre entre uma molécula doadora no estado excitado e uma molécula receptora no estado fundamental. As moléculas doadoras usualmente emitem em um comprimento de onda menor que se sobrepõe com o espectro de absorção do receptor. A transferência de energia ocorre sem a emissão de um fóton, sendo o resultado de uma interação dipolo-dipolo de longo alcance entre o doador e o receptor. A taxa de transferência de energia depende da extensão da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e do espectro de absorção do receptor, da eficiência quântica do doador, da orientação relativa entre os dipolos de transição do doador e receptor, e da distância entre as moléculas doadoras e receptoras (Clegg, 1996). Assim, torna-se possível medir o FRET entre nanocristais e anticorpos fluorescentes e fazer uso dessa propriedade para o desenvolvimento de um biossensor.

1.6 Validação de ensaios

O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação ou aplicação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência, denominado validação. Na NBR ISO 9000, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003) define validação como a “comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos”. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, RE N°999 de 29/05/2003) considera que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Ou seja, a validação baseia-se em estabelecer e documentar as características de desempenho de um método e assim demonstrar se o método é adequado para uma determinada finalidade analítica.

É de fundamental importância utilizar ensaios validados e bem caracterizados para a obtenção de resultados confiáveis, os quais podem ser adequadamente interpretados em estudos clínicos. Guias internacionais como

Eurachem (1998) e IUPAC (Thompson *et al.*, 2002), estabelecem definições e regras gerais para o processo de validação de métodos analíticos, mas ao mesmo tempo destacam a importância da adequação da validação ao tipo de teste e uso pretendido. As recomendações mais importantes para a validação especificamente de imunoenaios foram revisadas por Findlay *et al.* (2000) e Shah *et al.* (2000). As características de desempenho avaliadas no processo de validação são:

- *Limite de detecção (LD)*: é a menor concentração de um analito na amostra de teste que pode ser confiavelmente diferenciada de zero.
- *Limite inferior de quantificação (LQ)*: é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão.
- *Limite superior de quantificação (LSQ)*: é a mais alta concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequada.
- *Faixa de quantificação*: é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual é possível a determinação com precisão e exatidão, sob as condições especificadas para o ensaio.
- *Precisão*: é o grau de concordância (grau de dispersão) entre as concentrações obtidas de repetidas análises de uma mesma amostra, sob condições previamente definidas.
- *Exatidão*: é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.
- *Linearidade da diluição*: é a concordância entre as concentrações obtidas de uma mesma amostra analisada em múltiplas diluições.
- *Avaliação de interferentes*: é a análise de amostras de plasma antes e após a adição de possíveis interferentes analíticos, como lipídios, hemoglobina e bilirrubina.
- *Estabilidade*: verificação da estabilidade de um analito em uma dada matriz, sob condições específicas em um dado intervalo de tempo.
- *Robustez*: é a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Visando contribuir com os estudos de fisiopatologia da aterosclerose e risco cardiovascular, o objetivo desse trabalho foi desenvolver imunoensaios para determinação da subfração eletronegativa da LDL, dos autoanticorpos contra LDL(-) e de seus imunocomplexos, assim como, implementar as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de um biossensor para LDL(-).

2.2 Objetivos específicos

- Padronização e validação de imunoensaios para determinação de LDL(-), autoanticorpos anti-LDL(-) e IC-LDL(-)
- Obtenção da quimera de proteína verde fluorescente com fragmento variável de cadeia única anti-LDL(-) (GFP5-scFv)
- Síntese de nanopartículas que, juntamente com a GFP5-scFv, atuem como transdutor em um biossensor para LDL(-)

3. MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I

3.1 Plasma humano

Foram coletados 35 mL de sangue de 15 voluntários em tubos contendo EDTA (1 mg/mL), os quais foram centrifugados a 2.500 RPM por 10 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e a ele imediatamente adicionado o antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT 20 mM) e inibidores de protease: aprotinina (2 µg/mL), benzamidina (2 mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF 1 mM). Os níveis plasmáticos de colesterol e LDL-colesterol das amostras foram analisados no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Essas amostras de plasma foram utilizadas na validação dos três imunoenaios. Uma parte dos plasmas normocolesterolêmicos (colesterol abaixo de 200 mg/dL e LDL abaixo de 130 mg/dL) foi misturada com a finalidade de formar um *pool* para ser utilizado como padrão do ELISA para IC-LDL(-). Foi determinada a concentração de IgG total do *pool* de plasma pelo equipamento Nephelometer Analyzer II (Behring®), aliquoteado e congelado a -20°C até o momento do uso. Uma parte dos plasmas hipercolesterolêmicos (colesterol acima de 240 mg/dL e LDL acima de 160 mg/dL) foi misturada com a finalidade de formar um *pool* para purificação de LDL(-). Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FCF) da USP, protocolo nº391.

3.2 Obtenção das frações nativa e eletronegativa da LDL

3.2.1 Isolamento de LDL

As lipoproteínas plasmáticas foram separadas pelo método de ultracentrifugação sequencial utilizando-se a ultracentrífuga Sorvall® modelo Ultra Pro 80 com rotor Sorvall® de ângulo fixo T-1270. Foram centrifugados 120 mL do *pool* de plasma hipercolesterolêmico durante 8h, 55.000 RPM, a 4°C, com salina de

densidade 1,019g/mL. A fração sobrenadante, correspondente a VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), foi removida e o plasma remanescente ajustado para a densidade 1,063g/mL com KBr, sendo centrifugado com salina de densidade 1,063g/mL, durante 8h, 55.000 RPM, a 4°C. A LDL sobrenadante foi isolada e dialisada contra tampão Tris-HCl 20mM, pH7,4, por 4 horas com trocas a cada 1 hora, à 4°C e protegida da luz (Havel *et al.*, 1955, Redgrave *et al.*, 1975, Griffin *et al.*, 1990, Hodis *et al.*, 1994).

3.2.2 Purificação das frações nativa e eletronegativa de LDL

A LDL foi filtrada em filtro 0,22 µm e injetada em uma coluna de troca iônica (Sephacrose UNO Q12, Bio-Rad®), conectada a um sistema FPLC (fast protein liquid chromatography, Bio-Rad®). A fase móvel constituiu um gradiente formado por tampão Tris 20 mM, pH 7,4 (bomba A) e tampão Tris 20 mM + NaCl 1 M, pH 7,4 (bomba B). Todas as soluções foram filtradas em 0,22 µm e desgazeificadas em banho ultrassônico. O tempo de corrida foi de 60 minutos e a taxa de fluxo 4 mL/min, como se segue: 0 a 44 mL: 0% tampão B; 44 a 74 mL: 10% tampão B; 74 a 110 mL: 20% tampão B; 110 a 140 mL: 50% tampão B; 140 a 164 mL: 100% tampão B; 164 a 212 mL: 0% tampão B. (Vedie *et al.*, 1991; De Castellarnau *et al.*, 2000). Devido a sua maior eletronegatividade, a LDL(-) foi eluída da coluna após aumento da concentração de NaCl da fase móvel. Os tempos de eluição para LDL nativa (LDLn) e LDL(-) foram de 28,8 e 37,6 minutos, respectivamente. Os eluentes foram monitorados a 280 nm UV e os picos correspondentes a LDL(-) e LDLn foram coletados utilizando um coletor de frações (BioLogic BioFrac Fraction Collector, Bio-Rad®).

Os tubos correspondentes a cada uma das frações foram somados, dialisados contra tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e aplicados em uma coluna de cromatografia por afinidade Hitrap Blue (Amersham/GE®) para remoção de qualquer resíduo de albumina. Os elutos de LDL(-) e LDLn foram concentradas a vácuo sob refrigeração em um Speed Vac SC110 Savant®. Ambas LDL foram dialisadas contra PBS pH 7,4 e tiveram suas concentrações protéicas determinadas pelo método de Lowry (1951) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Às alíquotas de LDL(-) e LDLn foi acrescentado o mesmo conjunto de

antioxidantes e inibidores de proteases utilizados durante a coleta das amostras, e em seguida foram armazenadas a -20°C e protegidas da luz até o momento do uso.

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

3.3 Anticorpos monoclonais

Dois hibridomas, 1A3H2 e 2C7D5F10, secretores de MAbs anti-LDL(-) do isotipo IgG1, foram obtidos anteriormente em nosso laboratório por imunização de camundongos Balb/c com LDL(-) isolada de plasma humano (Telles, 2008).

3.3.1 Cultura dos hibridomas

Os dois hibridomas obtidos, secretores de MAbs anti-LDL(-), foram descongelados e cultivados separadamente em garrafas na presença de meio RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de sulfato de streptomicina, 100 U/mL de penicilina G sódica e 0,25 µg/mL de anfotericina B. As garrafas ficaram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, a 37°C.

3.3.2 Congelamento dos hibridomas

Visando manter o estoque de hibridomas, foram congeladas mais alíquotas dos mesmos. Uma alíquota do meio contendo as células foi utilizada para contagem em câmara de Neubauer e o restante foi centrifugado a 1.500 RPM por 5 minutos. Após a centrifugação, o sedimento celular obtido foi ressuspensionado em meio de congelamento (meio de cultura contendo 10% de dimetilsulfóxido, DMSO), obtendo-

se suspensões de 2×10^6 células/mL. As suspensões obtidas foram transferidas para criotubos estéreis (1mL/criotubo), os quais foram armazenados em nitrogênio líquido.

3.3.3 Produção de líquido ascítico

Foram injetados intraperitonealmente 0,5 mL de óleo mineral (Nujol[®], Schering-Plough) em camundongos isogênicos Balb/c, machos, de 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da USP, e lá mantidos em ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados, e com água e ração em livre demanda, durante todo o período de experimentação. Após 48 horas da injeção do óleo mineral, os camundongos receberam pela mesma via, uma injeção de 0,5 mL do meio de cultura contendo 2×10^6 células do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal. Para cada clone foram empregados 10 animais. Decorridos 7 dias da injeção dos hibridomas, os animais apresentaram desenvolvimento de tumor ascítico, dos quais foram coletados cerca de 2 mL de líquido ascítico por punção peritoneal. Os líquidos ascíticos coletados foram centrifugados a 3.500 RPM, durante 10 minutos, a 4°C, separando-se dessa forma os *debris* celulares e o óleo mineral. Ao líquido ascítico límpido e livre de células foi adicionado PMSF na concentração final de 1mM e armazenado a -20°C até o momento do uso. Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAF/FCF) da USP, protocolo nº119.

3.3.4 Purificação dos MAbs

O líquido ascítico foi diluído 1:10 em tampão PBS, pH 7,0 e filtrado em 0,45 µm. Os anticorpos monoclonais anti-LDL(-) foram purificados aplicando-se o líquido ascítico lentamente, em coluna de cromatografia por afinidade (Sepharose Proteína G - Amersham/GE[®]) por 2 horas. Em seguida, 10 ml de tampão PBS, pH 7,0 foi aplicado na coluna para remoção de proteínas irrelevantes. Os anticorpos foram eluídos da coluna com tampão ácido cítrico 0,1 M pH 3,0 e os eluatos imediatamente neutralizados com tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0. O eluato foi dialisado contra PBS,

pH 7,4, *overnight*, a 4°C. A concentração dos anticorpos foi determinada pelo método de absorção no ultravioleta a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman DU640, usando o coeficiente de extinção molar da IgG ($1,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.3.5 Biotinilação do MAb 2C7D5F10

Uma alíquota contendo 10 mg de MAbs 2C7D5F10 foi dialisada contra tampão borato de sódio 0,1 M, pH 8,8, durante 12 horas. A seguir, foi adicionado 1 mg de biotina (éster de D-biotinoil- ϵ -ácido aminocaproic-N-hidroxisuccinimida, Roche®) dissolvida em 100 μL de DMSO ao anticorpo, na proporção de 250 μg de biotina por 1 mg de anticorpo. Essa solução ficou em banho-maria 37°C por 4 horas, sob agitação. Depois foi adicionado 1 M de NH_4Cl por 10 minutos. O anticorpo foi dialisado contra PBS, pH 7,4, *overnight* a 4°C, e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.3.6 Fragmentação do MAb 2C7D5F10

Para fragmentação, 10 mg dos anticorpos monoclonais 2C7D5F10 foram incubados com 1 mg de papaína (solubilizada em 100 mM de acetato de sódio pH 5,5), 10 mM de cisteína hidrocloreada e 3 mM de EDTA à 37°C, sob leve agitação, por 4 horas (Almeida *et al.*, 1998). O produto foi passado lentamente em uma coluna de Sepharose Proteína G (Amersham/GE®) por 30 minutos. Os anticorpos não digeridos e a porção Fc ficaram retidos na coluna separando-se, assim, da porção Fab, que foi recolhida após passar livremente pela coluna. Em seguida, os anticorpos não digeridos e a porção Fc foram eluídos com tampão ácido cítrico 0,1 M pH 3,0 e os eluatos imediatamente neutralizados com tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0. Ambas frações do anticorpo foram dialisadas *overnight* contra PBS pH 7,4, a 4°C (Parham, 1978). A digestão de anticorpos do iso tipo IgG com papaína gera dois fragmentos Fab e um Fc, conforme demonstra a Figura 8.

Para confirmar a fragmentação e purificação dos anticorpos foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em cuba vertical (Bio-Rad®) ligada a uma fonte de eletroforese (Pharmacia Biotech, modelo EPS 600) programada para 100 volts (Laemmli, 1970). No gel, com

0,75 mm de espessura e contendo 12% de acrilamida, foram aplicados o anticorpo inteiro, a fração Fab e a fração Fc, na concentração final de 1,5 µg por poço, na presença de β-mercaptoetanol. Após a corrida, o gel foi corado com nitrato de prata (Chevallet *et al.*, 2006). No gel foi utilizado o marcador de peso molecular BenchMark, Invitrogen®, nº cat. 10748-010.

Figura 8. Anticorpo digerido com papaína. O sítio de clivagem do anticorpo pela papaína localiza-se na região da dobradiça antes das pontes dissulfeto intercadeias. A digestão resulta na geração de dois fragmentos Fab idênticos e um fragmento Fc (Adaptado de Vaz *et al.*, 2007).

3.3.7 Reatividade dos MABs

Foi avaliada a reatividade dos MABs 1A3H2 e 2C7D5F10 às frações nativa e eletronegativa da LDL, assim como às LDLs modificadas *in vitro* por cobre e MDA. Foi avaliada também a reatividade do MAb comercial anti-LDL-MDA (nº de catálogo 17591, Abcam) com a LDL(-) e LDLn.

LDLn (2 µg/mL) foi incubada com 5 µM de CuSO₄ ou 0,25 M de MDA durante 5, 30, 60 e 180 minutos. A oxidação foi interrompida pela adição de 1 mM de EDTA e 10 mM de BHT. Uma placa de poliestireno, fundo plano (high binding, Corning/Costar®, nº cat. 3590), foi sensibilizada com 1 µg/mL de LDL(-), LDL(n), LDL-CuSO₄ ou LDL-MDA (50 µL/poço) diluídas em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubada *overnight* a 4°C para adsorção na superfície da placa. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes com tampão PBS-Tween 0,05% pH

7,4, 200 µL/poço. Em seguida, para bloquear os sítios remanescentes da placa, foram adicionados 150 µL/poço de leite desnatado a 2% (Molico, Nestlé®) em tampão PBS-Tween 0,01%, permanecendo por 1h30min em estufa 37°C. Após esse período, a placa foi lavada como descrito anteriormente. Foram acrescentados 10 µg/mL dos anticorpos 1A3H2, 2C7D5F10 ou anti-LDL-MDA e incubou-se a placa por 1h30min em estufa 37°C. A placa foi lavada e, então, colocados 50 µL/poço de anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (nº de catálogo 61-6020, Invitrogen-Zimed®), diluído 1:1000 em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%, sendo incubadas por 1h em estufa 37°C. Após esta etapa, a placa foi lavada e incubada com 50 µL/poço de TMB (Sigma-Aldrich®) durante 15 minutos em estufa 37°C. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de H₂SO₄ 0,5 M e a placa lida a 450 nm (SLT Spectra).

A reatividade dos MAb's com os antígenos foi considerada positiva quando a absorbância foi superior a duas vezes a absorbância do branco. O branco da reação constituiu-se de todas as etapas do ensaio com exceção da amostra, em seu lugar foi adicionada solução diluente da amostra (PBS-Tween 0,01% leite desnatado 1%).

3.3.8 Constante de afinidade dos MAb's

Afinidade é a medida da força de ligação entre um sítio de combinação do anticorpo e um determinante antigênico. A constante de afinidade dos MAb's 1A3H2 e 2C7D5F10 foi determinada por ELISA, realizando diluições seriadas dos MAb's e da LDL(-), conforme descrito por Beatty *et al.* (1987).

Placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (high binding, Corning/Costar®, nº cat. 3590) foram sensibilizadas com três concentrações diferentes de LDL(-), sendo uma concentração metade da outra (2, 1 e 0,5 µg/mL), em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween 0,05% pH 7,4, 200 µL/poço. Em seguida, para bloquear os sítios remanescentes das placas, foram adicionados 150 µL/poço de leite desnatado a 2% (Molico, Nestlé®) em tampão PBS-Tween 0,01%, permanecendo por 1h30min em estufa 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas como descrito anteriormente. Foram adicionados

50 µL/poço dos MAbs 1A3H2 ou 2C7D5F10 diluídos seriadamente (1000 a 0,1 ng/mL) nas placas e estas foram incubadas por 1h30min em estufa 37°C. As placas foram lavadas e então colocados 50 µL/poço de anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Invitrogen-Zimed[®]), diluído 1:1000 em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%, sendo incubadas por 1h em estufa 37°C. Após esta etapa, as placas foram lavadas e incubadas com 50 µL/poço de TMB (Sigma-Aldrich[®]) durante 15 minutos em estufa 37°C. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de H₂SO₄ 0,5 M e a densidade óptica foi lida a 450 nm (SLT Spectra).

Para cada placa foi construída uma curva sigmoideal da densidade óptica (DO) versus o logarítmo da concentração dos MAbs adicionados em cada poço. Considerando o platô superior da curva como 100% (DO-100), a concentração de MAb resultante em 50% de densidade óptica (DO-50), em uma determinada concentração de antígeno adsorvido, foi utilizada para calcular a constante de afinidade usando a Equação 1, que é baseada na Lei de Ação das Massas. A DO-100 denota a ocupância máxima dos epitopos disponíveis nas moléculas de antígeno. As placas foram sensibilizadas com diferentes concentrações de antígeno, sendo uma (Ag') metade da outra (Ag); Ab e Ab' são as concentrações de anticorpo nos poços na DO-50 e DO-50' para placas sensibilizadas com Ag e Ag', respectivamente.

Equação 1. Cálculo da constante de afinidade.

$$\text{Constante de afinidade} = (n-1) / 2(n[Ab']_{\text{total}} - [Ab]_{\text{total}})$$

$$\text{onde } n = [Ag]_{\text{total}} / [Ag']_{\text{total}}$$

Fonte: Beatty *et al.*, 1987

3.4 Desenvolvimento e padronização dos imunoenaios

3.4.1 Imunoensaio para determinação de LDL(-)

Na padronização do ELISA para LDL(-) (Figura 9), placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (high binding, Corning/Costar®, nº cat. 3590), foram sensibilizadas com 50 µL/poço de MAb 1A3H2 nas concentrações 5, 10 ou 15 µg/mL diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4°C para adsorção do anticorpo na superfície da placa. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween 0,05% pH 7,4, 200 µL/poço. Em seguida, para avaliar o bloqueio, foram adicionados 150 µL/poço de caseína 1 ou 2 % (Sigma-Aldrich®), albumina 1 ou 2% (Sigma-Aldrich®) ou leite desnatado 2 ou 5% (Molico, Nestlé®) em tampão PBS-Tween 0,01%, permanecendo por 1h30min em estufa 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas como descrito anteriormente. Foram acrescentados 50 µL/poço de LDL(-) purificada como padrão do imunoensaio em diferentes concentrações e 50 µL/poço de amostras de plasma em diferentes diluições em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%. As placas ficaram incubadas por 1h30min em estufa 37°C. Como controle negativo foi utilizada a LDL(n). As placas foram lavadas e então colocados 50 µL/poço de MAb 2C7D5F10 biotilado nas concentrações 5, 10 ou 15 µg/mL diluído em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%, sendo incubadas por 1h em estufa 37°C. As placas foram lavadas e foram adicionados 50 µL/poço de Streptavidina conjugada à peroxidase (Biosource, Invitrogen®) diluída 1:200.000, 1:100.000, 1:80.000 ou 1:50.000 em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01% e incubadas por 1h em estufa 37°C. Após esta etapa, as placas foram lavadas 4 vezes, sendo que na última lavagem as placas ficaram 30 segundos de molho. A revelação do ensaio foi testada com 50 µL/poço de OPD (Sigma-Aldrich®) diluído em tampão citrato-fosfato, pH 5,3 na concentração final de 1 mg/mL, com 1 µL de H₂O₂ por mL de tampão ou 50 µL/poço de TMB (Sigma-Aldrich®). Após o desenvolvimento da cor por 15 minutos em estufa 37°C, a reação com OPD foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2 M e leitura efetuada em leitora de placas (SpetraCount™, Packard) a 492 nm; a reação com TMB foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 0,5 M e lida a 450 nm.

Figura 9. Representação esquemática do ELISA para LDL(-). Placas foram sensibilizadas com MAb 1A3H2 (1), o qual capturou a LDL(-) da amostra (2). O MAb 2C7D5F10 conjugado a biotina (3) se ligou à LDL(-) capturada nos poços. Então, foi adicionada a streptavidina conjugada à peroxidase (4), que se ligou à biotina. TMB e OPD foram testados como cromógenos.

3.4.2 Imunoensaio para determinação de anticorpos anti-LDL(-)

Na padronização do imunoensaio para anticorpos anti-LDL(-) (Figura 10) placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (high binding, Corning/Costar®, nº cat. 3590) foram sensibilizadas com 1 µg/mL ou 5 µg/mL de LDL(-) (50 µL/poço) diluída em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4°C para adsorção da mesma na superfície da placa. Como controle negativo, foi utilizada a LDL(n) na sensibilização das placas. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween 0,05% pH 7,4, 200 µL/poço. Em seguida, para bloquear os sítios remanescentes da placa, foram adicionados 150 µL/poço de leite desnatado a 2% (Molico, Nestlé®) em tampão PBS-Tween 0,01%, permanecendo por 1h30min em estufa 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas como descrito anteriormente. Foram acrescentados 50 µL/poço MAb 2C7D5F10 em diferentes concentrações como padrão dos imunoensaios e 50 µL/poço de amostras de plasma em diferentes diluições em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01% e incubou-se a placa por 1h30min em estufa 37°C. As placas foram lavadas e então, colocados 50 µL/poço de anti-IgG humana conjugado a peroxidase (Bio-Rad®), diluído 1:5000, 1:2500 ou 1:1250 em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01% nos poços das amostras de plasma, e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Invitrogen-Zimed®) diluído 1:4000, 1:2000, 1:1000 ou 1:500 em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%

nos poços da curva padrão, sendo incubadas por 1h em estufa 37°C. Após esta etapa, as placas foram lavadas 4 vezes e na última lavagem as placas ficaram 30 segundos de molho. A revelação das placas foi realizada com 50 µL/poço de TMB (Sigma-Aldrich®). Após 15 minutos em estufa 37°C, a reação foi parada com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 0,5 M e a absorbância das placas foram medidas a 450 nm em uma leitora de espectrofotometria (SLT Spectra).

Figura 10. Representação esquemática do ELISA para anti-LDL(-). Placas foram sensibilizadas com LDL(-) (1), a qual capturou anti-LDL(-) da amostra (2). Então, foi adicionado anticorpo anti-IgG humana conjugado a peroxidase (3). TMB foi usado como cromógeno.

3.4.3 Imunoensaio para determinação de imunocomplexos de LDL(-)

Na padronização do imunoensaio para IC-LDL(-) (Figura 11), placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (high binding, Corning/Costar®, nº cat. 3590), foram sensibilizadas com 2,5, 5 e 10 µg/mL/poço da porção Fab do MAb 2C7D5F10 diluídas em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e foram incubadas *overnight* a 4°C para adsorção do mesmo na superfície da placa. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS-Tween 0,05% pH 7,4, 200 µL/poço, com 30 segundos de molho na última lavagem. Em seguida, para bloquear os sítios remanescentes da placa foram adicionados 150 µL/poço de caseína 2,5% (Sigma-Aldrich®), albumina bovina 3% (Sigma-Aldrich®) ou leite desnatado 2% ou 5% (Molico, Nestlé®) em tampão PBS-Tween 0,01%, permanecendo por 1h30min em estufa 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas como descrito anteriormente. Foram acrescentados 50 µL/poço do *pool* de plasma com concentração conhecida de IgG ou 50 µL/poço das amostras de plasma em

diferentes diluições em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01% e incubou-se a placa por 1h30min em estufa 37°C. As placas foram lavadas e então colocados 50 µL/poço de anticorpos anti-IgG humana (H+L) ou anticorpos anti-IgG humana Fc específico nas diluições 1:2000, 1:4000 e 1:8000 conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich®) em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%, sendo incubadas por 1h em estufa 37°C. Após esta etapa, as placas foram lavadas e a revelação dos ensaios foi feita com 50 µL/poço de TMB. Após 15 minutos em estufa 37°C, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 0,5 M e as placas foram lidas a 450 nm em uma leitora de espectrofotometria (SLT Spectra).

Figura 11. Representação esquemática do ELISA para IC-LDL(-). Placas foram sensibilizadas com o Fab do MAb 2C7D5F10 (1), o qual capturou IC-LDL(-) da amostra (2). Então, foram testados os anticorpo anti-IgG e anti-Fc de IgG humana conjugados à peroxidase (3). TMB foi usado como cromógeno.

3.5 Validação dos imunoensaios

As características de desempenho dos ensaios investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho do método, foram: limites de detecção e quantificação (faixa de quantificação), precisão intra e inter-ensaios e exatidão (recuperação). Também foi investigada a linearidade da diluição, interferentes, estabilidade da amostra e robustez. Os ensaios foram validados de acordo com critérios de guias para validação de métodos analíticos incluindo EURACHEM (1998), IUPAC (Thompson *et al.*, 2002) e INMETRO (2003).

3.5.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos imunoensaios foram estabelecidos testando diluições seriadas dos padrões em triplicata. O padrão de LDL(-) foi diluído de 160 até 0,078 mg/L. O padrão do ELISA para anticorpos anti-LDL(-), MAb 2C7D5F10, foi diluído de 1 a 0,0002 mg/L. O padrão do ensaio para IC-LDL(-) foi diluído de 8 a 0,002 g/L de IgG. A quantidade de antígeno ligado ao anticorpo sensibilizado na placa (ou a quantidade de anticorpo ligado ao antígeno sensibilizado na placa) é representada por uma curva sigmoidal da absorbância versus o logaritmo da concentração do antígeno (ou anticorpo) adicionado em cada poço da placa. O LD considerado foi a média de 10 brancos ($\overline{10B}$) do ensaio mais 3 vezes o desvio padrão dos brancos (DPB) e o LQ inferior considerado foi a média de 10 brancos do ensaio mais 10 vezes o desvio padrão dos brancos, como demonstrado na Equações 2 e 3, respectivamente. Na curva sigmoidal de cada imunoensaio foi encontrada a faixa linear de resposta, que é a faixa entre o LQ inferior e o último ponto da curva analítica, cumprindo o requisito que o coeficiente de correlação (r) da reta fosse igual ou maior que 0,99. O valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação da reta dos três imunoensaios foi 0,99, uma vez que quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. O limite superior de quantificação (LSQ) é o mesmo valor do último ponto da curva analítica.

Equação 2. Cálculo do limite de detecção.

$$LD = \overline{10B} + 3 \times DPB$$

Fonte: INMETRO, 2003

Equação 3. Cálculo do limite de quantificação.

$$LQ = \overline{10B} + 10 \times DPB$$

Fonte: INMETRO, 2003

3.5.2 Precisão intra e inter-ensaios

Para avaliar a precisão intra-ensaio 3 amostras (uma próxima do limite inferior de quantificação, uma do centro e outra próxima do limite superior de quantificação da curva) foram testadas em 10 replicatas na mesma placa. Para avaliar a precisão inter-ensaios as mesmas amostras foram testadas em 4 replicatas em 5 placas em 5 dias diferentes (Thompson *et al.*, 2002; Welfringer *et al.*, 2005). A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%), de acordo com a Equação 4, onde S é o desvio padrão, y_i é a concentração da amostra e $\bar{y}$ é a concentração média das amostras de plasma. O imunoensaio é considerado preciso quando apresenta um coeficiente de variação de até 15%, exceto no limite inferior de quantificação, onde não deve exceder 20% do CV (Shah *et al.*, 2000).

Equação 4. Cálculo do coeficiente de variação.

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{y}} \times 100 \quad \text{onde } S = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Fonte: Koch *et al.*, 2001

3.5.3 Exatidão (recuperação)

Na ausência de materiais ou métodos de referência, a exatidão pode ser investigada pela recuperação. A recuperação consiste na comparação entre os resultados obtidos antes e depois da adição de uma alíquota do padrão na amostra a ser quantificada, não podendo esta alíquota exceder 10% do volume final (Cembrowski *et al.*, 2000). O teste de recuperação do ensaio para determinação de LDL(-) foi realizado adicionando padrão de LDL(-) em uma amostra de plasma e em LDL(n). O teste de recuperação do ensaio para determinação de anti-LDL(-) foi realizado adicionando plasma com alta concentração de anticorpos anti-LDL(-) em um plasma com baixa concentração dos mesmos. O teste de recuperação para o ensaio de IC-LDL(-) foi realizado adicionando plasma com alta concentração de IC-LDL(-) em um plasma com baixa concentração dos mesmos. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação, segundo a Equação 5. Foram

considerados valores aceitáveis níveis de recuperação de 100% +/- 20% (Findlay *et al.*, 2000).

Equação 5. Cálculo da recuperação.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left[\frac{(\text{concentração pós-adição} - \text{concentração pré-adição})}{\text{concentração adicionada}} \right] \times 100$$

Fonte: Eurachem, 1998

3.5.4 Linearidade da diluição

O efeito da diluição nas concentrações de LDL(-), anti-LDL(-) e IC-LDL(-) quantificadas pelos imunoensaios, foi analisado utilizando-se duas amostras de plasma com 4 diluições seriadas. As amostras a serem analisadas em múltiplas diluições têm uma concentração nominal. As amostras de plasma para LDL(-) foram diluídas 1:1000 e 1:2000, 1:4000, 1:8000; as amostras para anti-LDL(-) foram diluídas 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800; as amostras para IC-LDL(-) foram diluídas 1:12,5, 1:25, 1:50 e 1:100. A linearidade de diluição foi definida em termos de concordância entre os resultados observados e o valor teórico aceito como verdadeiro, tendo como critério de aceitabilidade um erro relativo menor que 20% (Equação 6).

Equação 6. Cálculo do erro relativo.

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100$$

NOTA: X_{lab} = média dos valores obtidos experimentalmente; X_v = valor aceito como verdadeiro

Fonte: Findlay *et al.*, 2000

3.5.5 Estabilidade do analito

Alíquotas de plasma e do padrão de LDL(-), contendo a mistura de inibidores de protease e antioxidante, foram estocadas a 4°C, -20°C e -80°C. Cada alíquota foi testada nos imunoensaios a cada 15 dias durante seis meses. A influência do congelamento/descongelamento nas amostras de plasma e no padrão de LDL(-) estocados a -20°C e -80°C foi avaliada com 3 ciclos de congelamento/descongelamento. Foi considerado 1 ciclo de congelamento/descongelamento a amostra mantida congelada por pelo menos 24 horas e mantida descongelada por 15 minutos a temperatura ambiente. O critério para estabilidade foi definido em termos de concordância entre os resultados observados e o valor alvo nominal, conforme Equação 6, sendo considerada estável a amostra com um erro relativo inferior a 20% (%ER <20) (Maple *et al.*, 2004).

3.5.6 Estudo de interferentes

As concentrações de LDL(-), anti-LDL(-) e IC-LDL(-) foram determinadas antes e após a adição de agentes potencialmente interferentes como lipídios, bilirrubina e hemoglobina em várias concentrações (Kohn *et al.*, 2000). As amostras de plasma foram suplementadas com 600, 800 e 1000 mg/dL de triglicérides (Lipovenos MCT, Fresenius-Kabi[®]), com 100, 250 e 500 mg/dL de hemoglobina (nº cat. 47, Padrão de hemoglobina, Labtest[®]) e com 5, 10, 15 e 20 mg/dL de bilirrubina (nº cat. 10158046, Padrão de bilirrubina, Precibil, Roche[®]).

3.5.7 Robustez

O estudo da robustez foi realizado durante o desenvolvimento dos imunoensaios, observando se as variações no tempo e temperatura de incubação das placas tinham efeito na qualidade do ensaio. Quando foram constatadas susceptibilidades dos imunoensaios à variações, as precauções foram incluídas no item resultados.

3.5.8 Análise estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas nos programas SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Inc., EUA) versão 13,0 e Excel 2007 (Microsoft Office, EUA). Os gráficos apresentam a média das triplicatas $\pm$ desvio-padrão.

PARTE II

3.6 Clonagem molecular

3.6.1 Vetores

A sequência de DNA que codifica a GFP5 (GenBank: AAB47998.1), obtida por Siemering *et al.* (1996) está localizada entre os sítios de restrição *EcoRI* e *SacI* do vetor bacteriano pET-28a(+) (Novagen®), sendo então, denominado pET-GFP5, o qual foi construído por Hering *et al.* (2009). Esse vetor possui gene de resistência ao antibiótico kanamicina.

A sequência de DNA que codifica o scFv anti-LDL(-) foi obtida anteriormente por Telles (2008) a partir do hibridoma secretor do MAb 2C7D5F10. Essa sequência de DNA está localizada entre os sítios de restrição *XmaI* e *NcoI* do vetor de levedura pPIgLE Z22 (<http://www.unb.br/ib/cel/imol/vetor/pPIgLE.htm>), sendo então, denominado pPIgLE anti-LDL(-). Nesse vetor, após a sequência do scFv anti-LDL(-), está localizada a sequência da proteína A, entre os sítios de restrição *NcoI* e *EcoRI*. O vetor pPIgLE possui gene de resistência ao antibiótico carbenicilina. A Figura 12 mostra o mapa dos sítios de restrição dos dois vetores.

Figura 12. Vetores utilizados na clonagem molecular. Em A, o vetor bacteriano pET-GFP5 e em B, o vetor de levedura pPIgLE anti-LDL(-).

3.6.2 Preparo de células competentes

Uma colônia de *E. coli* da linhagem DH5 α (Invitrogen[®]), fornecida pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP, foi inoculada em 3 mL de meio LB (Luria-Bertani) e incubada *overnight* a 37°C, a 200 RPM. Posteriormente, 1 mL dessa cultura foi inoculada em 35 mL de meio LB e incubada a 37°C, a 200 RPM. Quando a cultura atingiu densidade óptica a 600 nm de 0,4 a 0,6, ela foi incubada no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugada a 2000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em 10 mL de TFB (*Transformation buffer*) e incubadas em gelo por 30 minutos. As células foram novamente centrifugadas a 2000 RPM por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 2,4 mL de TFB gelado, sendo a partir daí consideradas competentes. As células competentes foram aliqüotadas em microtubos estéreis e armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso (Ausubel *et al.*, 2003).

3.6.3 Transformação bacteriana por choque térmico

Em microtubos contendo 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α foram adicionados 0,5 μ g do DNA plasmidial (pET-GFP5 ou pPIgLE anti-LDL-). Esses microtubos foram incubados em gelo por 30 minutos, em seguida foram incubados a 42°C por 2 minutos, e posteriormente, por 5 minutos no gelo. As células transformadas dos microtubos foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL contendo 1000 μ L de meio LB, os quais permaneceram por 1 hora a 37°C, a 200 RPM. Em seguida, foram semeados 100 μ L das células transformadas com pET-GFP5 em placas contendo LB ágar com 100 μ g/mL de kanamicina e 100 μ L das células transformadas com pPIgLE anti-LDL(-) em placas contendo LB ágar com 100 μ g/mL de carbenicilina. Essas placas foram incubadas por 16 horas em estufa 37°C (Maranhão *et al.*, 2003).

3.6.4 Purificação dos plasmídios

Uma colônia isolada de células transformadas com o vetor pET-GFP5 da placa foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo kanamicina (100 μ g/mL) e uma

colônia isolada de células transformadas com o vetor pPIgLE anti-LDL(-) da placa foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo carbenicilina (100 µg/mL). Esses inóculos foram incubados por 16 horas a 37°C, a 200 RPM. No dia seguinte, os meios de cultura contendo as células foram centrifugados a 4500 RPM por 20 minutos a 4°C. A partir do sedimento bacteriano foi realizada a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep, conforme instruções do fabricante (QUIAGEN®, nº cat. 27104).

3.6.5 Digestão dos plasmídios com enzima de restrição

Foram incubados 2 µg do vetor pPIgLE anti-LDL(-) e 0,5 µg do vetor pET-GFP5 separadamente com 1 µL da enzima de restrição *SacI* (New England BioLabs®, nº cat. R0156L) para cada 0,5 µg de vetor, durante 2 horas em banho-maria 37°C. Em seguida, a reação foi incubada a 65°C por 30 minutos para inativação da enzima *SacI*.

O vetor pET-GFP5 possui apenas um sítio de clivagem com *SacI*, que está localizado imediatamente após a sequência da GFP5, portanto, após a digestão o vetor linearizou. No vetor pPIgLE anti-LDL(-) há dois sítios de clivagem com *SacI*. Um deles está localizado imediata e anteriormente ao sítio de restrição *XmaI*, onde se inicia a sequência do scFv anti-LDL(-). O outro sítio de *SacI* está localizado imediata e anteriormente ao sítio de restrição *EcoRI*, que finaliza a sequência da proteína A. Portanto, após a digestão com *SacI*, houve a liberação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1000 pb que contém a sequência de genes referente ao scFv anti-LDL(-) e proteína A.

3.6.6 Desfosforilação do vetor pET-GFP5

Para impedir a recircularização do vetor pET-GFP5, foi removido o fosfato da extremidade 5' do vetor pela enzima fosfatase alcalina (SAP, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Em 0,5 µg de vetor pET-GFP5 previamente linearizado com a enzima *SacI*, foram adicionados 5 µL da enzima SAP, 5 µL do tampão 10x da enzima e água autoclavada suficiente para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada em banho-maria 37°C por 2 horas. Em seguida, a reação foi incubada a

65°C por 30 minutos para inativação da enzima SAP. O vetor pET-GFP5 linearizado e desfosforilado foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.6.7 Purificação dos fragmentos de scFv anti-LDL(-)

A recuperação dos fragmentos de DNA referentes ao scFv anti-LDL(-) foi realizada de acordo com o método *freeze-squeeze* (Tautz *et al.*, 1983). O produto da digestão do vetor pPigLE anti-LDL(-) com *SacI* foi aplicado em gel de agarose a 0,8% e após a migração eletroforética, as bandas de interesse correspondentes ao scFv anti-LDL(-) foram cortadas com o auxílio de um bisturi. As fatias de agarose contendo as bandas foram aplicadas em colunas para extração de DNA (Millipore, nº cat. 42600). As colunas foram centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos e posteriormente lavadas 2 vezes com tampão tris-HCl 10 mM pH 8,5 a 5000 RPM por 1 minuto. Ao eluído das colunas foram adicionados 2 volumes da eluição de etanol absoluto gelado, 3 µL de glicogênio (20 mg/mL) e 0,5 volume da eluição de acetato de sódio 3 M pH 5,2. Essa solução ficou armazenada a -20°C por 72 horas para precipitação do DNA e posteriormente foi centrifugada a 10.000 RPM por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado 2 vezes com 8 mL de etanol 70% gelado a 10.000 RPM por 20 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 20 µL de água MilliQ autoclavada. A purificação foi confirmada por eletroforese de gel de agarose, aplicando-se 1 µL da amostra purificada. Em todos os géis de agarose foram utilizando os marcadores de peso molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen®, nº cat. 10787-018) e High DNA Mass Ladder (Invitrogen®, nº cat. 10496-016).

3.6.8 Ligação dos fragmentos de DNA

Em um microtubo foram adicionados o vetor pET-GFP5 linearizado e desfosforilado e o inserto scFv anti-LDL(-) purificado na razão molar de 1:6 de acordo com a Equação 7, juntamente com 2 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®, nº cat. 15224-041) e 4 µL do tampão 5x da enzima. Essa solução ficou incubada por 2 horas a 25°C. A enzima T4 DNA ligase, para ligar os fragmentos de DNA previamente clivados pelas endonucleases de restrição, requer um grupo OH

livre na extremidade 3' de uma das cadeias de DNA e um grupo fosfato na extremidade 5' da outra cadeia.

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com 5 μ L do produto da ligação diluído 1:2, conforme procedimento descrito no item 3.6.3. Colônias isoladas da placa de células transformadas com o produto da ligação foram inoculadas cada uma em 10 mL de meio LB contendo 100 μ g/mL de kanamicina. Esses inóculos foram incubados por 16 horas a 37°C, a 200 RPM. No dia seguinte, os meios de cultura contendo as células foram centrifugados a 4500 RPM por 20 minutos a 4°C e a partir do sedimento bacteriano foi realizada a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep, conforme instruções do fabricante (QUIAGEN®, nº cat. 27104).

Equação 7. Cálculo para ligação de fragmentos de DNA.

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} \times \text{razão molar } \frac{\text{vetor}}{\text{inserto}} = \text{ng de inserto}$$

3.6.9 Triagem dos clones recombinantes

Os plasmídios obtidos das purificações foram digeridos com a enzima *SacI*, conforme descrito no item 3.6.5. Os plasmídios digeridos foram aplicados em gel de agarose 0,8% e aqueles que confirmaram a presença do inserto scFv anti-LDL(-) no vetor foram digeridos com a enzima *XhoI*, para verificação do sentido de ligação do inserto. O tamanho dos fragmentos clivados com *XhoI* também foi observado em eletroforese de gel de agarose 0,8%.

3.6.10 Remoção da sequência gênica da proteína A

A proteína A, uma proteína da parede celular de *Staphylococcus aureus*, fusionada ao scFv era utilizada para purificação do mesmo em resina carregada com IgG (Langone *et al.*, 1978). Com a fusão do scFv à GFP5, a proteína A tornou-se desnecessária, pois a GFP5 contém uma cauda de hexa-histidina na porção N-

terminal que pode ser usada na purificação. A remoção da sequência da proteína A foi realizada pela digestão do vetor, agora denominado pET-GFP5-scFv, com a enzima de restrição *Xho*I. Há dois sítios de restrição *Xho*I no vetor. Um deles está localizado no sítio múltiplo de clonagem do vetor, como foi demonstrado anteriormente na Figura 12. O outro sítio de restrição de *Xho*I está localizado no final da sequência do scFv anti-LDL(-).

Foi incubado 1 µg do vetor pET-GFP5-scFv com 1 µL da enzima de restrição *Xho*I (New England BioLabs®, nº cat. R0146L) para cada 0,5 µg de vetor, durante 2 horas em banho-maria 37°C. Em seguida, a reação foi incubada a 65°C por 30 minutos para inativação enzimática. Após a digestão houve a liberação de um fragmento de DNA de 256 pb que codifica a proteína A. Logo após, foi realizada a ligação das extremidades coesivas do vetor pET-GFP5-scFv com 2 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®, nº cat. 15224-041) e 4 µL do tampão 5x da enzima. Essa solução ficou incubada por 2 horas a 25°C. Posteriormente, células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com 5 µL do produto da ligação diluído 1:2. Colônias isoladas da placa de células transformadas com o produto da ligação foram inoculadas cada uma em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de kanamicina. Esses inóculos foram incubados por 16 horas a 37°C, a 200 RPM. No dia seguinte, os meios de cultura contendo as células foram centrifugados a 4500 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a partir do sedimento bacteriano foi realizada a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep System, conforme instruções do fabricante (Promega®, nº cat. #A1221). O DNA purificado foi visualizado em gel de agarose 0,8%.

3.6.11 Sequenciamento do DNA

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

Base Caller Cimarron 3.12. Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de sequenciamento estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento.

Nome	Sequência	Utilização
T7 Promoter	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	Para sequenciamento da extremidade 5' do vetor pET-28a(+)
T7 Terminator	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'	Para sequenciamento da extremidade 3' do vetor pET-28a(+)
VH3 <i>Xma</i> I	5' CCA CTC CCG GGT TCA GCT GCA GCA 3'	Para sequenciamento da extremidade 5' da VH
VH4 <i>Xba</i> I	5' AAC CTC AGT CAC CGT CTC CTC TAG AA 3'	Para sequenciamento da extremidade 3' da VH
VL1 <i>Bgl</i> II	5' GTG ATA GAT CTC GTG ATG ACC CAG TC 3'	Para sequenciamento da extremidade 5' da VL
VL2 <i>Xho</i> I/ <i>Nco</i> I	5' GCT GGG ACC AAG CTC GAG ATT AAC CAT GGC AA 3'	Para sequenciamento da extremidade 3' da VL

NOTA: VH = cadeia pesada do scFv; VL = cadeia leve do scFv

3.6.12 Análise do sequenciamento

As análises das sequências nucleotídicas foram realizadas pelo programa “Electropherogram quality analysis”, disponível no site do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (www.biomol.unb.br/phph/). Análises adicionais foram realizadas utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 e o T-Coffee versão 5.05.

3.7 Expressão da proteína recombinante

3.7.1 Predição da estrutura proteica

A predição da estrutura da proteína (Kelley *et al.*, 2009) foi realizada utilizando o programa Geno3D, disponível no site <http://geno3d-pbil.ibcp.fr>. Os modelos usados foram obtidos do RCSB Protein Data Bank

(<http://www.rcsb.org/pdb>) e escolhidos por homologia após alinhamento dos aminoácidos pelo programa Phyre (Protein Homology/analogY Recognition Engine - <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>). O melhor modelo para o scFv disponível no Protein Data Banking foi o 2gki (Kim *et al.*, 2006) com 69% de homologia e para a GFP5 foi o 1ema (Ormö *et al.*, 1996) com 97% de homologia. A estrutura da proteína foi visualizada pelo software RasMol versão 2.7.4.2.

3.7.2 Expressão da GFP5-scFv

Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen®) foram transformadas com 0,5 µg do DNA plasmidial pET-GFP5-scFv. Colônias isoladas da placa de células transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB acrescido de 100 µg/mL de kanamicina. Esses pré-inóculos foram incubados por 16 horas a 37°C, a 200 RPM. No dia seguinte, 5 mL dos pré-inóculos foram transferidos para 500 mL de meio LB acrescido de kanamicina (100 µg/mL) e submetido a 200 RPM de agitação a 20°C ou 25°C. Quando a cultura atingiu densidade óptica entre 0,4 e 0,6 a 600 nm foram adicionados 0,25, 0,5 ou 1 mM de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosídeo, Fermentas®) aos inóculos e estes permaneceram incubados por 18 horas. Após a expressão, o meio de cultura foi centrifugado a 4500 RPM por 20 minutos, sendo o sobrenadante descartado.

3.7.3 Lise bacteriana

O sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 5 mL de tampão (NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 200 mM; PMSF 1 mM, EDTA 5 mM; lisozima 150 µg/mL; pH 7,4) e ficou em repouso no gelo por 30 minutos para ação da lisozima. O sedimento bacteriano foi lisado em um sonicador Branson Sonifier 250, no gelo, com 2 pulsos de 15 segundos em 30% da potência, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso. Em seguida foi centrifugado a 4500 RPM por 15 minutos, separando-se o sedimento e o sobrenadante para posterior análise em SDS-PAGE.

3.7.4 Solubilização dos corpos de inclusão

O sedimento sonificado (corpos de inclusão) foi ressuspensionado em 10 mL de tampão (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 200 mM; imidazol 30 mM) e centrifugado a 4500 RPM por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido 2 vezes para lavar o sedimento. Então, o sedimento foi ressuspensionado em 20 mL do tampão acima com uréia (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 3 a 8 M e 20 mM de β -mercaptoetanol para desnaturação da proteína. Essas soluções ficaram a temperatura ambiente, *overnight*, protegidas da luz.

3.7.5 Purificação da GFP5-scFv

A presença da cauda de histidina na proteína GFP5-scFv anti-LDL(-) permitiu a purificação por cromatografia por afinidade utilizando uma resina carregada com níquel (nº cat. 17-5268-01, Amersham/GE®). A solução contendo a proteína em uréia foi centrifugada a 4500 RPM por 10 minutos para confirmação da total solubilização. A proteína solubilizada foi incubada com a resina por 1 hora, sob agitação (*batch*). Em seguida, foi aplicado o tampão de eluição (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 200 mM; gradiente de imidazol de 100 a 500 mM; uréia de 3 a 8 M; pH 7,4) na resina e a proteína foi coletada.

3.7.6 Reenovelamento da GFP5-scFv

O reenovelamento da proteína foi testado com dois diferentes métodos: por diálise e na coluna de purificação. Ambos os métodos baseiam-se na remoção gradual do agente desnaturante, a uréia. No método por diálise, foi adicionado poliestirenosulfonato de sódio (PSS; foram testados 5 e 50 μM) na proteína recombinante previamente purificada e esta foi dialisada contra tampão isento de uréia (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 200 mM; pH 8,5) a 4°C e protegida da luz. A diálise foi realizada até que a solução da proteína atingisse concentração de uréia de 2,5 M (aproximadamente 24 horas). A diálise foi continuada com o mesmo tampão, mas acrescido de 400 mM L-arginina e 500 μM glutatona oxidada até que a solução da proteína atingisse concentração de uréia de 0,5 M (aproximadamente 24 horas). Somente então, com a proteína já reenovelada foi realizada a diálise em PBS pH 7,4

durante 2 horas a 4°C (Umetsu *et al.*, 2003; Tsumoto *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2009). No método de reenovelamento na coluna, a proteína ligada na resina de níquel, foi sendo reenovelada após aplicação de tampões com concentrações decrescentes de uréia, até a remoção completa da uréia. Em seguida, a proteína reenovelada foi eluída da coluna utilizando o tampão descrito no item 3.7.5, porém isento de uréia (Liu *et al.*, 2006).

3.8 Caracterização da GFP5-scFv

A concentração da proteína recombinante foi determinada pelo método de absorção no ultravioleta a 280 nm em um espectrofotômetro Beckman DU640 (coeficiente de extinção molar: $1,19 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A proteína recombinante reenovelada foi visualizada por SDS-PAGE e confirmada com Western blot. A reatividade da proteína com a LDL(-) foi confirmada com Dot blot e ELISA.

3.8.1 SDS-PAGE e Western Blot

Foi realizada eletroforese em cuba vertical (Bio-Rad®) ligada a uma fonte de eletroforese (Pharmacia Biotech®, modelo EPS 600) a 100 volts, com géis de 1 mm de espessura e 12% de acrilamida. Foi utilizado o marcador de peso molecular pré-corado PageRuler Plus (Fermentas®, nº cat. SM1811). Após a corrida, um dos géis foi corado com coomassie blue, outro com prata e o outro foi usado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, GE®). A cuba de transferência permaneceu em gelo e foi submetida à corrente de 100 volts por 2 horas. Para confirmar a transferência das proteínas a membrana foi corada com solução corante Ponceau S. A membrana foi lavada com água destilada até desaparecer a coloração. Em seguida, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (PBS-leite desnatado 5%) sob agitação, a 4°C, *overnight*. A solução de bloqueio foi descartada e a membrana lavada com PBS-Tween 0,05% pH 7,4, durante 15 minutos com trocas de tampão a cada 5 minutos. A membrana foi incubada com anticorpo IgG de camundongo anti-histidina (GE®) diluído 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:1000

durante 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com solução de DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma-Aldrich®). Como controle positivo do Western blot foi utilizada a GFP5 (possui cauda de histidina) e como controle negativo foi utilizada albumina bovina (não possui cauda de histidina).

3.8.2 Dot Blot

Uma membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com 1 µg de LDL(-) ou LDL(n). Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5%, em tampão PBS, *overnight* a 4°C. Após esse período, a membrana foi lavada com tampão PBS-Tween 0,05% pH 7,4, durante 15 minutos com trocas de tampão a cada 5 minutos. A membrana foi incubada com 10 µg de GFP5-scFv diluída em 1% de leite desnatado em tampão PBS por 1h30min a temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada e então adicionado anticorpo IgG anti-histidina (GE®) diluído 1:1000 em 1% de leite desnatado em tampão PBS, sendo incubada por 1h30min em temperatura ambiente sob agitação, e posteriormente incubada com anti-IgG conjugada a peroxidase por 1 hora. A membrana foi revelada com solução de DAB.

3.8.3 ELISA

Placas de poliestireno de 96 poços, fundo plano (high binding, Corning/Costar®, nº cat. 3590) foram sensibilizadas com 1 µg/mL de LDL(-) ou 1 µg/mL de LDL(n) (50 µL/poço) diluídas em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween 0,05% pH 7,4, 200 µL/poço. Em seguida, a placa foi bloqueada com 150 µL/poço de leite desnatado a 2%, em tampão PBS-Tween 0,01%, permanecendo por 1h30min em estufa 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas como descrito anteriormente. Foram acrescentados 1 µg de GFP5, GFP5-scFv ou MAb 2C7D5F10, 50 µL/poço diluídos em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01% e incubou-se a placa por 1h30min em estufa 37°C. As placas foram lavadas e então colocados 50 µL/poço de anticorpo IgG anti-histidina (GE®) diluído 1:1000 em 1% de leite desnatado em tampão PBS-Tween 0,01%,

sendo incubadas por 1h em estufa 37°C, e posteriormente incubadas com anti-IgG conjugada a peroxidase. Para revelação foi utilizado TMB e as placas lidas em comprimento de onda de 450 nm (SLT Spectra).

3.8.4 Estabilidade da GFP5-scFv

Alíquotas de GFP5-scFv foram estocadas a 4°C, -20°C e -80°C durante três meses. Cada alíquota foi testada quanto a sua afinidade pela LDL(-) a cada 15 dias por dot blot, como descrito no item 3.8.2. A influência do congelamento/descongelamento nas alíquotas estocadas a -20°C e -80°C foi avaliada com 3 ciclos de congelamento/descongelamento. Foi considerado 1 ciclo de congelamento/descongelamento a amostra mantida congelada por pelo menos 24 horas e mantida descongelada por 15 minutos a temperatura ambiente.

3.9 Síntese de nanopartículas

3.9.1 Síntese de nanocristais de seleneto de zinco/sulfeto de zinco (ZnSe/ZnS)

Em 60 mL de água destilada e deionizada foram adicionados 1 mM de perclorato de zinco e 2,4 mM de ácido mercaptopropiônico. A solução teve seu pH aumentado para 10,5 pela adição de hidróxido de sódio e foi colocada sob o fluxo de nitrogênio por 30 minutos. Em paralelo, foram misturados 10 mg de selênio e 6,5 mg de borohidreto de sódio em 2 mL de água destilada e deionizada, sendo esta solução também colocada sob hidrogênio por 30 minutos. Foram adicionados 0,5 mL dessa solução na solução de perclorato de zinco. Foram colocados 30 mL dessa mistura em uma autoclave revestida com teflon, sendo esta mantida em forno a 70°C por 24 horas. Foram direcionados 3 mL da solução autoclavada para o pós-processamento realizado em cubeta de quartzo. Foi acrescentado ácido mercaptopropiônico até uma concentração final de 5 mM, sendo então a cubeta posicionada frente a luz ultravioleta dentro de uma estufa mantida a 60°C por 3 horas. Posteriormente uma quantidade de ácidos mercaptosuccinônicos foi adicionada até uma concentração final também de 5 mM, sendo a cubeta novamente posicionada frente a luz ultravioleta em estufa mantida a 60°C, desta vez por 1 hora.

A eficiência quântica dos nanocristais foi determinada a partir da comparação com a absorção e emissão do quinino, cuja eficiência quântica é conhecida (Lan *et al.*, 2007; Hering *et al.*, 2009).

3.9.2 Síntese de nanopartículas de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Em um tubo contendo 20 mL de água miliQ, foram adicionados 5 mL de lactato de cálcio 18 mM, 5 mL de fosfato de amônio 10,8 mM e 10 mL de PSS 2 g/L. O pH das soluções de lactato de cálcio e fosfato de amônio foi previamente ajustado para 10 com hidróxido de amônia. Após um minuto, foram adicionados 2 mL de corante 3 mM dissolvido em etanol. Os corantes testados na síntese das nanopartículas foram: coomassie blue R-250, coomassie blue G-250, safranina, ponceu S, fluoresceína e amido black. O pH final da dispersão coloidal foi 9,6. Depois de 2 dias em repouso e a temperatura ambiente, foram centrifugados 2 mL da solução em um tubo cônico contendo uma membrana separadora de 100 kDa (Vivaspin, GE[®]) durante 5 minutos a 4000 RPM para separar as nanopartículas dos contra-íons (lactato, amônia e sódio), do excesso de PSS dissolvido e do corante não absorvido. As nanopartículas centrifugadas foram ressuspensas em 2 mL de água, centrifugadas e ressuspensas novamente. Este procedimento foi repetido 5 vezes no total. Após a síntese foi avaliada a absorbância das nanopartículas (Schwartz *et al.*, 2009).

3.9.3 Síntese de nanopartículas de prata

Foram misturados 10 mL de PSS-co-Maleico 1 mM com 10 mL de nitrato de prata 1 mM, ficando sob agitação por 5 minutos. Foi adicionado à mistura 1 mL de solução de borohidreto de sódio 10 mM, sob vigorosa agitação. A solução imediatamente se tornou laranja escuro, confirmando a formação das nanopartículas de prata (Limsavarn *et al.*, 2007). Foram centrifugados 2 mL da solução em um tubo cônico contendo uma membrana separadora de 100 kDa (Vivaspin, GE[®]) durante 5 minutos a 4000 RPM. As nanopartículas centrifugadas foram ressuspensas em 2 mL de água, centrifugadas e ressuspensas novamente. Este procedimento foi

repetido 5 vezes no total. Após a síntese, foi avaliada a absorbância das nanopartículas.

3.9.4 Síntese de nanopartículas de ouro

Foram adicionados 1 mL de solução aquosa de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4 , 5mg/mL) e 42,5 μL de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3 , 1 mg/mL) em 1 mL de solução aquosa de citrato (10 mg/mL), sob agitação. Foi adicionada quantidade suficiente de água para completar o volume da solução para 2,5 mL. A mistura foi incubada por 5 minutos. A cor da solução permaneceu pouco alterada durante a incubação. A adição de solução de citrato a mistura $\text{HAuCl}_4/\text{AgNO}_3$ pode causar mudança de cor do amarelo claro para o laranja, levando a precipitados de ouro preto após adição da solução $\text{HAuCl}_4/\text{AgNO}_3/\text{citrato}$ à água fervente. Em um balão de duas bocas de 100 mL foi colocado 47,5 mL de água e aquecido até a fervura. A água continuou a ferver por 10 minutos e a solução $\text{HAuCl}_4/\text{AgNO}_3/\text{citrato}$ foi rapidamente injetada na água fervente com pipeta, sob vigorosa agitação. A cor da solução de reação alterou rapidamente, em menos de 1 minuto, de incolor, azul acinzentado, púrpura para vermelho rubi. A solução de reação ficou por mais 1 hora sob agitação para garantir a formação de nanopartículas de ouro uniformes (Xia *et al.*, 2010).

3.10 Interação entre nanopartículas e GFP5-scFv

Todos os testes de interação entre nanopartículas e GFP5-scFv foram realizados em um fluorímetro (SPEX Fluorolog 1681, Spex Industries Inc.) equipado com lâmpada de xenônio de 450 Watts. Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm x 1 cm de caminho óptico e as medidas foram realizadas em modo ângulo reto. Os espectros foram corrigidos utilizando-se o padrão de correção mcorrect.spt presente no equipamento e o sistema de medição de sinal do fluorímetro selecionado foi o modo S.

Os nanocristais de ZnSe/ZnS foram adicionados em concentrações crescentes (até 190 nM) em 3 mL de solução contendo GFP5-scFv em concentração fixa de 34 nM, e a ocorrência gradual do FRET foi sendo avaliada. O comprimento

de onda de excitação foi fixado em 310 nm e os espectros de emissão foram obtidos em função da concentração de nanocristais. As fendas do fluorímetro foram fixadas em 1 mm, 1 mm, 3 mm, 3 mm, respectivamente. Posteriormente foram adicionados 0,05 µg de LDL(-) e foi obtido o espectro de emissão.

Em 3 mL de solução contendo 0,7 nM de GFP5-scFv, foram adicionadas concentrações crescentes de nanopartículas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (até 0,34 ng). O comprimento de onda de excitação do fluorímetro foi fixado em 433 nm. As fendas do fluorímetro foram fixadas em 2 mm, 2 mm, 5 mm, 5 mm, respectivamente. Foram obtidos espectros de emissão em função da concentração das nanopartículas.

Em 3 ml de solução contendo 2,7 nM de GFP5-scFv, foram adicionadas concentrações crescentes de nanopartículas de prata (até 0,0675 nM). O comprimento de onda de excitação do fluorímetro foi fixado em 400 nm. As fendas do fluorímetro foram fixadas em 2 mm, 2 mm, 5 mm, 5 mm, respectivamente. Foram obtidos espectros de emissão em função da concentração das nanopartículas.

Em 3 ml de solução contendo 4,2 nM de GFP-scFv, foram adicionadas concentrações crescentes de nanopartículas de ouro até 0,1 nM. As fendas do fluorímetro foram fixadas em 2 mm, 2 mm, 5 mm, 5 mm, respectivamente. Foram obtidos espectros de emissão em função da concentração das nanopartículas. Paralelamente aos experimentos com nanopartículas de ouro, foram testadas nanopartículas de ouro submetidas a um tratamento adicional, isto é, foi adicionado à solução contendo nanopartículas 0,01% em peso do ligante ácido 3-mercaptopropionossulfônico (Sigma®).

4. RESULTADOS

PARTE I

4.1 Obtenção das subfrações de LDL

A separação das subfrações de LDL humana por troca iônica está demonstrada na Figura 13. O pico 1 corresponde ao inibidor de protease acrescentado ao plasma, o pico 2 contém a LDL(n) e o pico 3 a subfração eletronegativa da LDL. A partir de 120 mL do *pool* de plasma hipercolesterolêmico foram obtidos 5 mL de LDL(-) na concentração 391 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 13. Cromatograma do fracionamento por FPLC das subfrações nativa e eletronegativa de LDL de plasma humano. O gel de agarose demonstrou maior mobilidade eletroforética da LDL(-) (B) em relação a LDLn (A). Plasma não purificado foi usado em C.

4.2 Obtenção dos MAbs

Após a cultura em garrafas dos dois hibridomas secretores de anticorpos anti-LDL(-) e sua aplicação no peritônio de camundongos, foram coletados cerca de 2 mL de líquido ascítico por camundongo. Os anticorpos foram purificados e quantificados, obtendo-se MAb 1A3H2 na concentração de 203 $\mu\text{g/mL}$ e 637 $\mu\text{g/mL}$ de MAb 2C7D5F10.

A porção Fab purificada do MAb 2C7D5F10 fragmentado foi aplicada em gel de poliácridamida, juntamente com o MAb inteiro e a porção Fc. No gel da Figura 14

é possível observar em A, que o MAb com β -mercaptoetanol migrou como 2 bandas de proteínas, correspondentes a cadeia pesada (~50 Kda) e cadeia leve (~25 Kda). Em B, o Fab migrou, também sob condições reduzidas, como uma banda dupla de ~25 Kda, das duas bandas, a inferior corresponde à cadeia leve e a outra à metade NH2 terminal da cadeia pesada clivada (Fd). Em C, o Fc sob condições reduzidas apareceu como uma banda única de ~25 Kda que migra mais devagar que a dupla banda de Fab.

Figura 14. SDS-PAGE 12% do MAb 2C7D5F10 fragmentado. O gel confirmou a pureza do Fab obtido.

4.3 Reatividade dos MAbs

Os MAbs 1A3H2 e 2C7D5F10 apresentaram alta reatividade à LDL(-) (DO > 2,0) e não à LDL(n) (DO < 0,12), conforme demonstra a Figura 15. Os MAbs também se ligaram a LDL que foi oxidada por cobre durante 5 minutos. As LDLs modificadas pelo MDA ou pelo cobre por mais de 5 minutos não foram reconhecidas pelos MAbs. O MAb comercial anti-LDL-MDA não apresentou reatividade à LDL(-) e LDL(n).

Figura 15. Reatividade dos MAb. O ELISA comprovou a reatividade dos MAb 1A3H2 e 2C7D5F10 à LDL(-).

4.4 Constante de afinidade

O MAb 2C7D5F10 tem uma constante de afinidade de $0,98 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, que é aproximadamente 10 vezes maior que a do MAb 1A3H2 ($0,74 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Constante de afinidade dos MAb anti-LDL(-) determinada por ELISA.

MAbs	[Ag] (ng/mL)	DO50	[Ab] na DO-50 (ng/mL)	Constante de Afinidade (M^{-1})	Média da constante de afinidade (M^{-1})
1A3H2	2000	1,4	4,92	$0,84 \times 10^7$	$0,74 \times 10^7$
	1000	1,4	6,92	$0,63 \times 10^7$	
	500	1,3	9,37		
2C7D5F10	2000	1,4	0,92	$0,95 \times 10^8$	$0,98 \times 10^8$
	1000	1,3	0,86	$1,00 \times 10^8$	
	500	1,3	0,80		

4.5 Imunoensaio para determinação de LDL(-)

Após a padronização e otimização de cada etapa, as condições finais do ELISA para LDL(-) são: 10 $\mu\text{g/mL}$ do MAb 1A3H2 na sensibilização da placa; uso de leite 2%, previamente aquecido a 100°C para inativar proteases, para bloquear os

sítios remanescentes da placa; plasma diluído 1:2000; MAb 2C7D5F10 marcado com biotina na concentração 10 µg/mL; diluição da streptavidina conjugada à peroxidase 1:80.000; revelação utilizando o cromógeno OPD. A temperatura (37°C) de incubação com cromógeno OPD deve ser respeitada, para não interferir na quantificação do ensaio.

4.5.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do ensaio foram 0,423 mg/L e 0,517 mg/L de LDL(-), respectivamente. O limite superior de quantificação foi 20 mg/L de LDL(-) (Figura 16).

Figura 16. Diluição seriada do padrão de LDL(-) de 160 até 0,078 mg/L.

4.5.2 Curva-padrão

De acordo com os limites de quantificação, seis concentrações de LDL(-) (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 mg/L de proteína) foram utilizadas como padrão dos imunoenaios para determinação de LDL(-) em plasma humano. O CV% de cada

concentração do padrão, testada 10 vezes em uma mesma placa, está na Tabela 3. No ELISA foram obtidas as médias das triplicatas de cada amostra depois de descontado o valor da absorbância do branco de sua respectiva placa. Estes valores foram utilizados para calcular as concentrações de LDL(-) em g de proteína/L nas amostras a partir da curva de calibração elaborada. As curvas foram determinadas plotando as concentrações de LDL(-) da curva padrão versus a absorbância, de acordo com a equação: $y = a \times X + b$, onde y é a absorbância a 492 nm, X é a concentração em g/L de proteína de LDL(-), a é o coeficiente angular (*slope*) e b é o intercepto da reta (Figura 17).

Tabela 3. CV% da absorbância do padrão de LDL(-) em diferentes concentrações.

Replicata	0,625 mg/L	1,25 mg/L	2,5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	20 mg/L
1	0,282	0,526	0,789	1,095	1,345	1,546
2	0,321	0,484	0,780	1,100	1,351	1,594
3	0,322	0,509	0,779	1,064	1,410	1,576
4	0,285	0,573	0,774	1,053	1,394	1,564
5	0,235	0,494	0,763	1,062	1,359	1,644
6	0,234	0,474	0,748	1,068	1,357	1,558
7	0,227	0,489	0,751	1,058	1,354	1,514
8	0,273	0,524	0,780	1,060	1,355	1,503
9	0,280	0,479	0,776	1,101	1,340	1,559
10	0,294	0,518	0,786	1,071	1,322	1,514
Média	0,275	0,507	0,773	1,073	1,359	1,557
Desvio padrão	0,034	0,030	0,014	0,018	0,026	0,042
CV	12,4%	5,9%	1,8%	1,7%	1,9%	2,7%

Figura 17. Curva-padrão típica do ELISA para determinação de LDL(-) com faixa de trabalho de 0,625 a 20 mg/L de LDL(-).

4.5.3 Precisão intra e inter-ensaios

A precisão intra-ensaio variou de 9,5 a 11,5% e a precisão inter-ensaios variou de 11,3 a 18,9% (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Precisão intra-ensaio do ELISA para LDL(-).

Replicata	Plasma com valor de LDL(-) próximo ao LQ inferior (g/L)	Plasma com valor de LDL(-) no centro da curva de calibração (g/L)	Plasma com valor de LDL(-) próximo ao LQ superior (g/L)
1	1,15	7,07	18,83
2	1,19	7,91	22,36
3	1,11	9,27	23,92
4	1,05	9,42	24,85
5	1,29	7,53	18,41
6	1,28	8,11	22,80
7	1,38	7,56	21,52
8	1,54	7,90	23,80
9	1,36	7,48	24,38
10	1,35	8,20	24,62
Média	1,27	8,05	22,55
Desvio padrão	0,15	0,76	2,32
CV	11,5 %	9,5 %	10,3 %

Tabela 5. Precisão inter-ensaios do ELISA para LDL(-).

Replicata	Plasma com valor de LDL(-) próximo ao LQ inferior (g/L)	Plasma com valor de LDL(-) no centro da curva de calibração (g/L)	Plasma com valor de LDL(-) próximo ao LQ superior (g/L)
1	1,15	7,07	20,66
2	1,19	7,91	20,56
3	1,11	9,27	22,16
4	1,05	9,42	23,72
5	1,06	8,03	24,65
6	1,20	8,27	22,11
7	1,23	8,88	22,60
8	1,10	8,80	21,32
9	1,14	8,38	23,60
10	1,20	9,17	24,18
11	1,27	9,88	24,42
12	1,11	8,20	18,06
13	1,58	9,67	17,47
14	1,53	8,85	18,41
15	1,60	9,90	18,72
16	1,63	6,48	19,08
17	1,64	7,36	17,68
18	1,74	6,27	19,13
19	1,72	6,66	21,66
20	1,68	6,49	20,16
Média	1,35	8,25	21,02
Desvio padrão	0,25	1,19	2,37
CV	18,9 %	14,4 %	11,3 %

4.5.4 Recuperação

A recuperação do padrão de LDL(-) no plasma variou no intervalo de 93,6% a 105,1% e na LDL nativa de 92,8% a 102,5% (Tabela 6).

Tabela 6. Recuperação de LDL(-).

	Resultado obtido (g/L)	Resultado esperado (g/L)	Diferença (g/L)	Recuperação
Plasma	5,15			
+ 20 g/L de LDL(-)	26,16	25,15	+1,01	105,1%
+ 10 g/L de LDL(-)	15,14	15,15	-0,01	99,9%
+ 5 g/L de LDL(-)	9,83	10,15	-0,32	93,6%
LDL Nativa	0			
+ 40 g/L de LDL(-)	39,40	40,00	-0,60	98,5%
+ 20 g/L de LDL(-)	20,47	20,00	+0,47	102,5%
+ 10 g/L de LDL(-)	9,47	10,00	-0,53	94,7%
+ 5 g/L de LDL(-)	4,64	5,00	-0,36	92,8%

4.5.5 Linearidade da diluição

Duas amostras de plasmas, A e B, foram diluídas seriadamente. Houve linearidade da diluição de 1:1000 a 1:8000 (RE<20%), conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Linearidade da diluição de amostras de plasma no ELISA para LDL(-).

	diluição 1:1000		diluição 1:2000		diluição 1:4000		diluição 1:8000	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Concentração teórica (g/L)	6,17	9,53	6,17	9,53	6,17	9,53	6,17	9,53
Concentração obtida (g/L)	7,39	10,44	6,14	9,50	6,22	9,02	7,35	11,24
Desvio padrão (g/L)	0,64	1,27	0,04	0,48	0,36	0,50	0,30	1,40
CV (%)	8,70	12,18	0,68	5,01	5,81	5,53	4,05	12,45
ER (%)	19,74	9,60	0,54	0,32	0,69	5,33	19,11	18,02

4.5.6 Testes de estabilidade

O plasma armazenado a 4°C não apresentou estabilidade da LDL(-). Considerando a linha de tendência, nas amostras armazenadas a -20°C nota-se uma inclinação ascendente de 1,43% ao mês (Figura 18-A), e nas amostras armazenadas a -80°C, há uma inclinação ascendente de 1,27% ao mês (Figura 18-

B). O padrão de LDL(-) armazenado a 4°C apresentou estabilidade por 15 dias e quando armazenado a -20°C e a -80°C ficou estável durante 4 meses (ER < 20%), com uma inclinação na linha de tendência de 2,66% quando armazenado a -20°C e 3,11% quando armazenado a -80°C. A partir do quarto mês, o padrão não apresentou mais estabilidade (ER > 20%) (Figura 19).

Uma alíquota de plasma e de padrão de LDL(-) foram testadas em triplicatas após 1, 2 e 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A amostra de plasma armazenada a -20°C, após 1 ciclo de congelamento/descongelamento teve diminuição de 29% no valor de LDL(-), e o plasma armazenado a -80°C teve diminuição de 22,5%. O padrão de LDL(-) teve redução significativa de seus valores somente após o 3º ciclo de congelamento/descongelamento (Tabela 8).

Figura 18. Quantificação de LDL(-) de uma amostra de plasma armazenada por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C (B). Foram plotadas as médias $\pm$ desvio-padrão das quantificações, linha de tendência (traçada por regressão linear) e seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

Figura 19. Quantificação do padrão de LDL(-) armazenado por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C (B). Foram plotadas as médias $\pm$ desvio-padrão das quantificações, linha de tendência (traçada por regressão linear) e seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

Tabela 8. Concentração de LDL(-) em uma amostra de plasma e no padrão de LDL(-) após os ciclos de congelamento/descongelamento.

Amostra	Antes do congelamento	Após 1º ciclo	E.R.	Após 2º ciclo	E.R.	Após 3º ciclo	E.R.
Plasma (-20°C)	3,18 g/L	2,26 g/L	-29,0%	2,19 g/L	-31,2%	1,84 g/L	-42,0%
Plasma (-80°C)	3,18 g/L	2,46 g/L	-22,5%	2,16 g/L	-32,0%	2,39 g/L	-25,0%
Padrão (-20°C)	5,0 mg/L	4,9 mg/L	-2,0%	4,0 mg/L	-20,0%	2,9 mg/L	-42,0%
Padrão (-80°C)	5,0 mg/L	4,6 mg/L	-8,0%	4,1 mg/L	-18,0%	3,3 mg/L	-34,0%

4.5.7 Estudo de interferentes

A amostra de plasma suplementada com agentes potencialmente interferentes não apresentou interferência significativa de lipídios (triglicérides) até 1000 mg/dL, de bilirrubina até 20 mg/dL e hemoglobina até 500 mg/dL.

4.6 Imunoensaio para determinação de anticorpos anti-LDL(-)

Após a padronização e otimização de cada etapa, ficaram estabelecidas as seguintes condições: 1 µg/mL de LDL(-) para adsorção na placa; diluição 1:2500 de anticorpos anti-IgG humana e diluição 1:1000 de anticorpos anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. O tempo de incubação (1 hora) com o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase deve ser respeitado, para não interferir na quantificação do ensaio.

4.6.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do ensaio foram 0,0028 mg/L e 0,0032 mg/L de anticorpos anti-LDL(-), respectivamente. O limite superior de quantificação foi 0,125 mg/L de anticorpos anti-LDL(-) (Figura 20).

Figura 20. Diluição seriada do MAb 2C7D5F10 de 1 até 0,0002 mg/L.

4.6.2 Curva-padrão

Como padrão dos imunoensaios para determinação de anticorpos anti-LDL(-), foram utilizadas seis concentrações do MAb 2C7D5F10 (0,004, 0,008, 0,016,

0,031, 0,063 e 0,125 mg/L). O CV% das absorbâncias de cada concentração do padrão, testada 10 vezes em uma mesma placa, está na Tabela 9. De cada amostra de plasma foram obtidas as médias das triplicatas depois de descontado o valor da absorbância do branco de sua respectiva placa. Estes valores foram utilizados para calcular as concentrações de anticorpos anti-LDL(-) em mg/L nas amostras a partir da curva de calibração elaborada. As curvas foram determinadas considerando-se as concentrações de anticorpos anti-LDL(-) da curva padrão versus a absorbância, de acordo com a equação: $y = a \times X + b$, onde y é a absorbância a 450 nm, X é a concentração em mg/L de anticorpos anti-LDL(-), a é o coeficiente angular (*slope*) e b é o intercepto da reta (Figura 21).

Tabela 9. CV% da absorbância do MAb 2C7D5F10 utilizado como padrão do ensaio em diferentes concentrações.

Replicata	0,004 mg/L	0,008 mg/L	0,016 mg/L	0,031 mg/L	0,063 mg/L	0,125 mg/L
1	0,310	0,580	1,013	1,348	1,775	2,021
2	0,337	0,558	0,889	1,440	1,840	2,063
3	0,320	0,600	0,980	1,495	1,837	2,060
4	0,405	0,628	0,958	1,323	1,846	2,041
5	0,384	0,591	0,949	1,387	1,865	2,083
6	0,340	0,645	0,990	1,363	1,820	2,157
7	0,302	0,616	0,938	1,332	1,773	2,060
8	0,261	0,583	0,993	1,333	1,772	2,123
9	0,278	0,570	0,990	1,364	1,772	2,090
10	0,319	0,498	0,976	1,424	1,801	2,102
Média	0,326	0,587	0,968	1,381	1,810	2,080
Desvio padrão	0,044	0,041	0,036	0,056	0,036	0,040
CV	13,5%	7,0%	3,7%	4,0%	2,0%	1,9%

Figura 21. Curva-padrão típica do imunoensaio para determinação de anticorpos anti-LDL(-) com faixa de trabalho de 0,004 a 0,125 mg/L de MAb 2C7D5F10.

4.6.3 Precisão intra e inter-ensaios

A precisão intra-ensaio variou de 6,4 a 8,3% e a precisão inter-ensaios variou de 10,1 a 16,2% (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Precisão intra-ensaio do ELISA para anti-LDL(-).

Replicata	Plasma com valor de anti-LDL(-) próximo ao LQ inferior (mg/L)	Plasma com valor de anti-LDL(-) no centro da curva de calibração (mg/L)	Plasma com valor de anti-LDL(-) próximo ao LQ superior (mg/L)
1	2,50	12,05	23,86
2	2,23	14,05	23,14
3	2,28	12,84	21,63
4	2,13	13,98	21,28
5	2,05	12,90	20,82
6	2,22	11,12	22,43
7	2,09	12,14	23,65
8	2,25	11,23	20,44
9	2,32	11,62	18,66
10	2,45	12,80	22,03
Média	2,25	12,47	21,79
Desvio padrão	0,14	1,03	1,59
CV	6,4%	8,3%	7,3%

Tabela 11. Precisão inter-ensaios do ELISA para anti-LDL(-).

Replicata	Plasma com valor de anti-LDL(-) próximo ao LQ inferior (mg/L)	Plasma com valor de anti-LDL(-) no centro da curva de calibração (mg/L)	Plasma com valor de anti-LDL(-) próximo ao LQ superior (mg/L)
1	2,28	12,92	23,86
2	2,85	14,90	23,14
3	2,28	16,03	21,63
4	2,84	14,47	21,28
5	2,36	12,05	19,48
6	2,42	14,05	18,91
7	2,60	12,84	16,63
8	2,66	13,98	18,03
9	2,50	11,17	21,53
10	2,23	12,02	23,17
11	2,28	12,68	19,35
12	2,13	14,93	20,29
13	2,89	15,05	23,46
14	2,96	11,89	24,59
15	3,04	14,36	23,06
16	2,90	13,45	22,98
17	2,03	13,33	26,07
18	1,68	15,36	24,82
19	1,94	13,91	24,18
20	1,91	15,96	22,98
Média	2,44	13,77	21,97
Desvio padrão	0,39	1,40	2,50
CV	16,2%	10,1%	11,4%

4.6.4 Recuperação

A recuperação do anticorpo anti-LDL(-) no plasma variou no intervalo de 93,8% a 114,2% (Tabela 12).

Tabela 12. Recuperação do anticorpo anti-LDL(-).

	Resultado obtido (mg/L)	Resultado esperado (mg/L)	Recuperação %
Plasma A	3,07		
plasma A + 11,93 mg/L Ac	15,38	15,00	103,2
plasma A + 9,71 mg/L Ac	12,30	12,79	95,0
plasma A + 5,25 mg/L Ac	9,07	8,32	114,2
plasma A + 3,21 mg/L Ac	6,44	6,28	105,0
Plasma B	7,65		
plasma B + 11,93 mg/L Ac	18,64	19,58	93,8
plasma B + 9,71 mg/L Ac	17,20	17,36	98,3
plasma B + 5,25 mg/L Ac	13,50	12,90	111,5
plasma B + 3,21 mg/L Ac	10,88	10,86	100,6

4.6.5 Linearidade da diluição

Duas amostras de plasmas, A e B, foram diluídas seriadamente, conforme mostra a Tabela 13. Houve linearidade da diluição de 1:100 a 1:800 (RE<20%).

Tabela 13. Linearidade da diluição de amostras de plasma no ELISA para anti-LDL(-).

Plasma	diluição 1:100		diluição 1:200		diluição 1:400		diluição 1:800	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Concentração teórica (mg/L)	6,09	4,63	6,09	4,63	6,09	4,63	6,09	4,63
Concentração obtida (mg/L)	6,74	4,66	5,85	4,61	5,33	4,43	5,32	5,31
Desvio padrão (mg/L)	0,57	0,16	0,11	0,30	0,06	0,10	0,24	0,49
CV (%)	8,5	3,5	1,8	6,4	1,1	2,4	4,4	9,2
ER (%)	10,61	0,57	3,97	0,43	12,44	4,41	12,57	14,74

4.6.6 Testes de estabilidade

O plasma armazenado a 4°C não apresentou estabilidade de anticorpos anti-LDL(-), mas as alíquotas armazenadas a -20°C e a -80°C permaneceram estáveis durante 6 meses (ER<20%) (Figura 22). Considerando a linha de tendência, nota-se

uma discreta inclinação ascendente de 2,19% ao mês nas amostras armazenadas a -20°C, e 2,57% ao mês nas amostras armazenadas a -80°C.

Uma alíquota de plasma foi testada em triplicata após 1, 2 e 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A amostra de plasma armazenada a -20°C, após 1 ciclo de congelamento/descongelamento teve diminuição de 35,9% no valor de anti-LDL(-), e o plasma armazenado a -80°C teve diminuição de 24,8%. Não houve redução significativa após os demais ciclos de congelamento/descongelamento em ambas temperaturas (Tabela 14).

Figura 22. Quantificação de anticorpo anti-LDL(-) em uma amostra de plasma armazenada por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C. Foram plotadas as médias +/- desvio-padrão das quantificações, linha de tendência (traçada por regressão linear) e seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

Tabela 14. Concentração de anti-LDL(-) em uma amostra de plasma após os ciclos de congelamento/descongelamento.

Amostra	Antes do congelamento	Após 1º ciclo	E.R.	Após 2º ciclo	E.R.	Após 3º ciclo	E.R.
Plasma (-20°C)	3,09 mg/L	1,98 mg/L	35,9%	2,09 mg/L	32,2%	2,04 mg/L	33,9%
Plasma (-80°C)	3,09 mg/L	2,32 mg/L	24,8%	2,25 mg/L	27,1%	2,21 mg/L	28,3%

4.6.7 Estudo de interferentes

A amostra de plasma suplementada com agentes potencialmente interferentes não apresentou interferência significativa de lipídios (triglicérides) até 800 mg/dL, de bilirrubina até 20 mg/dL e hemoglobina até 250 mg/dL na determinação de anticorpos anti-LDL(-).

4.7 Imunoensaio para determinação de IC-LDL(-)

Após a padronização do imunoensaio para IC-LDL(-) as condições estabelecidas foram: 5 µg/mL de Fab do MAb 2C7D5F10 para adsorção na placa; leite desnatado 5% como bloqueio; anticorpo anti-IgG humana Fc específico na diluição 1:4000. O branco do imunoensaio ficou muito alto quando foi utilizado o anticorpo anti-IgG humana (H+L), provavelmente devido a interação não específica com o Fab adsorvido na placa. O número de lavagens e os tempos de incubação (30 segundos) de cada lavagem com PBS-Tween 0,05% devem ser respeitados nesse ELISA, pois caso contrário o ensaio apresentará alto ruído de fundo, interferindo na quantificação.

4.7.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação do ensaio foram 0,023 g/L e 0,034 g/L de IC-LDL(-), respectivamente. O limite superior de quantificação foi 4 g/L de IC-LDL(-) (Figura 23).

Figura 23. Diluição seriada de um *pool* de plasma de 8 até 0,002 g/L de IgG.

4.7.2 Curva-padrão

Foi estabelecida uma curva de calibração com 7 pontos de concentração de IC-LDL(-) (0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 g/L de IgG). O CV% das absorbâncias de cada concentração do padrão, testada 10 vezes em uma mesma placa, está na Tabela 15. No ELISA para IC-LDL(-) foram obtidas as médias das triplicatas de cada amostra depois de descontado o valor da absorbância do branco de sua respectiva placa. Estes valores foram utilizados para calcular as concentrações de IC-LDL(-)/IgG em g/L nas amostras a partir da curva de calibração elaborada. As curvas foram determinadas plotando as concentrações de IC-LDL(-)/IgG da curva padrão versus a absorbância, de acordo com a equação: $y = a \times X + b$, onde y é a absorbância a 450 nm, X é a concentração em g/L de IC-LDL(-), a é o coeficiente angular (*slope*) e b é o intercepto da reta (Figura 24).

Tabela 15. CV% da absorbância do *pool* de plasma utilizado como padrão do ensaio em diferentes concentrações.

Replicata	0,06 g/L	0,12 g/L	0,25 g/L	0,5 g/L	1 g/L	2 g/L	4 g/L
1	0,598	0,770	1,029	1,334	1,597	1,727	2,123
2	0,564	0,768	0,938	1,323	1,534	1,876	2,020
3	0,563	0,837	1,059	1,301	1,573	1,678	2,211
4	0,549	0,858	1,123	1,280	1,619	1,902	2,201
5	0,564	0,891	1,091	1,331	1,524	1,753	2,096
6	0,510	0,876	1,104	1,311	1,512	1,726	2,147
7	0,572	0,795	0,958	1,328	1,437	1,843	2,087
8	0,502	0,789	1,028	1,364	1,589	1,854	2,209
9	0,486	0,872	0,916	1,397	1,545	1,877	2,058
10	0,492	0,896	0,905	1,295	1,518	1,760	1,975
Média	0,540	0,835	1,015	1,326	1,545	1,800	2,113
DP	0,039	0,050	0,081	0,034	0,053	0,079	0,081
CV	7,2%	6,0%	8,0%	2,6%	3,4%	4,4%	3,8%

Figura 24. Curva-padrão típica do imunoensaio para determinação de IC-LDL(-) com faixa de trabalho de 0,06 a 4 g/L de IgG.

4.7.3 Precisão intra e inter-ensaios

A precisão intra-ensaio variou de 12,7 a 18,7% e a precisão inter-ensaios variou de 14,3 a 18,7% (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16. Precisão intra-ensaio do ELISA para IC-LDL(-).

Replicata	Plasma com valor de IC-LDL(-) próximo ao LQ inferior (g/L)	Plasma com valor de IC-LDL(-) no centro da curva de calibração (g/L)	Plasma com valor de IC-LDL(-) próximo ao LQ superior (g/L)
1	5,88	45,39	118,06
2	6,23	38,71	98,15
3	8,00	37,40	104,68
4	5,27	49,38	97,31
5	8,10	37,05	109,75
6	9,90	38,83	115,55
7	7,31	35,47	83,37
8	7,47	35,36	91,24
9	6,89	31,41	88,15
10	6,33	36,94	120,11
Média	7,14	38,59	102,64
Desvio padrão	1,34	5,17	13,01
CV	18,7%	13,4%	12,7%

Tabela 17. Precisão inter-ensaios do ELISA para IC-LDL(-).

Replicata	Plasma com valor de IC-LDL(-) próximo ao LQ inferior (g/L)	Plasma com valor de IC-LDL(-) no centro da curva de calibração (g/L)	Plasma com valor de IC-LDL(-) próximo ao LQ superior (g/L)
1	7,12	38,24	117,05
2	4,94	32,94	120,38
3	5,78	40,86	89,68
4	4,73	39,66	109,75
5	6,93	37,32	88,15
6	5,05	38,40	120,11
7	5,27	46,90	81,24
8	4,30	33,43	85,54
9	6,91	40,31	94,33
10	6,39	32,39	113,82
11	5,93	34,05	90,51
12	5,38	35,61	83,34
13	7,56	49,44	94,08
14	8,84	40,74	113,85
15	7,72	49,89	115,88
16	7,37	46,07	114,25
17	5,76	39,38	116,76
18	6,25	37,80	87,22
19	5,91	35,89	114,98
20	7,30	30,16	83,94
Média	6,27	38,97	101,74
Desvio padrão	1,18	5,57	14,78
CV	18,7%	14,3%	14,5%

4.7.4 Recuperação

A recuperação de IC-LDL(-) no plasma variou no intervalo de 84,2% a 118,8% (Tabela 18).

Tabela 18. Recuperação de IC-LDL(-).

	Resultado obtido (g/L)	Resultado esperado (g/L)	Recuperação %
Plasma A	7,25		
plasma A + 8,13 g/L IC-LDL(-)	15,47	15,37	101,1
plasma A + 10,86 g/L IC-LDL(-)	19,72	18,10	114,9
plasma A + 21,49 g/L IC-LDL(-)	32,78	28,73	118,8
plasma A + 43,67 g/L IC-LDL(-)	58,39	50,92	117,1
Plasma B	8,68		
plasma B + 8,13 g/L IC-LDL(-)	15,55	16,81	84,6
plasma B + 10,86 g/L IC-LDL(-)	20,52	19,53	109,1
plasma B + 21,49 g/L IC-LDL(-)	34,22	30,17	118,8
plasma B + 43,67 g/L IC-LDL(-)	45,44	52,35	84,2

4.7.5 Linearidade da diluição

Duas amostras de plasmas, A e B, foram diluídas seriadamente, conforme mostra a Tabela 19. Houve linearidade da diluição de 1:12,5 a 1:100 (RE<20%).

Tabela 19. Linearidade da diluição de amostras de plasma no ELISA para IC-LDL(-).

Plasma	diluição 1:12,5		diluição 1:25		diluição 1:50		diluição 1:100	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Concentração teórica (g/L)	11,42	28,86	11,42	28,86	11,42	28,86	11,42	28,86
Concentração obtida (g/L)	13,60	24,85	12,42	29,53	11,13	29,93	9,21	23,94
Desvio padrão (g/L)	0,99	1,82	0,94	1,73	0,28	0,98	0,71	1,77
CV (%)	7,3	7,3	7,6	5,9	2,5	3,3	7,7	7,4
ER (%)	19,1	13,9	8,7	2,3	2,5	3,7	19,3	17,1

4.7.6 Testes de estabilidade

O plasma armazenado a 4°C não apresentou estabilidade de IC-LDL(-), mas as alíquotas armazenadas a -20°C e a -80°C permanecem estáveis durante os 6 meses de teste (RE<20%). Em relação às amostras armazenadas a -20°C,

considerando a linha de tendência da Figura 25-A, nota-se uma discreta inclinação ascendente de 2,40% ao mês. Em relação às amostras armazenadas a -80°C, há uma inclinação descendente na linha de tendência de -0,37% ao mês (Figura 25-B).

Figura 25. Quantificação de IC-LDL(-) de uma amostra de plasma armazenada por 6 meses a -20°C (A) e a -80°C (B). Foram plotadas as médias $\pm$ desvio-padrão das quantificações, linha de tendência (traçada por regressão linear) e seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

Uma alíquota de plasma foi testada em triplicata após 1, 2 e 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A amostra de plasma teve redução significativa de IC-LDL(-) somente após o 2º ciclo de congelamento/descongelamento (Tabela 20).

Tabela 20. Concentração de IC-LDL(-) em uma amostra de plasma após os ciclos de congelamento/descongelamento.

Amostra	Antes do congelamento	Após 1º ciclo	E.R.	Após 2º ciclo	E.R.	Após 3º ciclo	E.R.
Plasma (-20°C)	9,94 g/L	7,98 g/L	19,7%	5,58 g/L	43,9%	5,29 g/L	46,8%
Plasma (-80°C)	9,94 g/L	8,04 g/L	19,2%	7,32 g/L	26,4%	5,88 g/L	40,8%

4.7.7 Análise de interferentes

A amostra de plasma suplementada com agentes potencialmente interferentes não apresentou interferência significativa de lipídios (triglicérides) até 1000 mg/dL, de bilirrubina até 5 mg/dL e hemoglobina até 500 mg/dL.

PARTE II

4.8 Construção do vetor de expressão

O cassette de expressão do scFv anti-LDL(-) com proteína A, de aproximadamente 1000 pb está indicado pela seta na Figura 26. Ele foi removido do vetor de levedura pPIgLE Z22 utilizando a enzima de restrição *SacI*, foi purificado e inserido no vetor bacteriano pET-GFP5 previamente linearizado com *SacI* e desfosforilado com a enzima SAP, formando o vetor pET-GFP5-scFv.

Figura 26. Digestão dos vetores pPIgLE Z22 e pET-GFP5. Em 1 e 3, o vetor pPIgLE anti-LDL(-) intacto; em 2, o vetor pPIgLE digerido com *SacI* e a banda correspondente ao cassette de expressão que foi liberada após a digestão; em 4, o cassette de expressão purificado; em 5, o vetor pET-GFP5 intacto; em 6, vetor pET-GFP5 digerido com *SacI*; M: marcador de peso molecular. Gel de agarose a 0,8%.

Foram escolhidas 8 colônias de *E. coli* DH5α (um terço das colônias presentes na placa) resultantes da transformação com o vetor pET-GFP5-scFv. Os plasmídeos obtidos dessas colônias foram digeridos com a enzima *SacI* para confirmar a presença do inserto. Apenas os plasmídeos 5 e 6 realmente continham o inserto (Figura 27). Nos demais, o vetor pET-GFP5 recircularizou sem o inserto,

mesmo tendo usado previamente a enzima SAP para desfosforilar a extremidade 5' do vetor.

Figura 27. Confirmação da ligação do inserto. A partir de 8 colônias foram feitas mini preparações, as quais foram digeridas com *SacI*. As mini preparações 5 e 6 liberaram o fragmento correspondente ao cassete de expressão (1000 pb), confirmando a ligação do scFv no pET-GFP5. M: marcador de peso molecular. Gel de agarose a 0,8%.

Como foi utilizada apenas a enzima de restrição *SacI* para remover o cassete de expressão e inseri-lo no vetor linearizado também com *SacI*, o inserto poderia se ligar ao vetor de duas maneiras diferentes, no sentido de leitura ou no sentido contrário. Para confirmar se o inserto estava na orientação correta, foi realizada a digestão com a enzima *XhoI*, levando em consideração a distância entre os sítios de *XhoI* presentes no vetor e no inserto (256 pb entre um sítio e outro). Um dos sítios de *XhoI* está localizado no sítio múltiplo de clonagem do vetor e o outro está localizado no final da sequência do scFv anti-LDL(-). Após digestão com *XhoI*, o plasmídeo 5 liberou um fragmento de aproximadamente 800 pb e o plasmídeo 6 liberou um fragmento de 256 pb (Figura 28). O tamanho do fragmento liberado demonstrou que apenas no plasmídeo 6 o inserto estava ligado na orientação correta. O fragmento de 256 pb liberado pela enzima *XhoI* correspondia a sequência de DNA da proteína A mais 9 oligonucleotídeos do final da sequência do scFv (Figura 29). Com essa digestão, entrou em fase de leitura na porção C-terminal uma cauda de hexa-histidina. Sendo assim, a proteína recombinante GFP5-scFv ficou

com 2 caudas de histidina, uma N-terminal e outra C-terminal, que podem ser usadas para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade com metais.

Figura 28. Confirmação da orientação do inserto. As mini preparações 5 e 6, que contém o scFv foram digeridas com a enzima *Xho*I. A mini-prep 5 liberou um fragmento de 800 pb enquanto que a mini-prep 6 liberou um fragmento de 256 pb. Isto confirmou que a mini-prep 6 tinha o scFv ligado na orientação correta. M: marcador de peso molecular. Gel de agarose a 0,8%.

Figura 29. Remoção da proteína A. Em 1, a seta indica uma banda de 256 pb correspondente a sequência gênica da proteína A liberada após digestão do vetor pET-GFP5-scFv com a enzima *Xho*I. Em 2, o vetor fechado após eliminação do fragmento e em 3, o vetor digerido com *Xho*I, já não apresenta mais o fragmento de 256 pb. M: marcador de peso molecular. Gel de agarose a 0,8%.

4.9 Predição da estrutura tridimensional da proteína

Após a análise da sequência de aminoácidos pelo programa Geno3D, foi gerada uma imagem da provável estrutura tridimensional da GFP5-scFv. De acordo com a Figura 30 é possível constatar que não há interferência espacial entre as duas proteínas, ficando o sítio de ligação ao antígeno do scFv completamente exposto para interação com a LDL(-) e a GFP5 livre para emissão da fluorescência.

Figura 30. Predição da estrutura tridimensional da GFP5-scFv. Imagem gerada pelo programa Geno3D mostra a GFP5 (azul) em formato de barril ligada ao domínio da cadeia pesada do scFv (verde), seguida do domínio da cadeia leve (vermelho).

4.10 Expressão, purificação e reenovelamento da GFP5-scFv

A condição ideal para expressão da GFP5-scFv foi a 25°C, durante 18 horas com 1 mM de IPTG. Para averiguar o grau de solubilidade da proteína recombinante, as bactérias foram lisadas e as frações solúvel e insolúvel foram analisadas separadamente. Observou-se que a GFP5-scFv foi totalmente expressa sob a forma de corpos de inclusão, agregados insolúveis de proteínas, conforme demonstrado na Figura 31. No teste de solubilização com uréia de 3 a 8 M, as concentrações 7 e 8 M solubilizaram completamente a GFP5-scFv agregada, sendo então, adotada a concentração 7 M de uréia. No teste de eluição com gradiente de imidazol, a solução contendo 100 mM de imidazol eluiu um pouco da proteína da resina, mas a solução de 200 mM foi ideal para a total eluição da GFP5-scFv. O teste de reenovelamento da proteína na coluna de purificação não teve um bom

desempenho, ocorrendo agregação de praticamente toda proteína na resina de níquel. Por outro lado, o reenovelamento da proteína por diálise foi bem sucedido, havendo maior recuperação de proteína ativa. Após vários testes de reenovelamento foi possível obter aproximadamente 90% de recuperação da proteína recombinante. O rendimento da proteína (purificada e reenovelada) ficou em aproximadamente 5 mg por litro de cultura de *E. coli*.

Figura 31. Expressão e purificação da GFP5-scFv. A GFP5-scFv aparece no gel como uma banda de 58 Kda, o que está de acordo com o seu peso molecular teórico. Em 1, o sobrenadante resultante da lise bacteriana, com uma banda praticamente imperceptível da proteína recombinante; em 2, o sobrenadante purificado em resina carregada com níquel; em 3, o sedimento resultante da lise bacteriana; em 4, a solução do sedimento bacteriano que já passou pela resina de níquel, sendo possível perceber que toda proteína recombinante ficou retida na resina; em 5, a GFP5-scFv purificada. SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue.

4.11 Caracterização da GFP5-scFv

A banda da GFP5-scFv presente no gel foi confirmada por Western Blot (Figura 32). A quimera manteve as características individuais das proteínas fusionadas, emitindo a fluorescência característica da GFP5 e interagindo com a LDL(-) como o scFv (Figura 33).

A GFP5-scFv, quando armazenada a 4°C, permaneceu estável durante 45 dias. Quando armazenada a -20°C ou -80°C, a proteína permaneceu estável durante os três meses de teste e resistiu aos três ciclos de congelamento/descongelamento, apresentando afinidade pela LDL(-) no dot blot.

Figura 32. SDS-PAGE 12% e Western blot da GFP5-scFv. A GFP5-scFv purificada pode ser visualizada no gel corado com coomassie blue (A), no Western blot (B) e no gel corado com prata (C). A GFP5 foi usada como controle positivo e a albumina bovina como controle negativo.

Figura 33. Caracterização da proteína recombinante. Em A, o ELISA mostrou a afinidade da GFP5-scFv com a LDL(-) e não com a LDL nativa, assim como o MAb 2C7D5F10, do qual as sequências da região variável da cadeia leve e pesada foram usadas para construir o gene recombinante. Em B, o Dot blot; a primeira seta aponta o controle positivo (GFP5-scFv direto na membrana), a segunda seta aponta a GFP5-scFv que se ligou na LDL(-) adsorvida na membrana, a terceira seta aponta que não houve ligação da GFP5-scFv com a LDL(n) adsorvida na membrana. Em C, a emissão de fluorescência da GFP5-scFv sob luz ultravioleta em um microtubo.

4.12 Interação das nanopartículas com GFP5-scFv

Os nanocristais de ZnSe/ZnS utilizados possuem cerca de 3 nm de diâmetro, apresentando pico de emissão em 390 nm e eficiência quântica de 50%. A formação do complexo nanocristais/GFP5-scFv ocorreu por interação eletrostática (Hering *et al.*, 2007, 2009). Neste sistema, os nanocristais atuaram como doadores de energia e a GFP5-scFv como receptora. À medida que se aumentou a concentração dos nanocristais, a intensidade da emissão da GFP5-scFv também aumentou, como pode ser observado na Figura 34. Este acréscimo na intensidade de emissão da proteína se deve à chamada emissão sensibilizada, o que caracteriza o processo de transferência de energia por ressonância (FRET). Verificou-se também o efeito da adição de LDL(-) no sistema nanocristais/GFP5-scFv. Na figura 35 pode-se observar que houve um lento aumento da emissão de fluorescência da GFP5-scFv (demorou cerca de 8 horas), na presença de LDL(-). Tal aumento de intensidade somente foi observado na presença da LDL(-).

Figura 34. Interação entre nanocristais de ZnSe/ZnS e GFP5-scFv. Evolução do espectro de emissão do complexo nanocristais/GFP5-scFv em função do aumento da razão molar entre nanocristais (ZnSe) e a GFP5-scFv (G). Excitação a 310 nm.

Figura 35. Interação entre nanocristais de ZnSe/ZnS, GFP5-scFv e LDL(-). Evolução temporal do espectro de emissão do complexo nanocristais/GFP5-scFv na presença de LDL(-). Excitação em 310 nm.

De todos os corantes testados na padronização da síntese das nanopartículas de fosfato de cálcio, o coomassie blue R-250 foi o ideal. Os corantes safranina, ponceu S, fluoresceína e amido Black não se fixaram na superfície das nanopartículas durante a síntese. As nanopartículas sintetizadas com coomassie blue R-250, com cerca de 90 nm de diâmetro, apresentaram λ_{max} (lambda máximo de absorbância) em 540 nm, bem próximo do pico de emissão da GFP5-scFv (508 nm). Essas nanopartículas não apresentaram emissão quando excitadas a 395 nm ou 433 nm, que são os picos de excitação da GFP5-scFv. Após a adição dessas nanopartículas em solução contendo GFP5-scFv, houve supressão de 20% da fluorescência da proteína, como pode ser observado na Figura 36.

As nanopartículas de prata, com tamanho teórico de 5 nm de diâmetro, apresentaram λ_{max} em torno de 400 nm. Após a adição dessas nanopartículas em solução contendo GFP5-scFv, houve supressão de aproximadamente 90% da fluorescência da proteína, como pode ser observado na Figura 37

Figura 36. Interação entre nanopartículas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e GFP5-scFv. Evolução do espectro de emissão da GFP5-scFv em função da adição de nanopartículas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ recobertas com coomassie blue R-250. Excitação em 433 nm.

Figura 37. Interação entre nanopartículas de prata e GFP5-scFv. Evolução do espectro de emissão do complexo nanopartículas de prata/GFP5-scFv em função do aumento da razão molar entre as nanopartículas (Ag) e a GFP5-scFv (G). Excitação em 400 nm.

As nanopartículas de ouro sintetizadas, com 18 nm de diâmetro, apresentaram pico de absorção em 518 nm, praticamente se sobrepondo ao pico de emissão da GFP5-scFv (Figura 38). Ao se adicionar concentrações crescentes de nanopartículas de ouro na solução contendo GFP5-scFv a emissão de fluorescência da GFP5-scFv foi gradualmente sendo diminuída até ocorrer completa supressão (100%) (Figura 39). As nanopartículas tratadas com o ligante de ácido 3-mercaptopropionossulfônico na superfície foram usadas como controle negativo, pois não promoveram a supressão da fluorescência da GFP5-scFv.

Figura 38. Sobreposição da absorção das nanopartículas de ouro com a emissão da GFP5-scFv.

Figura 39. Interação entre nanopartículas de ouro e GFP5-scFv.. Evolução do espectro de emissão do complexo nanopartículas de ouro/GFP5-scFv em função do aumento da razão molar entre as nanopartículas (Au) e a GFP5-scFv (G). Excitação em 400 nm.

5. DISCUSSÃO

Considerando que a LDL(-) está presente na circulação sanguínea e que alguns estudos comprovaram sua aterogenicidade, a quantificação de LDL(-) e de seus anticorpos no plasma pode fornecer informações adicionais no estudo do processo aterosclerótico e doenças cardiovasculares. Há alguns imunoensaios descritos na literatura e disponíveis comercialmente para uso em pesquisa para determinação de LDL oxidada e/ou LDL-MDA (Holvoet *et al.*, 2006), fosfatidilcolina oxidada (Itabe *et al.*, 1996; Fraley *et al.*, 2006), LDL oxidada ligada a glicoproteína I β 2 (Cayman Chemical) e anticorpos anti-LDL oxidada (Biomedica Gruppe; Kamiya Biomedical Company). Entretanto, não há imunoensaios ou biossensores descritos para determinação da fração minimamente modificada da LDL, de seus anticorpos e imunocomplexos. Outro ponto fundamental é validar ensaios usados na pesquisa, pois pequenas diferenças no desempenho do método podem ter profundos efeitos quando os resultados são analisados.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO. Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003. Como este trabalho focou na validação de imunoensaios para uso em pesquisa, também foram consultados guias como o Eurachem e o IUPAC, os quais são aceitos internacionalmente e utilizados em publicações sobre validação de ELISAs (Magliulo *et al.*, 2005; Eidem *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007; Valares *et al.*, 2007). É importante esclarecer que guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado (Ribani *et al.*, 2004).

O ELISA desenvolvido nesse trabalho para quantificação de LDL(-) utiliza os anticorpos monoclonais 1A3H2 e 2C7D5F10 de murino, obtidos por Telles (2008). Os epitopos na partícula de LDL(-), reconhecidos pelos MAbs ainda não foram

caracterizados uma vez que a LDL apresenta uma estrutura complexa, apresentando uma monocamada anfipática de fosfolípidos, colesterol não esterificado e uma molécula de apo B-100. Entretanto, já se sabe que os MAbs 1A3H2 e 2C7D5F10 não se ligam à LDL nativa, LDL-MDA, nem a LDL oxidada com sulfato de cobre por mais de 5 minutos. Esses MAbs têm como diferencial o fato de terem sido obtidos pela imunização de camundongo com o antígeno isolado de plasma humano e não pela imunização com preparações de LDL modificadas *in vitro*, conforme experimentos realizados por Holvoet *et al.* (1998) e Bevan *et al.* (2003).

A afinidade do anticorpo também tem implicação na performance de um imunoensaio. Os MAbs 1A3H2 e 2C7D5F10 apresentam uma boa constante de afinidade, em concordância com a afinidade típica de anticorpos monoclonais IgG (entre 10^6 e 10^{10} M^{-1}) relatada por alguns autores (Hajighasemi *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). O fato de o MAb 2C7D5F10 ter uma constante de afinidade 10 vezes maior que o MAb 1A3H2, torna-o mais interessante para uso em imunoensaios.

Os anticorpos monoclonais são atrativos para uso como reagentes em imunoensaios porque eles são quimicamente uniformes, altamente específicos, e podem ser produzidos e purificados em grandes quantidades (Nelson *et al.*, 2000). A produção de líquido ascítico em animais injetados intraperitonealmente com os hibridomas é uma técnica bastante empregada em laboratórios de pesquisa. No entanto, esta técnica apresenta alguns inconvenientes de ordem operacional, além de causar desconforto e, a seguir, a morte do animal utilizado, sendo pelas últimas razões uma prática condenada em diversos países. Uma alternativa seria o cultivo dos hibridomas em biorreatores, o qual possibilita a ampliação de escala do processo, sem o uso de animais (Peterson *et al.*, 1998). Porém, os hibridomas 1A3H2 e 2C7D5F10 não foram produzidos para cultivo em biorreator.

Anteriormente, foi desenvolvido em nosso grupo um anticorpo monoclonal murino anti-LDL(-) (MAb 3D1036) (Damasceno *et al.*, 2002 e 2006). Utilizando esse MAb em imunoensaios, com placas previamente sensibilizadas com plasma diluído 1:2, não foi possível detectar a LDL(-) no plasma usando cromógenos como ABST, OPD e TMB. Neste caso, foi necessário o uso de isoluminol e uma leitora de quimiluminescência para revelação do ensaio (Barros *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*,

2006). Com os dois MABs atuais (1A3H2 e 2C7D5F10) foi possível desenvolver um ensaio do tipo sanduíche, que é mais sensível que o ELISA anteriormente utilizado. Para aumentar ainda mais a sensibilidade do teste utilizou-se o método de amplificação biotina-avidina. A biotina é uma vitamina hidrossolúvel de baixo peso molecular com elevada afinidade pela proteína avidina. Cada molécula de streptavidina possui quatro sítios de ligação para biotina. Além do mais, a biotinilação é um processo de fácil execução e que não acarreta alterações nos anticorpos (Diamandis *et al.*, 1991). A vantagem do ELISA para LDL(-) é que ele não requer pré-tratamento das amostras de plasma, tais como ultracentrifugação ou extração. Com uma placa de 96 poços um grande número de amostras pode ser quantificada ao mesmo tempo com um único equipamento.

O imunoensaio desenvolvido nesse trabalho para a determinação de anti-LDL(-) em plasma possui a vantagem de utilizar o MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-) como padrão da curva de calibração bem como a LDL(-) purificada de plasma humano como antígeno de captura. A especificidade de qualquer ELISA para análise de autoanticorpos é fortemente dependente da qualidade do antígeno adsorvido na placa, sendo a sua purificação uma etapa crucial. Se durante o processo de purificação do antígeno, um ou mais contaminantes estão presentes, pode ocorrer reação cruzada no ELISA e comprometer a especificidade do ensaio (González-Buitrago *et al.*, 2006).

No que se refere ao imunoensaio para determinação de IC-LDL(-), foi usada apenas a porção Fab do MAb 2C7D5F10 adsorvido na placa para capturar o imunocomplexo, um modelo de ELISA já utilizado por Wang *et al.* (2003). Foi utilizada esta estratégia para evitar reações cruzadas entre o MAb adsorvido na placa e o anticorpo anti-IgG humana marcado com peroxidase usado no ensaio. Adicionalmente, o uso de anti-IgG humana específico para a região Fc apresentou menor ruído de fundo em relação ao uso de anti-IgG humana total (cadeias leve e pesada) no ensaio. Apesar de ser um anti-IgG humana e o Fab adsorvido na placa ser de murino, houve reatividade cruzada entre os dois anticorpos.

Na curva de calibração de imunoensaios é necessário usar um número suficiente de padrões para definir adequadamente a relação entre concentração e resposta. De acordo com as recomendações revisadas por Shah *et al.* (2000), os imunoensaios quantitativos devem conter uma curva de calibração com um mínimo

de seis pontos de concentração. Seguindo essas recomendações, os ELISAs para determinação de LDL(-) e anti-LDL(-) foram padronizados com uma curva de calibração com 6 pontos de concentração e o ELISA para IC-LDL(-) com 7 pontos.

Conforme descrito no DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, as concentrações mais esperadas das amostras devem, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho e os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. No ELISA para LDL(-) desenvolvido no laboratório, a diluição de 1:2000 abrangeu a maior parte das amostras testadas, situando-as no centro da faixa de quantificação e houve linearidade de diluição de 1:1000 a 1:8000. Comparativamente, o kit comercial da Mercodia® utiliza amostras de plasma diluídas 1:6561 para quantificar LDL-oxi.

Devido a ausência de imunoensaios de referência para determinação de LDL(-), anti-LDL(-) e IC-LDL(-), a exatidão foi investigada pela recuperação, conforme recomendação do guia de laboratório para validação de métodos, Eurachem (1998). O teste de recuperação do ELISA para LDL(-) foi realizado adicionando o padrão de LDL(-) em uma amostra de plasma e em LDL(n). No entanto, como o padrão do ELISA para anti-LDL(-) é um anticorpo de camundongo, não foi possível adicioná-lo às amostras humanas para quantificar a recuperação. Dessa forma, foi adicionado um plasma com alta concentração de anticorpos anti-LDL(-) em um plasma com baixa concentração dos mesmos. No ELISA para IC-LDL(-) também foi adicionado um plasma com alta concentração IC-LDL(-) em um plasma com baixa concentração dos mesmos, uma vez que o padrão desse ELISA é um soro de referência. Os três ELISAs apresentaram recuperação dentro dos valores descritos como aceitáveis para imunoensaios por Findlay *et al.* (2000).

Os imunoensaios são mais propensos a interferências da matriz do que, por exemplo, os ensaios cromatográficos, pois os imunoensaios são realizados sem a extração da amostra. Alterações nas amostras como lipemia, hemólise e icterícia, podem interferir na performance de alguns ensaios. Entretanto, nos imunoensaios validados não houve interferência significativa de lipídios, hemoglobina e bilirrubina diante dos testes realizados, semelhante ao resultado obtido por Kohno *et al.* (2000) na validação de um ELISA sanduíche para LDL-oxi.

A diminuição dos valores de LDL(-) após os ciclos de congelamento/descongelamento sugere que nesse processo os epitopos das

partículas de LDL(-) podem sofrer alguma mudança conformacional. Como em qualquer ensaio, repetidos descongelamentos das amostras devem ser evitados. A amostra de plasma armazenada a -80°C apresentou estabilidade com um gradativo aumento mensal de LDL(-). Nyyssönen *et al.* (1996) demonstrou que a LDL(-) permaneceu estável em amostras de plasma armazenadas a -80°C durante 2 meses e após 1 ano houve um aumento gradual em sua concentração. No entanto, os autores não testaram o período entre 2 meses e 1 ano.

O ELISA, de um modo geral, é um ensaio que apresenta elevada sensibilidade e especificidade, bem como rapidez, baixo custo, simplicidade técnica, versatilidade, objetividade de leitura e possibilidade de adaptação a diferentes graus de automação. No entanto, outros tipos de imunoenaios começaram a emergir baseados na tecnologia de biossensores, como os imunossensores. Os imunossensores apresentam as mesmas características do ELISA, mas com a vantagem da velocidade de análise, sem necessidade das etapas de lavagem. Seguindo essa tendência, foi obtida uma proteína recombinante para ser usada no desenvolvimento de um biossensor para determinação de LDL(-), a GFP5-scFv.

Na etapa de clonagem molecular da GFP5-scFv, foi removida a sequência de DNA da proteína A pela digestão com a enzima de restrição *Xho*I. Com essa digestão foram removidos também os últimos 9 oligonucleotídeos da sequência do scFv anti-LDL(-). Isso não trouxe prejuízo a integridade e função do scFv uma vez que as CDRs (região determinante de complementariedade), responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, foram preservadas.

Foram realizados os testes para obtenção de uma maior expressão da proteína recombinante na cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Porém, a proteína expressa no presente estudo foi obtida como agregados insolúveis (corpos de inclusão), semelhante a outros trabalhos com expressão de scFv em *E. coli* (Sakamoto *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Para o enovelamento correto na forma nativa, a GFP5-scFv requer a formação de duas pontes dissulfeto, uma no domínio da cadeia pesada e outra no domínio da cadeia leve do scFv, importantes para sua estabilidade. Pontes dissulfeto são formadas pela reação de oxidação entre dois resíduos de aminoácido cisteína, mas como o citoplasma da bactéria é um ambiente redutor, as pontes dissulfeto não se formam e a proteína se acumula como corpos de inclusão (Seo *et al.*, 2009).

As cepas de *E. coli*, Origami, Origami 2 e Orgami B (Novagen®) são deficientes em algumas redutases, favorecendo a formação de pontes dissulfeto e consequentemente a solubilidade das proteínas recombinantes. Porém, as cepas Origami e Origami B são resistentes ao antibiótico kanamicina, não podendo ser utilizadas com o vetor pET-28(+), que apresenta resistência ao mesmo antibiótico, restando testar a cepa Origami 2, que é sensível à kanamicina. Outra alternativa seria expressar a GFP5-scFv em levedura, como a *Pichia pastoris*, que tem capacidade de realizar modificações pós-traducionais (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006). Mas, para isso a sequência de DNA referente a GFP5-scFv teria que ser removida do vetor bacteriano para um vetor de expressão em levedura. Contudo, a formação de corpos de inclusão não traz, necessariamente, desvantagens ao processo, pois, o produto expresso tende a ser menos tóxico para a célula hospedeira, estando protegido da digestão proteolítica. Outro ponto positivo é o fato de serem facilmente isolados por centrifugação e, geralmente, consistirem em agregados parcialmente puros da proteína superexpressa (Sambrook *et al.*, 2001).

Os resíduos de histidina da GFP5-scFv têm habilidade em se ligar com alta afinidade aos íons metálicos na resina de purificação mesmo na presença de 7 M de uréia. Sob condições desnaturantes, a cauda de histidina da proteína recombinante ficou totalmente exposta para ligação com a resina de níquel, aumentando a eficiência do procedimento de purificação e reduzindo ligações inespecíficas (Block *et al.*, 2009).

O reenovelamento de uma proteína desnaturada é desafiador e tem sido estudado por diversos grupos de pesquisa (Tsumoto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Chow *et al.*, 2006). Dos métodos avaliados para reenovelamento da GFP5-scFv, a diálise foi o mais eficiente, havendo maior recuperação de proteína ativa. Nesse método foi fundamental o uso dos aditivos L-arginina e 5 µM PSS para impedir agregação da GFP5-scFv, além da adição de glutatona oxidada para formação das pontes dissulfeto. Outro fator fundamental foi a lenta troca de tampão durante a diálise, totalizando 48 horas. Desta forma, foi possível obter aproximadamente 5 mg de proteína por litro de cultura de *E. coli* após o reenovelamento, dentro da média do rendimento (0,1 a 10 mg/L) de expressão de scFv ou GFP-scFv relatada em alguns artigos (Casey *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2001; Peipp *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2008).

A degradação de proteínas recombinantes fusionadas, do tipo GFP-scFv, já foi relatada anteriormente por Lu *et al.* (2005) e Huang *et al.* (2006). Nos géis de poli-acrilamida, além da banda de 58 kDa da GFP5-scFv, foi observada também a presença de uma banda de aproximadamente 50 kDa. É importante lembrar que a proteína GFP5-scFv possui duas caudas de histidina, uma N-terminal e outra C-terminal. A banda de 50 kDa, provavelmente, é resultante da degradação da proteína fusionada, uma vez que a sua detecção foi confirmada pelo Western blot, utilizando-se anticorpo anti-His.

A conjugação de anticorpos com marcadores fluorescentes, tradicionalmente feita por conjugação química *in vitro* de fluoróforos orgânicos, requer grandes quantidades de proteína purificada e frequentemente é problemático em termos de otimização do nível de conjugação e perda da atividade (Hermanson, 2008). A expressão da proteína recombinante com a GFP5 elimina esse problema. A luz emitida pela GFP5 é devido à presença de um cromóforo com um anel imidazólico formado pela ciclização pós-traducional do tripeptídeo Ser65-Tyr66-Gly67 na cadeia da proteína. A conversão destes aminoácidos num fluoróforo ocorre espontaneamente, sem necessidade de enzimas, apenas necessitando da presença de oxigênio. A GFP5 também apresenta a vantagem de ser altamente estável, resistindo a elevadas temperaturas e desnaturação química (Tsien *et al.*, 1998).

Inicialmente, a intenção da fusão do scFv anti-LDL(-) com GFP5 era utilizar essa biomolécula em conjunto com nanocristais fluorescentes, formando um par de fluoróforos capaz de realizar FRET seletivamente. Isto é, almejava-se um sistema no qual a presença da LDL(-) pudesse alterar os parâmetros de transferência de energia entre os nanocristais e a proteína recombinante. Nos experimentos realizados ocorreu a transferência de energia dos nanocristais para a GFP5-scFv, porém a presença da LDL(-) provocou uma alteração muito lenta e pouco significativa na eficiência do FRET. Um modo de alterar este cenário seria através da modificação da superfície dos nanocristais, incluindo ligantes capazes de promover a dissociação do complexo nanocristal/GFP5-scFv na presença da LDL(-). Entretanto, é preciso ponderar que a eficiência quântica do nanocristal é bastante influenciada pelo tipo de ligante presente em sua superfície, de modo que, seria necessário não apenas identificar ligantes sensíveis à presença da LDL(-), mas também que não provocassem acentuada redução da eficiência quântica dos nanocristais.

A estratégia, então, foi alterada em busca de nanopartículas que absorvessem a fluorescência da GFP5-scFv. Manteve-se o princípio de transferência de energia, mas nessa nova estratégia a proteína recombinante passaria a atuar como doadora de energia e as nanopartículas passariam a ser os receptores. Nessa nova estratégia a GFP5-scFv, atuando como doadora, passa a ser monitorada em função da intensidade de sua emissão e este parâmetro é potencialmente mais sensível do que a variação na intensidade da emissão sensibilizada.

Os experimentos com as nanopartículas de fosfato de cálcio e de prata mostraram que estas absorvem a fluorescência da proteína recombinante, dando sustentação à estratégia. Todavia, os resultados mais interessantes foram obtidos com as nanopartículas de ouro, pois estas possuem uma sobreposição espectral com a GFP5-scFv próxima do ideal. Alguns trabalhos, como o de Dulkeith *et al.* (2002) e Fan *et al.* (2003), relatam a forte habilidade das nanopartículas de ouro em suprimir fluorescência. A interação entre as nanopartículas de ouro sintetizadas e a GFP5-scFv resultou em 100% de supressão da fluorescência, evidenciando que essas nanopartículas são promissoras para integrarem o imunossensor.

Como continuidade desse trabalho, um protocolo de recobrimento das nanopartículas de ouro com heparina (Sun *et al.*, 2009) será executado vislumbrando a conjugação destas com a LDL, em particular LDL(-) (Krisko *et al.*, 2006), de modo a se obter complexos nanopartículas de ouro/LDL(-). Será verificado, então, se a GFP5-scFv mantém sua capacidade de interação com a LDL(-) agora complexada com as nanopartículas de ouro e, caso a interação se mantenha, esta poderá vir a ser mapeada através da supressão da fluorescência da GFP5-scFv. O conjunto GFP5-scFv/nanopartículas de ouro criaria um novo nanobiotransdutor capaz de reconhecer e detectar a LDL(-) em um único passo, sem lavagens ou separação, estabelecendo a base de funcionamento de um imunossensor óptico para quantificação de LDL(-) em plasma. Estudos adicionais de caracterização da GFP5-scFv expressa e da LDL(-) purificada do plasma também serão necessários, assim como o estudo de interação entre essas duas partículas, utilizando técnicas como espalhamento de luz (espalhamento de raios-x a baixo ângulo, espalhamento de luz estático, espalhamento de luz dinâmico), microscopia de força atômica, microgravimetria e ressonância plasmônica de superfície.

6. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidos e validados imunoensaios para determinação de LDL(-), autoanticorpos anti-LDL(-) e IC-LDL(-). Adicionalmente, obteve-se uma proteína recombinante fluorescente com afinidade pela LDL(-) e nanopartículas de ouro com potencial para serem utilizados no desenvolvimento de um biossensor para LDL(-).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº899, de 29/05/2003.

ALMEIDA, S.R.; UNTERKIRCHER, C.S.; CAMARGO, Z.P. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. **Med Mycol**, v.36, n.6, p.405-11, 1998.

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

APOLINÁRIO, E.; FERDERBAR, S.; PEREIRA, E.C.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.; MONTE, O.; GAGLIARDI, A.R.; XAVIER, H.T.; ABDALLA, D.S.P. Minimally modified (electronegative) LDL(-) and anti-LDL(-) autoantibodies in diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. **Int J Atheroscler**, v.1, n.1, p.42-47, 2006.

ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosens Bioelectron**, v.23, n.7, p.1083-100, 2008.

ASATRYAN, L.; HAMILTON, R.T.; ISAS, J.M.; HWANG, J.; KAYED, R.; SEVANIAN, A. LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein. **J Lipid Res**, v.46, n.1, p.115-22, 2005.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: John Wiley & Sons, 2003.

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

BARROS, M.R.; BERTOLAMI, M.C.; ABDALLA, D.S.; FERREIRA, W.P. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. **Atherosclerosis**, v.184, n.1, p.103-7, 2006.

BASTA, G.; SCHMIDT, A.M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res**, v.63, n.4, p.582-92, 2004.

BEATTY, J.D.; BEATTY, B.G.; VLAHOS, W.G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. **J Immunol Methods**, v.100, n.1-2, p.173-9, 1987.

BENÍTEZ, S.; CAMACHO, M.; BANCELLS, C.; VILA, L.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Wide proinflammatory effect of electronegative low-

density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. **Biochim Biophys Acta**, v.1761, n.9, p.1014-21, 2006.

BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; FRANCO, M.; MARÍN, C.; PAZ, E.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; OTAL, C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, F.; SANCHEZ-QUESADA, J.L. Effect of simvastatin in familial hypercholesterolemia on the affinity of electronegative low-density lipoprotein subfractions to the low-density lipoprotein receptor. **Am J Cardiol**, v.93, n.4, p.414-20, 2004.

BENÍTEZ, S.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; RIBAS, V.; JORBA, O.; BLANCO-VACA, F.; GONZALEZ-SASTRE, F.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. **Circulation**, v.108, n.1, p.92-6, 2003.

BENÍTEZ, S.; VILLEGAS, V.; BANCELLS, C.; JORBA, O.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. Impaired binding affinity of electronegative low density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. **Biochemistry**, v.43, n.50, p.15863-72, 2004.

BERLINER, J.A.; HEINECKE, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radic Biol Med**, v.20, n.5, p.707-27, 1996.

BEVAN, R.J.; DURAND, M.F.; HICKENBOTHAM P.T.; KITAS, G.D.; PATEL, P.R.; PODMORE, I.D.; GRIFFITHS, H.R.; WALLER, H.L.; LUNEC, J. Validation of a novel ELISA for measurement of MDA-LDL in human plasma. **Free Radic Biol Med**, v.35, n.5, p.517-27, 2003.

BING, H.; WANG, J.; ZHANG, C.; CAI, H. Positive correlation between *in vivo* oxidized LDL and LDL immune complexes. **Clin Biochem**, v.37, n.1, p.72-5, 2004.

BIRD, R.E.; HARDMAN, K.D.; JACOBSON, J.W.; JOHNSON, S.; KAUFMAN, B.M.; LEE, S.M.; LEE, T.; POPE, S.H.; RIORDAN, G.S.; WHITLOW, M. Single-chain antigen-binding proteins. **Science**, v.242, n.4877, p.423-6, 1988.

BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERSBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; LABAHN, J.; SCHÄFER, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods Enzymol**, v.463, p.439-73, 2009.

BOULLIER, A.; HAMON, M.; WALTERS-LAPORTE, E.; MARTIN-NIZART, F.; MACKEREEL, R.; FRUCHART, J.C.; BERTRAND, M.; DURIEZ, P. Detection of autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins and of IgG-bound low density lipoproteins in patients with coronary artery disease. **Clin Chim Acta**, v.238, n.1, p.1-10, 1995.

BROWN, B.E.; RASHID, I.; VAN REYK, D.M.; DAVIES, M.J. Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. **FEBS J**, v.274, n.6, p.1530-41, 2007.

CAO, M.; CAO, P.; YAN, H.; REN, F.; LU, W.; HU, Y.; ZHANG, S. Construction and characterization of an enhanced GFP-tagged anti-BAFF scFv antibody. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.79, n.3, p.423-31, 2008.

CASEY, J.L.; COLEY, A.M.; TILLEY, L.M.; FOLEY, M. Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools. **Protein Eng**, v.13, n.6, p.445-52, 2000.

CAZZOLATO, G; AVOGARO, P; BITTOLO-BON, G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. **Free Radic Biol Med**, v.11, n.247-53, 1991.

CEMBROWSKI, G.S.; SULLIVAN, A.M.; HOFER, T.L. Quality control and statistics. In: BISHOP, M.L.; DUBEN-ENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P. **Clinical chemistry: principles, procedures, correlations**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, cap.3, p.40-76.

CHANG, Y.H.; ABDALLA, D.S.P.; SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. **Free Radic Biol Med**, v.23, n.2, p.202-14, 1997.

CHEN, C.H.; JIANG, T.; YANG, J.H.; JIANG, W.; LU, J.; MARATHE, G.K.; POWNALL, H.J.; BALLANTYNE, C.M.; MCINTYRE, T.M.; HENRY, P.D.; YANG, C.Y. Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. **Circulation**, v.107, n.16, p.2102-8, 2003.

CHEN, L.H.; HUANG, Q.; WAN, L.; ZENG, L.Y.; LI, S.F.; LI, Y.P.; LU, X.F.; CHENG, J.Q. Expression, purification, and *in vitro* refolding of a humanized single-chain Fv antibody against human CTLA4 (CD152). **Protein Expr Purif**, v.46, n.2, p.495-502, 2006.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nat Protoc**, v.1, n.4, p.1852-8, 2006.

CHOI, S.H.; HARKEWICZ, R.; LEE, J.H.; BOULLIER, A.; ALMAZAN, F.; LI, A.C.; WITZTUM, J.L.; BAE, Y.S.; MILLER, Y.I. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. **Circ Res**, v.104, n.12, p.1355-63, 2009.

CHOU, M.Y.; FOGELSTRAND, L.; HARTVIGSEN, K.; HANSEN, L.F.; WOELKERS, D.; SHAW, P.X.; CHOI, J.; PERKMANN, T.; BÄCKHED, F.; MILLER, Y.I.; HÖRKKÖ, S.; CORR, M.; WITZTUM, J.L.; BINDER, C.J. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. **J Clin Invest**, v.119, n.5, p.1335-49, 2009.

CHOW, M.K.; AMIN, A.A.; FULTON, K.F.; WHISSTOCK, J.C.; BUCKLE, A.M.; BOTTOMLEY, S.P. REFOLD: an analytical database of protein refolding methods. **Protein Expr Purif**, v.46, n.1, p.166-71, 2006.

CLEGG, R.M. Fluorescence resonance energy transfer. In: WANG, X.F.; HERMAN, B. **Fluorescence imaging spectroscopy and microscopy**. New York: John Wiley, 1996, p.179-252.

DAMASCENO, N.R.; SEVANIAN, A.; APOLINARIO, E.; OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, I.; ABDALLA, D.S. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clin Biochem**, v.39, n.1, p.28-38, 2006.

DAMASCENO, N.R.T.; APOLINÁRIO, E.; OLIVEIRA, J.M.A.; FERNANDES, I.; ABDALLA, D.S.P. Biomarcador da modificação oxidativa da LDL *in vivo*. **RBAC**, v.34, n.3, p.115-20, 2002.

DATASUS. Estatísticas vitais – mortalidade geral de 1998 a 2007. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2010.

DE CASTELLARNAU, C.; BANCELLS, C.; BENITEZ, S.; REINA, M.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J.; SANCHEZ-QUESADA, J.L. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions. **Clin Chim Acta**, v.376, n.1-2, p.233-6, 2007.

DE CASTELLARNAU, C.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; BENÍTEZ, S.; ROSA, R.; CAVEDA, L.; VILA, L.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.10, p.2281-7, 2000.

DEMUTH, K.; MYARA, I.; CHAPPEY, B.; VEDIE B.; PESCH-AMSELLEM, M.A.; HABERLAND, M.E.; MOATTI, N. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.16, n.6, p.773-83, 1996.

DETRY, B.; NULLENS, W.; CAO, M.L.; FRANS, A.; ROBERT, A.; CLERBAUX, T. Assessment of the lactate biosensor methodology. **Eur Respir J**, v.11, n.1, p.183-7, 1998.

DIAMANDIS, E.P.; CHRISTOPOULOS, T.K. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. **Clin Chem**, v.37, n.5, 625-36, 1991.

DOUMA, K.; PRINZEN, L.; SLAAF, D.W.; REUTELINGSPERGER, C.P.; BIESSEN, E.A.; HACKENG, T.M.; POST, M.J.; VAN ZANDVOORT, M.A. Nanoparticles for optical molecular imaging of atherosclerosis. **Small**, v.5, n.5, p.544-57, 2009.

DULKEITH, E.; MORTEANI, A.C.; NIEDEREICHHOLZ, T.; KLAR, T.A.; FELDMANN, J.; LEVI, S.A.; VAN VEGGEL, F.C.; REINHOUDT, D.N.; MÖLLER, M.; GITTINS, D.I. Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects. **Phys Rev Lett**, v.89, n.20, 2002.

EHARA, S.; UEDA, M.; NARUKO, T.; HAZE, K.; ITOH, A.; OTSUKA, M.; KOMATSU, R.; MATSUO, T.; ITABE, H.; TAKANO, T.; TSUKAMOTO, Y.; YOSHIYAMA, M.; TAKEUCHI, K.; YOSHIKAWA, J.; BECKER, A.E. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity acute coronary syndromes. **Circulation**, v.103, n.15, p.1955-60, 2001.

EIDEM, J.K.; KLEIVDAL, H.; KROLL, K.; DENSLOW, N.; VAN AERLE, R.; TYLER, C.; PANTER, G.; HUTCHINSON, T.; GOKSOYR, A. Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. **Aquat Toxicol**, v.78, n.2, p.202-6, 2006.

ERKKILÄ, A.T.; NÄRVÄNEN, O.; LEHTO, S.; UUSITUPA, M.I.J.; YLÄ-HERTTUALA, S. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and cardiolipin in patients with coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.1, p.204-9, 2000.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**. A laboratory guide to method validation and related topics 1998; 61p.

FAN, C.; WANG, S.; HONG, J.W.; BAZAN, G.C.; PLAXCO, K.W.; HEEGER, A.J. Beyond superquenching: hyper-efficient energy transfer from conjugated polymers to gold nanoparticles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.11, p.6297-301, 2003.

FINDLAY, J.W.; SMITH, W.C.; LEE, J.W.; NORDBLOM, G.D.; DAS, I.; DESILVA, B.S.; KHAN, M.N.; BOWSHER, R.R. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. **J Pharm Biomed Anal**, v.21, n.6, p.1249-73, 2000.

FRALEY, A.E.; TSIMIKAS, S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. **Curr Opin Lipidol**, v.17, n.5, p.502-9, 2006.

GERSH BJ, SLIWA K, MAYOSI BM, YUSUF S. The epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. **Eur Heart J**. 2010. [no prelo]

GHASEMI, Y.; PEYMANI, P.; AFIFI, S. Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting. **Acta Biomed**, v.80, n.2, p.156-65, 2009.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J.M.; GONZÁLEZ, C. Present and future of the autoimmunity laboratory. **Clin Chim Acta**, v.365, n.1-2, p.50-7, 2006.

GOUNOPOULOS, P.; MERKI, E.; HANSEN, L.F.; CHOI, S.H.; TSIMIKAS, S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. **Minerva Cardioangiol**, v.55, n.6, p.821-37, 2007.

GRECO, G.; BALOGH, G.; BRUNELLI, R.; COSTA, G.; DE SPIRITO, M.; LENZI, L.; MEI, G.; URSINI, F.; PARASASSI, T. Generation in human plasma of misfolded, aggregation-prone electronegative low density lipoprotein. **Biophys J**, v.97, n.2,

p.628-35, 2009.

GRIFFIN, B. A.; CASLAKE, M.J.; YIP, B.; TAIT, G.W.; PACKARD, C.J.; SHEPERD, J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. **Atherosclerosis**, v.83, n.1, p.59-67, 1990.

HAJIGHASEMI, F.; SABOOR-YARAGHI, A.A.; SHOKRI, F. Measurement of affinity constant of anti-human IgG monoclonal antibodies by an ELISA-based method. **Iran J Immunol**, v.1, n.3, p.154-61, 2004.

HAMADA, H.; ARAKAWA, T.; SHIRAKI, K. Effect of additives on protein aggregation. **Curr Pharm Biotechnol**, v.10, n.4, p.400-7, 2009.

HARKISS, G.D.; BROWN, D.L. Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC). **Clin Exp Immunol**, v.36, n.1, p.117-29, 1979.

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

HEALY, D.A.; HAYES, C.J.; LEONARD, P.; MCKENNA, L.; O'KENNEDY, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. **Trends Biotechnol**, v.25, n.3, p.125-31, 2007.

HERING, V.R.; FAULIN, T.E.S.; TRIBONI, E.R.; RODRIGUEZ, S.D.; BERNIK, D.L.; SCHUMACHER, R.I.; MAMMANA, V.P.; FALJONI-ALARIO, A.; ABDALLA, D.S.P.; GIBSON, G.; POLITI, M.J. Violet ZnSe/ZnS as an alternative to green CdSe/ZnS in nanocrystal-fluorescent protein FRET systems. **Bioconjug Chem**, v.20, n.6, p.1237-41, 2009.

HERING, V.R.; GIBSON, G.; SCHUMACHER, R.I.; FALJONI-ALARIO, A.; POLITI, M.J. Energy transfer between CdSe/ZnS core/shell quantum dots and fluorescent proteins. **Bioconjug Chem**, v.18, n.6, p.1705-8, 2007.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2008. p.816-822.

HEVONOJA, T.; PENTIKAINEN, M.O.; HYVONEN, M.T.; KOVANEN, P.T.; ALAKORPELA, M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.3, p.189-210, 2000.

HODIS, H.N.; KRAMSCH, D.M.; AVOGARRO, P.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO, G.; HWANG, J.; PETERSON, H.; SEVANIAN, A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). **J Lipid Res**, v.35, n.4, p.669-77, 1994.

HOLVOET P, COLLEN D, VAN DE WERF F. Malondialdehyde-modified LDL as a

marker of acute coronary syndromes. **JAMA**, v. 281, n.18, p. 1718-21, 1999.

HOLVOET, P.; MERTENS, A.; VERHAMME, P.; BOGAERTS, K.; BEYENS, G.; VERHAEGHE, R.; COLLEN, D.; MULS, E.; VAN DE WERF, F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.21, n.5, p.844-8, 2001.

HOLVOET, P.; MACY, E.; LANDELOOS, M.; JONES, D.; JENNY, N.S.; VAN DE WERF, F.; TRACY, R.P. Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of circulating oxidized LDL. **Clin Chem**, v.52, n.4, p.760-4, 2006.

HOLVOET, P.N., COLLEN, D.J. Assays, antibodies, and standards for detection of oxidized and MDA-modified low density lipoproteins. **BE Pat. 9859248**, 1998-12-30. 72p.

HUANG, D.; SHUSTA, E.V. A yeast platform for the production of single-chain antibody-green fluorescent protein fusions. **Appl Environ Microbiol**, v.72, n.12, p.7748-59, 2006.

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.22, n.7, p.1162-7, 2002.

IBII, T.; KAIEDA, M.; HATAKEYAMA, S.; SHIOTSUKA, H.; WATANABE, H.; UMETSU, M.; KUMAGAI, I.; IMAMURA, T. Direct Immobilization of Gold-Binding Antibody Fragments for Immunosensor Applications. **Anal Chem**, 2010 [no prelo].

INMETRO DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos** 2003; 35p.

INSULL, W. Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **Am J Med**, v.122, n.1A, p.3-14, 2009.

ITABE, H.; KIMURA, J.; UCHIYAMA, H.; SHIMAMURA, K.; TAKANO, T. Measuring method for Homo sapiens oxidation lipoprotein. **JP Pat 8304395**, 1996-11-22. 8p.

ITABE, H.; TAKESHIMA, E.; IWASAKI, H.; KIMURA, J.; YOSHIDA, Y.; IMANAKA, T.; TAKANO, T. A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. **J Biol Chem**, v.269, n.21, p.15274-9, 1994.

ITABE, H.; UEDA, M. Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications. **J Atheroscler Thromb**, v.14, n.1, p.1-11, 2007.

ITABE, H.; YAMAMOTO, H.; SUZUKI, M.; KAWAI, Y.; NAKAGAWA, Y.; SUZUKI, A.; IMANAKA, T.; TAKANO, T. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein. **J Biol**

Chem, v.271, n.52, p.33208-17, 1996.

JAYARAMAN, S.; GANTZ, D.L.; GURSKY, O. Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein. **Biochemistry**, v.46, n.19, p.5790-7, 2007.

JIE, G.; LIU, B.; PAN, H.; ZHU, J.J.; CHEN, H.Y. CdS nanocrystal-based electrochemiluminescence biosensor for the detection of low-density lipoprotein by increasing sensitivity with gold nanoparticle amplification. **Anal Chem**, v.79, n.15, p.5574-81, 2007.

KARVONEN, J.; PÄIVÄNSALO, M.; KESÄNIEMI, Y.A.; HÖRKKÖ, S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. **Circulation**, v.108, n.17, p.2107-12, 2003.

KELLEY, L.A.; STERNBERG, M.J.E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v.4, n.3, p.363-71, 2009.

KIM, Y.R.; KIM, J.S.; LEE, S.H.; LEE, W.R.; SOHN, J.N.; CHUNG, Y.C.; SHIM, H.K.; LEE, S.C.; KWON, M.H.; KIM, Y.S. Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. **J Biol Chem**, v.281, n.22, p.15287-95, 2006.

KOCH, D.D.; DABCC; JR, P.T. Evaluation of methods – with an introduction to statistical techniques. In: TIETZ, N.W.; BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Fundamentals of clinical chemistry**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, cap.13, p.234-249.

KOHNO, H.; SUESHIGE, N.; OGURI, K.; IZUMIDATE, H.; MASUNARI, T.; KAWAMURA, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; HASEGAWA, A.; NAGAI, R. Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidized phosphatidylcholine monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody. **Clin Biochem**, v.33, n.4, p.243-53, 2000.

KOSKINEN, S.; ENOCKSON, C.; LOPES-VIRELLA, M.F.; VIRELLA, G. Preparation of a human standard for determination of the levels of antibodies to oxidatively modified low-density lipoproteins. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.5, n.6, p.817-22, 1998.

KRISKO, A.; PIANTANIDA, I.; KVEDER, M.; PIFAT, G.; LEE, A.; GREILBERGER, J.; KIPMEN-KORGUN, D.; JÜRGENS, G. The effect of heparin on structural and functional properties of low density lipoproteins. **Biophys Chem**, v.119, n.3, p.234-9, 2006.

KUNJATHOOR, V.V.; FEBBRAIO, M.; PODREZ, E.A.; MOORE, K.J.; ANDERSSON, L.; KOEHN, S.; RHEE, J.S.; SILVERSTEIN, R.; HOFF, H.F.; FREEMAN, M.W. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal

receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. **J Biol Chem**, v.277, n.51, p.49982-8, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-5, 1970.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. New York: Springer Science, 2006. p.443-475.

LAN, G.Y.; LIN, Y.W.; HUANG, Y.F.; CHANG, H.T. Photo-assisted synthesis of highly fluorescent ZnSe(S) quantum dots in aqueous solution. **J Mater Chem**, v.17, n.25, p.2661-66, 2007.

LANGONE, J.J.; BOYLE, M.D.; BORSOS, T. Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. Effect of protein A on the functional activity of IgG. **J Immunol**, v.121, n.1, p.327-32, 1978.

LAPIENE, V.; KUKOLKA, F.; KIKO, K.; ARNDT, A.; NIEMEYER, C.M. Conjugation of fluorescent proteins with DNA oligonucleotides. **Bioconjug Chem**, v.21, n.5, p.921-7, 2010.

LEONARDUZZI, G.; CHIARPOTTO, E.; BIASI, F.; POLI, G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. **Mol Nutr Food Res**, v.49, n.11, p.1044-9, 2005.

LIMSAVARN, L.; SRITAVEESINSUB, V.; DUBAS, S. T. Polyelectrolyte assisted silver nanoparticles synthesis and thin film formation. **Materials Letters**, v.61, n.14-15, p.3048-51, 2007.

LIN, J.; JU, H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosens Bioelectron**, v.20, n.8, p.1461-70, 2005.

LIU, M.; WANG, X.; YIN, C.; ZHANG, Z.; LIN, Q.; ZHEN, Y.; HUANG, H. One-step on-column purification and refolding of a single-chain variable fragment (scFv) antibody against tumour necrosis factor alpha. **Biotechnol Appl Biochem**, v.43, n.3, p.137-45, 2006.

LOBO, J.; SANTOS, F.; GROSSO, D.; LIMA, R.; BARREIRA, A.L.; LEITE, M. Jr.; MAFRA, D.; ABDALLA, D.S.P. Electronegative LDL and lipid abnormalities in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. **Nephron Clin Pract**, v.108, n.4, p.298-304, 2008.

LOPES-VIRELLA, M.F.; BINZAFAR, N.; RACKLEY, S.; TAKEI, A.; LA VIA, M.; VIRELLA, G. The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the FcγRI receptor. **Atherosclerosis**, v.135, n.2, p.161-70, 1997.

LOPES-VIRELLA, M.F.; GRIFFITH, R.L.; SHUNK, K.A.; VIRELLA, G.T. Enhanced uptake and impaired intracellular metabolism of low density lipoprotein complexed with anti-low density lipoprotein antibodies. **Arterioscler Thromb**, v.11, n.5, p.1356-

67, 1991.

LOPES-VIRELLA, M.F.; KOSKINEN, S.; MIRONOVA, M.; HORNE, D.; KLEIN, R.; CHASSEREAU, C.; ENOCKSON, C.; VIRELLA, G. The preparation of copper-oxidized LDL for the measurement of oxidized LDL antibodies by EIA. **Atherosclerosis**, v.152, n.1, p.107-15, 2000.

LOPES-VIRELLA, M.F.; MCHENRY, M.B.; LIPSITZ, S.; YIM, E.; WILSON, P.F.; LACKLAND, D.T.; LYONS, T.; JENKINS, A.J.; VIRELLA, G.; DCCT/EDIC Research Group. Immune complexes containing modified lipoproteins are related to the progression of internal carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes. **Atherosclerosis**, v.190, n.2, p.359-69, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, n.1, p. 265-75, 1951.

LU, H.; KREUZER, M.P.; TAKKINEN, K.; GUILBAULT, G.G. A recombinant Fab fragment-based electrochemical immunosensor for the determination of testosterone in bovine urine. **Biosens Bioelectron**, v.22, n.8, p.1756-63, 2007.

LU, M.; GONG, X.G.; YU, H.; LI, J.Y. Cloning, expression, purification, and characterization of LC-1 ScFv with GFP tag. **J Zhejiang Univ Sci B**, v.6, n.8, p.832-7, 2005.

LUONG, J.H.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnol Adv**, v.26, n.5, p.492-500, 2008.

LUPPA, P.B.; SOKOLL, L.J.; CHAN, D.W. Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry. **Clin Chim Acta**, v.314, n.1-2, p.1-26, 2001.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v.22, n.4, p.249-70, 2005.

MAGLIULO, M.; MIRASOLI, M.; SIMONI, P.; LELLI, R.; PORTANTI, O.; RODA, A. Development and validation of an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk. **J Agric Food Chem**, v.53, n.9, p.3300-5, 2005.

MAPLE, L.; LATHROP, R.; BOZICH, S; HARMAN, W.; TACEY, R.; KELLEY, M.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A. Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum. **J Immunol Methods**, v.295, n.1-2, p.169-82, 2004.

MARANHÃO, A.Q. Transformação bacteriana. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Universidade de Brasília, 2003, cap VIII, p.129-41.

MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; HURLEY, B.L.; LOPEZ, L.R. Atherogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I (oxLDL/beta2GPI) complexes in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. **Lupus**, v.15, n.7, p.478-83, 2006.

MAXWELL, D.J.; TAYLOR, J.R.; NIE, S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. **J Am Chem Soc**, v.124, n.32, p.9606-12, 2002.

MEISINGER, C.; BAUMERT, J.; KHUSEYINOVA, N.; LOEWEL, H.; KOENIG, W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. **Circulation**, v.112, n.5, p.651-7, 2005.

MILLER, Y.I.; VIRIYAKOSOL, S.; BINDER, C.J.; FERAMISCO, J.R.; KIRKLAND, T.N.; WITZTUM, J.L. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. **J Biol Chem**, v.278, n.3, p.1561-8, 2003.

MIRONOVA, M.A.; KLEIN, R.L.; VIRELLA, G.T.; LOPES-VIRELLA, M.F. Anti-modified LDL antibodies, LDL-containing immune complexes, and susceptibility of LDL to *in vitro* oxidation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.49, n.6, p.1033-41, 2000.

NEGRE-SALVAYRE, A.; VIEIRA, O.; ESCARGUEIL-BLANC, I.; SALVAYRE, R. Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. **Mol Aspects Med**, v.24, n.4-5, p.251-61, 2003.

NELSON, P.N.; REYNOLDS, G.M.; WALDRON, E.E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P.G. Monoclonal antibodies. **Mol Pathol**, v.53, n.3, p.111-7, 2000.

NILSSON, J.; HANSSON, G.K.; SHAH, P.K. Immunomodulation of atherosclerosis – implications for vaccine development. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.1, p.18-28, 2005.

NYSSÖNEN, K.; KAIKKONEN, J.; SALONEN, J.T. Characterization and determinants of an electronegatively charged low-density lipoprotein in human plasma. **Scand J Clin Lab Invest**, v.56, n.8, p.681-9, 1996.

OLIVEIRA, J.A.; SEVANIAN, A.; RODRIGUES, R.J.; APOLINARIO, E.; ABDALLA, D.S. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. **Clin Biochem**, v.39, n.7, p.708-14, 2006.

OREKHOV, A.N.; KALENICH, O.S.; TERTOV, V.V.; PEROVA, N.V.; NOVIKOV, I.Y.D.; LYAKISHEV, A.A.; DEEV, A.D.; RUDA, M.Y.A. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis. **J Cardiovasc Risk**, n.2, v.5, p.459-66, 1995.

ORMÖ, M.; CUBITT, A.B.; KALLIO, K.; GROSS, L.A.; TSIEN, R.Y.; REMINGTON, S.J. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. **Science**, v.273, n.5280, p.1392-5, 1996.

PACKARD, R.R.; LICHTMAN, A.H.; LIBBY, P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. **Semin Immunopathol**, v.31, n.1, p.5-22, 2009.

PALINSKI, W.; ORD, V.A.; PLUMP, A.S. BRESLOW, J.L.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Arterioscler Thromb**, v.14, n.4, p.605-16, 1994.

PARASASSI, T.; BITTOLO-BON, G.; BRUNELLI, R.; CAZZOLATO, G.; KRASNOWSKA, E.K.; MEI, G.; SEVANIAN, A.; URSINI, F. Loss of apo-B secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL-. **Free Radic Biol Med**, v.31, n.1, p. 82–9, 2001.

PARHAM, P. Preparation and purification of active fragments from mouse monoclonal antibodies. In: WEIR, D.M. **Handbook of experimental immunology**. 3.ed. St. Louis: Blackwell Scientific Publications, 1978, v.1, cap.14, p.2-16.

PEDROSA, A.M.; FAINE, L.A.; GROSSO, D.M.; DE LAS HERAS, B.; BOSCA, L.; ABDALLA, D.S. Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: Involvement of Nrf2. **Biochim Biophys Acta**, v.1801, n.4, p.430-7, 2010.

PEIPP, M.; SAUL, D.; BARBIN, K.; BRUENKE, J.; ZUNINO, S.J.; NIEDERWEIS, M.; FEY, G.H. Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications. **J Immunol Methods**, v.285, n.2, p.265-80, 2004.

PENN, S.G.; HE, L.; NATAN, M.J. Nanoparticles for bioanalysis. **Curr Opin Chem Biol**, v.7, n.5, p.609-15, 2003.

PENTIKÄINEN, M.O.; ÖÖRNI, K.; ALA-KORPELA, M.; KOVANEN, P.T. Modified LDL – trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. **J Intern Med**, v.247, n.3, p.359-70, 2000.

PETERSON, E.; OWENS, S.M.; HENRY, R.L. Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse. **AAPS J**, v.8, n.2, p.383-90, 2006.

PETERSON, N.C.; PEAHEY, J.E. Comparison of *in vitro* monoclonal antibody production methods with an *in vivo* ascites production technique. **Contemp Top Lab Anim Sci**, v.37, n.5, p.61-6, 1998.

PICKETT, N.L.; O'BRIEN, P. Syntheses of semiconductor nanoparticles using single-molecular precursors. **Chem Rec**, v.1, n.6, p.467-79, 2001.

PODREZ, E.A.; FEBBRAIO, M.; SHEIBANI, N.; SCHMITT, D.; SILVERSTEIN, R.L.; HAJJAR, D.P.; COHEN, P.A.; FRAZIER, W.A.; HOFF, H.F.; HAZEN, S.L. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. **J Clin Invest**, v.105, n.8, p.1095-1108, 2000.

PRASSL, R.; LAGGNER, P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. **Eur Biophys J**, v.38, n.2, p.145-58, 2009.

RADULESCU, L.; STANCU, C.; ANTOHE, F. Antibodies against human oxidized low-density lipoprotein (LDL) as markers for human plasma modified lipoproteins. **Med Sci Monit**, v.10, n.7, p.207-14, 2004.

REDDY, K.R.C.; LILIE, H.; RUDOLPH, R.; LANGE, C. L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. **Protein Sci**, v.14, n.4, p.929-35, 2005.

REDGRAVE, T.G.; ROBERTS, D.C.; WEST, C.E. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. **Anal Biochem**, v.65, n.1-2, p.42-9, 1975.

REILLY, R.B.; LEE, T.C. Biosensors. **Stud Health Technol Inform**, v.152, p.109-18, 2010.

REISS, A.B.; ANWAR, K.; WIRKOWSKI, P. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis: a brief review. **Curr Med Chem**, v.16, n.21, p.2641-52, 2009.

REN, X.; GAO, S.; YOU, D.; HUANG, H.; LIU, Z.; MU, Y.; LIU, J.; ZHANG, Y.; YAN, G.; LUO, G.; YANG, T.; SHEN, J. Cloning and expression of a single-chain catalytic antibody that acts as a glutathione peroxidase mimic with high catalytic efficiency. **Biochem J**, v.359, n.2, p.369-74, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, v.27, n.5, p.771-80, 2004.

SAAD, A.F.; VIRELLA, G.; CHASSEREAU, C.; BOACKLE, R.J.; LOPES-VIRELLA, M.F. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. **J Lipid Res**, v.47, n.9, p.1975-83, 2006.

SAERENS, D.; HUANG, L.; BONROY, K.; MUYLDERMANS, S. Antibody Fragments as Probe in Biosensor Development. **Sensors**, v.8, n.8, p.4669-86, 2008.

SAKAMOTO, S.; TAURA, F.; PUTALUN, W.; PONGKITWITOON, B.; TSUCHIHASHI, R.; MORIMOTO, S.; KINJO, J.; SHOYAMA, Y.; TANAKA, H. Construction and expression of specificity-improved single-chain variable fragments against the bioactive naphthoquinone, plumbagin. **Biol Pharm Bull**, v.32, n.3, p.434-9, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Clonning: A Laboratory Manual**. 3ª Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap.2, p.9-45.

SANCHEZ, W.; GOIN, C.; BRION, F.; OLSSON, P.E.; GOKSØYR, A.; PORCHER, J.M. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. **Comp Biochem Physiol**, v.147, n.1, p.129-37, 2008.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; BENITEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v.15, n.3, p.329-35, 2004.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; CAMACHO, M.; ANTON, R.; BENITEZ, S.; VILA, L.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v.166, n.2, p.261-70, 2003.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; OTAL-ENTRAIGAS, C.; FRANCO, M.; JORBA, O.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; BLANCO-VACA, F.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Am J Cardiol**, v.84, n.6, p.655-9, 1999.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; PÉREZ, A.; CAIXÀS, A.; ORDÓNMEZ-LLANOS, J.; CARRERAS, G.; PAYÉS, A.; GONZÁLEZ-SASTRE, F.; DE LEIVA, A. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. **Diabetologia**, v.39, n.12, p.1469-76, 1996.

SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; PÉREZ, A.; CAIXÀS, A.; RIGLA, M.; PAYÉS, A.; BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. **J Clin Endocrinol Metab**, n.86, v.7, p.3243-9, 2001.

SCHWIERTZ, J.; WIEHE, A.; GRÄFE, S.; GITTER, B.; EPPLE, M. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. **Biomaterials**, v.30, n.19, p.3324-31, 2009.

SEO MJ, JEONG KJ, LEYSATH CE, ELLINGTON AD, IVERSON BL, GEORGIU G. Engineering antibody fragments to fold in the absence of disulfide bonds. **Protein Sci**, v.18, n.2, p.259-67, 2009.

SEVANIAN, A.; BITTOLO-BON, G.; CAZZOLATO G.; HODIS, H.; HWANG, J.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M.; URSINI, F. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched

circulating lipoprotein. **J Lipid Res**, v.38, n.3, p.419-28, 1997.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N.; POWELL, M.L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A. Bioanalytical method validation - a revisit with a decade of progress. **Pharm Res**, v.17, n.12, 1551-7, 2000.

SHASHKIN, P.; DRAGULEV, B.; LEY, K. Macrophage differentiation to foam cells. **Curr Pharm Des**, v.11, n.23, p.3061-72, 2005.

SHEN, Z.; MERNAUGH, R.L.; YAN, H.; YU, L.; ZHANG, Y.; ZENG, X. Engineered recombinant single-chain fragment variable antibody for immunosensors. **Anal Chem**, v.77, n.21, p.6834-42, 2005.

SHIMADA, K.; MOKUNO, H.; MATSUNAGA, E.; MIYAZAKI, T.; SUMIYOSHI, K.; MIYAUCHI, K.; DAIDA, H. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.174, n.2, p.343-7, 2004.

SHOJI, T.; NISHIZAWA, Y.; FUKUMOTO, M.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; KANDA, H.; EMOTO, M. KAWAGISHI, T.; MORII, H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. **Atherosclerosis**, v.148, n.1, p.171-7, 2000.

SIEMERING, K.R.; GOLBIK, R.; SEVER, R.; HASELOFF, J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. **Curr Biol**, v.6, n.12, p.1653-63, 1996.

STEINBERG, D. Lewis A: Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. **Circulation**, v.95, n.4, p.1062-71, 1997.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.G.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**, v.320, n.14, p.915-24, 1989.

STOCKER, R.; KEANEY, J.R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v.84, n.4, p.1381-1478, 2004.

STOLL, G.; BENDSZUS, M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. **Stroke**, v.37, n.7, p.1923-32, 2006.

SUN, I.C.; EUN, D.K.; NA, J.H.; LEE, S.; KIM, I.J.; YOUN, I.C.; KO, C.Y.; KIM, H.S.; LIM, D.; CHOI, K.; MESSERSMITH, P.B.; PARK, T.G.; KIM, S.Y.; KWON, I.C.; KIM, K.; AHN, C.H. Heparin-coated gold nanoparticles for liver-specific CT imaging. **Chemistry**, v.15, n.48, p.13341-7, 2009.

SUZUKI, T.; KOHNO, H.; HASEGAWA, A.; TOSHIMA, S.; AMAKI, T.; KURABAYASHI, M.; NAGAI, R.; SHIMADA, K.; NAKAMURA, H.; TERAMOTO, T.; YAMAGUCHI, H.; NISHIYAMA, S.; TAKAHASHI, H.; MICHISHITA, I.; SUGANO, Z.;

KONOSHI, K.; Clinical Trial of Oxidized LDL (CTOL) investigators. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. **Clin Biochem**, v.35, n.5, p.347-53, 2002.

TANAGA, K.; BUJO, H.; INOUE, M.; MIKAMI, K.; KOTANI, K.; TAKAHASHI, K.; KANNO, T.; SAITO, Y. Increased circulating malondialdehyde-modified LDL levels in patients with coronary artery diseases and their association with peak sizes of LDL particles. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.22, n.4, p.662-6, 2002.

TAUTZ, D.; RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. **Anal Biochem**, v.132, n.1, p.14-9, 1983.

TELLES, A.E.R. **Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) anti-LDL eletronegativa em *Pichia pastoris***. 90p. São Paulo, 2008. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. IUPAC: Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl Chem**, v.74, n.5, p.835–855, 2002.

TOMASIK, A.; JACHEĆ, W.; SKRZEP-POLOCZEK, B.; WIDERA-ROMUK, E.; WODNIECKI, J.; WOJCIECHOWSKA, C. Circulating electronegatively charged low-density lipoprotein in patients with angiographically documented coronary artery disease. **Scand J Clin Lab Invest**, v.63, n.4, p.259-65, 2003.

TOSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; KURABAYASHI, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; SUGANO, J.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; MICHISHITA, I.; SUZUKI, T.; NAGAI, R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels - a biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.10, p.2243-2247, 2000.

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annu Rev Biochem**, v.67, p.509-44, 1998.

TSUMOTO, K.; UMETSU, M.; KUMAGAI, I.; EJIMA, D.; PHILO, J.S.; ARAKAWA, T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. **Biotechnol Prog**, v.20, n.5, p.1301-8, 2004.

TSUMOTO, K.; UMETSU, M.; YAMADA, H.; ITO, T.; MISAWA, S.; KUMAGAI, I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. **Protein Eng**, v.16, n.7, p.535-41, 2003.

TURNER, A.P.; CHEN, B.; PILETSKY, S.A. *In vitro* diagnostics in diabetes: meeting the challenge. **Clin Chem**, v.45, n.9, p.1596-601, 1999.

UMETSU, M.; TSUMOTO, K.; HARA, M.; ASHISH, K.; GODA, S.; ADSCHIRI, T.; KUMAGAI, I. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient

refolding of a single-chain Fv fragment. **J Biol Chem**, v.278, n.11, p.8979-87, 2003.

URSINI, F.; DAVIES, K.J.; MAIORINO, M.; PARASASSI, T.; SEVANIAN, A. Atherosclerosis: another protein misfolding disease? **Trends Mol Med**, v.8, n.8, p.370-4.2002.

VALARES, J.A.; ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; PALACÍN, I.; MATA, L.; RAZQUIN, P. Development of a simple enzyme immunoassay for the determination of ovine luteinizing hormone. **Vet Res Commun**, v.31, n.4, p.427-36, 2007.

VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios – fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. 372p.

VEDIE, B.; MYARA, I.; PECH, M.A.; MAZIERE, J.C.; MAZIERE, C.; CAPRANI, A.; MOATTI, N. Fractionation of charge-modified low density lipoproteins by fast protein liquid chromatography. **J Lipid Res**, v.32, p.1359-69, 1991.

VIRELLA, G.; ATCHLEY, D.; KOSKINEN, S.; ZHENG, D.; LOPES-VIRELLA M.F. Pro-atherogenic and pro-inflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. **Clin Immunol**, v.105, n.1, p.81–92, 2002.

VIRELLA, G.; DERRICK, M.B.; PATE, V.; CHASSEREAU, C.; THORPE, S.R.; LOPES-VIRELLA, M.F. Development of capture assays for different modifications of human low-density lipoprotein. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.12, n.1, p.68-75, 2005.

VIRELLA, G.; LOPES-VIRELLA, M.F. Lipoprotein autoantibodies: measurement and significance. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.10, n.4, p.499-505, 2003.

VIRELLA, G.; THORPE, S.R.; ALDERSON, N.L.; DERRICK, M.B.; CHASSEREAU, C.; RHETT, J.M.; LOPES-VIRELLA, M.F. Definition of the immunogenic forms of modified human LDL recognized by human autoantibodies and by rabbit hyperimmune antibodies. **J Lipid Res**, v.45, n.10, p.1859-67, 2004.

VIRELLA, G.; WOHLTMANN, H.; SAGEL, J.; LOPES-VIRELLA, M.F.; KILPATRICK, M.; PHILLIPS, C.; COLWELL, J. Soluble immune complexes in patients with diabetes mellitus: detection and pathological significance. **Diabetologia**, v.21, n.3, p.184-91, 1981.

WALLENFELDT, K.; FAGERBERG, B.; WIKSTRAND, J.; HULTHE, J. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. **J Intern Med**, v.256, n.5, p.413-20, 2004.

WANG, J.; QIANG, H.; ZHANG, C.; LIU, X.; CHEN, D.; WANG, S. Detection of IgG-bound lipoprotein(a) immune complexes in patients with coronary heart disease. **Clin Chim Acta**, v.327, n.1-2, p.115-22, 2003.

WELFRINGER, F.; d'ATHIS, P.; SCHERRMANN, J.M; HERVÉ, F. Development and validation of an antigen-binding capture ELISA for native and putrescine-modified

anti-tetanus F(ab')₂ fragments for the assessment of the cellular uptake and plasma kinetics of the antibodies. **J Immunol Methods**, v.307, n.1-2, p.82-95, 2005.

WILLNER, I.; BARON, R.; WILLNER, B. Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics. **Biosens Bioelectron**, v.22, n.9-10, p.1841-52, 2007.

WILSON, W.F. The epidemiology of atherosclerotic disease. In: LOSCALZO, J. **Molecular mechanisms of atherosclerosis**. London and New York: Taylor & Francis, 2005, cap.2, p.3-28.

WITZTUM, J.L., WULF, P., HORKKO, S., STEINBERG, D. Antibodies to oxidation-specific epitopes on lipoprotein and methods for their use in detecting, monitoring and inhibiting the growth of atheroma. **US Pat 9908109**, 1999-02-18. 57p.

WU, R.; DE FAIRE, U.; LEMNE, C.; WITZTUM, J.L.; FROSTEGÅRD, J. Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. **Hypertension**, v.33, n.1, p.53-9, 1999.

XIA, H.; BAI, S.; HARTMANN, J.; WANG, D. Synthesis of monodisperse quasi-spherical gold nanoparticles in water via silver(I)-assisted citrate reduction. **Langmuir**, v.26, n.5, p.3585-9, 2010.

XIA, H.C.; HU, W.G.; YANG, X.X.; LI, F.; ZHANG, Z.C. Preparation and primary application of monoclonal antibodies against a novel ribosome-inactivating protein Moschatin from pumpkin seeds. **Acta Biochim Biophys Sin**, v.36, n.2, p.105-10, 2004.

YAMASHITA, H.; EHARA, S.; YOSHIYAMA, M.; NARUKO, T.; HAZE, K.; SHIRAI, N.; SUGAMA, Y.; IKURA, Y.; OHSAWA, M.; ITABE, H.; KATAOKA, T.; KOBAYASHI, Y.; BECKER, A.E.; YOSHIKAWA, J.; UEDA, M. Elevated plasma levels of oxidized low-density lipoprotein relate to the presence of angiographically detected complex and thrombotic coronary artery lesion morphology in patients with unstable angina. **Circ J**, v.71, n.5, p.681-7, 2007.

YAN, W., CHEN, X.; LI, X.; FENG, X.; ZHU, J.J. Fabrication of a label-free electrochemical immunosensor of low-density lipoprotein. **J Phys Chem B**, v.112, n.4, p.1275-81, 2008.

YANG, B.; YAJIMA, W.; DAS, D.; SURESH, M.R.; KAV, N.N. Isolation, expression and characterization of two single-chain variable fragment antibodies against an endo-polygalacturonase secreted by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Protein Expr Purif**, v.64, n.2, p.237-43, 2009.

YANG, J.; WU, Q.; WANG, H.; PAN, K.; LEI, H.; HU, D.; SHEN, Y.; XIAO, Z.; ZHENG, X.; SUN, Y. Production and identification of high affinity monoclonal antibodies against pesticide carbofuran. **ASC**, v.6, n.9, p.1082-8, 2007.

YLA-HERTTUALA, S., PALINSKI, W.; BUTLER, S.W.; PICARD, S.; STEINBERG,

D.; WITZTUM, J.L. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. **Arterioscler Thromb**, v.14, n.1, p.32–40, 1994.

YLA-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; ROSENFELD, M.E.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; BUTLER, S.; WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **J Clin Investig**, v.84, n.4, p.1086-95, 1989.

ZHANG, Q.; BAI, G.; CHENG, J.; YU, Y.; TIAN, W.; YANG, W. Use of an enhanced green fluorescence protein linked to a single chain fragment variable antibody to localize *Bursaphelenchus xylophilus* cellulase. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.71, n.6, p.1514-20, 2007.

ZHANG, W.; ZHANG, W.; TANG, Y.; ZHANG, J.; LIU, J.N. Characterization of an anti-thioredoxin monoclonal antibody. **Biotechnol Lett**, v.28, n.3, p.183-8, 2006.

ZINGG, J.M.; RICCIARELLI, R.; AZZI, A. Scavenger receptors and modified lipoproteins: fatal attractions? **IUBMB Life**, v.49, n.5, p.397-403, 2000.

ZIOUZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; SAHADY, D.; ORASANU, G.; PERREY, S.; CUTAK, B.; HASSELL, T.; AKIYAMA, T.E.; BERGER, J.P.; SEVANIAN, A.; PLUTZKY, J. Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. **J Biol Chem**, v.278, n.41, p.39874-39881, 2003.

ZIOUZENKOVA, O.; ASATRYAN, L.; AKMAL, M.; TETTA, C.; WRATTEN, M.L.; LOSETO-WICH, G.; JÜRGENS, G.; HEINECKE, J.; SEVANIAN, A. Oxidative cross-linking of ApoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. Relevance to atherogenesis caused by hemodialysis. **J Biol Chem**, v.274, n.27, p.18916-24, 1999.