

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

GUILHERME JULIATTO MOLINA TINOCO

Seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos contra galectina-3 por
eletroforese capilar associada à técnica *Phage Display*

Ribeirão Preto

2019

GUILHERME JULIATTO MOLINA TINOCO

Seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos contra galectina-3 por eletroforese capilar associada à técnica *Phage Display*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto

2019

RESUMO

MOLINA TINOCO, G. J. **Seleção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos contra galectina-3 por eletroforese capilar associada à técnica *Phage Display***. 2019. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A galectina-3 (Gal-3) é uma proteína multifuncional presente em diversos processos fisiológicos e patológicos incluindo desenvolvimento tumoral, metástase e insuficiência cardíaca. Uma das ferramentas disponíveis para o estudo dessas proteínas é a técnica *Phage Display*, que proporciona a expressão de uma biblioteca combinatória de fragmentos de anticorpo expressa na superfície de bacteriófagos e a seleção de unidades capazes de se ligar a um determinado alvo. Essa última etapa, ou seja, a seleção de unidades é denominada de panning e apresenta limitações como possibilidade de selecionar alvos inespecíficos, dificuldade de utilizar proteínas alvos de baixa massa molecular e rotina excessivamente trabalhosa e longa. Assim, neste trabalho foi utilizada a eletroforese capilar (EC), uma técnica de separação compatível com análise de proteínas e vírus, no desenvolvimento de um método para seleção de fragmentos de anticorpos específicos para a Gal-3 no contexto da tecnologia de *Phage Display*. Inicialmente, amostras de Gal-3 foram expressas em culturas de *E. Coli* e purificadas em coluna de afinidade sepharose-alfa-lactose. Em seguida as proteínas foram analisadas por EC e as seguintes condições foram escolhidas: eletrólito de corrida Tris-HCl 50mM pH 6,8, Tensão 20kV, 18°C, aditivo trietilamina 4mM, concentração de Gal-3 50 µg/mL, 1psi de injeção por 10 segundos, capilar de 30cm com revestimento interno PVA. Em seguida, as amostras de Gal-3 foram incubadas com a biblioteca de fragmentos de anticorpos fusionados a bacteriófagos e analisadas em EC com as mesmas condições, utilizando os mesmos princípios do panning clássico, porém com a inclusão de uma técnica analítica de separação. Após a incubação com a biblioteca, foi observada com 8 minutos de análise a migração do complexo [Gal-3 + Fago], que foi coletado e amplificado com sucesso, comprovando a possibilidade da técnica analítica de EC ser utilizada como uma ferramenta alternativa ao panning tradicional com a vantagem de maior seletividade, e rapidez.

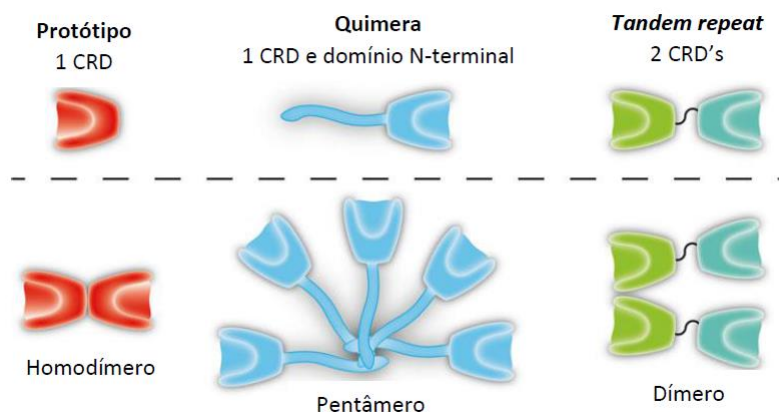
Palavras-chave: Eletroforese Capilar; Galectina-3; *Phage Display*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Galectinas

Galectinas são glicoproteínas altamente preservadas ao longo da evolução pertencentes à família das lectinas (CONNIE et al., 2015; VARKI et al., 2009). Estas moléculas são capazes de se ligar a um subgrupo de açúcares conhecido como β -galactosídeos (exemplo de um membro desse subgrupo: lactose) através do seu domínio de reconhecimento de carboidratos ou CRD (*carbohydrate recognition domain*) presente na porção C-terminal (BARONDES et al., 1994). O domínio N-terminal é sensível à ação de metaloproteases, desempenha papel de oligomerização e também é responsável pela interação com outras proteínas intracelulares (NEWLACZYL; YU, 2011). Quinze subtipos de galectinas (1 a 15) já foram descritos em mamíferos, sendo 11 deles encontrados em humanos, com massa molecular variando de 14 a 39 kDa. Estas lectinas são divididas em três grupos de acordo com sua estrutura (Figura 1): (i) prototípicas, geralmente homodímeros contendo um CRD cada, (ii) *tandem repeat*, monômeros com dois CRD's distintos conectados por um domínio peptídico e (iii) quimera, representado apenas pela galectina-3 (Gal-3) (ARGÜESO; PASNJWANI, 2011).

Figura 1: Classificação das galectinas quanto à sua estrutura quaternária: protótipo (1 CRD), quimera (1 CRD e domínio N-terminal) e *tandem repeat* (2 CRD's).



FONTE: Retirado e adaptado de CONNIE et al., 2015.

A interação dessas glicoproteínas com carboidratos - macromoléculas que desempenham importantes funções em diversos processos celulares (VARKI et al., 2009) - gera importantes vias de sinalização celular dependentes dessa ligação (GREWAL et al., 2008). Neste cenário, as galectinas associam-se a uma grande quantidade de processos biológicos tais como: diferenciação e sobrevivência de células do sistema nervoso central e periférico (CAMBY et al., 2006), controle da resposta inflamatória aguda e crônica (LIU; RABINOVICH, 2009), fibrose tecidual (SCHINDLER et al., 2016), regeneração tecidual (NISHIYAMA et al., 2000) e desenvolvimento tumoral (TRIMBOLI et al., 2016).

1.1.1 Galectina-3: caracterização, atividade e interações biológicas

A Gal-3 apresenta aproximadamente 30kDa de massa molecular aparente, atuando de forma monomérica ou até pentamérica, de acordo com sua concentração (BARONDES et al., 1994). Ela é sintetizada por ribossomos livres, secretada por vias não clássicas de sinalização e pode ser encontrada principalmente no citoplasma, porém, também é capaz de atravessar membranas, núcleo e mitocôndria celular (FORTUNA-COSTA et al., 2014, KRZEŚLAK; LIPÍŃSKA, 2004). Extracelularmente, a Gal-3 interage via CRD com β -galactosídeos ricos em N-acetil-lactosamina e lactose presentes na matriz extracelular (KRZEŚLAK; LIPÍŃSKA, 2004, PUGLIESE et al., 2014, IACOBINI et al., 2003).

A Gal-3 está associada a diversos eventos fisiológicos e patológicos como insuficiência cardíaca (IC) (MEDVEDEVA et al., 2016), angiogênese (FORTUNA-COSTA et al., 2014), remodelamento de vias aéreas (GE, et al., 2010), interações extracelulares (OCHIENG; FURTAK; LUKYANOV, 2004) e fibrilação atrial (TAKEMOTO et al., 2016), possuindo inclusive papel de biomarcador de diagnóstico ou prognóstico em algumas dessas condições. Adicionalmente, um grande número de evidências indica um importante papel da Gal-3 no desenvolvimento tumoral e em processos de metástase, sendo ela uma importante peça do microambiente de células tumorais invasoras, principalmente por mudanças em proteínas de contato e vias de sinalização de controle do citoesqueleto (FRIEDL; ALEXANDER, 2011). A Gal-3 extracelular parece contribuir para esses processos, e dessa forma, para a progressão do câncer, sendo encontrada com alta expressão em vários tipos de tumores, como de mama (WARFIELD et al., 1997), melanoma (HONJO et al., 2001), pulmão (O'DRISCOLL et al., 2002) e sarcoma (MELO et al., 2011). Ainda no desenvolvimento tumoral, outro ponto a ser tratado é a relação entre a expressão aumentada de Gal-3 e o prolongamento da vida celular, através de mecanismos capazes de impedir as células de

entrarem em processo apoptótico e, portanto, favorecendo o aparecimento do câncer em condições saudáveis. Um possível mecanismo é explicado pela semelhança estrutural da Gal-3 com a proteína BCL-2, supressora apoptótica (YANG; HSU; LIU, 1996). Outro possível mecanismo está relacionado com a aderência na matriz extracelular (MEREDITH; FAZELI; SCHWARTZ, 1993). Estudos indicam que a Gal-3 pode inibir esse processo, garantindo a aderência e, portanto, inibindo a morte celular (MATARESSA et al., 2000). Por essas razões, essa lectina é estudada como alvo de terapias antitumorais (ZOU et al., 2005) e como biomarcador de prognósticos (SHEKHAR et al., 2004).

Além da sua importância no estudo do câncer, a Gal-3 ganhou destaque devido à sua relação com uma doença responsável por uma notável taxa de mortalidade na população mundial: a IC (ZULKIFLI; SURIDANDA, 2016). A proximidade dessa condição com outras patologias, como a doença arterial coronariana e amiloidose cardíaca ressaltam a importância da pesquisa com objetivo de auxiliar no diagnóstico e prognóstico. Em resposta a agressões agudas e crônicas, células do sistema imunológico são recrutadas ao tecido cardíaco, convertendo-o lentamente em tecido fibroso e comprometendo sua função, caracterizando a IC (CREEMERS; PINTO, 2011). A Gal-3 é secretada por macrófagos sob influência de mediadores químicos e é uma peça fundamental nos processos inflamatórios e conseqüentemente na fibrose cardíaca, sendo detectada em altas concentrações em pacientes com IC crônica e aguda. Além de apresentar vantagens frente a outros biomarcadores já utilizados, como por exemplo, a maior estabilidade, a Gal-3 também pode ser usada como marcador de início da formação de tecido fibroso. A íntima relação entre concentrações de Gal-3 e a IC a torna um alvo promissor na identificação de pacientes de alto risco, além de auxiliar em prognósticos a curto e longo prazo, sendo necessários mais estudos para confirmar sua viabilidade (HRYNCHYSHYNA et al., 2013).

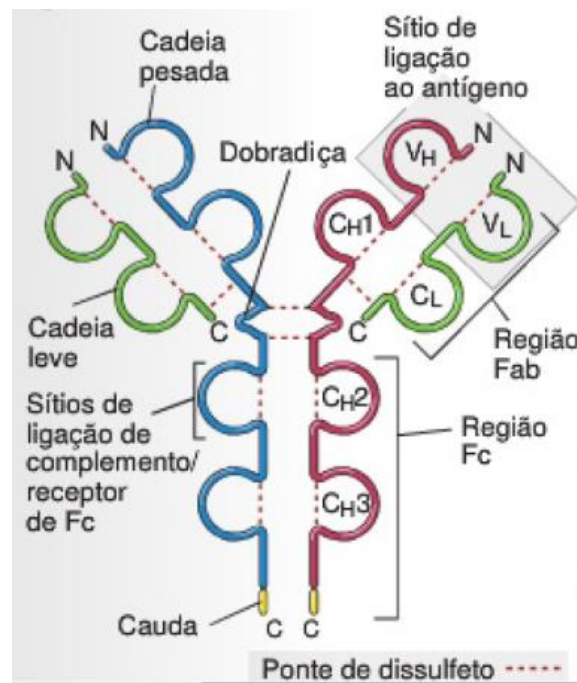
Considerando a relevância clínica da Gal-3, torna-se necessária a busca por ferramentas biotecnológicas que desempenhem interações de alta especificidade capazes de atuar na terapia, diagnóstico e pesquisa de eventos biológicos associados a essa proteína. Uma possível forma de se explorar este campo é pela busca de novos anticorpos capazes de atuar sobre a Gal-3.

1.2 Imunoglobulinas

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são proteínas circulantes produzidas pelas células B em resposta à exposição a estruturas estranhas ao organismo, denominadas antígenos. Esta resposta faz parte da imunidade adaptativa para a opsonização, eliminação, neutralização de

antígenos, bem como geração de células B de memória para futuras respostas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). As imunoglobulinas dividem-se em cinco classes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, sendo cada uma destas associada a um tipo de resposta imunológica especializada para diferentes antígenos. A estrutura clássica de um anticorpo pode ser exemplificada pela IgG (Figura 2). Esta é formada por duas cadeias pesadas compostas por quatro domínios globulares cada, duas cadeias leves compostas por dois domínios globulares cada, sendo estas quatro unidades, então, unidas por pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007; RUDIN et al., 1998).

Figura 2: Representação esquemática de uma imunoglobulina IgG.



FONTE: Retirado e Modificado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012.

A porção de ligação ao antígeno ou Fab (*Fragment Antigen Binding*) contém os domínios variável leve (VL) e variável pesado (VH), os quais possuem regiões de hipervariabilidade denominadas Regiões Determinantes de Complementaridade ou CDR (*Complementarity Determining Regions*), capazes de se ligar a um antígeno através de múltiplas regiões de contato, resultando em uma alta especificidade. Após o contato direto com o antígeno, as regiões constantes da cadeia pesada presentes na porção cristalizável das imunoglobulinas ou Fc (*Fragment Crystallizable*) interagem com estruturas celulares, contribuindo para o desencadeamento de mecanismos efetores responsáveis pela eliminação de patógenos. A existência da imensa variabilidade de anticorpos e CDR's é devido a um

engenhoso mecanismo denominado recombinação V(D)J. Genes de variabilidade (V), diversidade (D) e junção (J), codificadores de imunoglobulinas, presentes em cada linfócito individual, sofrem rearranjos aleatórios podendo gerar, a partir de um número limitado de genes, milhares de clones de anticorpos diferentes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A compreensão da genética de imunoglobulinas e as avançadas técnicas moleculares da biologia molecular permitiram a construção *in vitro* de vastos repertórios de anticorpos (ou bibliotecas de anticorpos) utilizadas na inovadora técnica de *Phage Display*.

1.3 *Phage Display*

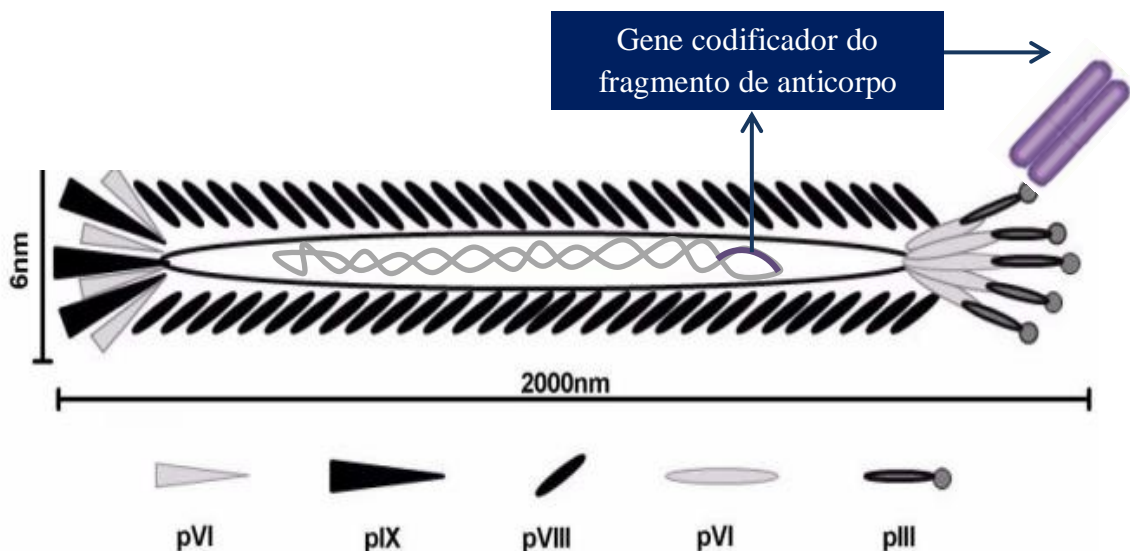
A técnica *Phage Display* tem sido amplamente utilizada atualmente, contribuindo de forma decisiva para descobertas nos campos da biologia celular, imunologia, farmacologia e para o desenvolvimento de novos fármacos (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPERA, 2012). Esta metodologia é utilizada para a identificação e seleção de anticorpos ou peptídeos, a partir de bibliotecas combinatórias, que tenham afinidade e especificidade para um determinado alvo (SMITH 1985). Bacteriófagos, ou fagos (vírus capazes de infectar bactérias), são geneticamente modificados para que cada partícula viral represente um clone de uma dada biblioteca e carregue a sequência codificadora diretamente relacionada àquela proteína. Assim, bibliotecas expostas na superfície de fagos são utilizadas para varrer células, tecidos, órgãos e soluções em busca de alvos específicos (BENHAR 2001). A partir daqui trataremos especificamente de bibliotecas de anticorpos.

Bibliotecas combinatórias são construídas a partir dos genes codificadores de cada clone de um repertório de anticorpos de pacientes humanos ou animais. Tais sequências são clonadas em um vetor plasmidial do tipo fagomídeo (ANDRIS-WIDHOPF et al., 2001), que consiste em uma sequência de DNA circular dupla fita com uma origem de replicação bacteriana, origem de replicação viral, um sítio para inserção do gene exógeno (do clone de anticorpo), genes marcadores de seleção e uma região promotora (VEDOVELI; PICANÇO E CASTRO, 2016). Porém, o fagomídeo não possui os genes necessários para a codificação e montagem de uma nova partícula viral completa, tornando-se necessária a adição de fagos auxiliares (fago *helper*), os quais fornecem tal informação genética. Dessa forma, os fagos auxiliares infectam bactérias contendo o fagomídeo recombinante, gerando novas partículas virais capazes de expressar o fragmento de anticorpo no invólucro proteico viral (capsídeo) (BARBAS et al., 2001).

Os bacteriófagos utilizados na técnica de *Phage Display* são do tipo M13, pertencentes à família *Inoviridae*, gênero *Inovirus*, sendo capazes de infectar bactérias que apresentam

pilus sexual sem causar lise (HEMMINGA et al., 2010; ICTV, 2014). Estruturalmente o fago M13 possui uma forma de haste flexível com um genoma circular de DNA fita simples envolto em um capsídeo composto pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX (Figura 3). Para finalidade de apresentação de peptídeos exógenos a pVIII e pIII são as mais comumente empregadas, sendo que o gene codificador desse peptídeo se encontra no genoma do vírus (BARBAS et al., 2001; BRIGIDO; MARANHÃO, 2002).

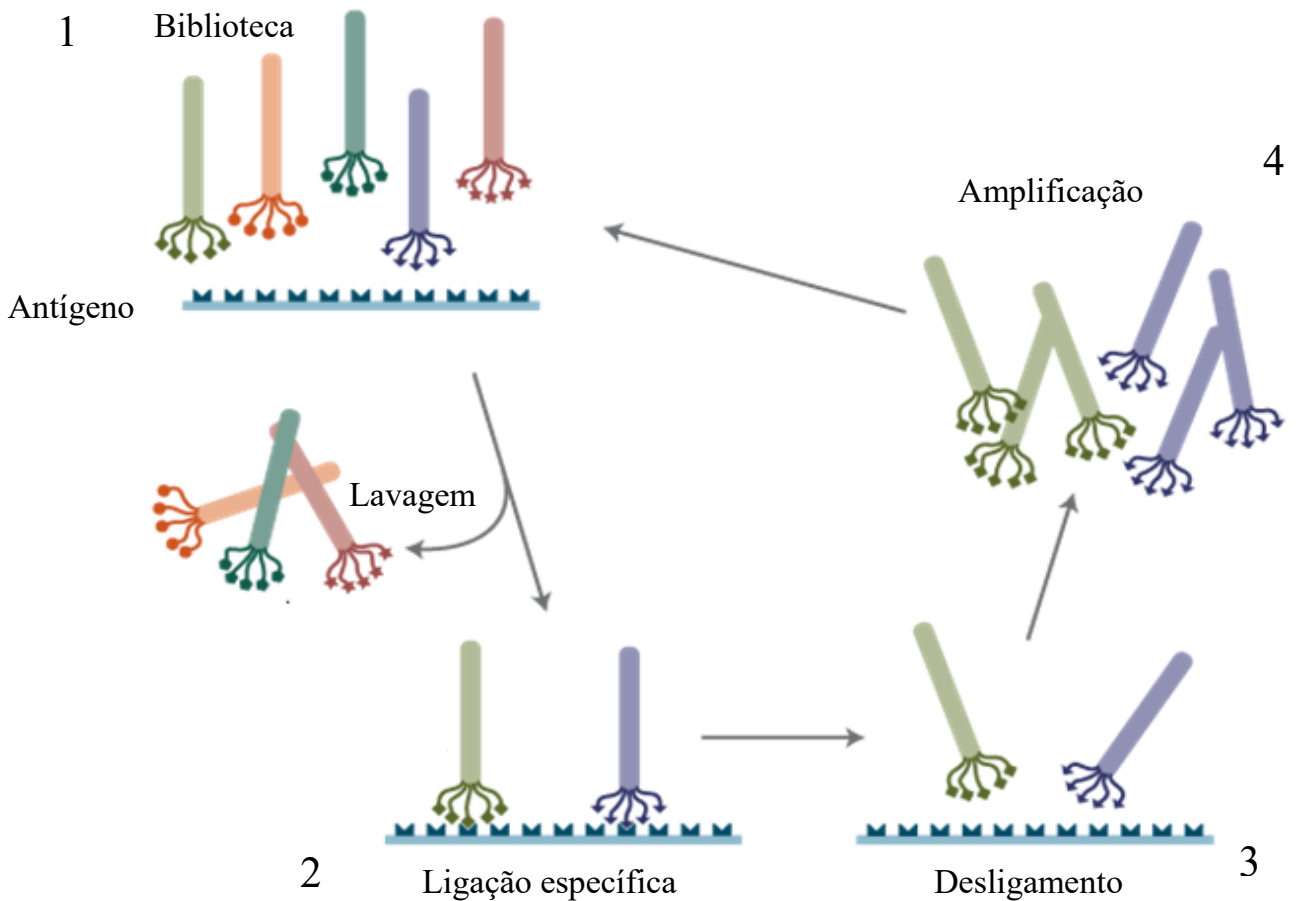
Figura 3: Representação esquemática de um bacteriófago M13 com um fragmento de anticorpo fusionado a proteína estrutural pIII.



FONTE: Retirado e modificado de KONTHUR; WALTER, 2002.

Em um processo de seleção por afinidade denominado *panning* (Figura 4), a biblioteca exposta na superfície de fagos é então apresentada às moléculas-alvo, que geralmente se encontram imobilizada em um suporte sólido, como uma placa de ELISA *High-Binding* de 96 poços (PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010). Os fagos fusionados aos clones de anticorpos de baixa afinidade ao alvo imobilizado são removidos por lavagens consecutivas enquanto que os específicos permanecem ligados (VODNIK et al., 2011). Aqueles capazes de interagir com o alvo, são recuperados e amplificados biologicamente em *Escherichia coli* (*E. coli*) para, então, serem submetidos a novos ciclos de seleção (Figura 4). Por fim, os clones selecionados pelo processo de *panning* podem ser sequenciados e analisados quanto à sensibilidade e especificidade, sendo destinados a diversas aplicações, tanto em diagnóstico quanto em terapêutica (VODINIK et al., 2011).

Figura 4: Representação de um *round* da seleção (*panning*) natécnica *Phage Display*.



FONTE: Retirado e modificado de <https://international.neb.com/products/e8110-phd-12-phage-display-peptide-library-kit#Product%20Information>.

Resultados laboratoriais indicam que a etapa de seleção (*panning*) apresenta as seguintes limitações (JONES et al., 2016; TUR et al, 2001):

- Possibilidade de seleção de anticorpos inespecíficos: após a sensibilização da placa de ELISA com o alvo de interesse, é realizada a etapa de bloqueio dos sítios não ocupados com uma solução de albumina de soro bovino ou BSA (*bovine serum albumin*) 3% (p/v). Apesar da pré-incubação da biblioteca de anticorpos com BSA 1%, existe ainda a possibilidade de se obter anticorpos contra esta proteína de bloqueio.
- Dificuldade de utilizar proteínas alvos de baixa massa molecular: proteínas e/ou peptídeos de baixa massa molecular (até ~5kDa) não são eficientemente adsorvidas na superfície sólida (placa de ELISA), sendo necessária sua conjugação à proteínas carreadoras,

como BSA e ovalbumina ou OVA. Assim, gera-se a possibilidade de seleção de clones de anticorpos contra o composto carreador.

Adicionalmente, o uso de bibliotecas em rotinas de seleção é considerado excessivamente trabalhoso (RAMI et al., 2017). Nesse contexto, o uso de uma técnica de separação capaz de fornecer uma alternativa ao *panning* clássico pode contribuir para uma metodologia mais eficiente e menos trabalhosa, além de fornecer importantes melhorias na seletividade. Trabalhos recentes revelam o potencial da eletroforese capilar nesse contexto (ZHAO et al., 2010).

1.4 Eletroforese Capilar

1.4.1 Histórico

No século XX a eletroforese foi introduzida por Arne Tiselius no contexto do estudo das proteínas do soro que haviam a pouco sido descobertas. Como técnica de separação essa prática consiste na migração diferencial de íons ou substância ionizáveis solvatadas em um meio contendo eletrólitos e sob ação de um campo elétrico (TISELIUS, 1930). As principais limitações associadas à eletroforese logo foram esclarecidas: difusão da amostra e grande geração de calor, que foram amenizadas com a utilização de um suporte de aplicação para amostra (gel ou papel). Porém o calor gerado pela passagem de uma corrente elétrica (efeito Joule) continuou como um empecilho, gerando gradientes de temperatura e densidade que, por sua vez, provocam movimentos de convecção, prejudicando diretamente a separação dos componentes da amostra (HJERTÉN, 1967).

A redução do diâmetro dos suportes foi outro fator associado à dissipação do calor gerado pela passagem de corrente elétrica, dessa forma o desenvolvimento de suportes cada vez menores foi impulsionado, passando por suportes de acetato de celulose, poros gelatinizados, (RICHE; KOHN, 1987) capilares de teflon (MIKKERS; EVERAERTS; VERHEGGEN, 1979) e capilares de sílica fundida (JORGENSEN; LUKACS, 1983). Nesse contexto surgiu a eletroforese capilar (EC) que, pela grande superfície de contato do fluxo com o capilar ofereceu uma confiável forma de resfriamento do sistema. Além disso, o capilar também possui alta resistência elétrica, permitindo o estabelecimento de intensos campos elétricos, tornando as análises extremamente rápidas e eficientes (PERRET, 2003).

As particularidades da EC permitiram o surgimento de diversas técnicas capazes de atender as particularidades dos mais diversos tipos de análise. Dentre as técnicas de eletromigração cabe destacar: eletroforese capilar de peneiramento ou CSE (*capillary sieving electrophoresis*), eletroforese capilar em meio não aquoso ou NACE (*nonaqueous capillary*

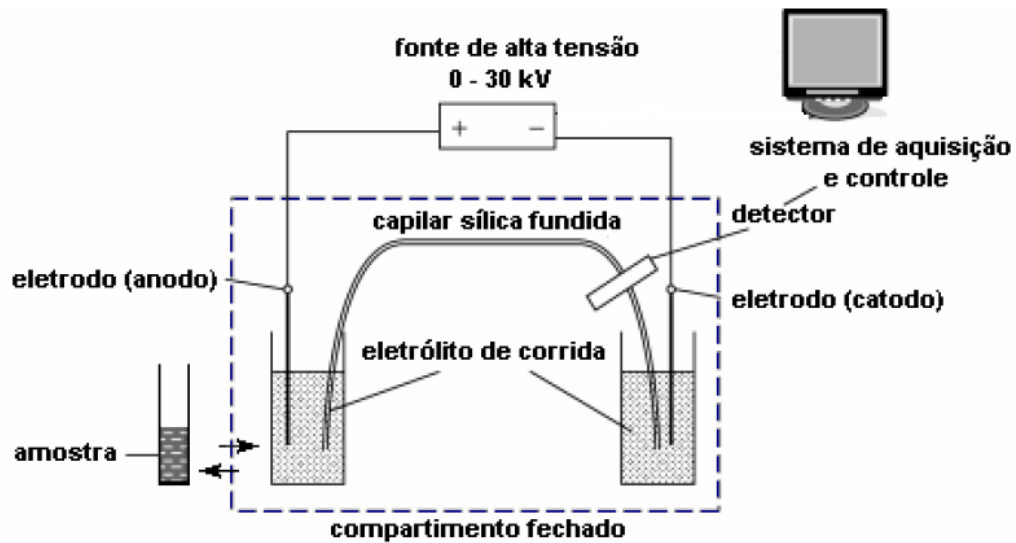
electrophoresis), eletroforese capilar em gel ou CGE (*capillary gel electrophoresis*), focalização isoelétrica capilar ou CIEF (*capillary isoelectric focusing*), isotacoforese capilar ou CITP (*capillary isotachophoresis*), cromatografia eletrocinética ou EKC (*electrokinetic chromatography*), cromatografia eletrocinética micelar ou MEKC (*micellar electrokinetic chromatography*), eletroforese capilar de afinidade ou CAE (*capillary affinity electrophoresis*), cromatografia eletrocinética em microemulsão ou MEEKC (*microemulsion electrokinetic chromatography*), eletrocromatografia capilar ou CEC (*capillary electrochromatography*) e por fim a eletroforese capilar em solução livre ou FSCE (*free solution capillary electrophoresis* ou CZE - *capillary zone electrophoresis*) que pode ser considerada a mais empregada e utilizada neste trabalho (J. A. F., et al., 2007; TAVARES, 1997; COLTON et al., 1998).

1.4.2 Instrumentação, Vantagens e Aplicações

A EC é uma técnica de separação indicada para substâncias iônicas ou ionizáveis, incluindo desde íons de baixa massa molecular até macromoléculas. Sua aplicação se estende ao controle de qualidade de compostos de interesse farmacêutico e biotecnológico (MORZUNOVA, 2006), separação de enantiômeros (JIANFENG et al., 2011), estudos de metabolômica (RAMAUTAR, 2016), nanotecnologia (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2017), busca por novos fármacos (FARCAŞ et al., 2017; OUIOMET; D'AMICO; KENNEDY, 2017) biomoléculas, proteínas (DESHMANE et al., 2011; OLABI; STEIN; WÄTZIG, 2018; KAHLE; MAUL; WÄTZIG, 2018), e vírus (KREMSER et al., 2007).

A instrumentação é composta por um capilar de pequeno calibre (diâmetro interno de 25, 50, 75 ou 100µm) com as extremidades mergulhadas em reservatórios preenchidos com uma solução de eletrólitos (Figura 5). Uma tensão elétrica é aplicada com auxílio de dois eletrodos, cada um também mergulhado em um reservatório, e um campo elétrico é gerado, acarretando no movimento de analitos previamente injetados em direção ao eletrodo de carga oposta (SUNTORNUSUK, 2007).

Figura 5: Representação da instrumentação utilizada em um sistema de EC.



FONTE: Retirado de COSTA, 2008.

Como técnica de separação a EC apresenta importantes características (CUNHA, 2013):

- Alta eficiência;
- Baixo custo de operação;
- Baixo volume de injeção, indicada para amostras de baixa disponibilidade;
- Baixo tempo de análise;
- Sistema automatizado;
- Único solvente utilizado é a água, ou seja, mantendo o compromisso com as diretrizes da Química Verde;
- Detecção em fluxo.

Quando a EC é comparada à principal técnica no contexto da química analítica, a cromatografia líquida ou HPLC (*high performance liquid chromatography*), duas importantes vantagens são observadas: como já mencionado, o baixo gasto de solventes representa um contraste ao volume de solventes usados em HPLC, que demandam deslocamento de recursos financeiros com a compra e descarte adequado. Além disso, a presença de colunas empacotadas em HPLC contribui para alargamento dos picos, por três mecanismos: caminhos múltiplos, difusão longitudinal e resistência à transferência de massa. Em EC o uso de

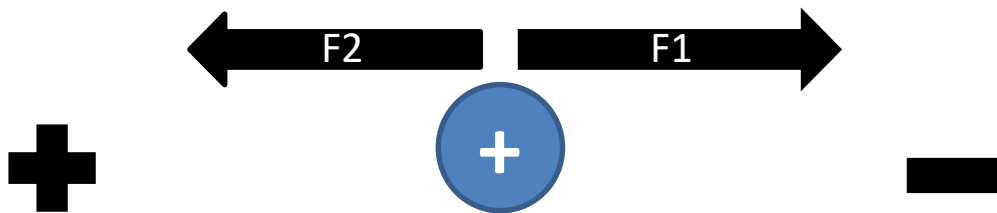
capilares de sílica fundida sem recheios implica na atuação de apenas um fator de alargamento, no caso a difusão longitudinal, acarretando em um considerável aumento no número de pratos (Figura 6) e, portanto, na eficiência da técnica (HARRIS, 2012). Adicionalmente, ao contrário da HPLC, em EC não são utilizadas bombas de pressão para impulsionar a fase móvel, que também acarreta em alargamento de banda. (HEIGER, 1997).

Apesar de todas as suas vantagens, a principal desvantagem da EC está na sua detectabilidade, que é inferior quando comparada a outras técnicas de separação (BIZZOTTO et al., 2013).

1.4.3 Teoria da migração eletroforética

A eletroforese é uma técnica de separação que consiste na migração de um íon sob o efeito de um campo elétrico (E). O íon será acelerado pela ação da força elétrica (F1) resultante da aplicação do campo E e como resultado desse movimento, uma força de atrito (F2) age no sentido oposto, dificultando o movimento. F1 e F2 possuem sentidos opostos e eventualmente se cancelam (Figura 6) e o íon adquire velocidade constante (TAVARES, 1995):

Figura 6: Esquemática das forças agindo sob um íon após a aplicação de um campo elétrico em um suporte apropriado.



FONTE: o autor (2019).

A força elétrica (F1) é resultado do produto da carga do íon (z_i), a carga elementar (e) e o campo elétrico E, de acordo com a equação 1 (TAVARES, 1995):

Equação 1

$$F_1 = |z_i| \cdot e \cdot E$$

Segunda a lei de Stokes, a força de atrito (F_2) para íons de forma esférica pode ser obtida de acordo com a viscosidade do meio (η), o raio iônico efetivo (ri) e a velocidade eletroforética (V_{ef}), como demonstrado na equação 2 (TAVARES, 1995):

Equação 2:
$$F_2 = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot ri \cdot V_{ef}$$

Ao atingir a velocidade final, a resultante de forças atuando no íon é nula, igualando F_1 e F_2 (TAVARES, 1995), ou seja:

$$F_1 = F_2$$

Equação 3:
$$3|zi|.e.E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot ri \cdot V_{ef}$$

Com o rearranjo das variáveis temos a equação 3:

Equação 4:
$$\frac{V_{ef}}{E} = \frac{|zi|.e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot ri}$$

Conceitualmente a V_{ef} de um íon é obtida pelo produto do campo elétrico E e da mobilidade eletroforética (μ_{ef}), equação 4:

Equação 5:
$$V_{ef} = E \cdot \mu_{ef}$$

Ao combinar os termos das equações 3 e 4 temos as implicações do conceito de μ_{ef} , equação 5:

Equação 6:
$$\mu_{ef} = \frac{|zi|.e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot ri}$$

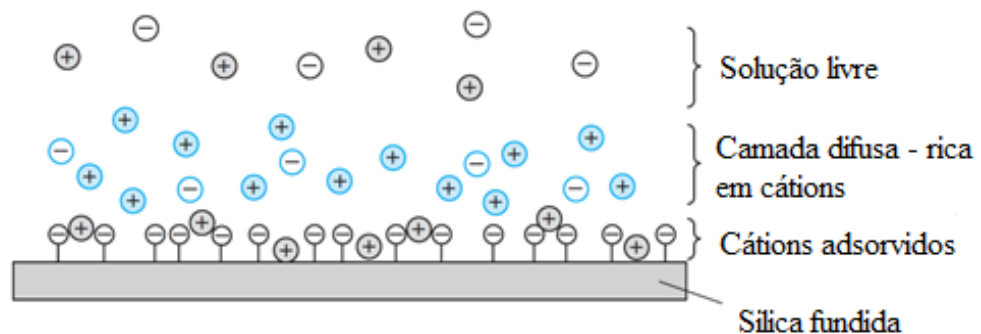
Dessa forma o conceito de μ_{ef} rege a migração de espécies que possuem cargas, sendo diretamente proporcional à V_{ef} dessas espécies (equação 4) (TAVARES, 1995). A presença das variáveis associadas à carga da espécie no numerador indica que a μ_{ef} é diretamente proporcional à sua carga, enquanto que o raio iônico no denominador indica que análitos maiores apresentarão menor valor de mobilidade.

1.4.4 Teoria da migração eletrosmótica

Os capilares empregados em EC normalmente são compostos de sílica fundida que, por ser sensível a rompimentos, requer um revestimento externo de poliimida com objetivo de auxiliar na resistência mecânica. O revestimento é removido na porção utilizada para detecção, devido a interferências na região UV-VIS (ALTRIA, 1996). A sílica fundida contém uma superfície de grupos silanóis capazes de adquirir carga em virtude do pH do meio. O preenchimento desse capilar com uma solução aquosa em pH capaz de ionizar alguns de seus grupamentos fornece as condições para o aparecimento de 3 camadas distintas no interior do capilar: camada de cátions adsorvidos, camada difusa e solução livre (Figura 7) (HARRIS, 2005).

Figura 7: Esquemática das camadas formadas a partir do preenchimento de um capilar de sílica fundida por uma solução aquosa em pH apropriado.

FONTE: Retirado e modificado de HARRIS, 2005.

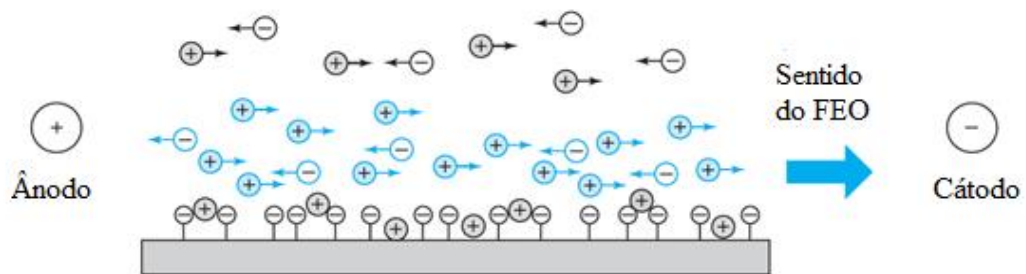


Após a ionização de alguns dos grupamentos silanóis, cátions em solução associados às moléculas de água são fortemente atraídos e adsorvem na parede do capilar, formando a camada de cátions adsorvidos ou camada fixa. Acima da camada fixa, a concentração de cátions decresce conforme a distância da parede do capilar negativamente carregado aumenta, sendo essa região com gradiente de cátions não adsorvidos conhecida como camada difusa. Quando a distância da parede do capilar se torna suficiente para a concentração de cátions decrescer ao ponto de se tornar uma solução com igual distribuição de cátions e ânions, a região é considerada a solução livre do interior do capilar (TAVARES, 1995).

Quando uma diferença de potencial é aplicada no sistema descrito, forças elétricas atuam nos cátions da camada difusa provocando um movimento unilateral em direção ao

eletrodo de carga oposta. Assim como os cátions, as moléculas de água que os solvatam também se movimentam, gerando um fluxo ao longo de todo capilar que atua em todos os componentes da mistura, incluindo íons positivos, negativos e compostos neutros (Figura 8). Esse fluxo é conhecido como fluxo eletrosmótico (FEO) (LI, 1993).

Figura 8: Representação do aparecimento do FEO após aplicação de uma diferença de potencial em um capilar de sílica fundida.



FONTE: Modificado de HARRIS, 2005.

A intensidade deste fluxo é dependente da mobilidade eletrosmótica (μ_{feo}), que está relacionada a várias constantes, tais como permitividade da solução (ϵ_r), a viscosidade do meio (η), a permitividade do vácuo (ϵ_0) e o potencial electrocinético (ou zeta) (ζ) e pode ser expressa pela equação 6 (TAVARES, 1995):

Equação 7:
$$\mu_{feo} = -\frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta}{\eta}$$

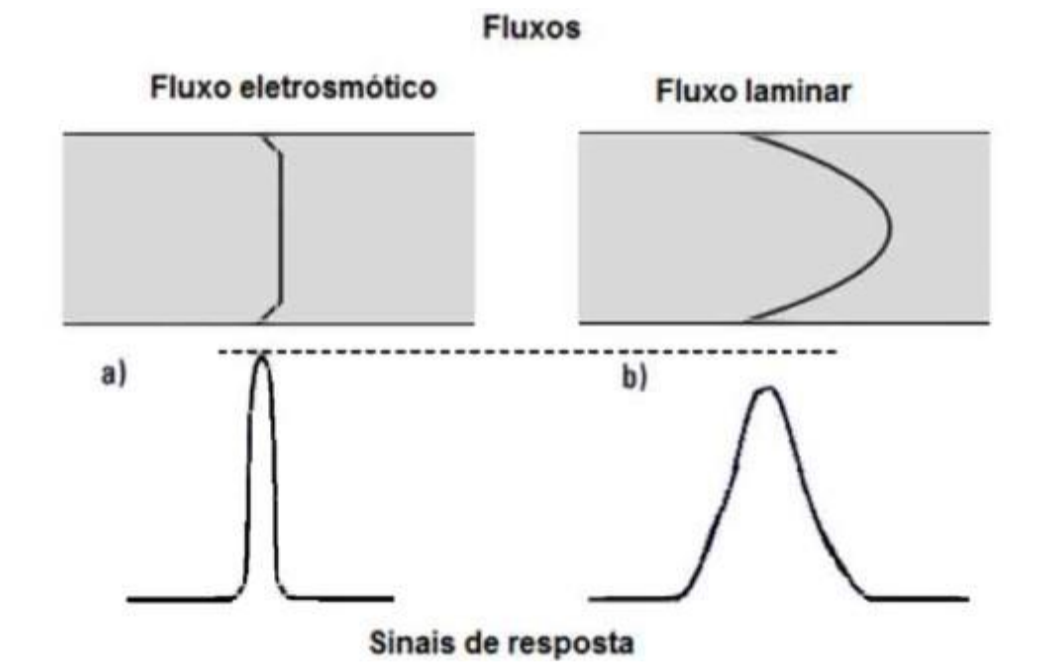
Adicionalmente, de forma similar ao conceito de migração eletroforética, a μ_{feo} também influenciará a velocidade do FEO. Essa velocidade do FEO (V_{feo}) será diretamente proporcional ao campo elétrico aplicado E e a μ_{feo} (equação 7) (TAVARES, 1995):

Equação 8:
$$V_{feo} = \mu_{feo} \cdot E$$

A alta eficiência desse sistema está vinculada ao perfil radial do FEO desencadeado pelo movimento dos cátions da camada difusa. Como a espessura da camada difusa é muito menor que o raio do capilar o perfil de velocidade radial aparece como linear, ou seja, o fluxo é uniforme na seção transversal do capilar. Assim, o FEO permite altas resoluções, devido à

menor dispersão de banda em comparação às técnicas que empregam pressão para bombeamento de fluidos (Figura 9) na qual as tensões entre as camadas adjacentes causam um perfil parabólico da velocidade de fluxo (HEIGER, 1997).

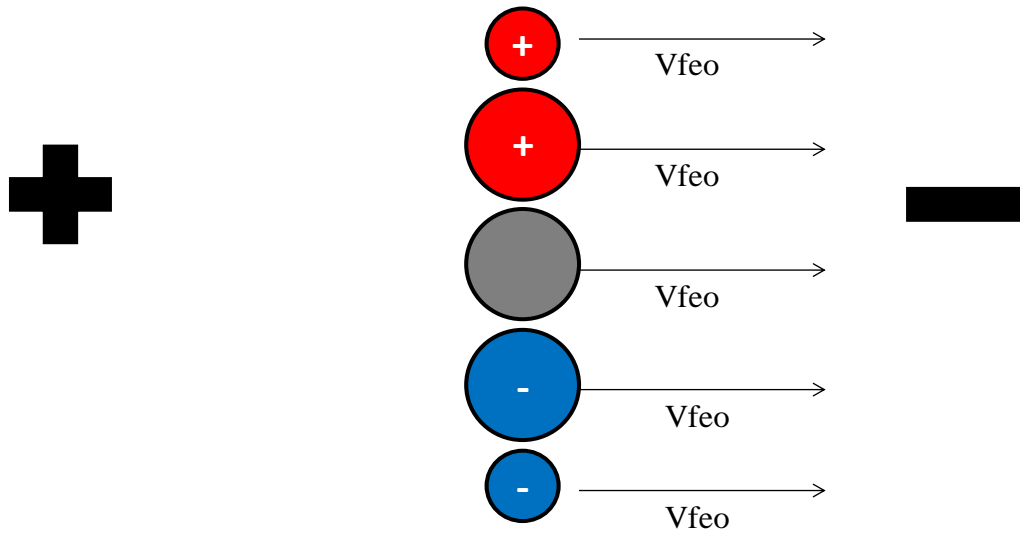
Figura 9: Perfis dos fluxos eletrosmótico, típico de EC (a) e laminar, próprio de HPLC (*high performance liquid chromatography*) (b), e suas correspondentes zonas de amostras.



FONTE: Retirado de HEIGER, 1997.

Todas as espécies introduzidas nos sistemas sofrerão influência do FEO originado pela aplicação de um campo elétrico no capilar de sílica com grupamentos silanóis parcialmente ionizados. A Figura 10 esquematiza o vetor de velocidade eletrosmótica aplicado em componentes carregados positivamente (esferas vermelhas), neutros (esfera cinza) e carregados negativamente (esferas azuis). Compostos de mesma carga (apenas um sinal de mais ou menos), porém de tamanhos diferentes terão o mesmo vetor de velocidade adicionado. Esse processo é o mesmo para compostos de mais cargas comparadas com aqueles que possuem menos cargas (TAVARES, 1995).

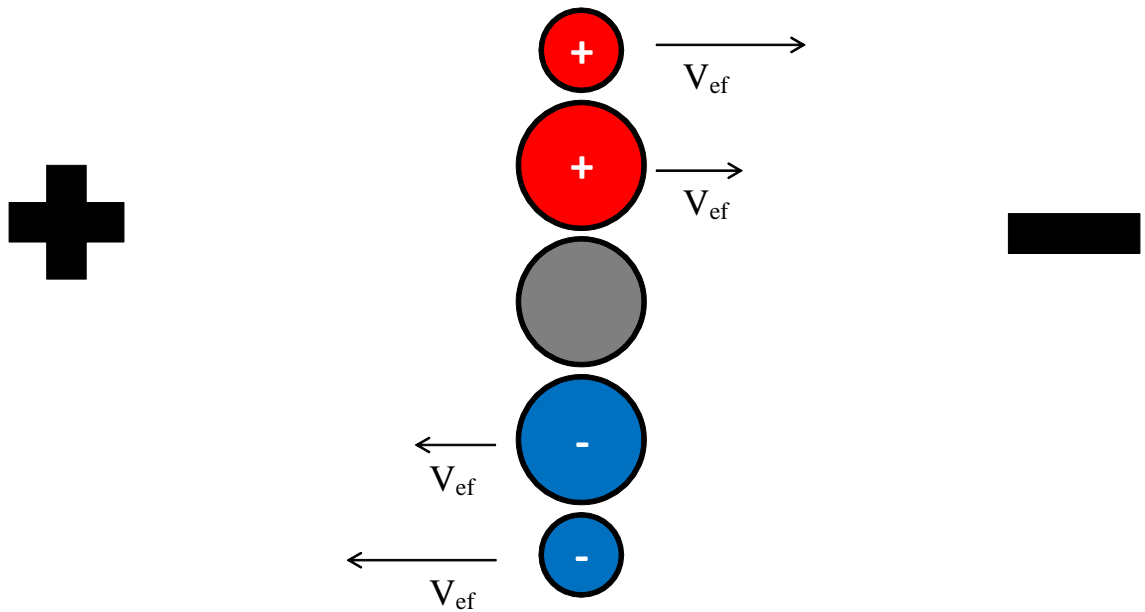
Figura 10: Esquemática da aplicação do vetor de V_{feo} em diferentes espécies presentes em uma solução.



FONTE: o autor (2019).

Além do FEO, a aplicação de uma diferença de potencial também dá origem a V_{ef} , diretamente proporcional a sua μ_{ef} e ao campo elétrico aplicado. Porém, esse vetor será influenciado pela presença e natureza da carga e pelo tamanho da espécie. A Figura 11 representa a intensidade e sentido dos vetores de V_{ef} aplicado em cada uma das espécies. Cátions de menor massa terão um vetor maior aplicado quando comparados com cátions de maior massa, e no sentido do eletrodo de carga oposta. Ânions terão comportamentos semelhantes e espécies sem carga não desenvolverão V_{ef} (TAVARES, 1995).

Figura 11: Esquematização da aplicação do vetor de V_{ef} em diferentes espécies presentes em uma solução.



FONTE: o autor (2019).

Com a ação do FEO e movimentos eletroforéticos, o resultado é a migração de cátions, ânions e espécies neutras em um único sentido. Essa resultante dá origem à velocidade aparente (V_{ap}) expressa pela equação 8, sendo que, se o FEO possuir o mesmo sentido da V_{ef} , o sinal será positivo, e negativo se o FEO estiver em sentido oposto (TAVARES, 1995; RIBEIRO, 2017).

Equação 8:
$$V_{ap} = V_{ef} \pm V_{feo}$$

É importante ressaltar que nesse modo diferentes espécies neutras não são separadas, formando uma única banda de migração no capilar (TAVARES, 1997). Por fim, considerando os fenômenos de μ_{feo} e μ_{ef} o desempenho do sistema de EC pode ser afetado por alguns fatores, como (CUNHA, 2017):

- pH do eletrólito de corrida: influencia a desprotonação dos grupos silanóis da parede interna do capilar, afetando assim a magnitude do FEO. Também influencia a migração eletroforética de ácidos e bases fracas por afetar o surgimento de cargas pela ionização de grupos funcionais;
- Tensão aplicada: influencia diretamente na V_{feo} e V_{ef} , eficiência, resolução e tempo de análise. Também pode causar altos valores de corrente elétrica, gerando efeito Joule e alargamento de banda;
- Força iônica: excesso de íons no meio promove o achatamento da dupla camada elétrica, reduzindo o valor do potencial zeta e do FEO;
- Temperatura: está associada a variação da viscosidade da solução influenciando as μ_{feo} e μ_{ef} e prejudicando a precisão das análises.

1.5 EC e análise de proteínas

Desde seu surgimento na década de 80 a EC sempre se mostrou como uma importante ferramenta para análise de proteínas. A busca constante pelo papel dessas macromoléculas em sistemas biológicos coloca a EC como uma técnica de destaque em pesquisas na área de proteômica (HUCK; BONN, 2004).

Ao se tratar de eficiência de separação dentro de um sistema de EC, proteínas apresentam importantes diferenças quando comparadas às pequenas moléculas. Massa molecular, carga elétrica, conformação, hidrofobicidade e capacidade de ligação específica são algumas das características que precisam ser levadas em consideração no desenvolvimento de um método (HUCK; BONN, 2004).

A análise de proteínas ou macromoléculas por EC pode levar ao fenômeno de adsorção na parede do capilar. Devido ao seu tamanho e vários sítios de interação com a sílica, estruturas proteicas podem permanecer adsorvidas na parede do capilar, não chegando ao detector e/ou contaminando análises posteriores. Esse processo prejudica a reprodutibilidade, eficiência e resolução de análises e pode ser considerado um dos maiores desafios no desenvolvimento de métodos para análise de proteínas (SCHURE; LENHOFF, 1993). Diversos recursos podem ser utilizados para contornar esse problema como soluções em pH extremos, aditivos na solução de eletrólitos gerando revestimentos temporários ou revestimentos permanentes por reações químicas (WÄTZIG; DEGENHARDT; KUNKEL,

1998, CORRADINI; CANNARSSA, 1996). Essas modificações internas no capilar buscam inibir possíveis adsorções indesejáveis gerando, em teoria, uma proteção homogênea, resistente a certa faixa de pH e que proporcione um aumento da reprodutibilidade e eficiências dos métodos (HORVATH; DOLNÍK, 2001).

1.5.1 Revestimento Dinâmico

O revestimento dinâmico é obtido pelo uso de aditivos como tensoativos, sais zwitterônicos, polímeros hidrofílicos lineares e aminas no eletrólito de corrida, formando ligações não-covalentes temporárias com grupamentos silanóis e/ou competindo por sítios de absorção ao longo do capilar e, em teoria, inibindo esse fenômeno (RIGHETTI et al., 2001). Por um lado, essa prática apresenta o baixo custo e simplicidade, por outro, problemas de reprodutibilidade, interação analito/aditivo e até precipitação proteica podem ocorrer (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). A interação do aditivo com a parede do capilar pode prejudicar a formação da camada dielétrica que resulta no FEO, portanto a concentração do aditivo é um importante fator a ser controlado, principalmente se a intenção for evitar esse fenômeno.

O procedimento para se alcançar o revestimento dinâmico envolve lavagem do capilar com eletrólito de corrida contendo o aditivo desejado, seguido da corrida com o analito e por fim, uma lavagem para remoção do aditivo, tendo em vista a imprevisibilidade da sua permanência no capilar. Uma ferramenta para controlar essa imprevisibilidade é a lavagem e aplicação do revestimento dinâmico antes de toda corrida (HORVATH; DOLNÍK, 2001). Exemplos de aditivos utilizados como revestimento dinâmico são: poliacrilamida (GIMÉNEZ et al., 2008) e PBPVSA (*Polybrene-poly(vinylsulfonicacid)*) (HASELBERG et al., 2011).

1.5.2 Revestimento Permanente

Uma alternativa ao processo de revestimento dinâmico é o revestimento permanente, caracterizado ou pela adição de polímeros capazes de se ligar covalentemente à superfície do capilar ou por modificações permanentes na sílica por processos de derivatização. Quando utilizados corretamente, os polímeros serão capazes de se ancorar à sílica, reagindo com parte dos grupamentos silanóis presentes no capilar. No caso das reações de derivatização, o revestimento só será eficiente se a reação ocorrer com todos os silanóis da superfície interna. Esse revestimento leva a uma inibição da adsorção de proteínas, contribuindo para uma boa reprodutibilidade de resultados. Além disso, este revestimento deve se manter estável por

certo tempo e dentro de uma faixa de pH, que depende diretamente do revestimento empregado (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993).

Os capilares com revestimento permanente apresentam um FEO consideravelmente reduzido quando comparado aos capilares não-revestidos devido ao impedimento da formação da camada dielétrica originada a partir da presença de grupamentos silanóis livres no capilar. Nesse contexto é necessário avaliar a μ_{ef} , pois será o principal parâmetro responsável pela migração efetiva do analito (HORVATH; DOLNÍK, 2001). Exemplos de revestimento permanente: EPDMA [do inglês, *epoxy-poly(dimethylacrylamide)*] (CRETICH et al., 2002) e polivinilalcool (PVA) (BELDER et al., 2001).

5. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para seleção de fragmentos de anticorpo contra Gal-3 por EC no contexto da técnica *Phage Display*. Evidências científicas sugerem a participação da Gal-3 no desenvolvimento tumoral e em processos de metástase, além de estar diretamente ligada com o estudo e diagnóstico da IC, uma condição associada com diversas doenças cardíacas. O estudo dessa proteína é auxiliado pela técnica *Phage Display*, que permite a elaboração de uma biblioteca combinatória de fragmentos de anticorpos fusionados a bacteriófagos e sua seleção contra um alvo (*panning*). Contudo, há limitações associadas à seleção do alvo como: baixa seletividade, tamanho de alvo e excesso de trabalho necessário. Assim, a busca por novas técnicas, mais seletivas, rápidas e menos simplificadas é importante. Neste contexto, a técnica de EC foi avaliada como alternativa à etapa de seleção. Essa técnica é conhecida pela sua alta resolução, eficiência, baixo custo e baixa geração de resíduos, além de ser compatível com análise biomoléculas e vírus.

Muitos desafios foram encontrados ao longo do trabalho, incluindo a adsorção da Gal-3 na parede do capilar não-revestido e revestido e degradação proteica. Para superar essas dificuldades foram explorados o uso de um capilar revestido e o aditivo catiônico trietilamina para inibir o processo de adsorção na parede do mesmo, permitindo a migração da proteína. A modificação de parâmetros eletroforéticos contribuiu para maior eficiência e menor tempo de análise. A incubação da biblioteca de Fab com a proteína alvo promoveu a formação do complexo [Gal-3 + fago] que ao ser introduzido no sistema EC migrou pelo capilar, passando pelo detector, gerando um sinal analítico e coletado no reservatório de saída. O crescimento de bactérias infectadas na solução coletada no reservatório de saída do equipamento de EC confirmou a viabilidade do processo de seleção alternativo proposto, proporcionando maior seletividade e rapidez.

Assim, o presente trabalho apresentou uma ferramenta alternativa ao processo de *panning* atualmente utilizado dentro do contexto da técnica *Phage Display*. Atualmente a literatura carece de estudos relacionando a EC e a Gal-3 associada à técnica *Phage Display*. Portanto, os resultados aqui demonstrados representam o início de uma notável relação entre esses temas até então não correlacionados. As vantagens obtidas com a utilização da EC podem ser aplicáveis a outros alvos, se configurando, dessa forma, como um ponto de partida para diversos trabalhos posteriores.

6. REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*, 6a ed, Editora Saunders, 2007.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. Ed. Cap. 5, p. 91. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALTRIA, K.D. *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications*. New Jersey: 349 p. 1996.
- ANDREEV, V. P.; LISIN, E. E. *Investigation of the electroosmotic flow effect on the efficiency of capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 13(1), 832–83, 1992.
- ANDRIS-WIDHOPF, J., et al. (Ed). *Generation of antibody libraries: PCR amplification and assembly of light- and heavy-chain coding sequences*. *Phage display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 102–109, 2001.
- ARGÜESO, P.; PANJWANI, N. *Focus on molecules: Galectin-3*. *Exp Eye Res* 92: 2-3, 2011.
- BARBAS, C. F., et al. (Ed). *Phage Display: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- BARONDES, S.H., et al (Ed). *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. *Cell* 76:597–598, 1994.
- BECKTEL, W. J.; SCHELLMAN, J. A. *Protein stability curves*. *Biopolymers*, 26 1859-1877, 1987.
- BELDER, D., et al. (Ed). *Cross-linked poly(vinyl alcohol) as permanent hydrophilic column coating for capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* 22:3813–3818, 2001.
- BENHAR, I. *Biotechnological applications of phage and cell display*. *Biotechnology Advances*. v.19, n.1, p.1-33, 2001.
- BIZZOTTO, C. S., et al. (Ed). *Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee*. *FoodScienceTechnol*. 33, 186–191, 2013.
- BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. *Bibliotecas Apresentadas em Fagos*. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 26, 2002.
- CAMBY, I., et al. *Galectin-1: a small protein with major functions*. *Glycobiology* 16 (11):137R-157R, 2006.
- CAZES, J. *Encyclopedia of Chromatography*. Vol. 1, Marcel Dekker Inc. New York, USA, 2001.

CE SOLUTIONS. In: Separation Science - new horizons in chromatography and detection techniques. 2. ed. Basel, Switzerland. 2012. Disponível em: <<http://www.kantisto.nl/images/Kantisto/CESolution/cesol02.pdf>>. Acesso em: 15/05/2019

COLTON, I.J., et al (Ed). *Affinity capillary electrophoresis: A physical-organic tool for studying interactions in biomolecular recognition*. Electrophoresis, 19 367–382, 1998.

CONNIE, M. A., et al (Ed). Evolving Mechanistic Insights into Galectin Functions. In: STOWELL, S. R., CUMMINGS, R. D. *Galectins Methods and Protocols*. New York: Humana Press, cap. 1, p. 3, 2015.

CORRADINI, D., CANNARSSA, G., *LC-GC,14*, 326-330, 1996.

COSTA, José Luiz da. *Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense*. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. doi:10.11606/T.46.2008.tde-23092008-104730. Acesso em: 2019-08-22.

COWLES, E. A. et al (Ed). *Carbohydrate-binding protein 35 isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative*. J. Biol. Chem. 265, 17706–17712, 1990.

CREEMERS, E.E.; PINTO, Y.M. *Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart*. Cardiovasc Res; 89:265—72, 2011.

CRETICH, M., et al. (Ed). *Decreased protein peak asymmetry and width due to static capillary coating with hydrophilic derivatives of polydimethylacrylamide*. Electrophoresis, 23, 2274-2278, 2002.

CUNHA, R.R. *Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)*. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG, 2013. <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17373/1/RAFAELRODRIGUES.pdf>

CUNHA, R.R. *Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol na presença de outros princípios ativos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)*. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG, 2017. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21236>

DESHMANE, S.L. et al. (Ed). *High-performance capillary electrophoresis for determining HIV-1 Tat protein in neurons*. PLoS ONE, 6, art. no. e16148, 2011.

EUGÊNIO, P. DE F. M.; CARRILHO, E. *Evaluation of capillaries with different inner coatings for DNA analysis using dilute polymer solutions by capillary electrophoresis*. J. Braz. Chem. Soc. vol.20 no.10 São Paulo, 2009.

FARCAŞ, E., et al (Ed). *Capillary electrophoresis in the context of drug Discovery*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 10;144:195-212, 2017.

FAREWELL, A.; NEIDHARDT, F. C. *Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(17), 4704–4710, 1998.

FORTUNA-COSTA, A., et al (Ed). *Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis*. *Frontiers in oncology*, v. 4, n. June, p. 1–9, 2014.

FRIEDL, P., ALEXANDER, S. *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity*. *Cell* 147(5):992–1009, 2011.

GE, X.N., et al (Ed). *Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice*. *J Immunol*. Juk 5; 185(2):1205-14, 2010.

GILGES, M.; KLEEMIS, M. H.; SCHOMBURG, G. *Capillary zone electrophoresis separations of basic and acidic proteins using poly(vinyl alcohol) coatings in fused silica capillaries*. *Anal. Chem.* 66, 2038, 1994.

GIMÉNEZ, E., et al. (Ed). *Analysis of intact erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein by capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 29:2161–2170, 2008.

GONZÁLEZ-CURBELO, M.Á., et al (Ed). *Recent application of nanomaterials in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, Volume 38, Issue 19, 2017.

GREWAL, P. K., et al (Ed). *The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis*. *Nature medicine*, 14(6), 648–655, 2008.

GROSSMAN, P. D.; COLBURN, J. C. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Academic Press. San Diego, CA, 1992.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 6ª ed., Rio de Janeiro, LTC, 2005.

HARRIS, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. 7ª Ed., New York, W. H. Freeman and Company, 2012.

HASELBERG, R., et al. (Ed). *Capillary electrophoresis–mass spectrometry using non covalently coated capillaries for the analysis of biopharmaceuticals*. *AnalBioanalChem*, 400:295–303, 2011.

HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Hewlett Packard Co. 5091–6199, 1997.

HEMMINGA, M. A., et al. (Ed). *Viruses: incredible, nano machines. New advance with filamentous phages*. *European Biophysics Journal*, v.39, n.4, p.541-550, 2010.

HJERTÉN, S. *Free Zone Electrophoresis*, *Chromatogr. Rev.* 9, 1967.

HJERTÉN, S., et al. (Ed). *Fast, high-resolution (capillary) electrophoresis in buffers designed for high field strengths*. *Electrophoresis*. 16(4): 584–594, 1995.

HONJO, Y., et al. (Ed). *Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells*. Clin Cancer Res 7(3):661–8, 2001.

HORVATH, J.; DOLNÍK, V. *Polymer wall coatings for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 22, 644-655, 2001.

HRYNCHYSHYNA, N., et al (Ed). *Galectin-3: A new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure*. Archives of Cardiovascular Disease 106, 541—546, 2013.

HUANG, J. X; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPERA, M. A. *Development of Anti Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.56, n.9, p.4569-4582, 2012.

HUCK, C.W.; BONN, G.K. *Analysis of Proteins by Capillary Electrophoresis*. Methods in Molecular Biology, vol. 384: Capillary Electrophoresis, 2004.

IACOBINI, C. et al (Ed). *Role of Galectin-3 in Diabetic Nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology, v. 14, n. 90003, p. 264S–270, 2003.

ICTV, 2014. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Taxonomy. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

JIANFENG, W.U., et al (Ed). *Investigation of Enantiomeric Separation of Chiral Drugs by CE Using Cu(II)–Clindamy in Complex as a Novel Chiral Selector*. Chromatographia 74:789–797, 2011.

JONES, M. L., et al. (Ed). *Targeting membrane proteins for antibody discovery using phage display*. Sci Rep. 18;6:26240, 2016.

JORGENSON, J.W.; LUKACS, K.D. *Capillary zone electrophoresis*. Sci. (Washington, DC); (United States). 222, 1983.

KAHLE, J.; MAUL, K.J.; WÄTZIG, H. *The next generation of capillary electrophoresis instruments: Performance of CE-SDS protein analysis*. Electrophoresis, 39(2):311-325, 2018.

KONTHUR, Z.; WALTER, G. *Automation of phage display for high-through put antibody development*. Targets. v.1, n.1, p.30-36, 2002.

KRZEŚLAK, A.; LIPIŃSKA, A. *Galectin-3 as a multifunctional protein*. Cellular & amp; molecular biology letters, v. 9, n. January, p. 305–328, 2004.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, 1993.

LAW, W. S.; ZHAO, J. H.; LI, S.F.Y. *On-line sample pre concentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications*. Electrophoresis, 26, 3486, 2005.

- LI, S.F.Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, practice and applications*. Amsterdam: Elsevier, 583 p, 1993.
- LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. *Galectins: regulators of acute and chronic inflammation*. Ann NY AcadSci. 1183:158-82, 2009.
- MATARRESE, P., et al. (Ed). *Galectin-3 Overexpression Protects From Apoptosis By Improving Cell Adhesion Properties*. Int. J. Cancer: 85, 545–554, 2000.
- MAYER, B. X.; MÜLLER, M. *Long-term analyses with capillary electrophoresis*. LC–GC, Europe 2–7, 2001.
- MEDVEDEVA, E.A., et al (Ed). *Galectin-3 in patients with chronic heart failure: Association with oxidative stress, inflammation, renal dysfunction and prognosis*. Minerva Cardioangio 164(6):595-602, 2016.
- MELO, F., et al. (Ed). *The promigratory activity of the matricellular protein galectin-3 depends on the activation of PI-3 kinase*. PLoS One 6(12):e29313, 2011.
- MEREDITH, J.E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M.A. *The extracellular matrix as a cell survival factor*. Molecular Biology of the Cell. 4(9):953-961, 1993.
- MIKKERS, F.E.P.; EVERAERTS, F.M.; VERHEGGEN, P.E.M. *Concentration distributions in free zone electrophoresis*. J. Chromatogr. 169 1–10, 1979.
- MORZUNOVA, T. G. *Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (A review)*. Pharm. Chem. J. 4, 158-170, 2006.
- NEWLACZYL, A.U.; YU, L.G. *Galectin-3-a jack-of-all-trades in cancer*. Cancer Lett 313: 123-128, 2011.
- NISHIYAMA, J. *Up-regulation of galectin-3 in acute renal failure of the rat*. Am J Pathol 157: 815-823, 2000.
- O'DRISCOLL, L., et al. (Ed). M. *Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro*. Anticancer Res 22(6A):3117–25, 2002.
- OCHIENG, J., FURTAK, V., LUKYANOV, P. *Extracelular functions of galectin-3*. Glycoconjugate Journal 19, 527-535, 2004.
- OLABI, M.; STEIN, M.; WÄTZIG, H. *Affinity capillary electrophoresis for studying interactions in life sciences*. Methods, Volume 146, Pages 76-92, 146:76-92, 2018.
- OUIMET, C.M.; D'AMICO, C.I.; KENNEDY, R.T. *Advances in Capillary Electrophoresis and the Implications for Drug Discovery*. Expert OpinDrugDiscov, 12(2):213-224, 2017.
- PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. *Phage display: concept, innovations, applications and future*. Biotechnology Advances. v.28, n.6, p.849- 858, 2010.

PERKAMPUS, H.H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1992.

PERRET, D. *Capillary electrophoresis for drug analysis*. Clarke's analysis of drugs and poisons: Pharmaceutical Press, v.1. 30, p.535-549, 2003.

PUGLIESE, G., et al (Ed). *Galectin-3 in diabetic patients*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 52, n. 10, p. 1413–1423, 2014.

RADER, C.; STEINBERGER, P.; BARBAS, C. *Selection from antibody libraries*. In: BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; e SILVERMAN, G. J. (eds.) *Phage Display - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

RAMAUTAR, R. *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Clinical Metabolomics*. Advances in Clinical Chemistry, Volume 74, 2016.

RAMI, A., et al (Ed). *An overview on application of phage display technique in immunological studies*. Asian Pac J Trop Biomed, 2017.

RIBEIRO, M. M. A. de C., *Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)*. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG, 2017. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/19846>

RICHES, P. G.; KOHN, J. *Improved resolution of cellulose acetate membrane electrophoresis*, Ann. Clin. Biochem. 24 77–79, 1987.

RIGHETTI, P. G., et al. (Ed). *Electrophoresis*, 22, 603–611, 2001.

RODI, D.J.; MAKOWSKI, L.; KAY, B.K. *One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies*. Curr Opin Chem Biol; 6:92–96, 2002.

ROSA, M.; ROBERTS, C. J.; RODRIGUES, M. A. *Connecting high-temperature and low-temperature protein stability and aggregation*. PloS one, 12(5), e0176748. doi:10.1371/journal.pone.0176748, 2017.

ROSEMAN, D.S.; WEINBERGER, R. *Quantitative capillary zone electrophoresis method for the precise determination of charge differences arising from the manufacture of heparan-N-sulfatase*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 85, 67–73, 2013.

RUDIN, A., et al. (Ed). *Differential kinetics and distribution of antibodies in serum and nasal and vaginal secretions after nasal and oral vaccination of humans*. Infect Immun.66(7):3390-6, 1998.

SANFELICE, D; TEMUSSI, P. A. *Cold denaturation as a tool to measure protein stability*. Biophys Chem, 208:4–8. doi:10.1016/j.bpc.2015.05.007, 2016.

- SCHINDLER, E. I., et al (Ed). *Short- and long-term biologic variability of galectin-3 and other cardiac biomarkers in patients with Stable heart failure and healthy adults*. ClinChem 62: 360-366, 2016.
- SCHURE, M. R.; LENHOFF, A. M. *Consequences of wall adsorption in capillary electrophoresis: theory and simulation*. Analytical Chemistry, 65(21), 3024–3037, 1993.
- SHEKHAR, M., et al. (Ed). *Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions*. Am J Pathol. Dec;165(6):1931-41, 2004.
- SMITH, G. P. *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, v.228, p.1315-1317, 1985.
- STOCKS, J.; NANJEE, M. N.; MILLER, N. E. *Analysis of high density lipoproteins by capillary zone and capillary SDS gel electrophoresis*. J Lipid Res.; 39:218–227, 1998.
- SUNTORNUSUK, L. *Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis: a survey on recent applications*. J Chromatogr Sci. Evanston, v. 45, n. 9, p. 559-577, 2007.
- TAKEMOTO, Y., et al (Ed). *Galectin-3 regulates atrial fibrillation remodeling and predicts catheter ablation outcomes*. JACC Basic TranslSci 1: 143-154, 2016.
- TAVARES, M. F. M. *Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar*. Quím. Nova, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, Oct, 1997.
- TAVARES, M.F.M. *Eletroforese capilar: Conceitos básicos*. Quim. Nova. 173–181, 1995.
- TISELIUS, A. *The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins*. Suécia, 1930.
- TRIMBOLI, P., et al. *Galectin-3 and HBME-1 improve the accuracy of core biopsy in indeterminate thyroid nodules*. Endocrine 52: 39-45, 2016.
- TUR, M.K., et al. (Ed). *Selection of scFv Phages on Intact Cells Under Low pH Conditions Leads to a Significant Loss of Insert-Free Phages*. Bio Techniques 30:404-413, 2001.
- VARKI, A., et al., (Ed). *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- VEDOVELI, N. C. P. S.; PICANÇO E CASTRO, V. *Manual para construção de vetores*. Ribeirão Preto, FUNDHERP, 2016.
- VODNIK, M., et al. (Ed). *Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack*. Molecules. v.16, n.1, p.790-817, 2011.
- WARFIELD, P., et al. (Ed). *J. Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3*. Invasion Metastasis, 17(2):101–12, 1997.
- WÄTZIG, H.; DEGENHARDT, M.; KUNKEL, A., *Electrophoresis, 19*, 2695-2752, 1998.

YANG, R.Y.; HSU, D.K.; LIU, F.T. *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 93, 6737–6742, 1996.

ZHAO, P., et al (Ed). *New method for determination of average scFv fragment number displayed on the M13 phage surface*. PureAppl. Chem., Vol. 82, No. 1, pp. 205–211, 2010.

ZOU, J., et al. (Ed). *Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion*. Carcinogenesis 26(2):309–18, 2005.

ZULKIFLI, A. H.; SURIDANDA, D. S. *Tolvaptan: A novel diuretic in heart failure management*. J Tehran Heart Cent. 11(1):1-5, 2016.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).