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

Efeitos do fragmento variável de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizado em nanocápsulas na aterosclerose experimental

Marcela Frota Cavalcante

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Co-orientadora:
Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

São Paulo
2016

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

Efeitos do fragmento variável de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizado em nanocápsulas na aterosclerose experimental

Marcela Frota Cavalcante
Versão Original

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Co-orientadora:
Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

São Paulo
2016

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

Cavalcante, Marcela Frota
C376e Efeitos do fragmento variável de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizado em nanocápsulas na aterosclerose experimental / Marcela Frota Cavalcante. -- São Paulo, 2016.
273p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientadora: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra
Co-orientadora: Pohlmann, Adriana Raffin

1. Bioquímica clínica 2. Arteriosclerose I. T. II Abdalla, Dulcinéia Saes Parra, orientador. III. Pohlmann, Adriana Raffin, co-orientadora.

616.0756 CDD

Marcela Frota Cavalcante

Efeitos do fragmento variável de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizado em nanocápsulas na aterosclerose experimental

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientadora/Presidente

_____

1° examinador

_____

2° examinador

_____

3° examinador

_____

4° examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2016.

Aos meus pais Frieda e Francisco
por apoiarem meus sonhos,
por sustentarem meus passos e
por nunca me deixarem desistir.

Ao meu irmão Paulo
pela amizade e
por assumir minhas responsabilidades
de filha durante essa jornada.

À minha orientadora Dulci
por me mostrar que a Ciência faz parte de mim,
por guiar meus caminhos e
nunca me deixar desanimar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família que tornou possível a relização deste sonho.

Agradeço ao Gustavo pelos momentos vividos neste último ano, por acreditar nos meus sonhos e por caminhar sempre ao meu lado.

Agradeço aos amigos Débora, Gisele, Larissa, Leo, Natália, Nathália D., Nathália S., Nayanne, Patrícia e Rodrigo pelos sorrisos, pelas conversas e por nunca perderem a fé em mim.

Agradeço, especialmente, à minha orientadora Dulci pelos ensinamentos, pelas conversas e pelo ombro amigo.

Agradeço aos colegas de laboratório, minha segunda família nesta cidade, Gustavo, Jac, Luciane, Soraya e Walter pelo apoio diário nos experimentos, pelas discussões científicas e pelas conversas na hora do café.

Agradeço à Profa. Adriana Pohlmann, à Profa. Silvia Guterres, à Profa. Sandra Farsky, ao Prof. Bernhard Brüne, ao Prof. Dmitry Namgaladze e ao Prof. Koiti Araki pela colaboração e pela disponibilidade em sempre atender às minhas dúvidas.

Agradeço às colegas Carine Drewes, Márcia Adorne, Marina Spatti, Marina Kremmerer e Mayara Uchiyama pela colaboração, pelas várias horas dedicadas aos experimentos e por enriquecerem este trabalho e a minha vida.

Agradeço aos técnicos Elaine, Mário e Renata e aos funcionários Ana, Edna, Mari, Rose, Claudinha, Renata, Flávia, Silvânia, Fátima e José pela paciência durante os experimentos e pela enorme contribuição a este trabalho.

Agradeço aos colaboradores voluntários que doaram sangue para a execução deste trabalho e aos colaboradores involuntários, os 106 camundongos utilizados neste projeto, porque, sem eles, nossos objetivos não seriam alcançados.

Agradeço à FAPESP e ao CNPq por acreditarem na Ciência, por nos fornecerem apoio financeiro para a execução deste projeto e pelo auxílio mensal por meio de bolsas e reserva técnica.

Por fim**,** agradeço imensamente a todos os envolvidos na produção deste trabalho durante os últimos 4 anos.

“Dans la vie, rien n’est à craindre, tout est à comprendre.”

Marie Curie

RESUMO

CAVALCANTE, M.F. **Efeitos do fragmento variável de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizado em nanocápsulas na aterosclerose experimental.** 2016. 273f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo. A aterosclerose é a base fisiopatológica dessas doenças, sendo definida como um processo crônico-inflamatório multifatorial, resultando da interação de diferentes células como linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas na parede arterial. A lipoproteína de baixa densidade eletronegativa [LDL(-)], uma subfração modificada da LDL nativa, desempenha um papel-chave na aterosclerose, uma vez que as modificações sofridas por esta partícula são capazes de induzir o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos e a subsequente formação de células espumosas. O sistema imunológico é crucial no processo aterogênico e estratégias terapêuticas direcionadas à imunoregulação deste processo têm sido utilizadas como novas alternativas tanto na prevenção do desenvolvimento quanto da progressão desta doença. Dentre essas estratégias, destaca-se o uso de fragmentos de anticorpos como o scFv (do inglês, *single chain fragment variable*), que podem ainda estar conjugados a nanopartículas com o intuito de aumentar sua eficiência de ação no organismo. Diante do papel da LDL(-) na aterosclerose, este projeto objetivou avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* de um sistema nanoestruturado contendo fragmentos scFv anti-LDL(-) derivatizados na superfície de nanocápsulas sobre macrófagos murinos e humanos primários e em camundongos *knockout* para o gene do receptor da LDL (*Ldlr*$^{-/-}$) no desenvolvimento e na progressão dessa doença. Demonstrou-se que o tratamento de macrófagos com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn diminuiu de forma significativa a captação de LDL(-), assim como a expressão de IL-1β (mRNA e proteína) e MCP-1 (mRNA). Foi demonstrada a internalização da nanoformulação pelos macrófagos via diferentes mecanismos de endocitose, demonstrando seu potencial uso como carreador de fármacos. *In vivo,* a nanoformulação diminuiu de forma significativa a área da lesão aterosclerótica em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ submetidos à avaliação pela técnica de tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, PET), utilizando o radiotraçador ^{18}F-FDG (^{18}F-desoxiglicose),

associada à tomografia computadorizada (CT) com agente de contraste iodado, além da análise morfométrica das lesões no arco aórtico. O conjunto dos resultados obtidos evidenciou a ação ateroprotetora da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, reforçando seu potencial como estratégia terapêutica na aterosclerose.

Palavras-chave: aterosclerose, endocitose, lipoproteína de baixa densidade, LDL(-), macrófago, nanoformulação, scFv, ^{18}F-FDG, PET/CT.

ABSTRACT

CAVALCANTE, M.F. **Effects of an anti-LDL(-) single chain fragment variable vectorized in nanocapsules in experimental atherosclerosis.** 2016. 273f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide. Atherosclerosis is the pathophysiological basis of these diseases, defined as a chronic inflammatory multifactorial process, resulting from the interaction of several cells such as lymphocytes macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells within the arterial wall. The electronegative low-density lipoprotein [LDL(-)], a modified subfraction of native LDL, plays a key role in atherosclerosis, since its modifications are capable of inducing the accumulation of cholesteryl esters in macrophages and the subsequent foam cells formation. The immune system is crucial in atherogenic process and therapeutic strategies directed to the immunoregulation of this process have been used as a new alternative in the prevention of the development as well as the progression of this disease. Among these strategies, it is the use of antibody fragments such as scFv (single chain fragment variable), which may be also conjugated to nanoparticles in order to increase their efficiency in the body. Given the role of LDL(-) in atherosclerosis, the aim of this project was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of a nanostructured system containing scFv anti-LDL(-) fragments derivatized on the surface of nanocapsules on murine and human primary macrophages and in the development and progression of the disease in LDL receptor knockout mice (*Ldlr*$^{-/-}$). It was demonstrated that the treatment of macrophages with scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn formulation significantly decreases the uptake of LDL(-) and the expression IL-1β (mRNA and protein) and MCP-1 (mRNA). Moreover, the internalization of the nanoformulation by macrophages through different endocytosis mechanisms was shown, demonstrating its potential use as a nanocarrier. *In vivo*, the nanoformulation decreased the area of atherosclerotic lesions in *Ldlr*$^{-/-}$ mice evaluated by positron emission tomography with ^{18}F-FDG associated with computed tomography with iodinated contrast agent (PET/CT), besides the lesion morphometric analysis at the aortic arch Thus, these data provide evidence of the atheroprotection action of the

ateroprotection action of the scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn formulation, suggesting its promising use as a therapeutic strategy for atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis, endocytosis, low-density lipoprotein, LDL(-), macrophage, nanoformulation, scFv, ^{18}F-FDG, PET/CT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica 39

Figura 2 - Envolvimento de linfócitos no desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica 43

Figura 3 - Representação da composição da partícula de LDL 45

Figura 4 - Representação esquemática do anticorpo IgG e de diferentes fragmentos de anticorpos (A) e do scFv em maior escala (B) 50

Figura 5 - Representação esquemática dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas 52

Figura 6 - Representação da técnica de Tomografia por Emissão de Pósitrons 56

Figura 7 - Representação esquemática do complexo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn formado pela ligação entre as nanocápsulas MCMN-Zn e o scFv anti-LDL(-).....79

Figura 8 - Imagens representativas dos procedimentos para técnica de microscopia intravital 90

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo de tratamento em modelo de lesão inicial.....93

Figura 10 - Imagens representativas do arco aórtico de camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ obtidas por técnica de PET/CT 96

Figura 11 - Perfil de distribuição do diâmetro médio das nanocápsulas de núcleo lipídico LNC 103

Figura 12 - Perfil de distribuição do diâmetro médio das nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana (MN) 104

Figura 13 - Perfil de distribuição do diâmetro médio da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.....105

Figura 14 - Avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a captação de LDL(-) em macrófagos murinos e humanos primários por citometria de fluxo.....106

Figura 15 - Avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a captação de LDL(-) em macrófagos murinos primários por microscopia confocal ..107

Figura 16 - Avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a captação de LDL(-) em macrófagos humanos primários por microscopia confocal 108
Figura 17 - Efeitos da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a expressão gênica de *Il1b* em macrófagos murinos e de *IL1B* e *MCP1* em macrófagos humanos primários.....110

Figura 18 - Efeitos da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a expressão proteica de IL-1β em macrófagos murinos e humanos primários 111

Figura 19 - Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos e humanos primários por citometria de fluxo 112

Figura 20 - Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários por microscopia confocal.....113
Figura 21 - Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos humanos primários por microscopia confocal.....114
Figura 22 - Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos primários por microscopia hiperespectral e de fluorescência em sistema CytoViva®.....115

Figura 23 - Espectro da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn no interior de macrófagos primários.....116
Figura 24 - Investigação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos primários por citometria de fluxo 117
Figura 25 - Investigação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários por microscopia confocal. 118

Figura 26 - Investigação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos humanos primários por microscopia confocal ...119

Figura 27 - Avaliação da interação leucócito-endotélio em camundongos por microscopia intravital: leucócitos em rolamento.....121

Figura 28 - Avaliação da interação leucócito-endotélio em camundongos por microscopia intravital: leucócitos aderidos 122

Figura 29 - Avaliação da permeabilidade vascular por microscopia intravital: cálculo da mudança de intensidade óptica 123

Figura 30 - Avaliação da permeabilidade vascular por microscopia intravital: imagens em campo escuro 124

Figura 31 - Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: reconstrução em 3D dos grupos CC e CHC 130

Figura 32 - Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão do coração e da aorta dos grupos CC e CHC 130

Figura 33 - Distribuição do ^{18}F-FDG em modelo de desenvolvimento de lesão aterosclerótica inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ 131

Figura 34 - Captação do ^{18}F-FDG no coração e na aorta em relação ao sangue em modelo de desenvolvimento de lesão aterosclerótica inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ 132

Figura 35 - Captação do ^{18}F-FDG no arco aórtico de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ em modelo de lesão aterosclerótica inicial.....134

Figura 36 - Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão sagital completa 135

Figura 37 - Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão coronal completa.....136

Figura 38 - Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão axial completa 137

Figura 39 - Comparação entre a análise morfométrica da área da lesão aterosclerótica (x 10^4 μm^2) e o SUV do ^{18}F-FDG (%ID/cm^3) no arco aórtico de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$em modelo de lesão inicial 140

Figura 40 - Quantificação do conteúdo de colágeno no arco aórtico de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ em modelo de lesão aterosclerótica inicial.....141

Figura 41 - Quantificação do conteúdo lipídico na aorta de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ em modelo de lesão aterosclerótica inicial 143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta hipercolesterolêmica oferecida aos animais..... 70

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para quantificação dos níveis de expressão de mRNA em macrófagos humanos e murinos primários por PCR em Tempo Real.....84

Tabela 3 - Inibidores de endocitose utilizados no estudo da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos e humanos primários.....86

Tabela 4 - Celularidade sanguínea, após uma hora, de animais tratados com Salina, nanocápsulas MCMN-Zn e formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por via intravenosa, aos quais foi ofertada dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica 125

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos da urina de animais tratados com Salina, nanocápsulas MCMN-Zn e formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por via intravenosa, aos quais foi ofertada dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica 127

Tabela 6 - Controle de peso médio dos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial ao início e ao fim das 9 semanas, divididos por grupo de tratamento .128

Tabela 7 - Controle do consumo médio semanal de ração pelos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial durante 9 semanas, divididos por grupos de tratamento 129

Tabela 8 - Celularidade sanguínea dos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial ao fim das 9 semanas, divididos por grupo de tratamento.....138

Tabela 9 - Parâmetros bioquímicos da urina dos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial ao fim das 9 semanas, divididos por grupo de tratamento 139

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	*Apoptosis associated speck-like protein containing* CARD
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
ATCC	*American Type Culture Collection*
BCA	*Bicinchoninic acid assay*
BHT	Hidroxitolueno butilado
BMGY	*Buffered Glycerol Complex Medium*
BMMY	*Buffered Complex Methanol Medium*
BSA	*Bovine sérum albumin* ou Albumina sérica bovina
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CBA	*Cytometric Bead Array*
cDNA	DNA complementar
CC	Controle com dieta padrão
CD	*Cluster of differentiation*
CHC	Controle com dieta hipercolesterolêmica
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CT	*Computed Tomography* ou Tomografia computadorizada
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DAPI	*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride*
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DCV	Doença Cardiovascular
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DiI(C_{18})	*1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate*
DLS	Difração a laser
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIPA	*5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride*
ELISA	Enzimaimunoensaio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FDG	Fluorodeoxiglicose
Fcγ	Receptor Fc para gama globulina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPLC	*Fast Protein Liquid Chromatography*
FOXP3	*Forkhead box P3*
GLUT	Proteína transportadora de glicose
HC	Hipercolesterolêmica
HRP	*Horseradish peroxidase*
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMT	Espessura média da camada íntima
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IQ	Instituto de Química
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL(-)	Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LDLm	Lipoproteína de baixa densidade modificada
LDLn	Lipoproteína de baixa densidade nativa
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL contendo fosfolípides oxidados)

Ldlr$^{-/-}$	*knockout* para o gene do receptor de LDL
LNC	Nanocápsulas de núcleo lipídico
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Receptor de LDL oxidada semelhante à lectina
LSM	*Lymphocyte Separation Medium*
MAb	Anticorpo monoclonal
MCMN	*Metal Complex Multiwalled Nanocapsules*
MCP-1	Proteína-1 quimiotática para monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MN	*Multiwalled Nanocapsules* ou Nanocápsulas multiparede
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSFM	*Macrophage serum-free media*
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NF-κB	Fator de transcriçãoo nuclear *kappa* B
NIH	*National Institutes of Health*
OCT	3-butil-1-fenil-2-(telúriofenil)oct-2-en-1-ona
ORO	*Oil Red O*
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCL	Policaprolactona
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PCR-RT	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
PDGF-B	Fator de crescimento B derivado de plaquetas
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Poli etileno glicol
PET	*Positron Emission Tomography* ou Tomografia por Emissão de Pósitrons
PLA	*Ácido polilático*
PLA2	Fosfolipase A2
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PRR	Receptores de reconhecimento padrão

RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	Fragmento variável de cadeia única (*Single chain fragment variable*)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SFB	Soro fetal bovino
SMase	Esfingomielinase
SPAN	Monoesterato de sorbitano
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
SUV	*Standardized uptake value* ou Valor padronizado de captação
SR	Receptor *scavenger*
TGF-β	Fator de transformação do crescimento *beta*
TLR	Receptor *Toll Like*
TMB	Tetrametil Benzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USIV	Ultrassonografia intravascular
VCAM-1	Molécula 1 de adesão vascular
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VL	Cadeia variável leve de anticorpo
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VH	Cadeia variável pesada de anticorpo
VOI	Volume de interesse
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
1. INTRODUÇÃO 35
1.1 Aterosclerose: conceito e fisiopatologia 37
1.2 LDL: estrutura e modificações 44
1.3 LDL(-): contribuição no processo aterosclerótico 46
1.4 scFv anti-LDL(-): desenvolvimento e efeitos na aterosclerose 48
1.5 Nanotecnologia: conceitos e utilizações 51
1.6 Nanoformulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn: desenvolvimento e efeitos no processo aterogênico 54
1.7 Técnicas de imagem: Tomografia por Emissão de Pósitrons no diagnóstico da aterosclerose 55
2. OBJETIVOS 59
2.1 Objetivo Geral 61
2.2 Objetivos Específicos 61
3. MATERIAIS E MÉTODOS 63
3.1 Questões Éticas 65
3.2 Materiais 65
3.3 Células 65
3.3.1 Levedura *Pichia pastoris* 65
3.3.2 Fibroblastos murinos da linhagem L-929 66
3.3.3 Macrófagos murinos primários 66
3.3.4 Macrófagos humanos primários 66
3.4 Condições de cultivo 66
3.4.1 Macrófagos murinos primários 66
3.4.2 Macrófagos humanos primários 68
3.5 Animais de laboratório 69
3.6 Dieta hipercolesterolêmica 70

3.7 Isolamento e caracterização de LDL eletronegativa 70
3.8 Obtenção e caracterização do scFv anti-LDL(-) 72
3.8.1 Expressão do scFv anti-LDL(-) 72
3.8.2 Concentração do sobrenadante e purificação do scFv anti-LDL(-) 73
3.8.3 Confirmação da expressão de scFv anti-LDL(-) 74
3.8.3.1 Análise das proteínas em SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 74
3.8.3.2 Coloração do gel de SDS por prata 74
3.8.3.3 Análise de proteínas por Western Blot 75
3.8.3.4 Afinidade do scFv anti-LDL (-) pelo método ELISA 75
3.9 Produção da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn 76
3.9.1 Preparação do complexo metálico de nanocápsulas multiparedes (MCMN-Zn) 77
3.9.2 Conjugação do scFv anti-LDL(-) às nanocápsulas MCMN-Zn 78
3.9.3 Caracterização físico-química das nanopartículas 79
3.9.4 Afinidade do complexo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn pelo método ELISA 80
3.10 Estudos *in vitro* 80
3.10.1 Caracterização de macrófagos murinos primários diferenciados de células da medula óssea 81
3.10.2 Avaliação do efeito *in vitro* da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn em macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários sobre a formação de células espumosas 81
3.10.2.1 Citometria de fluxo 82
3.10.2.2 Microscopia confocal 82
3.10.3 Avaliação da expressão gênica de citocinas pró e antiinflamatórias por PCR em Tempo Real 83
3.10.4 Quantificação proteica de citocinas pró e antiinflamatórias 84
3.10.5 Avaliação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários 85
3.10.5.1 Citometria de fluxo 85
3.10.5.2 Microscopia confocal 86
3.10.5.3 Microscopia hiperespectral e de fluorescência em sistema CytoViva® 87

3.11 Estudos *in vivo* 88
3.11.1 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a interação leucócito-endotélio e sobre a permeabilidade vascular por técnica de microscopia intravital 88
3.11.2 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a área da lesão aterosclerótica 92
3.11.2.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons associada à Tomografia Computadorizada 93
3.11.2.2 Reconstrução de imagens 95
3.11.2.3 Processamento e análise de imagens 95
3.11.2.4 Celularidade sanguínea após o tratamento 96
3.11.2.5 Análise qualitativa da urina 96
3.11.2.6 Análise morfométrica das lesões ateroscleróticas no arco aórtico 96
3.11.2.7 Quantificação do conteúdo de colágeno no arco aórtico 98
3.11.2.8 Quantificação do conteúdo lipídico na aorta 98
3.12. Análise Estatística 99
4. RESULTADOS 101
4.1 Caracterização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn 103
4.2 Estudos *in vitro* 105
4.2.1 Avaliação do efeito *in vitro* da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn em macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários sobre a formação de células espumosas 105
4.2.2 Avaliação da expressão gênica e proteica de citocinas pró e antiinflamatórias 108
4.2.3 Avaliação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários 111
4.3 Estudos *in vivo* 120
4.3.1 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a interação leucócito-endotélio e sobre a permeabilidade vascular por técnica de microscopia 120

intravital
4.3.2 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a área da lesão aterosclerótica 128
4.3.2.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons associada à Tomografia Computadorizada 128
4.3.2.2 Análise morfométrica das lesões ateroscleróticas no arco aórtico 139
4.3.2.3 Quantificação do conteúdo de colágeno no arco aórtico 141
4.3.2.4 Quantificação do conteúdo lipídico na aorta 142
5. DISCUSSÃO 145
6. CONCLUSÃO 159
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 163
ANEXOS 189
ANEXO 1 – SOLUÇÕES E TAMPÕES 191
ANEXO 2 - CERTIFICADO DE QUALIDADE EM BIOSSEGURANÇA 200
ANEXO 3 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA 202
ANEXO 4 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 203
ANEXO 5 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 205
ANEXO 6 –DEPÓSITO DA PATENTE PI1106193-6 206
ANEXO 7 –DEPÓSITO DA PATENTE 10 2012 025132-9 207
ANEXO 8 – ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS 208
ANEXO 9 – ARTIGO SUBMETIDO EM PERIÓDICO 241
ANEXO 10 – ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO 261
ANEXO 11 – FICHA DO ALUNO 262
ANEXO 12 – CURRÍCULO LATTES DO ALUNO 265

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aterosclerose: conceito e fisiopatologia

As doenças cardiovasculares (DCV) são definidas como processos patológicos contínuos que se iniciam com a presença de um ou mais fatores de risco, levando ao desenvolvimento de lesões na parede arterial, que progridem e causam eventos cardiovasculares como o infarte agudo do miocárdio, dentre outros (DAHLÖF, 2010). Diversos são os fatores de risco associados a essas doenças, destacando-se: sedentarismo, tabagismo, má alimentação somada à obesidade, hipertensão e estresse, além de diabetes tipo 2 e dislipidemias quando não controladas (ESC/EAS, 2011). As DCV lideram as causas de mortalidade mundial (AHA, 2014). São mais de 500 mil óbitos por ano no Brasil, 400 mil em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América e cerca de 31% do número total de mortes no mundo (WHO, 2011).

A aterosclerose é a principal causa de DCV, estando associada à doença arterial coronariana, à doença vascular-cerebral e à doença vascular periférica (WHO, 2011; TOTH et al., 2014), sendo responsável por mais vítimas fatais do que todos os tipos de câncer combinados (STOCKER et al., 2004; AHA, 2014). É uma doença de desenvolvimento lento, podendo progredir a um estágio avançado no momento em que se inicia a manifestação dos sintomas (ESC, 2012). Dentre os fatores de risco conhecidos, os níveis plasmáticos elevados de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) destacam-se (SNIDERMAN et al., 2012; SNIDERMAN; KWITEROVICH, 2013; TOTH et al., 2014), estando associados a um terço dos casos de aterosclerose descritos (WHO, 2008).

A aterosclerose é uma doença crônico-inflamatória multifatorial da parede arterial – de artérias de calibre médio e grande - com o envolvimento do sistema imunológico (LEEUWEN et al., 2008; CARVALHO, PEREIRA, SHOENFELD, 2010), com participação das imunidades inata e adaptativa (WANROOJI et al., 2006; NILSSON; HANSSON, 2008) e sendo o resultado da interação de diferentes células como linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas

(GEORGE et al., 2000; CHAABANE; COEN; BOCHATON-PIALLAT, 2014). O acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade modificadas (LDLm), o aumento da produção de radicais livres, a presença de microrganismos infecciosos, estresse de cisalhamento, hipertensão, toxinas provenientes do tabaco ou a combinação desses, ou de outros fatores que levam a uma resposta inflamatória compensatória, induzem a ocorrência de uma complexa disfunção endotelial. O endotélio da parede arterial atua como uma barreira entre o sangue e as proteínas da matriz subendotelial e tem grande importância na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose. A ocorrência de disfunção endotelial neste local facilita o desenvolvimento de inflamação (LIBBY, 2006), caracterizando, assim, o processo aterogênico (STOLL et al., 2006; NICCOLI et al., 2012).

A formação da lesão aterosclerótica (Figura 1) pode ser iniciada pelo acúmulo de LDL modificada na camada íntima arterial (MCMAHON et al., 2007). Esse acúmulo é facilitado pelo aumento de LDL circulante, assim como o transporte e a retenção da lipoproteína nos locais preferenciais para o desenvolvimento da lesão nas artérias (LUSIS, 2000; SNIDERMAN et al., 2012). A lipoproteína é transportada para a camada íntima arterial por um mecanismo de difusão passiva dependente da interação entre a apolipoproteína B (Apo B) e proteoglicanos da matriz extracelular (SAHA et al., 2009).

Essa LDL modificada acumulada estimula o aumento da expressão das moléculas de adesão VCAM-1 (molécula 1 de adesão vascular) e ICAM-1 (molécula 1 de adesão intercelular) por células endoteliais e de MCP-1 (proteína 1 quimiotática para monócitos) por células musculares lisas, colaborando com o recrutamento de leucócitos para o local da lesão, proporcionando, assim, a ligação de monócitos circulantes e de células T ao endotélio e a consequente transmigração dessas células à íntima arterial (GU et al, 1998; REAPE; GROOT, 1999; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002). As células endoteliais e as células musculares lisas atuam ainda na secreção do fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês, M-CSF), que induz a diferenciação de monócitos em macrófagos. Os macrófagos capturam as lipoproteínas modificadas, via endocitose mediada por receptor, promovendo o acúmulo de ésteres de colesterol no citoplasma e, consequentemente, formando as chamadas células espumosas (LUSIS, 2000). Essas células espumosas são suscetíveis à apoptose, propiciando a liberação de colesterol e debris celulares e contribuindo para o aumento do conteúdo lipídico no centro necrótico da lesão

(ESTRUCH et al., 2013). Nesta etapa, os macrófagos secretam também interleucina 1 beta (IL-1β), que estimula a ativação de linfócitos, assim como do fator de necrose tumoral alfa (TNFα), que inicia a cascata de citocinas, aumenta a permeabilidade vascular e promove o recrutamento de mais macrófagos, ambos atuando na amplificação da inflamação (LIBBY, 2002).

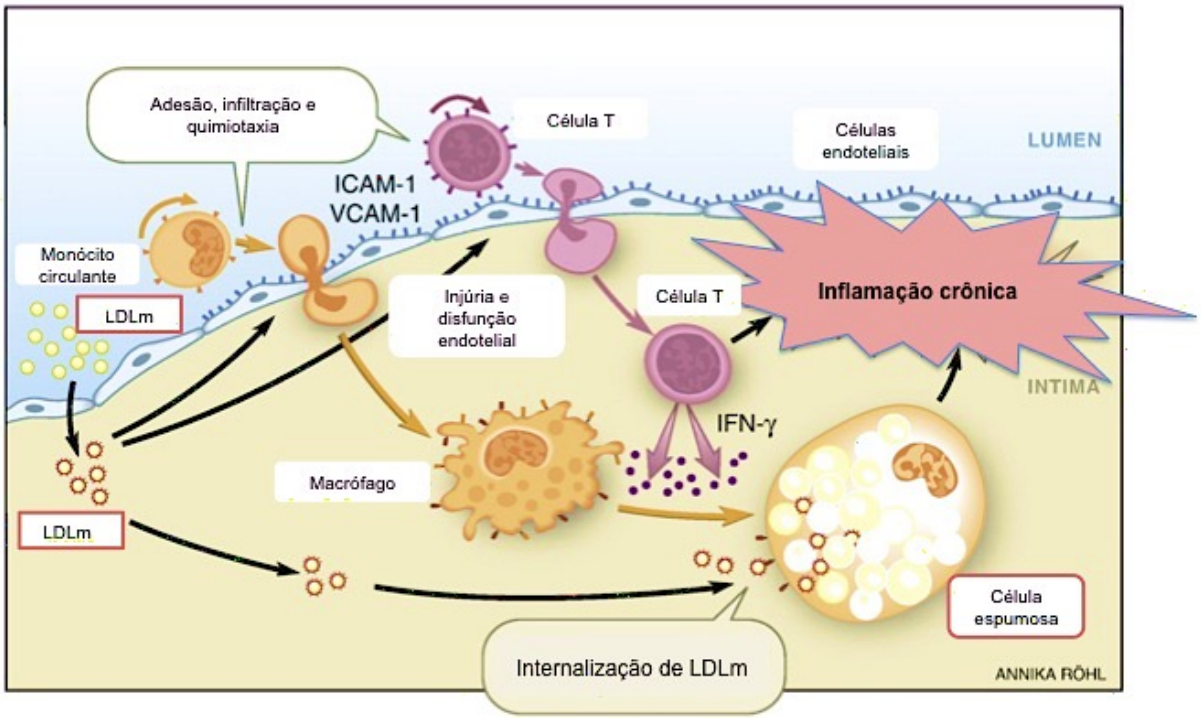


Figura 1: Início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica. As lipoproteínas modificadas, acumuladas na íntima arterial, ativam o endotélio que recruta monócitos circulantes que se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos internalizam a LDL modificada, que causa injúria e disfunção endotelial, e se transformam em células espumosas. Essas células são suscetíveis à apoptose e contribuem para o aumento do conteúdo lipídico no centro necrótico da lesão (Adaptado de ANDERSSON; LIBBY; HANSSON, 2010).

Simultaneamente ocorre o aumento da expressão de PRRs ou receptores de reconhecimento padrão (revisado por ANDERSSON; LIBBY; HANSSON, 2010), que interagem com padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, PAMPs) ou com padrões moleculares associados ao dano (do inglês, DAMPs) e permitem o reconhecimento de antígenos, como a LDLm. No caso da aterosclerose, os receptores mais importantes são os *scavenger* (SRs) e os *Toll-like* (SHASHKIN et al., 2005; ESTRUCH et al., 2013).

Os receptores *scavenger* são divididos em 8 classes (A-H), estando grande parte delas relacionadas ao desenvolvimento da aterosclerose por contribuição direta à formação de células espumosas pela interação com LDLm (revisado por KZHYSHKOWSKA; NEYEN; GORDON, 2012). Dentre os receptores *scavenger* que merecem destaque no reconhecimento e internalização da LDLm podem ser citados: os de classe A (SR-AI e SR-AII), classe B (CD36 e SR-BI) e classe E (LOX1 – receptor de LDL oxidada semelhante à lectina 1) (revisado por MOORE; FREEMAN, 2006).

Os receptores *scavenger* podem variar quanto à habilidade de endocitar e degradar partículas de LDLm. O CD36, por exemplo, é encontrado em diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, adipócitos, células endoteliais e plaquetas e possui diversos ligantes comuns ao SR-A, diferindo, no entanto, em relação à sua baixa afinidade de ligação à LDL extensivamente oxidada (ENDEMAN et al., 1993). Receptores SR-BI, assim como CD36, demonstram alta eficiência no reconhecimento e internalização de LDL oxidada. No entanto, a degradação da partícula é realizada de forma adequada apenas quando internalizada pelo último (SUN et al., 2007). Diversos estudos têm demonstrado o papel crítico dos SRs sobre a formação de células espumosas. Kunjathoor et al., (2002) evidenciaram que ambos os SR-A e o CD36 são responsáveis por 75 a 90% da degradação de LDL modificada por acetilação ou oxidação em estudo envolvendo o uso de macrófagos peritoneais isolados de camundongos *knockout* para os três receptores. Moore e Freeman (2006) determinaram que o CD36 é responsável por 60 a 70% do acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos expostos à LDL oxidada. Em 2010, um estudo realizado por nosso grupo (PEDROSA et al., 2010) demonstrou o aumento da expressão de CD36 e da formação de células espumosas em macrófagos murinos na presença de LDL eletronegativa [LDL(-)], uma subfração modificada da LDL nativa (LDLn). Vale ressaltar que a expressão desses receptores, diferentemente da expressão dos receptores B/E, que reconhecem um domínio N-terminal da apo B-100 (revisado por GLASS; WITZTUM, 2001) na LDL nativa, não é regulada pelo nível de colesterol intracelular, favorecendo a internalização contínua de LDLm e a consequente formação das células espumosas e, assim, de estrias gordurosas (LIBBY, 2006).

Os receptores *toll-like* (TLRs) desempenham um papel importante na regulação da resposta imune inata através do reconhecimento de organismos patogênicos,

proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (MEDZHITOV, 2001; AKIRA et al., 2006) associados aos PAMPs e aos DAMPs. Atualmente, são conhecidos mais de dez tipos de TLRs em humanos e 13 em camundongos (LUNDBERG; HANSSON, 2010), que podem ser expressos tanto na superfície das células quanto em compartimentos intracelulares (HONGHUI et al., 2012). Os TLRs reconhecem os padrões moleculares e ativam NF-κB (Fator de transcrição nuclear *kappa* B), que induz um aumento da expressão de diversos genes inflamatórios, ativando, assim, o sistema imune e intensificando a resposta inflamatória (ADEREM; ULEVITCH, 2000). A implicação dos TLRs na aterosclerose foi sugerida, inicialmente, a partir da observação da expressão de TLR-4 por macrófagos presentes em lesões ateroscleróticas (XU et al., 2001), sendo encontrados também em células endoteliais e musculares lisas (EDFELDT; SWEDENBORG; HANSSON, 2002; OTSUI et al., 2007). Edfeldt e colaboradores (2002) demonstraram o aumento da expressão de TLR-1, TLR-2 e TLR-4 por células endoteliais e macrófagos infiltrados provenientes de lesões ateroscleróticas, o que não foi evidenciado em artérias normais. Adicionalmente, foi determinado o aumento da expressão de TLR4 em monócitos circulantes de pacientes com doença arterial coronariana (METHE et al., 2005). Sabe-se que TLR-4 é o receptor para LPS (lipopolissacarídeo, componente encontrado na parede celular de bactérias gram-negativas) e a interação entre eles depende de um co-receptor, o CD14 (expresso em monócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos). Ambos atuam em conjunto no reconhecimento da LDL eletronegativa e na sua internalização, favorecendo a formação de células espumosas (MILLER et al., 2003) e a indução do seu efeito pró-inflamatório (ESTRUCH et al., 2013).

As células T estão presentes em todos os estágios da aterosclerose e desempenham um papel essencial no início e na progressão de lesões (KETELHUTH, 2013). Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ são recrutados para a íntima arterial (Figura 2), a sua ativação, no entanto, é dependente do reconhecimento de antígenos, que devem ser apresentados por proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) presentes nos macrófagos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Após esse reconhecimento, a resposta imune adaptativa é iniciada e as células T passam a produzir citocinas inflamatórias, como IFN-γ (Interferon gama) e IL-4, variando com o tipo de célula T ativada. Células T $CD4^+$ são encontradas predominantemente em relação a células T $CD8^+$ em placas

ateroscleróticas humanas (revisado por HANSSON; ROBERTSON; SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2006).

Linfócitos T $CD4^+$ podem ser distinguidos em diferentes tipos, dentre eles: Th1, Th2 e Treg (células T regulatórias). As células Th1 secretam IFN-γ e TNF-α, as células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10; ambas regulam negativamente uma a outra através da secreção de suas citocinas especificas. Em termos gerais, células Th1 promovem a ativação de macrófagos, enquanto as Th2 promovem a produção de anticorpos anti-LDLm por linfócitos B (NILSSON; HANSSON; SHAH, 2005). As células Treg, por sua vez, são caracterizadas pela expressão de receptores de superfície CD25 (uma subunidade do receptor de IL-2) e CD4, além do fator de transcrição FOXP3 (do inglês, *forkhead box P3*) (revisado por LIBBY; LICHTMAN; HANSSON, 2013). Essas células atuam na inibição da inflamação e da progressão da lesão aterosclerótica, reduzindo a formação de células espumosas *in vitro* e induzindo a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2 (antiinflamatório) ao invés de M1 (pró-inflamatório) (LIU et al., 2011). Grande parte dos efeitos mediados pelas células Treg são provenientes das citocinas IL-10 e TGF-β (Fator de transformação do crescimento β) (revisado por LAHOUTE et al., 2011). Estudos em camundongos C57BL/6 *Il10*$^{-/-}$ tratados com anticorpo anti-TGF- β demonstraram o agravamento da inflamação vascular assim como o aumento da progressão da lesão aterosclerótica (MALLAT et al., 1999), tendo sido observados resultados semelhantes em camundongos C57BL/6 *Apoe*$^{-/-}$ tratados com o mesmo anticorpo (MALLAT et al., 2001). Adicionalmente, um estudo envolvendo a transferência de um isolado de células $CD4^+CD25^+$, contendo células Treg, demonstrou redução do desenvolvimento da aterosclerose em diversos modelos murinos (AIT-OUFELLA et al., 2006).

Em uma etapa posterior do desenvolvimento da lesão (Figura 2), ocorre a proliferação de células musculares lisas, provenientes da camada média da artéria, que, uma vez na camada íntima, passam a secretar elementos da matriz extracelular, formando uma capa fibrosa, que recobre a lesão, favorecendo o desenvolvimento das placas e o aumento do seu tamanho (CHAABANE; COEN; BOCHATON-PIALLAT, 2014). A lesão continua a crescer pela migração de novas células mononucleares e seu ponto crítico é caracterizado quando a lesão atinge a camada adventícia e, em seguida, se expande em direção ao lúmen (LUSIS, 2000). A placa aterosclerótica é caracterizada por depósitos de restos celulares, lipídeos e

uma capa fibromuscular lisa (KETELHUTH; HANSSON, 2011). Com o avanço da doença, esta placa pode evoluir para uma condição de maior vulnerabilidade, erosão e ruptura. Por sua vez, a exposição da matriz extracelular e do centro lipídico-necrótico ao sangue inicia uma resposta trombótica que culminará nos desfechos clínicos característicos da aterosclerose (KETELHUTH; HANSSON, 2011; THIM et al., 2012).

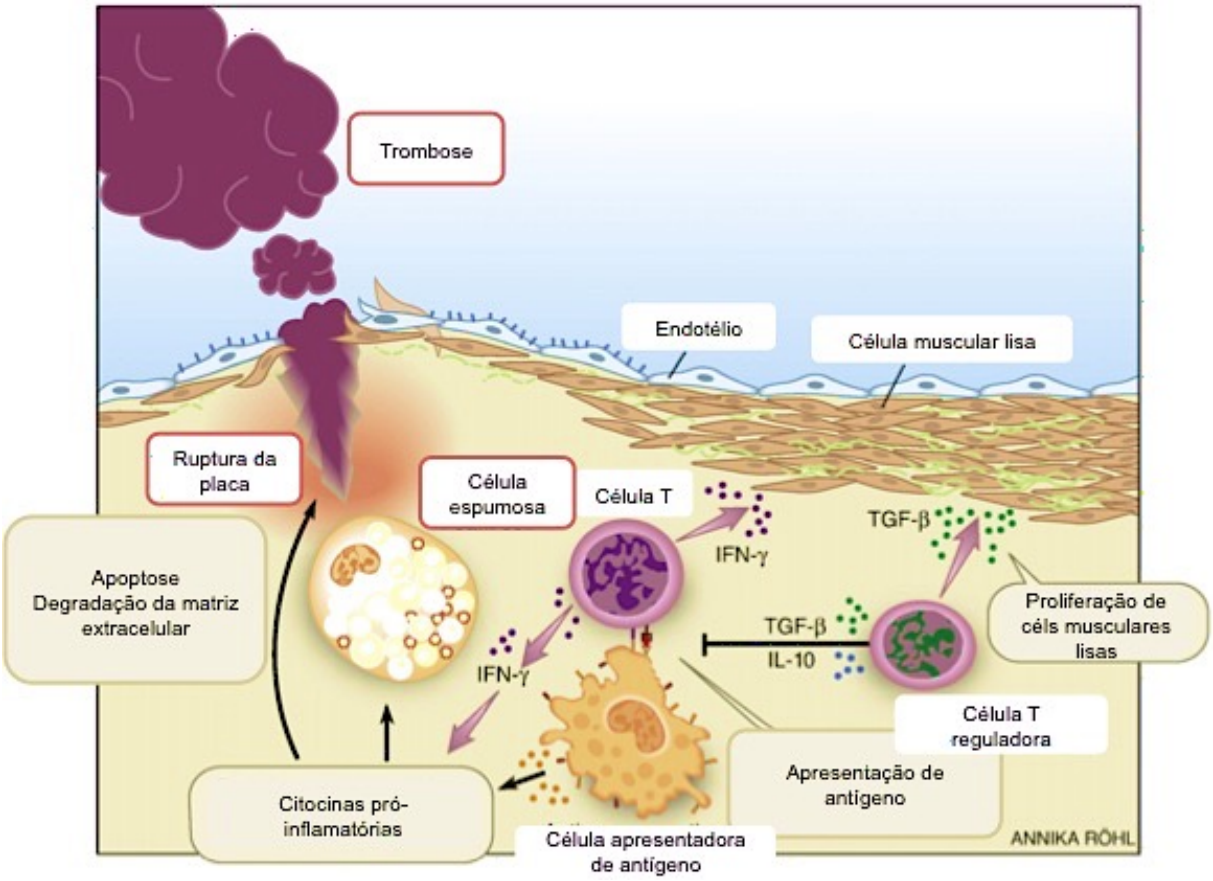


Figura 2: Envolvimento de linfócitos no desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica. Linfócitos são apresentados por proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) presentes nos macrófagos. Em termos gerais, células Th1 promovem a ativação de macrófagos, enquanto Th2 promove a produção de anticorpos anti-LDLm por linfócitos B. Em uma etapa posterior, ocorre a proliferação de células musculares lisas, que passam a secretar elementos da matriz extracelular, formando uma capa fibrosa, que recobre a lesão, e favorecendo o desenvolvimento das placas e o aumento do seu tamanho. A lesão continua a crescer pela migração de novas células mononucleares e seu ponto crítico é caracterizado quando a lesão atinge a camada adventícia e, em seguida, se expande em direção ao lúmen. Com o avanço da doença, esta placa pode evoluir para uma condição de maior vulnerabilidade, erosão e ruptura. Adaptado de ANDERSSON; LIBBY; HANSSON, 2010).

1.2 LDL: estrutura e modificações

Há relatos de que vários antígenos podem estar envolvidos no início e progressão da aterosclerose (MILIOTI et al., 2008), incluindo a β2 Glicoproteína I (KOBAYASHI et al., 2003; KLINGENBERG et al., 2011) e proteínas de choque térmico (BENAGIANO et al., 2005). Entretanto, a LDL e suas versões modificadas destacam-se como os mais importantes candidatos (HERMANSSON et al., 2010; HERMANSSON et al., 2011; KETELHUTH et al., 2011).

A lipoproteína de baixa densidade é uma fração constituída por partículas compostas por aproximadamente 75% de lipídeos e 25% de proteínas (BANCELLS et al., 2010). Sua partículas são formadas (Figura 3) por uma parte central de lipídios hidrofóbicos e uma monocamada de lipídios polares e apolipoproteínas que circundam os primeiros (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006). Sua síntese ocorre na circulação sanguínea pela ação da enzima lipase lipoprotéica a partir da lipólise da VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), produzida e secretada pelo fígado, em uma etapa posterior à formação da IDL (lipoproteína de densidade intermediária) (ITABE, 2008). É uma partícula esférica com um diâmetro médio de 22 nm, sua principal apolipoproteína é a apoB-100 (peptídeo de cadeia única com aproximadamente 500 kDa), possuindo ainda traços de apo-E (apolipoproteína E), e possui meia-vida plasmática de aproximadamente dois a três dias (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006). É a principal responsável pelo transporte do colesterol sérico, sendo internalizada por sua ligação aos receptores de LDL (B/E) presentes na membrana plasmática de células hepáticas e dos tecidos periféricos, regulando a síntese de colesterol nesses locais (BRAUNWALD, 1999).

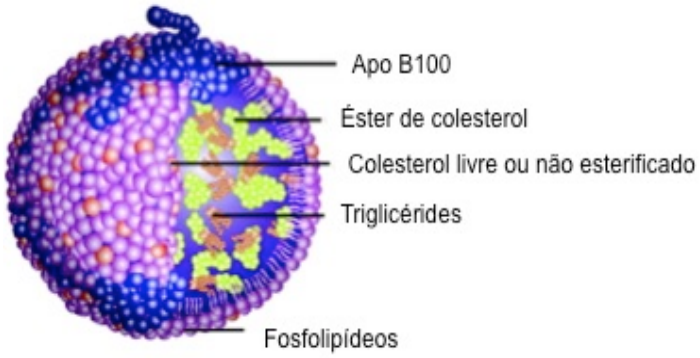


Figura 3: Representação da composição da partícula de LDL. A lipoproteína de baixa densidade é constituída por cerca de 75% de lipídeos, compreendendo uma parte central de lipídeos hidrofóbicos (colesterol livre ou não esterificado, colesterol esterificado e triglicérides) e uma monocamada de lipídeos polares (fosfolipídeos) e 25% de proteínas. A sua principal apolipoproteína é a apo B100 (Adaptada de WILLY ORGANIC CHEMISTRY, 2016).

LDL modificada é o termo genérico para descrever uma grande variedade de partículas provenientes de alterações físico-químicas que os componentes lipídicos e protéicos da LDL podem sofrer. Diversos processos *in vivo* como oxidação (JUN-JUN et al., 2000), carbamilação (SHAH et al., 2008), nitração (PELUFFO et al., 2007), glicação (BROWN et al., 2007), enriquecimento com ácidos graxos não-esterificados (do inglês NEFA, non-esterified fatty acids) (BENÍTEZ et al., 2002), reações cruzadas com hemoglobina (ZIOUZENKOVA et al., 1999) e modificações provocadas pela ação enzimática de lipoxigenases e mieloperoxidases (HEVONOJA et al., 2000) podem alterar a partícula de LDL. Partículas modificadas podem diferir em relação ao seu tamanho, à sua densidade, composição química, carga elétrica e propriedades físicas (BANCELLS et al., 2010; NICCOLI et al., 2012).

Dentre as subfrações de LDL modificada, a LDL oxidada (LDLox) e a LDL eletronegativa são as mais estudadas, diante do seu amplo papel na gênese e na progressão da aterosclerose (YANG et al., 2012). A oxidação da partícula de LDL é um processo progressivo que leva à formação da LDL oxidada, uma partícula que contém lipídeos oxidados em diferentes proporções incluindo aldeídos, oxiesteróis e lipídeos peroxidados (SALVARYE et al., 2002). No processo de formação da LDLox, a apo B100 também sofre modificações, resultando na diminuição de sua afinidade por receptores B/E e no aumento da afinidade aos receptores scavenger, como o CD36 e o LOX-1 (SALVARYE et al., 2002). Essa subfração modificada da LDLn atua induzindo não só a formação de células espumosas e a apoptose em células endoteliais (MITRA et al., 2011) como também a secreção de enzimas de

degradação da matriz extracelular, as metaloproteinases, contribuindo, assim, para a ruptura da capa fibromuscular que recobre a lesão aterosclerótica e promovendo o início de um evento trombótico (HAGEMANN et al., 2012). A LDL eletronegativa, por sua vez, apesar de ter sido considerada inicialmente uma partícula oxidada, é, atualmente, definida como um conjunto de partículas modificadas de LDLn que apresentam diferentes propriedades, que podem variar de acordo com sua origem (ESTRUCH et al., 2013). Considera-se que outros mecanismos, além da oxidação, possam atuar na modificação dessas partículas, promovendo o aumento da carga negativa da LDLn, incluindo glicação não-enzimática e enriquecimento de ácidos graxos não-esterificados, além de modificações relacionadas à ação das enzimas fosfolipase A2 (do inglês, PLA2) e esfingomielinase (do inglês, SMase) (KOVANEN; PENTIKÄINEN, 2003). De forma geral, a LDL(-) é definida como um conjunto de partículas que possuem uma carga mais negativa – característica comum a essas partículas – em relação à LDL nativa. Essa subfração da lipoproteína de baixa densidade foi inicialmente identificada através de cromatografia de troca iônica de plasma humano por Avogaro, Bon e Cazzolato, em 1988.

1.3 LDL(-): contribuição no processo aterosclerótico

A LDL(-) pode ser encontrada no plasma sanguíneo (AVOGARO; BON; CAZZOLATO, 1988) e no espaço subendotelial (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2012), e está intimamente relacionada ao desenvolvimento da aterosclerose, apresentando propriedades pró-inflamatórias e pró-angiogênicas que contribuem para a progressão da doença (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2003). As concentrações plasmáticas da LDL(-) em indivíduos normolipêmicos representam cerca de 1 a 10% da concentração de LDL total. Diversos estudos já demonstraram que esses níveis encontram-se aumentados em indivíduos com doenças como diabetes tipos 1 e 2 (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 1996, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008), hipercolesterolemia familiar (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 1999; BARROS et al., 2006; PEREIRA et al., 2006), síndromes coronarianas (APOLINÁRIO; RODRIGUES; ABDALLA, 2006) e em pacientes renais crônicos sob tratamento de hemodiálise (LOBO et al., 2008). Além disso, estudos *in vivo* demonstraram a

presença de LDL(-) no plasma de camundongos (GROSSO et al., 2008) e coelhos (DAMASCENO, 2001) com lesões ateroscleróticas.

Em relação à sua composição, a LDL(-) contém maior quantidade de óxidos de colesterol e dienos conjugados e níveis diminuídos de α-tocoferol em comparação à LDL nativa ou não-modificada (CHANG; ABDALLA; SEVANIAN, 1997; BANCELLS et al., 2010), além de possuir um conteúdo aumentado de apolipoproteínas C-III e E, ácido siálico, ceramidas e ácidos graxos não-esterificados, e apresentar maior atividade de acetilhidrolase do fator ativador de plaquetas (do inglês, PAF-AH) (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2003). A LDL(-) apresenta ainda maior susceptibilidade à oxidação (CAZZOLATO et al., 1991) e à agregação (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2002). Outra característica importante da LDL(-) está relacionada à modificação em sua apoB-100 (PARASASSI et al., 2001) que: 1) dificulta seu reconhecimento pelo receptor B/E, por diminuição da sua afinidade de ligação ao receptor de LDL, aumentando o tempo de residência dessa lipoproteína na circulação e 2) promove um aumento de sua afinidade por proteoglicanos da matriz extracelular (ESTRUCH et al., 2013); isso implica na possibilidade de favorecimento da ligação entre a LDL(-) e proteoglicanos da matriz extracelular, tornando-a mais prejudicial em relação a outras formas modificadas (revisado por MELLO et al., 2011).

A LDL(-) pode contribuir para a aterogênese estimulando as células endoteliais a produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que desempenham um papel importante no recrutamento de leucócitos para a camada íntima arterial, proliferação celular e indução de uma resposta pró-inflamatória, favorecendo o desenvolvimento da aterosclerose. A LDL(-) pode interferir, por exemplo, sobre a integridade do endotélio, uma vez que seus estímulos pró-inflamatórios podem aumentar a expressão de moléculas de adesão que medeiam a ligação de monócitos circulantes e outros leucócitos ao endotélio. Estudos realizados por De Castellarnau e colaboradores (2007) em células endoteliais da veia umbilical humana (do inglês, HUVEC) determinaram que a LDL(-) apresenta citotoxicidade para células endoteliais, induz a expressão de citocinas (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2002), como IL-1β (ARMAN et al., 2008), IL-8 (DE CASTELLARNAU et al., 2000) e a proteína-1 quimiotática para monócitos (do inglês, MCP-1) (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2003), assim como moléculas de adesão, como a VCAM-1, induzida pela ação de TNFα, e ICAM-1 (HANSSON, 2001). Em monócitos e

linfócitos, a LDL(-) induz a liberação de IL-1β, IL-6, IL-10 e MCP-1 (BENÍTEZ et al., 2007; BANCELLS et al., 2010), sendo essa liberação mediada pelos receptores CD14 e TLR-4 em um mecanismo, que parece ser ativado pelo conteúdo aumentado de ceramidas e de NEFA (PFEIFFER et al., 2001).

A LDL(-) induz ainda a liberação do fator estimulador de colônias de macrófagos e do fator de crescimento B derivado de plaquetas (do inglês, PDGF-B) (DE CASTELLARNAU et al., 2007) e inibe a síntese de óxido nítrico pela eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) (BERLINER et al., 1995). Esse conjunto de dados sustenta fortemente a utilização da LDL(-) como alvo na terapia da aterosclerose.

1.4 scFv anti-LDL(-): desenvolvimento e efeitos na aterosclerose

Apesar dos relatos na literatura demonstrarem a importância da LDL e das LDL modificadas como antígeno no processo aterosclerótico, faltavam ferramentas adequadas para seus estudos. Nesse sentido, Abdalla e colaboradores (2002) desenvolveram anticorpos monoclonais (do inglês, MAbs) anti-LDL(-) (1A3H2 e 2C7D5F10) por imunização de camundongos da linhagem Balb/c com LDL(-), isolada a partir de plasma humano, e demonstraram que a imunização passiva de camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ com os MAbs anti-LDL(-) resultou em uma menor área de lesão aterosclerótica na raiz da aorta, menor número de células espumosas localizadas na região subendotelial da artéria e baixos níveis circulantes de LDL(-), quando comparados a animais não imunizados ou imunizados com um MAb controle irrelevante (GROSSO et al., 2008). Estes resultados indicaram a relevância desses MAbs como uma possível estratégia terapêutica na aterosclerose.

Esses MAbs são IgG bivalentes, que possuem a habilidade de se ligar a duas moléculas de antígeno ao mesmo tempo, o que promove um aumento de sua afinidade funcional e fornece maior tempo de tenção ou avidez pelo antígeno (HOLLINGER; HUDSON, 2005). No entanto, seu uso pode ser limitado pela imunogenicidade, proporcionando uma resposta imune quando injetados em humanos, e pela possibilidade de intensificar uma resposta deletéria e a progressão da aterosclerose, a partir da ação do domínio Fc, que recruta funções efetoras citotóxicas através de complemento e/ou receptores Fcγ (receptores Fc para gamma

globulina) presentes em células como os macrófagos (MARANHÃO et al., 2001). Atualmente, além da utilização de anticorpos monoclonais, também têm sido gerados, através de técnicas de engenharia de anticorpos, fragmentos de anticorpos ativos, como o F(ab')2 (Figura 4A), o Fab e o scFv (*single chain fragment variable* ou fragmento variável de cadeia única), que podem ser gerados em bactérias como *Escherichia coli* e leveduras como a *Pichia pastoris*. Neste último caso, o sistema de expressão da levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem se mostrado bastante eficiente, uma vez que se trata de um método consideravelmente rápido, barato, com a utilização de metanol como única fonte de carbono, e com alta taxa de expressão (CHAMES et al., 2000).

Uma vez que os scFv apresentam propriedades que tornam sua utilização mais indicada no tratamento de algumas doenças, e que não induzem reações indesejadas mediadas pela porção Fc dos anticorpos completos (MARANHÃO; BRIGIDO, 2001), nosso grupo trabalhou no desenvolvimento de um fragmento variável de cadeia única de um anticorpo anti-LDL(-) com potencial imunoregulatório, um scFv. O scFv (Figura 4B) representa a menor unidade funcional do anticorpo, sendo formado por frações variáveis (Fv) das cadeias leve e pesada do anticorpo, unidas por um peptídeo hidrofílico e flexível com cerca de 10 a 25 resíduos de aminoácidos (SHEN et al., 2008). Como o scFv deriva dos locais de ligação do anticorpo intacto, não existe qualquer perda significativa de afinidade ou especificidade (PETERSON et al., 2006) e sim apenas modificações referentes às propriedades farmacocinéticas. De acordo com Peterson e colaboradores (2006), o scFv possui massa molar de 28 kDa e, por isso, apresenta rápida difusão no tecido e melhor eliminação dos imunocomplexos formados. No entanto, pelo mesmo motivo, é facilmente eliminado por perda renal, durante a filtração glomerular, o que torna a sua meia-vida inferior quando comparado ao anticorpo completo. Peterson e colaboradores (2006) e Roskos e colaboradores (2004) indicaram que a meia-vida do scFv é inferior a 21 horas, fato confirmado por Reff e colaboradores (2001) e Fitch e colaboradores (1999), que determinaram valores de 7 a 14 horas para a meia-vida do scFv em humanos.

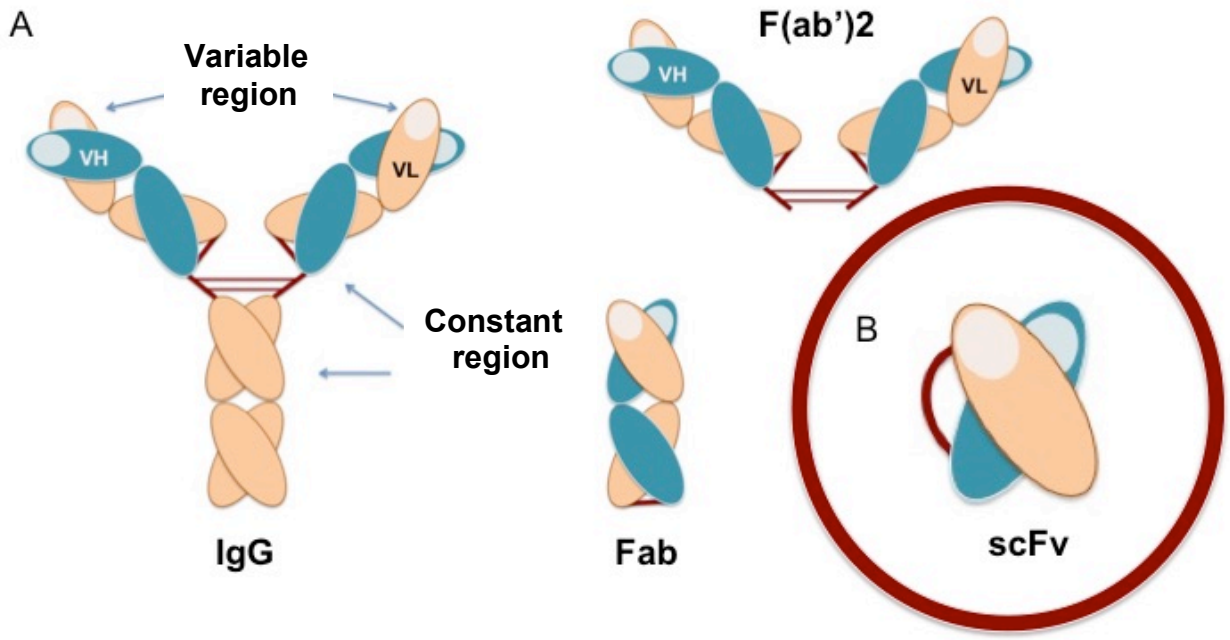


Figura 4: Representação esquemática do anticorpo IgG e de diferentes fragmentos de anticorpos (A) e do scFv em maior escala (B). Através de técnicas de engenharia de anticorpos, diversos fragmentos de anticorpos ativos, como o scFv. O scFv formado pelas porções variáveis da cadeias leve e pesada do anticorpo conectadas por um peptídeo hidrofílico e flexível constituído de 12 a 20 resíduos de aminoácidos, o que confere maior estabilidade à molécula (Acervo pessoal).

Diversos grupos têm contribuído para comprovar a eficácia terapêutica desses fragmentos. Robert e colaboradores (2006) demonstraram a atividade de um scFv diante da placa aterosclerótica, onde os fragmentos foram capazes de reconhecer um epítopo presente na superfície e no centro de lesões ateroscleróticas iniciais e avançadas, respectivamente, sugerindo que, inicialmente, o epítopo é expresso na superfície das lesões, sendo translocado para a íntima na progressão da placa. Adicionalmente, o tratamento com um scFv específico para peptídeos derivados da apoB-100 (SCHIOPU et al., 2004) e com um anti-LDLox (TSIMIKAS et al., 2011) reduziram a área da lesão aterosclerótica em camundongos *Apoe*$^{-/-}$ e em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$, respectivamente.

Embora a utilização de peptídeos, fragmentos de anticorpos e proteínas seja uma abordagem promissora para a prevenção e o tratamento de doenças, tais como a aterosclerose (NAGLE et al., 2003), essas terapias ainda apresentam algumas desvantagens, como a sua curta meia-vida de circulação, como já foi descrito, e a estabilidade reduzida (DUNCAN, 2003). Nesse contexto, visando melhorar a eficácia

destes potencias biofármacos, algumas estratégias têm surgido no campo da nanotecnologia, tais como o uso de nanopartículas poliméricas e conjugados de nanopartículas e proteínas que atuam como nano-carreadores (PSSAROS et al., 2012).

Tendo em vista que a meia-vida plasmática do scFv anti-LDL(-) seria relativamente curta, propôs-se que o uso de nanopartículas poliméricas melhoraria a eficiência desses fragmentos de anticorpos, por aumentar o seu tempo de circulação no organismo, o que permitiria a continuidade de sua ação, como descrito para outros nanodispositivos e nanopartículas aplicáveis na terapêutica (JAIN, 2005; TANSIL; GAO, 2006; DHAR et al., 2008).

1.5 Nanotecnologia: conceitos e utilizações

As nanopartículas são dispersões de partículas ou partículas sólidas com tamanho entre 10 e 1000 nm (MOHANRAJ; CHEN, 2006), embora sejam frequentemente produzidas no intervalo de 100 a 500 nm (QUITANAR et al., 1998). O seu tamanho reduzido confere aos constituintes dessas partículas propriedades físicas, químicas, ópticas e mecânicas completamente distintas das apresentadas macroscopicamente (PSARROS et al., 2012).

As nanopartículas podem apresentar diferentes formatos e composição química, favorecendo a manipulação de características como estabilidade (MITRAGOTRI; LAHANN, 2009), solubilidade e superfície química a fim de torná-las adequadas para aplicações diversas (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007). Dependendo do método utilizado para sua preparação, podem ser obtidos diferentes tipos de nanoestruturas, onde as substâncias ativas podem estar adsorvidas, dispersas ou dissolvidas. Como exemplos podem ser citadas: lipossomas, nanoemulsões, dendrímeros, nanopartículas metálicas, micelas poliméricas, nanotubos de carbono e nanopartículas poliméricas (POLETTO et al.,, 2008).

Na nanomedicina, as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas) (Figura 5) são as mais empregadas e podem ser formadas por polímeros naturais ou sintéticos (HAFNER et al., 2014) As nanoesferas consistem em sistemas onde a substância em estudo encontra-se homogeneamente dispersa e solubilizada no

interior de uma matriz polimérica, o que determina o sistema como monolítico, ou seja, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As nanocápsulas, por sua vez, são determinadas como sistemas do tipo reservatório, constituídas por uma membrana polimérica estabilizada por um agente tensoativo, disposta ao redor de um núcleo oleoso e isolado do meio externo (DE AZEVEDO, 2003; MOHANRAJ, CHEN, 2006; KHOEE; YAGHOOBIAN, 2008), podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003)

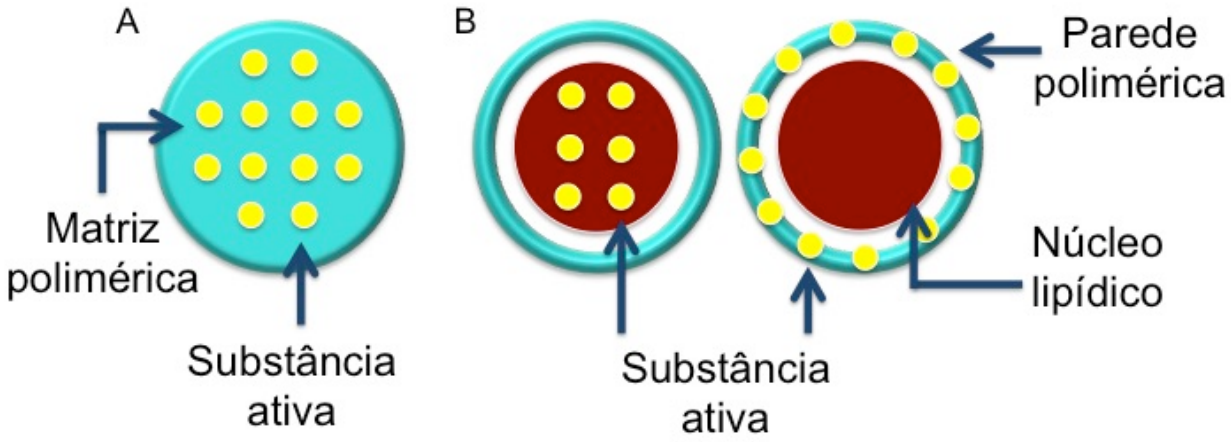


Figura 5: Representação esquemática dos dois tipos de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas. A: As nanoesferas consistem em sistemas homogêneos, onde a substância ativa encontra-se uniformemente dispersa em uma matriz polimérica. B: As nanocápsulas são representadas por um núcleo oleoso ou lipídico, revestido por uma membrana polimérica. A substância ativa pode estar adsorvida a essa membrana ou dissolvida em seu núcleo, de acordo com as características de solubilidade da mesma (Acervo pessoal).

As nanopartículas poliméricas têm sido estudadas, nas últimas décadas, como possíveis carreadores de substâncias ativas e agentes terapêuticos, assim como sua aplicação em sistemas de diagnóstico (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003), e as vias de administração são as mais variadas, incluindo: oral, oftálmica, tópica, intravenosa (COUVREUR et al., 2002; CRUZ et al., 2006), nasal e pulmonar (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007). Seu uso como carreador é favorecido por diversas vantagens, tais como: (i) facilidade de manipulação do seu tamanho e de suas características, com o intuito de permitir a transposição de barreiras biológicas como a barreira hematoencefálica, por exemplo (RE et al., 2011; HAFNER et al., 2014); (ii) propiciam o aumento da estabilidade de

fármacos e proteínas, além do aumento do tempo de meia vida dessas substâncias no meio biológico (JAIN, 2001); (iii) fornecem um maior controle da liberação progressiva do fármaco, durante o transporte e no local de ação, alterando sua distribuição e depuração, reduzindo possíveis efeitos colaterais e melhorando a eficácia terapêutica (MOHANRAJ; CHEN, 2006); (iv) oferecem uma maior interação celular, por sua maior superfície de contato (LOBATTO et al., 2011; ONOUE; YAMADA; CHAN, 2014); e (v) podem ser direcionados a alvos específicos, através do emprego de ligantes sítio-específicos como proteínas, peptídeos e anticorpos monoclonais ou seus fragmentos (DHAR et al., 2008; LOBATTO et al., 2011), permitindo, ainda, o transporte seguro de compostos terapêuticos potencialmente tóxicos ao seu local de ação, protegendo, assim, outros tecidos e células de possíveis efeitos deletérios (IRVING, 2007).

No contexto da aterosclerose, algumas abordagens são citadas como possibilidades para a introdução de sistemas nanoparticulados como carreadores direcionados a alvos específicos. Podem ser utilizados ligantes específicos para tipos celulares, como células endoteliais, macrófagos ou até células espumosas; ligantes específicos para componentes não-celulares, como elementos de matriz extracelular e lipoproteínas; ou ainda ligantes que mimetizem componentes naturais e impeçam sua ação (O'NEIL et al., 2009; BRILEY-SAEBO et al., 2011). Como exemplo, Maximov e colaboradores (2010) relataram a utilização de um complexo formado por uma nanopartícula de ácido(poli)lático ligada covalentemente a um anticorpo monoclonal anti-apoB-100 em ensaios com macrófagos e LDL, onde a ligação do complexo à LDL promoveu a redução das concentrações de LDL por internalização pelos macrófagos. O que se observa nos últimos anos, no entanto, é uma tendência em priorizar a construção de nanodispositivos conjugados a diferentes fragmentos de anticorpo, como o scFv (LAGINHA et al., 2008), diante da ausência do domínio Fc, como discutido anteriormente. Além disso, a conjugação com scFv's possibilita uma redução da variação do diâmetro dos sistemas nanoparticulados após a conjugação, diante do pequeno tamanho apresentado por essas proteínas em relação a anticorpos completos (VIGOR et al., 2010).

Diante disso, o desenvolvimento de uma formulação contendo nanopartículas conjugadas a fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) anti-LDL(-) tornou-se especialmente desejável, uma vez que o sistema possui baixa imunogenicidade, adequada meia-vida na circulação, promove melhor controle para o reconhecimento

molecular de LDL(-) e remoção mais eficiente dos imunocomplexos pelo sistema imunológico. Esse planejamento de partículas nanoestruturadas conjugadas ao scFv anti-LDL(-), além do fato de estudos envolvendo as doenças cardiovasculares serem relevantes nos atuais, gera a expectativa de que fragmentos de anticorpo para diferentes antígenos possam ser conjugados nestas nanoestruturas propostas, o que ampliaria sua aplicabilidade na área terapêutica.

1.6 Nanoformulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn: desenvolvimento e efeitos no processo aterogênico

O nosso grupo, então, desenvolveu a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, obtida a partir da conjugação de nanopartículas ao scFv anti-LDL(-) (Privilégio de Inovação No. 016110005557, de 11 de outubro de 2012 - Depositado no INPI), de acordo com Bender e colaboradores (2014). Estudos iniciais *in vivo* determinaram que camundongos *Ldlr*$^{-/-}$, em modelo de lesão aterosclerótica inicial, com 3 meses de idade tratados com 5 mg/Kg de scFv anti-LDL(-) em solução apresentaram menor área de lesão aterosclerótica ($p<0,05$) quando comparados ao controle não-tratado, e que animais com a mesma idade tratados com 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn reduziram o mesmo parâmetro em cerca de 50% ($p<0,01$), em relação ao controle (CAVALCANTE et al., 2016).

A partir desses resultados iniciais, o estudo foi expandido a fim de determinar os efeitos *in vitro* dessa nanoformulação sobre macrófagos murinos e humanos, assim como o elucidar o efeito benéfico *in vivo* em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ já demonstrado, incluindo a padronização da avaliação da área da lesão aterosclerótica por técnica de PET/CT (*Positron Emission Tomography-Computed Tomography* ou Tomografia por Emissão de Pósitrons associada à Tomografia computadorizada). A determinação do efeito da nanoformulação por PET/CT visava obter medidas mais precisas da lesão pré-estabelecida com a utilização de um número menor de animais em relação ao padrão ouro atual (técnicas histológicas), além de criar a possibilidade de acompanhamento dessa lesão ao longo do tempo.

1.7 Técnicas de imagem: Tomografia por Emissão de Pósitrons no diagnóstico da aterosclerose

Técnicas de imagem molecular tem sido cada vez mais utilizadas para o diagnóstico e o acompanhamento de doenças. Na cardiologia, essas novas tecnologias são capazes dar informações precisas (LIBBY; LITCHMAN; HANSSON, 2013) durante curtos períodos de observação e através de procedimentos menos invasivos em relação a métodos tradicionais como a angiografia por ultrassom e a ultrassonografia intravascular (USIV) (SCHOENHAGEN; TUZCU, 2008). Além disso, em geral, as técnicas tradicionais não fornecem informações sobre a atividade ou a vulnerabilidade das lesões existentes (MONTOYAMA et al., 2009; OBALD et al., 2013). No últimos 60 anos, entretanto, novas tecnologias têm surgido e permitido a utilização de sistemas avançados de escaneamento de imagens. Dentre essas técnicas, a Tomografia por Emissão de Pósitrons tem tido grande destaque, consistindo em uma técnica de imagem molecular não-invasiva, na qual a captação de um traçador radioativo (radioisótopos, que possuem afinidade por um tipo de célula específico ou por um alvo proveniente do seu metabolismo) é determinada em alvos específicos (Figura 6).

Geralmente, são utilizados radiotraçadores de meia-vida curta, uma vez que é possível predizer seu decaimento após a administração endovenosa, e emissores de pósitrons (TARKIN; JOSHI; RUDD, 2014). Quando um pósitron (partícula anti-matéria para o elétron) emitido encontra um elétron, ocorre um fenômeno denominado aniquilação de fótons, no qual as partículas destroem uma a outra, convertendo a massa total de ambos em 2 fótons gama de 511 kiloelétron Volt (keV) que seguem direções opostas, distanciando-se 180 graus um do outro. Esses fótons são finalmente captados por pares de detectores presentes no PET e esse sinal é convertido em imagens (NOLTING et al., 2012). A captação do radiofármaco por órgãos e tecidos do corpo pode ser quantificada a partir dessas imagens, através da avaliação da absorção do radiotraçador em questão. O valor padronizado de captação (do inglês SUV, *standardized uptake value*) é utilizado nessa técnica, sendo obtido a partir do cálculo da relação entre a concentração da captação do radiotraçador na região de interesse (ROI) e dose injetada dividida pelo peso do animal (HOESCHEN; RAFECAS; ASPELMEIER, 2011). O SUV é considerado uma

análise semi-quantitativa, sendo essencial para a complementação da interpretação visual de imagens de PET (THIE, 2004). Em imagens de lesões ateroscleróticas, no entanto, o SUV proveniente de imagens de PET nem sempre reflete a captação real do radiotraçador dentro da lesão, sendo necessária a utilização de técnicas complementares para a avaliação correta desta medida, como por exemplo a tomografia computadorizada (do inglês CT, *Computadorized tomography*) (IZQUIERDO-GARCIA et al., 2009; BURG et al., 2013).

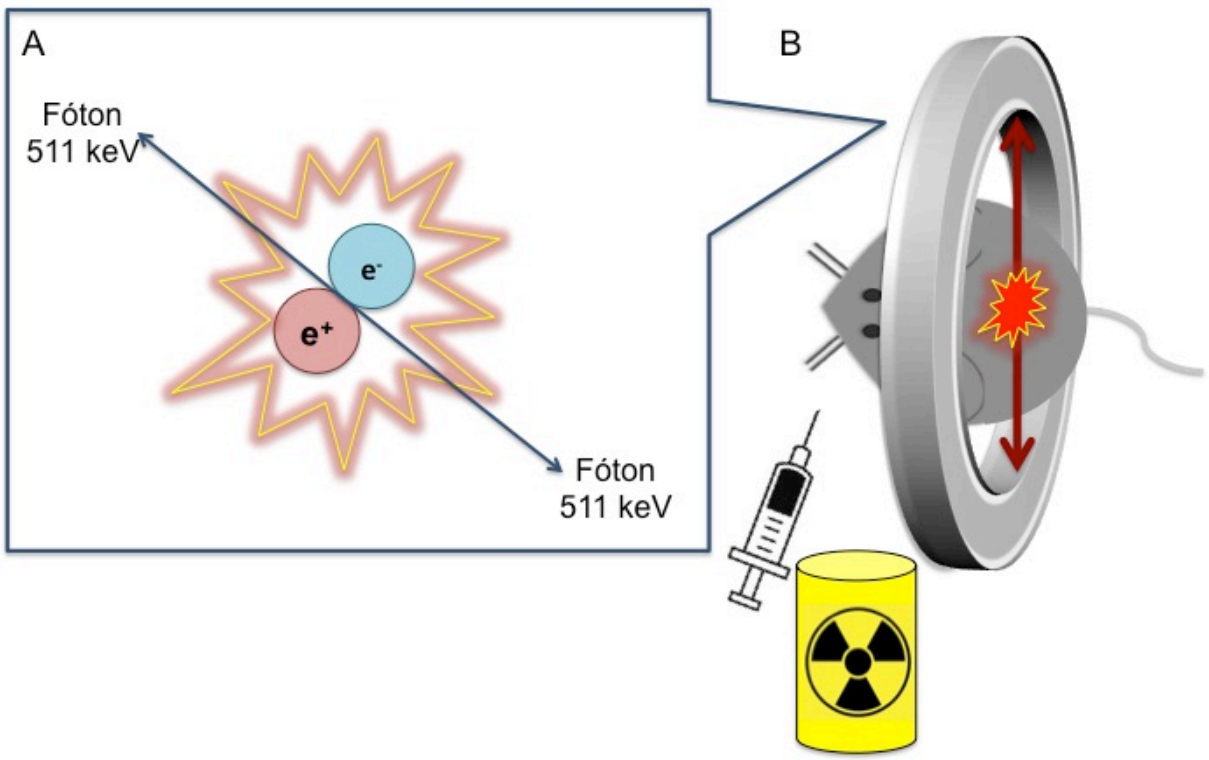


Figura 6: Representação da técnica de Tomografia por Emissão de Pósitrons. A: Fenômeno da aniquilação de fótons, no qual as partículas destroem uma a outra, convertendo a massa total de ambos em 2 fótons gama de 511 kiloelétron Volt (keV) que seguem direções opostas, distanciando-se 180 graus um do outro. B: Equipamento de PET representando a detecção dos fótons emitidos em tempos praticamente idênticos. Ambos são registrados como um evento coincidente (Acervo pessoal).

Neste sentido, a aquisição combinada de tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada tem demonstrado ser vantajosa em relação à utilização dessas técnicas de forma isolada, sendo uma ferramenta valiosa para o estadiamento de doenças, para a detecção de recidivas em pacientes

assintomáticos que apresentam aumento dos níveis de marcadores específicos de cada patologia, para a confirmação de resultados negativos obtidos por técnicas convencionais e ainda para o monitoramento da resposta às terapias utilizadas. A associação de PET e CT tornou-se uma abordagem importante na rotina clínica, por permitir a localização anatômica exata das lesões detectadas pelo escaneamento dos pacientes (ALMUHAIDEB; PAPATHANASIOU; BOMANJI, 2011).

O ^{18}F-FDG ou Flúordeoxiglicose-Flúor-18 é um radiofármaco que apresenta uma substituição do grupo hidroxila da posição C-2 por um átomo de Flúor-18 (GALLAGHER et al., 1978), e pode ser obtido por reação de fluorinação eletrofílica ou nucleofílica (YU, 2006), sendo essa última a mais utilizada por apresentar um alto rendimento e um menor tempo de reação (FOWLER; IDO, 2002). Por ser uma molécula análoga à glicose, o FDG também é transportado ativamente para o interior da célula por proteínas transportadoras de glicose (GLUT). Uma vez dentro da célula, glicose e FDG são fosforilados pela enzima hexoquinase, na primeira etapa do processo de glicólise. O FDG, diferentemente da molécula de glicose, não segue a via glicolítica para a obtenção de energia, permanecendo retido no interior da célula na forma de FDG-6-Fosfato (YU, 2006). Células com atividade metabólica mais elevada (presentes em patologias como o câncer e a aterosclerose, em processos inflamatórios ou na reparação de tecidos), apresentam um número aumentado de transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-3), assim como elevados níveis de hexoquinase, favorecendo maior captação e retenção de FDG em seu interior em relação a células com metabolismo normal. O ^{18}F, por sua vez, é um radionuclídeo emissor de pósitrons e apresenta uma meia-vida de cerca de 110 minutos (FOWLER; IDO, 2002), o que permite seu transporte (do local de produção ao local do experimento) de forma viável e sem perda significativa da sua atividade (ANDRÉS; DORADO, 2015).

A realização de PET/CT com ^{18}F-FDG emergiu nos últimos anos como uma ferramenta poderosa de imagem para a detecção de diversos tipos de câncer, assim como para a identificação e acompanhamento de processos inflamatórios, os quais são frequentemente atribuídos à captação de FDG por macrófagos, sendo considerado um marcador de atividade metabólica (BUETTNER; RUDD; FAYAD, 2011). Em doenças cardiovasculares, o uso de ^{18}F-FDG em PET/CT tem demonstrado ganhos significativos na detecção de inflamação na parede das artérias, favorecendo a identificação e a quantificação de lesões ateroscleróticas

(ROOMINGER et al., 2009) e de processos relacionados, como hipóxia, neoangiogênese e microcalcificação (TARKIN; JOSHI; RUDD, 2014).

De forma geral, pode-se dizer que a tecnologia de análise de imagens, utilizando o ^{18}F-FDG como um biomarcador, pode catalisar progressos tanto no diagnóstico quanto no prognóstico de doenças cardiovasculares, proporcionando medidas reprodutíveis da atividade das lesões e da vulnerabilidade das placas, o que o torna uma excelente ferramenta na padronização da avaliação da área da lesão aterosclerótica por técnica de PET/CT em nosso estudo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de uma formulação de nanopartículas derivatizadas com fragmentos de anticorpo anti-LDL(-) (formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn) sobre macrófagos murinos e humanos primários na formação de células espumosas e sobre a aterosclerose experimental induzida pela dieta hipercolesterolêmica em camundongos *knockout* para o gene do receptor da LDL (*Ldlr*$^{-/-}$).

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar *in vitro* o mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos e humanos primários.

- Avaliar o efeito da imunização passiva de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre:

i) o endotélio vascular por técnica de microscopia intravital.

ii) a área da lesão aterosclerótica por análise de imagens obtidas por tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (PET/CT).

iii) a área da lesão aterosclerótica por análise morfométrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Questões Éticas

O laboratório de Bioquímica Clínica – Nível de Biossegurança 1 é certificado junto à CTNBio/Ministério da Ciência e Tecnologia (Certificado de Qualidade em Biossegurança n° 090/98 – Anexo 2). Este projeto foi aprovado, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 3 de julho de 2012 pela Comissão Interna de Biossegurança (Anexo 3), em 27 de setembro de 2010 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo n° 114 - Anexo 4) e em 18 de fevereiro de 2013 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo n° 392 - Anexo 5), por estar de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Materiais

Os reagentes foram obtidos de fontes comerciais diversas e são descritos nos protocolos utilizados. A composição dos meios de cultura, tampões e soluções para coloração utilizados encontra-se descrita na seção ANEXOS (Anexo 1).

3.3 Células

3.3.1 Levedura *Pichia pastoris*

SMD1168 (#C17500, Invitrogen™, EUA): Δ*pep*4::*URA*3 Δ*kex*1::*SUC*2*his*4*ura3* (CEREGHINO; CREGG, 2000) com fenótipo His^{-} Mut^{+}. Esta linhagem foi utilizada para a expressão do scFv anti-LDL(-).

3.3.2 Fibroblastos murinos da linhagem L-929

NTCC clone 929 [L cell, L-929, derivada da cepa L] (ATCC® CCL-1, EUA): células da linhagem L-929 são capazes de secretar o fator de crescimento M-CSF para o meio de cultura no qual são cultivadas (WEISCHENFELDT; PORSE, 2008) e, por isso, foram utilizadas na diferenciação de células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$.

3.3.3 Macrófagos murinos primários

Os macrófagos murinos foram obtidos a partir da diferenciação de culturas primárias extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$, machos, com cerca de 60 dias de idade. As células foram isoladas e diferenciadas de acordo com o protocolo descrito em item posterior e foram utilizadas nos ensaios de investigação da captação de LDL(-) e da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.

3.3.4 Macrófagos humanos primários

Os macrófagos humanos foram obtidos a partir da diferenciação de monócitos isolados de sangue humano. As células foram isoladas e diferenciadas de acordo com o protocolo descrito em item posterior e foram utilizadas nos ensaios de investigação da captação de LDL(-) e da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.

3.4 Condições de cultivo

3.4.1 Macrófagos murinos primários

A diferenciação das células extraídas da medula óssea de camundongos exige a utilização de um meio específico, também chamado de meio condicionado, e que deve ser obtido a partir do cultivo de células da linhagem L-929. Sendo assim, os

fibroblastos foram cultivados em garrafas de cultura de 75 cm^2 em meio DMEM-*high glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, contendo 4500 mg de Glicose por litro, #11965-084, Gibco®, Life Technologies, EUA) com 10% de soro fetal bovino (#16000-044, Gibco®, Life Technologies, EUA) inativado a 56 ºC por 30 minutos. As células foram mantidas durante 6 dias em atmosfera úmida, 5% de CO_2 e 37 ºC, sendo feita a expansão das células para novas garrafas a cada 2 dias com auxílio de Tripsina-EDTA 0,25% (#25200-056, Gibco®, Life Technologies, EUA) para o desprendimento das mesmas, de acordo com instruções do fabricante. No sexto dia, as células foram coletadas, contadas e distribuídas (4,7 x 10^5 células) em garrafas de 75 cm^2 contendo 55 mL de meio DMEM-*high glucose* com 10% de soro fetal bovino. Após 7 dias de cultivo sob as mesmas condições de temperatura e umidade já descritas, o meio de cultura foi coletado, filtrado em uma membrana com poro de 0,45 μm e armazenado a -20 ºC em alíquotas de 5 mL para facilitar a sua utilização.

A extração das células da medula óssea de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$, machos, com cerca de 60 dias de idade, foi realizada de acordo com a programação dos ensaios de captação de LDL(-) e internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, sendo cada animal utilizado para um experimento independente. O protocolo foi desenvolvido de acordo com Weischenfeldt e Porse (2008), no qual o animal é submetido a uma injeção intramuscular na porção posterior das patas traseiras com a dose, recomendada pelo Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, de anestésicos (Cloridrato de Xilasina 7,5 mg/Kg – Bayer, Alemanha - e Cloridrato de Cetamina 75 mg/Kg – Parke-Davis, EUA) (NEVES et al., 2013) para sua eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, borrifa-se álcool 70% sobre o corpo do animal e inicia-se o procedimento de retirada de ambos os fêmures e das tíbias, através de um corte inicial no meio do abdômen, seguido da remoção de pele, músculo e tecido adiposo. Neste etapa, deve-se tomar muito cuidado para não cortar as extremidades dos ossos em questão de modo a expor a medula. Os ossos foram mantidos mergulhados em álcool 70% até o momento do uso no interior do fluxo laminar. Em seguida, as epífises foram cortadas para realização da lavagem da cavidade medular dos ossos com auxílio de seringa contendo 10 mL de meio RPMI. É fundamental que o meio de cultura atravesse todo o comprimento do osso. As células foram, então, coletadas em tubos Falcon™ de 15 mL, onde permaneceram por 5 minutos a fim de separar qualquer resquício de tecido precipitado e filtradas em membrana apropriada de 40 μm (Falcon™ *cell strainer*, #352340, Corning, EUA).

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, idêntico ao anterior, e centrifugado a 180 xg durante 8 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 5 mL de solução de lise e novamente centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de meio RPMI às células isoladas, que foram contadas em câmara de *Neubauer* e cultivadas por 7 dias, em placas de acordo com o desejado, em meio composto por: 30% de meio condicionado L-929, 55% de meio RPMI e 15% de SFB. A diferenciação das células em macrófagos foi confirmada por técnica de citometria de fluxo após o sétimo dia, conforme será descrito posteriormente. Nas 24 horas anteriores ao início dos estímulos, o meio foi substituído com redução da concentração de soro para apenas 1%. As células foram tratadas em diferentes tempos de acordo com o protocolo estabelecido com diferentes soluções, podendo conter nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-), scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e/ou LDL(-).

3.4.2 Macrófagos humanos primários

O isolamento de monócitos humanos primários e sua diferenciação em macrófagos foram realizados de acordo com o protocolo (KREMMERER et al., 2015) estabelecido pelo grupo do Dr. Dmitry Namgaladze e do Prof. Dr. Bernhard Brüne (*Institute of Biochemestry I, Faculty of Medicine, Johann Wolfgang Goethe Universität,* Frankfurt, Alemanha). A partir de bolsas de sangue, com volume de aproximadamente 100 mL, fornecidas pelo Hemocentro da *Johann Wolfgang Goethe Universität*, o material foi coletado e transferido para tubos Leucosep™ de 50 mL (#227-290, Greiner Bio-One, Alemanha) contendo meio LSM 1077 (*Lymphocyte Separation Medium,* #17-829E – Lonza Walkersville, EUA). Os tubos foram, então, centrifugados a 440 xg por 35 minutos em temperatura ambiente e programa 2 de desaceleração em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R, Alemanha). A camada de leucócitos foi retirada com auxílio de uma pipeta sorológica descartável e, em seguida, lavada consecutivas vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato)/EDTA 0,5 M até a obtenção de uma solução branca. O precipitado de células obtido ao final deste procedimento foi ressuspendido em tampão de corrida (PBS/EDTA 0,5 M/0,5% BSA) contendo cerca de 90 µL de *microbeads* magnéticas CD14 para células humanas (#130-050-201, MACS – Miltenyi Biotec, Alemanha) e

incubado a 4 ºC por 15 minutos. Adicionou-se tampão de corrida novamente à solução, a qual foi filtrada em membrana apropriada de 40 µm (Falcon™ *cell strainer*, #352340, Corning, EUA). Os monócitos marcados com as *beads* CD14 foram isolados a partir de coluna magnética no separador automático de células AutoMACS (MACS – Miltenyi Biotec, Alemanha). Após separação e contagem das células provenientes de cada bolsa de sangue individualmente, os monócitos foram cultivados, em placas de acordo com o desejado, em meio específico para macrófagos sem adição de soro fetal bovino (do inglês MSFM, *Macrophage serum-free media,* #12065-074, Gibco®, Life Technologies, EUA) tratados com M-CSF (#02843, StemCell Technologies, EUA) por pelo menos 7 dias em atmosfera úmida, 5% de CO_2 e 37 ºC**.** Cada bolsa de sangue foi destinada a um experimento independente. Após o sétimo dia de cultivo, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 - com adição de Penicilina 100 UI/mL e Estreptomicina 100 µg/mL (#31800-022, Gibco®, Life Technologies, EUA**)** - enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado a 56 ºC por 30 minutos**.** Nas 24 horas anteriores ao início dos estímulos, o meio foi substituído com redução da concentração de soro para apenas 1%. As células foram tratadas com diferentes soluções, podendo conter nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-), scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e/ou LDL(-).

3.5 Animais de laboratório

Camundongos da linhagem C57BL/6J *knockout* para o receptor de LDL (*Ldlr*$^{-/-}$) foram utilizados nos estudos de avaliação do efeito do tratamento da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Os animais foram mantidos em salas estéreis e termostatizadas em gaiolas individuais do biotério em condições apropriadas, com livre acesso à ração e água e com ciclos alternados de luz e escuridão durante todo o experimento.

3.6 Dieta hipercolesterolêmica

Os camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ receberam a dieta padrão fornecida pelo biotério da FCF-IQ/USP ou a ração hipercolesterolêmica (suplementada com 0,5% de colesterol) padronizada pelo nosso grupo, de acordo com o protocolo no qual foram inseridos. A composição da dieta hipercolesterolêmica pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição da dieta hipercolesterolêmica oferecida aos animais.

Nutrientes	Quantidade (%)
Carboidratos (*)	52,45
Fonte proteica (**)	16,50
Lipídios (***)	20,00
Celulose	5,00
Mistura mineral (+)	3,50
Mistura vitamínica (+)	1,00
L-Cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
Ácido cólico	0,50
Colesterol	0,50

(*) Carboidratos = amido (56,86%), amido dextrinizado (26,34%) e sacarose (18,68%).

(**) Fonte proteica = caseína comercial (> 85% de proteína);

(***) Lipídios = gordura de coco (70,10%) e óleo de soja (29,90%), mantendo a proporção dos ácidos linoleico e linolênico em 5:1 (LEE et al., 1989).

(+) Misturas mineral e vitamínica formuladas segundo recomendação da AIN-93.

3.7 Isolamento e caracterização da LDL eletronegativa

A coleta de sangue de indivíduos voluntários foi realizada a vácuo através de punção em veia do antebraço. Foram coletados cerca de 30 mL de sangue em tubos

estéreis Vacutainer® (6 mL) contendo EDTA como anticoagulante (1 mg/mL). Foi utilizado material estéril e descartável para essas coletas. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 500 xg por 10 minutos a 4 ^{o}C para a obtenção do plasma. Ao plasma foi imediatamente adicionado um coquetel contendo: antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT 20 mM) e inibidores de protease: aprotinina (2 µg/mL), benzamidina (2 mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF 1 mM). A amostra foi armazenada a -20 ^{o}C até o início do isolamento de LDL(-), realizado no Laboratório de Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, de acordo com protocolo padronizado pelo grupo (FAULIN et al., 2008).

Para isolamento da subfração eletronegativa da LDL, o plasma foi submetido à ultracentrifugação sequencial, utilizando-se a ultracentrífuga Beckman Coulter, modelo Optima™ XPN, com rotor Beckman Coulter de ângulo fixo T 70.1 durante 7 horas, a 215.000 xg e 4 ºC. A retirada de VLDL foi realizada com adição de solução salina de densidade igual a 1,019 ao plasma total. Já a retirada de LDL foi obtida após a adição de solução salina de densidade igual a 1,050.

A LDL isolada foi dialisada contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, filtrada em membrana com poro de 0,22 µm (Millipore®, CA) e injetada em uma coluna de troca iônica (*Sepharose* UNO Q12, Bio-Rad, EUA), conectada a um sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Bio-Rad, EUA). Neste sistema, a fase móvel é constituída de 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). O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300 mL do tampão B, seguida do seu equilíbrio com 300 mL de tampão A e da injeção da LDL na coluna. 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 (DE CASTELLARNAU et al., 2000). Os eluentes foram monitorados a 280 nm UV e os picos correspondentes a LDL(-) e LDL nativa foram coletados utilizando um coletor de frações (*BioLogic BioFrac Fraction Colletor*, Bio-Rad, EUA). Todas as soluções foram filtradas em 0,22 µm.

Ambas as frações de LDL foram dialisadas contra 1 litro de tampão PBS 1X pH 7,4 durante 4 horas, com troca de tampão a cada 60 minutos e tiveram suas concentrações proteicas determinadas pelo método de BCA (ThermoFisher Scientific, EUA), 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, que, em seguida, foram armazenadas a -20 °C e protegidas da luz até o momento do uso.

A confirmação do isolamento da LDL(-) foi obtida pela migração eletroforética em gel de agarose 0,5% (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2003). Foram aplicados 10 µg de LDL(-) ou LDLn por poço, sendo utilizada uma fonte de eletroforese modelo EPS 600 (Pharmacia Biotech, EUA) programada para 60 volts, durante 2 horas de corrida com tampão Tris 58 mM pH 9,5. Após a corrida, o gel foi submerso em corante *Comassie Brilliant Blue* por 20 minutos e descorado com solução de Etanol – Ácido acético - Água destilada (10:30:60, vol:vol:vol) até visualização das bandas. A mobilidade eletroforética da LDL(-) foi comparada a mobilidade eletroforética da LDLn.

3.8 Obtenção e caracterização do scFv anti-LDL(-)

3.8.1 Expressão do scFv anti-LDL(-)

A produção do scFv anti-LDL(-) foi realizada no sistema de expressão da levedura metilotrófica *Pichia pastoris* da linhagem SMD1168 (KAZUMA et al., 2013). As células de *Pichia pastoris*, previamente transformadas com o vetor de expressão pPIGLe (cedido pela Dra. Andréa Maranhão – UNB) contendo a sequência de DNA desejada, foram inoculadas em meio BMGY (*Buffered Complex Glycerol Medium*) incubadas à 30 ºC sob agitação constante (200 rpm) em agitador *shaker* Minitron HT (AG CH-4103 Infors HT, Suíça) por aproximadamente 16 horas ou até a cultura atingir OD_{600} de 2,0 a 6,0. Em seguida, a cultura foi submetida à centrifugação a 3000 xg por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram ressuspendidas em meio BMMY (Buffered *Complex Methanol Medium*) e incubadas novamente no *shaker* à 20 ºC sob agitação constante (200 rpm) durante 72 horas. Metanol (indutor da expressão) foi adicionado à cultura a cada 24 horas a uma concentração final de 1%, assim como o inibidor de serino-protease PMSF a uma concentração final de 1 mM. Após esse período, a cultura foi centrifugada novamente, as células foram descartadas e o sobrenadante armazenado a 4 ºC para posterior purificação.

3.8.2 Concentração do sobrenadante e purificação do scFv anti-LDL(-)

O sobrenadante foi concentrado em tubo filtrante Vivaspin® (GE Healthcare, EUA*)* de centrifugação com poro de 10 kDa. A purificação foi obtida por passagem em 1 mL de resina *Ni-Sepharose Fast Flow* (GE HealthCare, EUA) previamente equilibrada com 5 volumes da resina com tampão de ligação (Fosfato de Sódio 0,02 M, Cloreto de Sódio 0,5 M e 0,03 M de Imidazol, pH 7,6). A aplicação da amostra foi realizada no sistema "batch", no qual a amostra e a resina ficam em contato em um agitador orbital durante uma hora no gelo. A eluição do scFv anti-LDL(-) foi obtida por tratamento com tampão de Fosfato de Sódio 0,02 M, Cloreto de Sódio 0,5 M e 0,5 M de Imidazol, pH 7,6.

Foi determinado em estudos anteriores (KAZUMA et al., 2013), realizados pelo grupo do laboratório, que o scFv anti-LDL(-) é expresso de duas formas distintas pela *Pichia pastoris,* tendo uma delas 35 kDa e a outra 28 kDa. Para a realização dos testes *in vitro* e posteriores testes *in vivo*, viu-se a necessidade de desglicosilar o scFv anti-LDL(-), uma vez que a proteína glicosilada pode interferir na captação de LDL(-) em estudos com macrófagos.

Sendo assim, o scFv anti-LDL(-) purificado foi desnaturado com 0,5% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 0,04 M de DTT (Ditiotreitol) e aquecido a 100 °C durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado Citrato de sódio 50 mM pH 5,5 como tampão da reação, fornecido pelo fabricante junto à enzima Endo H (New England Biolabs, RU), e 1000 unidades da enzima Endo H, de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema de digestão foi incubado a 37 °C durante 1 hora.

O sistema de digestão citado acima foi, em seguida, purificado em resina de Concanavalina A (GE Healthcare, EUA) para separação dos resíduos de manose antes presentes no fragmento. O procedimento envolveu o empacotamento de 1 mL da resina em uma coluna com capacidade para 5 mL de purificado. A resina foi lavada e equilibrada com 5 mL de tampão de ligação (Trisc-HCl 20mM, NaCl 0,5 M, $MnCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 7,4), e em seguida o sistema de digestão foi aplicado, sendo incubado durante 40 minutos com a resina. A coluna foi agitada a cada 10 minutos e, após o término da incubação, passou por nova lavagem com 5 mL de tampão de ligação, onde o scFv foi eluído. Uma solução contendo Tris-HCl 20 mM,

NaCl 0,5 M e metil-α-D-manopiranoídeo 0,5 M, pH 7,4 foi adicionada ao sistema para remoção de resíduos.

O scFv eluído foi dialisado contra PBS pH 7,6 em membrana com poro do tamanho de 10 kDa e uma alíquota representativa foi quantificada pelo método de quantificação de proteínas BCA.

3.8.3 Confirmação da expressão de scFv

3.8.3.1 Análise das proteínas em SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

As proteínas purificadas a partir dos meios de cultura foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%. As amostras foram preparadas adequando-se o volume de amostra ao volume de tampão de amostra 10X concentrado, sendo aquecidas a 95°C durante 5 minutos para a posterior aplicação nos poços do gel de poliacrilamida. Foram aplicados 10 µg/mL de proteína por poço e 3 µL do marcador de peso molecular pré-corado *PageRuler Plus*® (Fermentas, EUA). A eletroforese foi realizada em cuba vertical (Bio-Rad) ligada a uma fonte de eletroforese a 80 V nos primeiros 5 minutos e a 100 V no restante do tempo por aproximadamente 2 horas ou até que as amostras atingissem o ponto desejado. Após a corrida, um dos géis foi corado com prata e o outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose *Hybond* ECL® (Amersham, EUA).

3.8.3.2 Coloração do gel de SDS por prata

Um dos géis foi submetido à coloração por prata, sendo incubado com as soluções de fixação, de lavagem, de sensibilização e de coloração durante 10 minutos sob agitação, nessa ordem. Em seguida, foi adicionada a solução de revelação sob agitação até o surgimento das bandas das proteínas. Nesse momento, foi adicionada rapidamente a solução de bloqueio, de modo a interromper a reação anterior. O gel foi incubado, por fim, com solução de fixação por 10 minutos sob agitação e reidratado com água destilada sob as mesmas condições. O gel foi

submetido a 3 lavagens com água destilada para remoção dos resíduos das soluções entre cada etapa descrita.

3.8.3.3 Análise de proteínas por Western Blot

Para confirmação da identificação do scFv por SDS-PAGE, o material foi transferido para uma membrana de nitrocelulose *Hybond* ECL® (Amersham, EUA). O sistema de transferência é composto pelo sistema: papel filtro (*Whatman Chromatography Paper,* Sigma-Aldrich, EUA), membrana de nitrocelulose, gel e papel filtro. O sistema de transferência utilizado é semi-úmido (*Transblot SD System*®, Bio-Rad, EUA) e sofre ação de uma corrente de 70 miliampéres durante 1 hora e 45 minutos. Seguida da transferência, foi adicionada uma solução de bloqueio [2% de solução de bloqueio (fornecida no kit de revelação) diluído em PBS-Tween (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween) 0,01% (v/v), pH 7,4] à membrana de nitrocelulose por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente, uma solução contendo anticorpo primário IgG de camundongo anti-His-HRP (#631212, *Clontech*, EUA) diluído 1:1500 por 16 horas a 4 ºC, sob agitação. Entre cada etapa, foi realizada a lavagem da membrana com solução PBS-Tween 0,05%, pH 7,4 durante 15 minutos com trocas de solução a cada 5 minutos. A revelação foi feita através de solução reveladora do kit *Pierce ECL Advanced Western Blotting*® (Amersham, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram obtidas através do *Image Quant* 400 (GE Healthcare, EUA).

3.8.3.4 Afinidade do scFv anti-LDL (-) pelo método ELISA

Uma diluição seriada da solução contendo o fragmento de anticorpo foi realizada para o ensaio de ligação à LDL(-) por ELISA (modificado de FAULIN et al., 2008). Como controle negativo, foi utilizada a LDL nativa, que não deve se ligar ao scFv anti-LDL(-). A microplaca de poliestireno de 96 poços (Costar, Corning Inc, EUA) foi sensibilizada com 50 µL de 1 µg/mL dos antígenos LDL nativa e LDL(-) diluídos em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. A placa foi sensibilizada a 4 ^{o} C durante 16 horas. A placa foi, então, lavada com 200 µL de PBS-Tween 0,05% (v/v) e bloqueada com 150 µL de leite desnatado 2% (p/v) diluído em PBS-

Tween 0,01% (v/v), previamente inativado por aquecimento (100 ^{o}C), durante 1 hora e 30 minutos a 37 ^{o}C.

Para a etapa de ligação do scFv anti-LDL(-), o scFv purificado foi diluído de modo a manter a concentração de 20 µg/mL e foram adicionados 50 µL/poço do mesmo. Para controle positivo de reatividade à LDL(-) foi utilizado 50 µL/poço do anticorpo monoclonal MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-) (0,5 µg/mL) produzido por nosso grupo. A placa foi mantida a 37 ^{o}C durante 1 hora. A placa foi novamente lavada com PBS-Tween 0,05% (v/v). Para detecção da ligação foi utilizado 50 µL/poço do anticorpo primário IgG de camundongo anti-His (#27-4710-01, GE Healthcare, EUA) diluído 1:1500 incubado a 37 ^{o}C durante 1 hora e 30 minutos. Como anticorpo secundário utilizou-se 50 µL/poço do IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (#22339919, Immuno Tools, Alemanha) a uma diluição de 1:1500 em uma incubação de 1 hora a 37 ^{o}C. Nos poços contendo MAb 2C7 D5F10 anti-LDL(-), apenas o anticorpo secundário foi introduzido no sistema.

A revelação foi realizada utilizando 50 µL/poço do reagente TMB (Tetrametil Benzidina) (#T0440, Sigma-Aldrich, EUA), substrato para detecção da atividade de peroxidases, e aguardou-se 15 minutos para a adição de 50 µL/poço da solução de parada da reação (Ácido Sulfúrico 0,5M). A leitura foi realizada em seguida em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (Bio-Tec Instruments Inc, EUA).

3.9 Produção da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn

O protocolo de produção das nanopartículas foi depositado junto ao INPI com o título: “Processo sintético para a produção e uso de nanocápsulas multiparede complexadas com íons metálicos” – Patente de Invenção n.016110005557, de 11 de Outubro de 2011 (Anexo 6). Adicionalmente, o protocolo de conjugação entre as nanocápsulas e o scFv anti-LDL(-) foi depositado junto ao INPI com o título: “Composição Farmacêutica Nanométrica e seus Usos” – Patente de Invenção n. BR 10 2012 025132-9, de 2 de Outubro de 2012 (Anexo 7).

Ambas as patentes são proveniente de estudos realizados pelo grupo coordenado pelas Profas. Dra. Adriana Raffin Pohlmann e Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres, respectivamente, do Instituto de Química e da Faculdade de Farmácia da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo grupo da Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla (FCF/USP).

3.9.1 Preparação do complexo metálico de nanocápsulas multiparedes (MCMN-Zn)

A síntese das nanocápsulas foi realizada em duas etapas distintas, de acordo com Bender e colaboradores (2014) (Anexo 8) e Adorne, 2015. Na primeira etapa, foram preparadas as nanocápsulas multiparede e na segunda etapa, foi realizada a sua complexação com íons metálicos.

Em um primeiro momento, foram produzidas as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) (JAGER et al., 2009). Para isso, uma fase orgânica foi preparada a partir da adição de 0,1 g de poli (epsilon) caprolactona (PCL, Sigma-Aldrich, EUA), 0,04 g de monoestearato de sorbitano (SPAN 60®, Sigma-Aldrich, EUA), 0,120 g de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Delaware, Brasil) e 25 mL de acetona. Esta fase permaneceu sobre agitação magnética por 1 hora a 40 ºC. Em paralelo, uma solução etanólica de 5 mL, contendo 0,03 g de fosfatidilcolina de soja (Lipoid S 75®, Lipoid, Suíça) foi preparada, sendo posteriormente adicionada à fase orgânica.

A etapa seguinte consistiu na adição desta solução orgânica sob 50 mL de uma solução aquosa formada por 0,08 g de polissorbato 80 (Tween 80, Delaware, Brasil) sob agitação magnética moderada na temperatura de 40 °C. Após 10 minutos de agitação, a mistura foi transferida para balão rotatório e evaporada sobre pressão reduzida para eliminar a acetona e concentrar a suspensão (próximo a 9 mL). O volume final foi ajustado em frasco volumétrico para 10 mL com água ultrapura.

Para revestir as nanocápsulas de núcleo lipídico, uma solução de quitosana (Sigma-Aldrich, EUA) 7mg/mL foi preparada através da dissolução do polissacarídeo em 10 mL de uma solução aquosa contendo ácido acético a 1%. Desta solução, 1 mL foi lentamente adicionado sobre 9 mL da suspensão de LNC sob agitação magnética moderada (900 rpm). O meio reacional permaneceu sobre agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Ao final deste período, uma suspensão de nanocápsulas multiparede (MN) foi obtida. A formação das nanocápsulas MN baseia-se na interação eletrostática entre o grupo amônio da quitosana e grupos carregados negativamente na superfície do núcleo lipídico.

A etapa final consistiu na formação do complexo multiparede contendo íons metálicos (MCMN-Zn). Este consistiu da complexação de 25 µg/mL de íons zinco

(Zn^{2+}) sobre as nanocápsulas multiparede. Para isso, primeiramente foi preparada uma solução padrão de íons zinco (Zn^{2+}) de 1 µg/mL [28 mg de Acetato de zinco (Sigma-Aldrich, EUA)] dissolvidos por 1 hora a 37 ^{o}C em 10 mL de água ultrapura]. Após esta etapa, adicionou-se lentamente 250 µL desta solução padrão em 9,75 mL da suspensão de nanopartículas MN sob agitação moderada (900 rpm).

3.9.2 Conjugação do scFv anti-LDL(-) às nanocápsulas MCMN-Zn

A conjugação das nanocápsulas ao scFv anti-LDL(-) foi realizada de acordo com Bender e colaboradores (2014) e Adorne (2015). As formulações foram recebidas na forma de três soluções: 1) Solução de nanocápsulas MN (10^{14} partículas/mL); 2) Solução de íons zinco (1 mg/mL); 3) Solução de fenilalanina (7,58 mg/mL). Para realizar a ligação entre as nanocápsulas MCMN-Zn e o scFv anti-LDL(-), foi adicionado scFv anti-LDL(-) à solução contendo nanocápsulas, de modo a atingir uma concentração final de 300 µg/mL de scFv anti-LDL(-) na formulação formada. A concentração da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sempre será expressa de acordo com a quantidade de scFv anti-LDL(-) adicionado às nanocápsulas MCMN-Zn. O procedimento foi feito de modo semelhante às ligações anteriores, gotejando-se a solução contendo scFv anti-LDL(-) sobre a solução de nanocápsulas sob agitação constante durante 1 minuto a 4 ºC. A ligação entre os fragmentos de anticorpos e o complexo MCMN requer que a adição do ligante ocorra em aproximadamente 1 minuto após a adsorção dos íons metálicos zinco. O processo de agitação moderada também é fundamental para a melhor formação dos complexos. Como controle negativo, foi realizada a conjugação do aminoácido fenilalanina (7,58 mg/mL) às nanocápsulas em substituição ao scFv anti-LDL(-).

É importante salientar que as nanocápsulas (Figura 7) foram sintetizadas, caracterizadas e enviados pelos colaboradores da UFRGS a fim de serem utilizadas pelo nosso grupo nos testes *in vitro* e *in vivo*. Todos os ensaios e caracterizações foram realizados pela Ms. Márcia Adorne, colaboradora deste projeto, como parte da sua dissertação de Mestrado. Por este motivo, os resultado aqui apresentados são descritos de forma resumida, visando apenas ilustrar os processos envolvidos na produção das nanopartículas em estudo. Vale ressaltar que para uma avaliação adequada dos efeitos da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, os tratamentos

nanocápsulas MCMN-Zn e scFv anti-LDL(-) foram utilizados como controle em todos os ensaios.

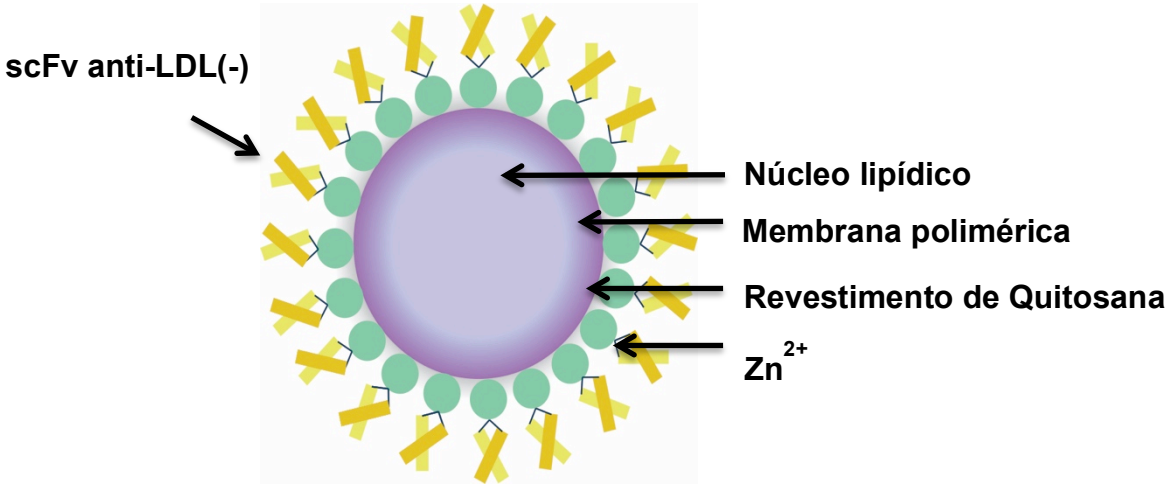


Figura 7: Representação esquemática do complexo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn formado pela ligação entre as nanocápsulas MCMN-Zn e o scFv anti-LDL(-). A formação do complexo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn ocorreu por adição do scFv anti-LDL(-) à solução contendo nanocápsulas MCMN-Zn após 1 minuto da adsorção de íons Zinco às nanocápsulas MN (Acervo pessoal).

3.9.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

Todas as formulações foram caracterizadas quanto a ausência de partículas micrométricas por meio da análise de distribuição de tamanho de partículas utilizando a técnica de difração a laser (Mastersizer® 2000, Malverns Instruments, RU) e por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) em equipamento Zetasizer® Nano-ZS (Malvern Instruments, RU). O índice de polidispersão (Span) foi calculado pela relação entre a diferença dos valores dos diâmetros nos percentis 90 e 10 e o valor do diâmetro médio sob a curva de distribuição de tamanho, determinada por difração a laser. Foi realizada ainda a análise de rastreamento de nanopartículas (Nanosight LM10, Nonasight®, RU) para determinar o diâmetro médio hidrodinâmico e a densidade do número de partículas (concentração de nanocápsulas, determinada pelo número de partículas por mililitro de formulação). O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética em um analisador ZetaPlus (Zeta Potential Analyser, Brookhaven Instruments Corporation, EUA) após a diluição de uma amostra da formulação em 10 mM de uma solução aquosa de NaCl. Valores de pH foram adquiridos a 25 ºC diretamente das formulações, usando o potenciômetro B474 (Micronal, BR), previamente

calibrado em pH 4,0 e 7,0. A quantidade de scFv anti-LDL(-) não conjugado à nanoformulação foi determinada pelo método de quantificação de proteínas Lowry modificado, após ultrafiltração-centrifugação a 1844 xg durante 5 minutos em membrana de 30 kDa (Amicon® Utra, MerckMillipore®, EUA). As análises foram executadas com todos os lotes de formulação sintetizados. Os valores de cada lote foram obtidos considerando a triplicata de análises de cada um deles.

3.9.4 Afinidade do complexo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn pelo método ELISA

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito (BENDER et al., 2014). A microplaca de poliestireno com 96 poços (Costar, Corning Inc, EUA) foi sensibilizada a 4 ^{o}C durante 16 horas com 50 µL de 25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) ou de formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn diluídos em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, e bloqueadas com 150 µL de leite desnatado 2% (p/v) diluído em PBS-Tween 0,01% (v/v) durante 1 hora e 30 minutos a 37 ^{o}C. Na terceira etapa, adicionou-se LDL(-) ou LDL nativa, como controle negativo, na concentração de 1 µg/mL. Em seguida, foi adicionado anticorpo monoclonal MAb 2C7D5F10 anti-LDL(-) (10 µg/mL) durante 1 hora a 37 ^{o}C a fim de permitir o reconhecimento da LDL(-) ligada ao scFv anti-LDL(-) ou à formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Um anticorpo IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (#22339919, Immuno Tools, Alemanha) foi adicionado ao sistema a uma diluição de 1:1500 durante 1 hora a 37 ^{o}C. A ligação específica foi observada após incubação com 50 µL/poço do substrato TMB (#T0440, Sigma-Aldrich, EUA). Após 15 minutos de incubação, foi adicionado 50 µL/poço da solução de parada da reação (Ácido Sulfúrico 0,5M). A leitura foi realizada em seguida em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

3.10 Estudos *in vitro*

Nos ensaios realizados, os macrófagos foram tratados com sa seguintes concentrações de cada tratamento: 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-), 6,25 µg/mL da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-

Zn e 37,5 µg/mL de LDL(-) isoladamente ou em diferentes combinações. Todos os ensaios foram realizados em duplicata com pelo menos três experimentos independentes.

3.10.1 Caracterização de macrófagos murinos primários diferenciados de células da medula óssea

Conforme descrito no item 3.4, os macrófagos murinos primários diferenciados a partir de células da medula óssea são caracterizados após 7 dias do início da diferenciação e antes de serem utilizados em qualquer tipo de ensaio. Para essa determinação, as células foram desaderidas com auxílio de Tripsina-EDTA 0,25% durante aproximadamente 5 minutos em incubadora de CO_2 a 37 ^{o}C. A tripsina foi então inativada com volume igual ou maior de Soro Fetal Bovino. As células foram homogeneizadas e transferidas para um tubo Falcon™ de 15 mL, centrifugadas a 100 g, por 5 minutos a 4 ^{o}C, ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI e contadas em câmara de Neubauer. 2 x 10^5 células foram separadas e transferidas para um tubo Falcon™ de 5 mL específico para uso em citômetro de fluxo. As células foram, então, marcadas com o anticorpo murino F4/80-PE-Cy5 diluído 1:1000 (#15-4801-82, *Ebioscience*, EUA) durante 30 minutos a 37 ^{o}C. Um tubo contendo a mesma quantidade de células sem marcação foi utilizado como controle do ensaio. Ambos os tubos foram centrifugados novamente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 300 µL de tampão PBS para leitura no citômetro. Foi utilizado o citômetro FACSCanto™ *Flow Cytometer* (Becton, Dickinson and Company, EUA) e os resultados foram analisados através do *software Flow Jow* Versão 10.0.2, ©Tree Star (EUA).

3.10.2 Avaliação do efeito *in vitro* da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn em macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários sobre a formação de células espumosas

A LDL(-) foi marcada com o fluoróforo DiI(C_{18}) (*1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate*, #D282, Life Technologies, EUA), que apresenta emissão em 565 nm, na proporção de 300 µg de DiI para cada 1 mg de LDL(-) (STEPHAN; YURACHEK, 1993) durante 16 horas a 37 ºC, sendo, em

seguida, filtrada em membrana com poro de 0,22 µm para retirada do excesso de corante não ligado à lipoproteína. Um controle negativo de PBS marcado com DiI foi utilizado em todos os ensaios. As células foram tratadas com nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anrti-LDL(-), formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e LDL(-), isoladamente ou em diferentes combinações. A internalização de LDL(-) foi confirmada pela observação de conteúdo lipídico no interior das células, sendo este observado pelas técnicas:

3.10.2.1 Citometria de fluxo

2,5 x 10^5 macrófagos, tanto humanos quanto murinos, foram cultivados por poço em placas de 12 poços e estimulados durante 3 horas. Após o estímulo, as células foram lavadas em PBS e coletadas para análise. Foram observados 10000 eventos. Todos os experimentos envolvendo macrófagos murinos primários foram realizados no citômetro FACSCanto™ *Flow Cytometer* e os ensaios com macrófagos humanos primários foram realizados no citômetro FACS LSR Fortessa™ *Flow Cytometer* (Becton, Dickinson and Company, EUA). Todos os resultados foram analisados através do *software Flow Jow* Versão 10.0.2.

3.10.2.2 Microscopia confocal

A técnica de microscopia confocal foi utilizada a fim de confirmar a internalização de LDL(-) sob as mesmas condições estabelecidas na avaliação por citometria de fluxo. Para isso, cultivou-se 2,5 x 10^5 macrófagos por poço em placas de cultura com fundo de vidro de 4 poços (#627-975, Greiner Bio-One, Alemanha). A marcação da LDL(-) com DiI foi mantida, assim como o tempo de incubação de 3 horas. Após esse tempo, as células foram fixadas com formaldeído 10% durante 15 minutos. O núcleo das células foi marcado com o fluoróforo DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*, #D1306, Life Technologies, EUA), que apresenta emissão em 461 nm, durante 5 minutos. As imagens foram obtidas através de um microscópio confocal de varredura a laser Carl Zeiss LSM510 Meta e iluminador HAL 100 (Zeiss, Alemanha). A intensidade de fluorescência é uma medida qualitativa e tem o objetivo de confirmar visualmente os resultados obtidos por outras técnicas.

3.10.3 Avaliação da expressão gênica de citocinas pró e antiinflamatórias por PCR em Tempo Real

1 x 10^6 macrófagos humanos primários foram cultivados e estimulados durante 24 horas ou 4 horas (apenas para a análise da expressão de *TNFA*) em placas de 6 poços com nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anrti-LDL(-), formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e LDL(-), isoladamente ou em diferentes combinações. Após o tempo de incubação, as células foram coletadas e o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™, EUA) segundo as especificações fornecidas pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, sendo considerado de boa qualidade as amostras que apresentaram razões de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm com valores próximos de 2.

Para a síntese de cDNA, foram utilizados 1 µg de RNA total, 4 µL de *SuperScript® Vilo cDNA Synthesis Kit* (#11754050, ThermoFisher Scientific, EUA) e água DEPC em um volume final de 20 µL. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 º C e 5 minutos a 85 ºC em termociclador PX2 Thermal Cycler® (ThermoFisher Scientific, EUA). Após o término da reação, os tubos foram colocados imediatamente em banho de gelo e armazenados a -20 ºC para análise posterior.

Para as reações de PCR em Tempo Real (RT-PCR), foram utilizados 2 µL de cDNA, 0,4 µL da mistura de oligonucleotídeos específicos para cada gene (Tabela 2), 2,6 µL de água miliQ estéril e 5 µL de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). O ensaio RT-PCR, para genes humanos, foi realizado em equipamento CFX96 *Touch* (BioRad, EUA) e, para genes murinos, no equipamento 7500 *Fast Real Time PCR System®* (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento dos *primers* e extensão a 60 °C por 60 segundos. Cada amostra foi analisada em duplicata. Foram utilizados oligonucleotídeos para amplificação de IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 e TNFα. A análise dos dados resultantes das reações de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct (ΔΔCt) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para normalização da expressão gênica, foram utilizados oligonucleotídeos para amplificação de *GAPDH*, genes humanos, e *Rpl13a*, genes murinos.

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos utilizados para quantificação dos níveis de expressão de mRNA em macrófagos humanos e murinos primários por PCR em Tempo Real.

Gene	Foward	Reverse
GAPDH	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3'	5'GGCATGGACTGTGGTCATGAG3'
IL1B	5'GGACAAGCTGAGGAAGATGC3'	5'TCGTTATCCCATGTGTCGAA3'
IL6	5'GAACTCCTTCTCCACAAGCG3'	5'TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT3'
IL10	5'TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA3'	5'GTCTTGGTTCTCAGCTTGGG3'
MCP1	5'CCCCAGTCACCTGCTGTTAT3'	5'TGGAATCCTGAACCCACTTC3'
TNFA	5'AACCTCCTCTCTGCCATCAA3'	5'GGAAGACCCCTCCCAGATAG3'
Rpl13a	5'TCCTCAAGACCAACGGACTCC3'	5'AACCTTTGGTCCCCACTTCCCT3'
Il1b	5'TTCCCATTAGACAACTGCACTAC3'	5'GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT3'
Il6	5'TGTGCAATGGCAATTCTGAT3'	5'ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC3'
Il10	5'GTACAGCCGGGAAGACAATAA3'	5'GCATTAAGGAGTCGGTTAGCA3'
Mcp1	5'CAGCAAGATGATCCCAATGA3'	5'GCTGAAGACCTTAGGGCAGA3'
Tnfa	5'AAACTGGGCATGCACGACCT3'	5'ACTTCAGCACCATAACAGCC3'

3.10.4 Quantificação proteica de citocinas pró e antiinflamatórias

1 x 10^6 macrófagos humanos primários foram cultivados em placas de 6 poços e estimulados por 48 horas com nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anrti-LDL(-), formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e LDL(-), isoladamente ou em diferentes combinações. As células foram coletadas e a quantificação de IL-1β foi realizada a partir da tecnologia de *beads* BD® CBA – *Cytometric Bead Array*. O ensaio consiste na incubação da amostra com *beads* de tamanho conhecido, contendo anticorpos primários marcados com PE que promovem a quantificação do analito em questão através da detecção de um sinal fluorescente. Para isso foi utilizado os kits Mouse *IL-1β Enhanced Sensitivity Flex Set* (#562278, BD Biosiences, EUA), *Human IL-1β Flex Set* (#558279, BD Biosiences, EUA), *Mouse inflammatory cytokine kit* (#552364, BD Biosiences, EUA) e *Human inflammatory cytokine kit* (#551811, BD Biosiences, EUA), sendo os dois últimos utilizados para a detecção de IL-6, IL-10,

MCP-1, IFN-γ e TNFα. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.10.5 Avaliação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários

As nanocápsulas foram marcadas com o fluoróforo Rodamina B (#R6626, Sigma-Aldrich, EUA), com emissão em 554 nm. Nessas nanocápsulas, a Rodamina B está ligada covalentemente ao PCL, sendo facilmente incorporada à formulação ainda na primeira etapa de produção. Por apresentar um espectro de emissão de fluorescência muito próximo ao do DiI, não foi possível fazer uma avaliação simultânea com os tratamentos de nanocápsulas MCMN-Zn ou da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e LDL(-) marcados. A internalização de partículas da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn marcada com Rodamina B pelos macrófagos foi avaliada, após 3 horas de tratamento, por citometria de fluxo, microscopia confocal e microscopia hiperespectral. Após a comprovação desta evidência, foram avaliados os possíveis mecanismos de endocitose envolvidos neste processo de internalização de nanopartículas. Para isso, as células foram tratadas com inibidores específicos (Tabela 3) durante 1 hora e em seguida tratadas com os estímulos de nanocápsulas MCMN-Zn e da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn nas concentrações descritas no início deste tópico (3.10) durante 3 horas. Foram realizados ensaios pelas técnicas já citadas:

3.10.5.1 Citometria de fluxo

2,5 x 10^5 macrófagos, murinos ou humanos primários, foram cultivados por poço em placas de 12 poços e estimulados. Após o estímulo, as células foram lavadas em PBS e coletadas para análise. Foram observados 10000 eventos. Todos os experimentos envolvendo macrófagos murinos primários foram realizados no citômetro FACSCanto™ *Flow Cytometer* e os ensaios com macrófagos humanos primários foram realizados no citômetro FACS LSR Fortessa™ *Flow Cytometer.* Todos os resultados foram analisados através do *software Flow Jow* Versão 10.0.2.

3.10.5.2 Microscopia confocal

Foram cultivados 2,5 x 10^5 macrófagos murinos ou humanos primários por poço em placas de cultura com fundo de vidro de 4 poços (#627-975, Greiner Bio-One, Alemanha) O núcleo das células foi marcado com o fluoróforo DAPI durante 5 minutos, após fixação das células com formaldeído 10%. Na avaliação do mecanismos de endocitose relacionada à captação da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMNZn, o fluoróforo *CellTracker™ Green* CMFDA (#C2925, Life Technologies, EUA) foi utilizado para marcação do citoplasma das células. As imagens foram obtidas através de um microscópio confocal de varredura a laser Carl Zeiss LSM510 Meta e iluminador HAL 100.

Tabela 3: Inibidores de endocitose utilizados no estudo da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos e humanos primários.

Inibidor	Concentração utilizada	Mecanismo envolvido	Macrófagos testados	Referências
Azida de Sódio	1 mM	Inibidor de fosforilação oxidativa	Murinos	Bicker e col. (2008)
Brefeldina A	1 µM	Inibidor do transporte intracelular de proteínas	Murinos	Becker, Volchuk e Rothman (2004)
Citocalasina B	40 µM	Inibidor de fagocitose	Humanos	Bylund e col. (2004)
Citocalasina D	40 µM	Inibidor de fagocitose	Humanos/Murinos	Wakatsuki e col. (2001)
Cloroquina	50 µM	Inibidor de endocitose	Humanos/Murinos	Chen, Gombart e Chen (2011)

Inibidor	Concentração utilizada	Mecanismo envolvido	Macrófagos testados	Referências
Dynasore	80 µM	Inibidor das vias de endocitose dependentes de dinamina	Humanos/Murinos	Macia e col. (2006)
EIPA	50 µM	Inibidor de macropinocitose	Humanos/Murinos	Nagao e col. (2010)
LY294002	20 µM	Inibidor da via PI3K	Humanos	Becker, Volchuk e Rothman (2004); Yamaguchi e col.. (2006)
Monensina de Sódio	20 µM	Inibidor de enzimas lisossomais	Murinos	Gao e col. (2013)
Nocodazol	2,5 µM	Inibidor de fagocitose	Humanos	Gao e col. (2013)

Azida de Sódio (#S8032, Sigma-Aldrich), Brefeldina A (#B7651, Sigma-Aldrich), Citocalasina B (#C6762, Sigma-Aldrich), Citocalasina D (#C8273, Sigma-Aldrich), Cloroquina (#C6628, Sigma-Aldrich), Dynasore (#D7693, Sigma-Aldrich), EIPA ou 5-(N-Ethyl-N-isopropil)amiloride (#A3085, Sigma-Aldrich), LY294002 (#L9908, Sigma-Aldrich), Monensina de Sódio (#M5273, Sigma-Aldrich), Nocodazol (#M1404, Sigma-Aldrich).

3.10.5.3 Microscopia hiperespectral e de fluorescência em sistema CytoViva®

Adicionalmente às técnicas descritas acima, a internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn foi confirmada utilizando o microscópio hiperespectral confocal de campo escuro de alta resolução e eficiência CytoViva® (CytoViva Inc, EUA), que permite a visualização de partículas com até 74 nm de diâmetro, além de possibilitar a obtenção do espectro de absorção das mesmas. Por se tratar de um microscópio confocal, também permite a avaliação de partículas conjugadas a fluoróforos (CYTOVIVA® HOME, 2016).

Para esses ensaios, foram cultivados 2 x 10^5 macrófagos, de ambas as espécies, em placas de 6 poços, contendo uma lamínula de vidro, limpa e livre de partículas de poeira, com 1 mm de espessura (*extra clean dust-free* Nexterion® Glass D *coverslips*; #D263T, Schott, EUA). Após o tratamento, as células foram lavadas 5 vezes com PBS a 37 °C e as lamínulas foram cuidadosamente retiradas das placas e posicionadas em uma lâmina de vidro contendo 10 µL de PBS 1X. As imagens de fluorescência foram obtidas com uma câmera digital Dage XL CCD (DAGE®, Japão) com uma objetiva de 100 x. Os dados para obtenção do espectro médio de cada amostra foram coletados de diferentes áreas através de uma câmera espectral Specim V10E CCD e determinados a partir do software ENVI *Hyperspectral Image Analysis*® (CytoViva Inc, EUA). As análises no microscópio CytoViva® foram conduzidas pela Dra. Mayara Uchiyama, em colaboração com o grupo do Prof. Koiti Araki do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.11 Estudos *in vivo*

3.11.1 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a interação leucócito-endotélio e sobre a permeabilidade vascular por técnica de microscopia intravital

A fim de garantir a segurança da utilização *in vivo* da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn na dose pré-estabelecida (CAVALCANTE et al., 2016) foi avaliado o seu efeito sobre os parâmetros da microcirculação e da permeabilidade vascular em camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$. Essa avaliação foi realizada por microscopia intravital, técnica que permite avaliar a dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos a partir da observação direta da rede vascular de tecidos transluminados ou não (GAVINS, 2012).

Para isso, 30 camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos, com 12 semanas de idade foram divididos em 6 grupos (n=6) e alimentados com dieta padrão do biotério ou dieta hipercolesterolêmica (HC) (Tabela 1) durante 8 semanas em protocolo de lesão inicial. Foram administrados via endovenosa preparações contendo solução

salina 0,9%, 5 x 10^5 partículas/Kg de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.

Os animais foram anestesiados com a mistura anestésica Cetamina e Xilazina por via intraperitoneal e tricotomizados na região interna da pata posterior esquerda. A veia femural foi canulada pela inserção de um catéter intravenoso (PE10, BD Biosciences, EUA) para a posterior infusão dos tratamentos. Em seguida, cada animal foi submetido aos procedimentos cirúrgicos necessários para a exposição do músculo cremáster, permanecendo anestesiados durante todo o protocolo.

Os animais foram, então, posicionados e fixados, em decúbito ventral, sobre uma placa de metal aquecida com uma região acrílica transparente, de forma a possibilitar a perfeita visualização da microcirculação subcutânea local. Cada animal foi disposto abaixo das objetivas do microscópio, conectado a uma lâmpada de fluorescência (*Super High Pressure Mercury Lamp Power Supply*, Nikon, modelo, HB-10101AF), constituindo, assim, sistema de microscopia por epi-iluminação (VANHEULE et al., 2008).

Uma vez exposto, o músculo cremáster foi então distendido por quatro pontos distintos, com auxílio de pequenos ganchos, formando uma área transparente, pela qual foi possível visualizar as estruturas microvasculares (Figura 8). Uma vênula pós-capilar com diâmetro entre 30 e 40 µM, facilmente observável ao microscópio na superfície transparente, foi então escolhida aleatoriamente para análise. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução tampão de Ringer-Locke gelatina (pH= 7,3 – 7,4; NaCl 154nM; KCl 5,6 mM; $CaCl_2.2H_2O$ 2mM; $NaHCO_3$ 6mM; Glicose 5mM e Gelatina) a temperatura de 37 ^oC.

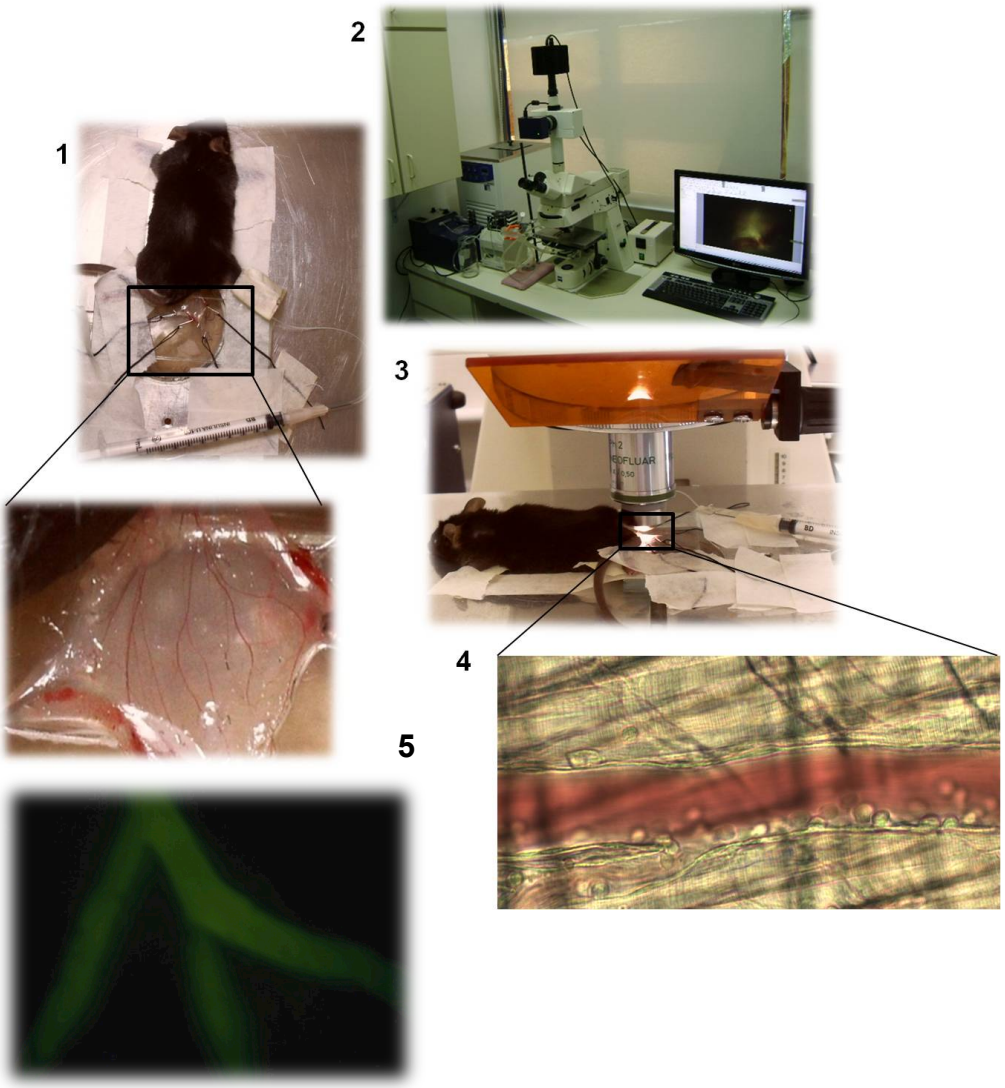


Figura 8: Imagens representativas dos procedimentos para técnica de microscopia intravital. 1: Exposição do músculo cremaster e posicionamento do animal sob o microscópio. Os animais foram anestesiados, tricotomizados e o seu músculo cremaster foi exposto e estendido sob uma placa aquecida; 2 e 3: A placa foi posicionada sobre o *charriot* do microscópio onde a malha vascular foi transiluminada; 4: Visualização da malha vascular em campo claro. 5: Visualização da malha vascular em campo escuro. Imagens cedidas pelo grupo da Profa. Sandra Farsky, FCF-USP (DREWES, 2015).

Após a escolha da vênula, foram administrados, por via intravenosa, durante 5 minutos, 100 µL de solução salina 0,9%, solução contendo nanocápsulas MCMN-Zn ou solução contendo a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, nas doses já citadas anteriormente. A vênula foi observada antes, logo após a administração do tratamento (tempo 0) e nos tempos de 10, 30 e 60 minutos seguintes. Foram

avaliados os parâmetros de número de leucócitos em comportamento de "*rolling*" ou rolamento, número de leucócitos aderidos, leucócitos migrados, formação de trombos e de áreas hemorrágicas, além da avaliação da velocidade do fluxo sanguíneo (sendo, 0 = fluxo inalterado; 1 = fluxo lento; 2 = fluxo parado). Os leucócitos em movimento na periferia do fluxo sanguíneo, em contato com o endotélio, foram considerados em comportamento "*rolling*". Essas células foram observadas individualmente e contadas durante um período de 5 minutos a partir de sua passagem por um ponto fixo selecionado na vênula. Foram considerados leucócitos aderidos aqueles que permaneceram por mais de 30 segundos fixados à parede vascular (FARSKY; SANNOMIYA; GARCIA-LEME, 1995).

Para a avaliação da permeabilidade vascular, após a última contagem dos parâmetros no campo claro (60 minutos após a administração do tratamento), foi administrada albumina conjugada com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (50 mg/kg, 100 µL, Sigma-Aldrich, EUA). Após 5 minutos, a malha vascular foi observada e fotografada no campo escuro no filtro do FITC ($\lambda_{emi.}$ = 488 nm). As intensidades ópticas integradas médias do composto fluorescente foram obtidas intra e extravascularmente (sendo utilizadas 4 áreas intra e 4 áreas extra computadorizadas de mesmo tamanho) e a seguinte fórmula foi utilizada para calcular a mudança da intensidade óptica: $\Delta I = 1 - (Ii - Io)/Ii$, aonde ΔI é a mudança na intensidade de luz, *Ii* é a intensidade de luz dentro do vaso e *Io* é a intensidade de luz fora do vaso. As imagens no campo claro e no campo escuro foram obtidas em microscópio óptico (Axioplan II, Carl-Zeiss, Alemanha) e as imagens foram capturadas por câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss, Alemanha), e transmitidas simultaneamente a um computador, no qual, posteriormente, foram analisadas pelo *software* AxioVision 4.8. Foi utilizada uma objetiva de imersão em água de 40x, o aumento final na tela do computador (Sony Trinitron) foi de 400x. Os aumentos proporcionados pelas objetivas do microscópio e pela câmera de projeção de imagem conferem ampliação e nitidez suficientes para as análises qualitativas e quantitativas no monitor do computador.

Ao término do protocolo de microscopia intravital, ou seja, uma hora após a administração dos tratamentos, o sangue foi coletado da veia cava em microtubos de 2 mL, contendo EDTA 10%, na proporção de 10 µL de anticoagulante para cada 1 mL de sangue. Foram realizadas a contagem total de leucócitos com líquido de Turk em microscópio óptico e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço, os quais foram fixados em lâminas, corados com solução corante de

May Grumwald-Giemsa (Sigma-Aldrich, EUA), modificada (ROSENFELD, 1947). Os esfregaços foram analisados em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 100x). O plasma separado por centrifugação foi utilizado para avaliação dos níveis plasmáticos de Colesterol Total (#76, Labtest, BR) e Triglicérides (#87, Labtest, BR), com o intuito de confirmar a diferença desses parâmetros entre camundongos que receberam ou não dieta hipercolesterolêmica.

Foram coletadas amostras de urina dos animais por punção direta da bexiga antes da coleta de sangue final. Posteriormente, as mesmas foram aplicadas a tiras reagentes (Urofita 10DL, Prodimol, BR) para análise bioquímica. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Sangue (número de eritrócitos por µL de urina), Urobilinogênio, Bilirrubina, Proteínas (mg/dL), Nitrito, Cetonas (mg/dL), Glicose (mg/dL), pH, Densidade e Leucócitos (número de leucócitos por µL de urina).

O processo de canulação da veia femoral foi conduzido juntamente com a Ms. Marina Spatti, e a exposição do músculo cremáster assim como as análises no microscópio foram conduzidas com a Dra. Carine Drewes, em colaboração com o grupo da Profa. Sandra Farsky da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.11.2 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a área da lesão aterosclerótica

60 camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos, com 12 semanas de idade foram divididos em 6 grupos (n=10) e alimentados com dieta padrão do biotério ou dieta hipercolesterolêmica (HC) (Tabela 1). Os grupos foram divididos em: Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas (MCMN-Zn) ($5x10^5$ partículas/Kg), scFv anti-LDL(-) (5 mg/Kg) e scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn (5 mg/Kg). Todos os grupos receberam semanalmente via endovenosa, pela veia da cauda, aproximadamente 100 µl das preparações, variando de acordo com o peso dos animais. Foi utilizado o protocolo de tratamento em modelo de lesão inicial (Figura 9), a partir do qual os animais foram alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica durante 8 semanas, tendo início após a administração da segunda dose de tratamento. O peso dos animais assim como o consumo de ração foram acompanhados semanalmente durante todo o experimento.

Uma semana após a última dose de tratamento administrada (referente às 8 semanas), os animais foram submetidos ao protocolo de avaliação *in vivo* da lesão aterosclerótica por técnica de PET/CT. O protocolo foi realizado de acordo com Andrés e Dorado (2015), no qual é avaliada a captação do ^{18}F (Flúor-18) conjugado à molécula FDG (Fluordesoxiglicose). O ^{18}F-FDG foi fornecido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) do Estado de São Paulo, como parte de uma colaboração com a Dra. Lorena Pozzo.

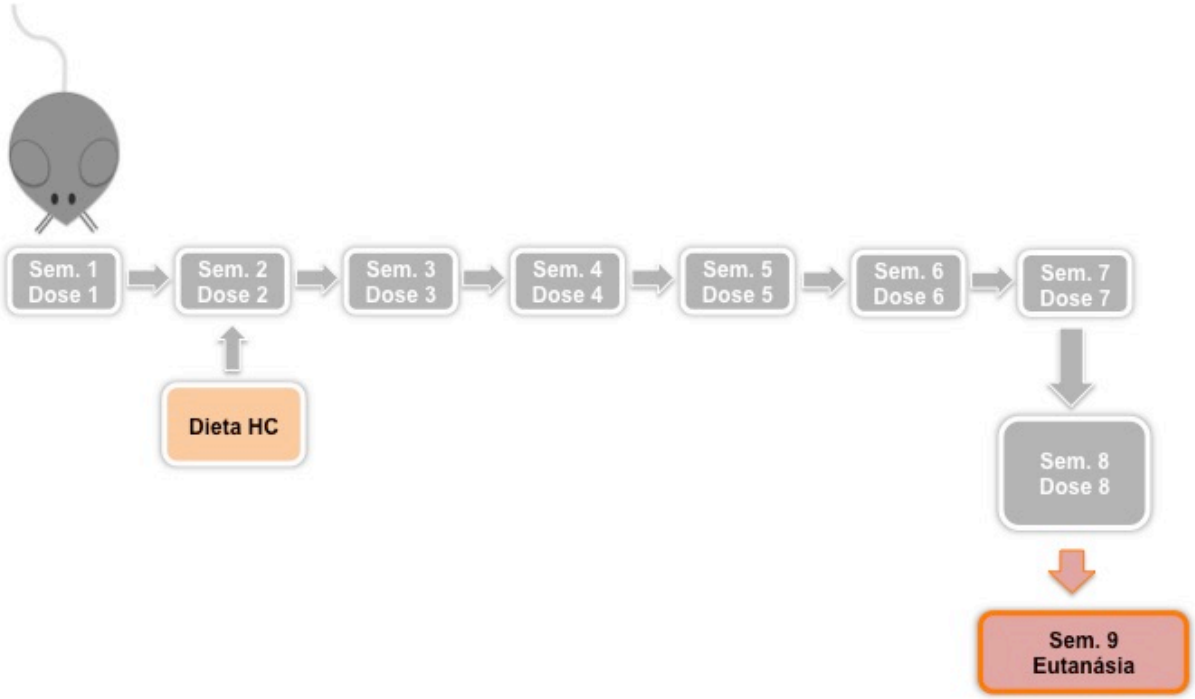


Figura 9: Representação esquemática do protocolo de tratamento em modelo de lesão inicial. Os animais foram alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica durante 8 semanas, tendo início após a administração da segunda dose de tratamento. Os grupos foram divididos em: Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn ($5x10^5$ partículas/Kg), scFv anti-LDL(-) (5 mg/Kg) e scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn (5 mg/Kg). Os animais receberam doses semanais pela veia da cauda, aproximadamente 100 μl das preparações (Acervo pessoal).

3.11.2.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons associada à Tomografia Computadorizada

A técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET) fornece imagens em 3D que representam a distribuição temporal e espacial de um agente de contraste

(radioisótopo) localizado em um alvo específico. Pode ser usada para visualização e avaliação quantitativa de diversos processos *in vivo*. O isótopo pode ser combinado com agentes de direcionamento, como um anticorpo específico e relacionado ao fenômeno estudado. A padronização dessa técnica, dentro do modelo experimental de lesão aterosclerótica, visa auxiliar não só o entendimento deste estudo e de estudos futuros desenvolvidos pelo grupo como também minimizar o uso de animais em nossos protocolos, a partir da possibilidade de acompanhamento das lesões de forma não-invasiva.

Para essa análise, os animais foram mantidos em jejum durante a noite anterior à obtenção das imagens, recebendo apenas água até o momento do início do ensaio. Os animais foram, então, pesados em balança semi-analítica (Mettler-Toledo, BR), e seus níveis plasmáticos de glicose foram aferidos com auxílio de sistema medidor de glicose portátil *Contour* TS (Bayer, Alemanha). Em seguida, os camundongos foram inseridos na câmara do sistema de anestesia (*Summit Anesthesia Support, MIP Anesthesia Technologies*) e anestesiados com 2% de Isoflurano (Cristália, BR) (98% de O_2, com fluxo de 2 L/min). Após alguns minutos, os animais receberam uma dose única de ^{18}F-FDG (19,35 ± 4,19) diluído em solução salina, contidos em aproximadamente 50 a 100 µL de solução, via endovenosa pelo plexo ocular e retornaram às suas gaiolas, onde permaneceram por 3 horas antes do início das aquisições das imagens.

Para dar continuidade ao ensaio, os animais foram novamente anestesiados em câmara de anestesia com 2% de Isoflurano (98% de O_2, com fluxo de 2 L/min) e, em sequência, acondicionados e posicionados dentro do equipamento Albira micro PET-SPECT-CT (Bruker Biospin, Billerica, EUA), onde permaneceram anestesiados durante 30 minutos de aquisição. Terminado o PET, os animais receberam 200 µL de agente de contraste radiográfico baseado em iodo (Omnipaque, Ioexol, GE HealthCare, RU) via endovenosa pela veia lateral da cauda. Imediatamente a essa administração, foi realizada aquisição da imagem de tomografia computadorizada durante 15 minutos, constituída de 400 projeções adquiridas com 400 µA e 45 keV.

Ao final dos procedimentos, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilazina por via intraperitoneal. Foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca, em seringa contendo EDTA 10%, seguida de coleta de urina, por aspiração do conteúdo da bexiga com seringa de 1 mL. Foram retirados os seguintes órgãos ou tecidos para medida da captação do ^{18}F-FDG em dosímetro:

fígado, baço, rins, pâncreas, estômago, intestinos, testículos, pulmões, coração, veia cava, aorta, músculo, osso, cauda e cérebro. As aortas foram retiradas desde a região do arco aórtico até porção final das artérias femorais. Os órgãos foram inseridos em tubos contendo Formalina 10%, pesados em balança analítica, avaliados quanto à atividade radioativa em dosímetro (Capintec, Inc, EUA) e armazenados em Formalina 10% ou Etanol 70% para futuras análises.

3.11.2.2 Reconstrução de imagens

Os arquivos obtidos na tomografia computadorizada foram reconstruídos usando algoritmo FBP (Filtered BackProjection), resultando em voxels de 125x125x125 mm. O algoritmo utilizado para reconstrução de arquivos PET foi o MLEM, com 12 interações, utilizando correções de decaimento e eventos coincidentes, mas sem correção de atenuação. Assim como arquivos CT, os arquivos resultantes contém voxels de 125 μm.

3.11.2.3 Processamento e análise de imagens

Todos os arquivos foram analisados com software PMOD (PMOD Technologies, versão 3.307, Suíça). Inicialmente, foi confirmado o co-registro entre os arquivos de PET e CT. Posteriormente, foram usados volumes de interesse (VOI) em arquivos de CT, com objetivo de selecionar o arco aórtico de cada animal. Finalmente, os volumes obtidos foram colocados em arquivos PET e a atividade, em SUV (do inglês, *standardized uptake value* ou valor padronizado de captação) no arco aórtico (Figura 10), foi calculada em porcentagem da dose injetada por centímetro cúbico (%ID/cm^3).

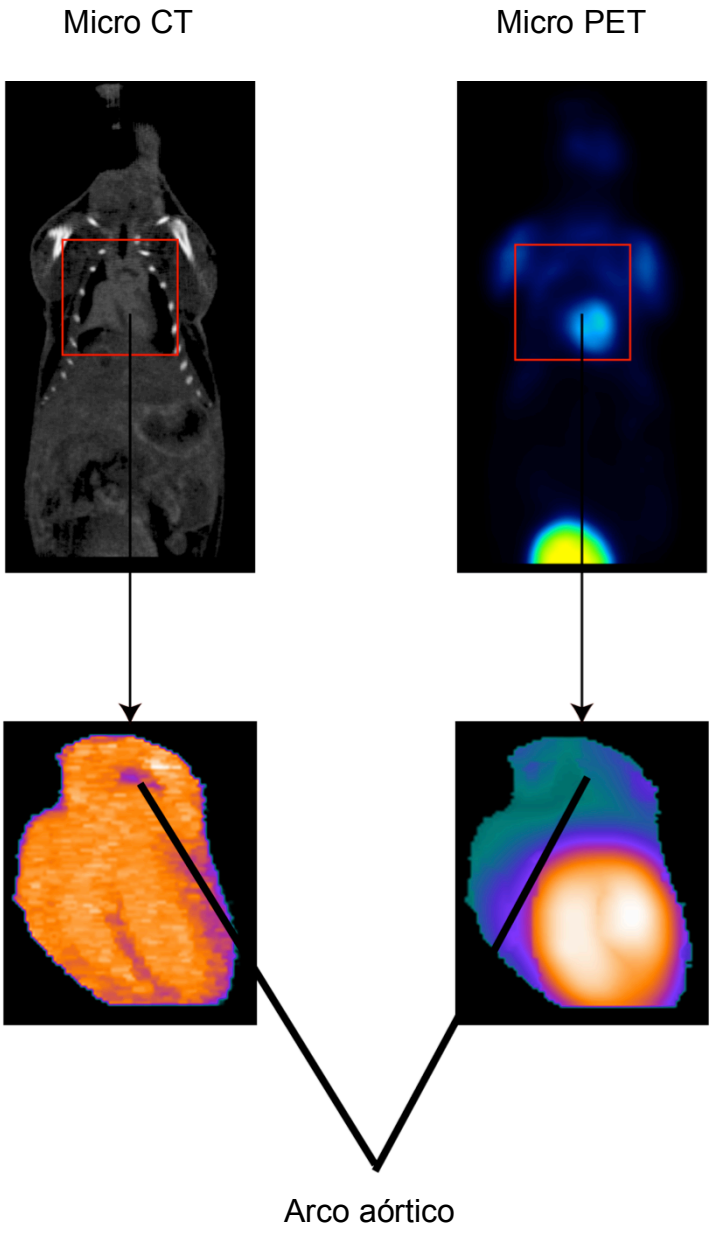


Figura 10: Imagens representativas do arco aórtico de camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ obtidas por técnica de PET/CT. Os animais receberam uma dose única de ^{18}F-FDG (19,35 ± 4,19) via endovenosa pelo plexo ocular. Após 3 horas da administração do radioisótopo, os camundongos foram acondicionados e posicionados dentro do equipamento Albira micro PET-SPECT-CT (Bruker Biospin, Billerica, EUA), onde permaneceram anestesiados durante 30 minutos de aquisição. Terminado o PET, os animais receberam 200 µL de agente de contraste radiográfico baseado em iodo (Omnipaque, Ioexol, GE HealthCare, RU) via endovenosa pela veia lateral da cauda. A aquisição da imagem de tomografia computadorizada foi realizada durante 15 minutos, constituída de 400 projeções adquiridas com 400 µA e 45 keV. Foi utilizado o parâmetro anatômico descrito nesta imagem para quantificação da captação do ^{18}F-FDG (Acervo pessoal).

3.11.2.4 Celularidade sanguínea após o tratamento

A partir do sangue coletado, foi realizada a contagem total do número de leucócitos em líquido de Turk (azul de metileno + ácido acético), e contagem diferencial em esfregaço corado com Panótico (Laborclin, BR).

3.11.2.5 Análise qualitativa da urina

Foram coletadas amostras de urina dos animais por punção direta da bexiga. Posteriormente, as mesmas foram aplicadas a tiras reagentes para análise bioquímica. Foram avaliados semi-quantitativamente os seguintes parâmetros: Sangue (número de eritrócitos por µL de urina), Leucócitos (número de leucócitos por µL de urina), Proteínas (mg/dL), Nitrito, Cetonas (mg/dL), Glicose (mg/dL) e pH.

3.11.2.6 Análise morfométrica das lesões ateroscleróticas no arco aórtico

Os corações armazenados em Formalina 10% (n=5), foram utilizados para avaliação da área da lesão aterosclerótica por análise morfométrica. A inclusão dos tecidos para corte em lâminas foi feita em três soluções de diferentes concentrações de gelatina: inicialmente, solução a 5% de gelatina por três horas, depois a 10% por mais três horas e a 25% por 16 horas, devendo ocorrer todas as etapas em banho-maria (temperatura entre 40-50 $^{\circ}$C). Os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base em um plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Os corações foram, então, embebidos no composto OCT (Killik, Easy Path, BR) dentro da câmara de congelamento do criostato. Os cortes foram desprezados até a proximidade da região de interesse.

Após identificar a aorta, cortes consecutivos 5 µm de espessura foram coletados em lâminas de microscópio silanizadas e cobertas com uma fina camada de gelatina. Os cortes coletados devem compreender a região entre o sinus aórtico e o início da aorta, amostrando uma extensão média de 250-300 µm, conforme Paigen e colaboradores (1987). Foram coletadas cerca de 10 lâminas, cada uma com 8 cortes, para cada animal. As referências anatômicas para a identificação do início da região de coleta são o formato arredondado da aorta e a presença de saliências em sua parede (constituem o início da formação das válvulas aórticas na raiz da aorta).

Já o desaparecimento das válvulas indica o fim da região de coleta. As lâminas foram numeradas em série e coradas com *Oil Red-O* (ORO, #O0625, Sigma-Aldrich, EUA) e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (HHS32, Sigma-Aldrich, EUA) e *Light Green* (#L1866, Sigma-Aldrich, EUA). Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador e o programa *NIS-Elements AR(tm)* versão 3.10 (Nikon, EUA). Foi utilizado o programa analisador de imagens *Image J* para a obtenção das medidas com auxílio da ferramenta *Color Deconvolution* (versão para Mac, NIH, EUA).

3.11.2.7 Quantificação do conteúdo de colágeno no arco aórtico

Os corações armazenados em Etanol 70% (n=5) foram incluídos em parafina e seccionados com auxílio de um micrótomo CUT 4050 (Microtec, BR) em cortes de 5 µm. Os cortes foram realizados na mesma região descrita no item anterior, de modo a permitir a visualização da porção inicial da aorta. Os cortes foram aderidos a lâminas histológicas silanizadas, desparafinados, hidratados, corados com Picrosirius Red (#365548, Sigma-Aldrich, EUA) e contra-corados com Hematoxilina de Carrazi (#H9627, Sigma-Aldrich, EUA) para avaliação do conteúdo de colágeno na região de interesse. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX50, sob luz polarizada, acoplado a uma câmera digital Olympus E 330 (Olympus, Japão). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x e foram analisadas em software ImageJ, após reconhecimento das regiões coradas de cor alaranjada na área estudada (IMAGEJ, 2007).

3.11.2.8 Quantificação do conteúdo lipídico na aorta

As aortas armazenadas em Formalina 10% (n=5) foram utilizadas para quantificação do conteúdo lipídico depositado em seu interior (BEATTIE et al., 2009). As amostras foram cortadas em três seguimentos: 1 cm do arco aórtico até a aorta torácica, aorta abdominal e artérias femorais, e coradas com Oil Red O (solução a 3% em isopropanol 70%) durante 30 minutos. Em seguida, as porções coradas foram lavadas com isopropanol 70% e armazenadas em água destilada. Posteriormente, as amostras foram cuidadosamente transferidas para placas de 96

poços, às quais foram adicionados 100 µL de uma mistura 2:1 (v/v) de clorofórmio e metanol, e mantidas sob agitação durante 4 min em agitador orbital, de modo a dissolver todo o conteúdo de ORO presente nas mesmas. As amostras foram retiradas das placas, transportadas para microtubos e o conteúdo de *Oil Red O* foi avaliado por absorbância (520 nm) em leitor específico (Bio-Tec Instruments Inc, EUA). Para cálculo da quantidade de ORO em cada amostra, foi utilizada uma curva padrão (0,012 – 3,125 µM) do mesmo corante. Foram adicionadas beads metálicas às amostras no interior dos microtubos visando a ruptura do tecido e sua completa dissolução. O conteúdo proteico das amostras de tecido foi avaliado pelo método de BCA e utilizado para normalização dos dados encontrados. Os resultados são expressos em µmol de ORO/ µg de proteína.

3.12. Análise Estatística

Os dados obtidos em todos os ensaios realizados foram analisados estatisticamente pelo teste de *One Way Anova.* O teste de Tukey foi utilizado na análise de comparações pareadas. Os cálculos foram realizados no programa GraphPad Prism (versão 6.01 para Mac, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn

As nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) apresentaram, macroscopicamente, cor branca e aspecto turvo, com valores de pH, ligeiramente ácido, variando de 4,4 a 6,1 (dados não apresentados, ADORNE 2015). A análise das formulações por técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz demonstrou um perfil de distribuição unimodal com diâmetro médio de 117 ± 4 nm (Figura 11) e índice de polidispersão (PDI) de 0,1, indicando um intervalo estreito de distribuição de tamanho.

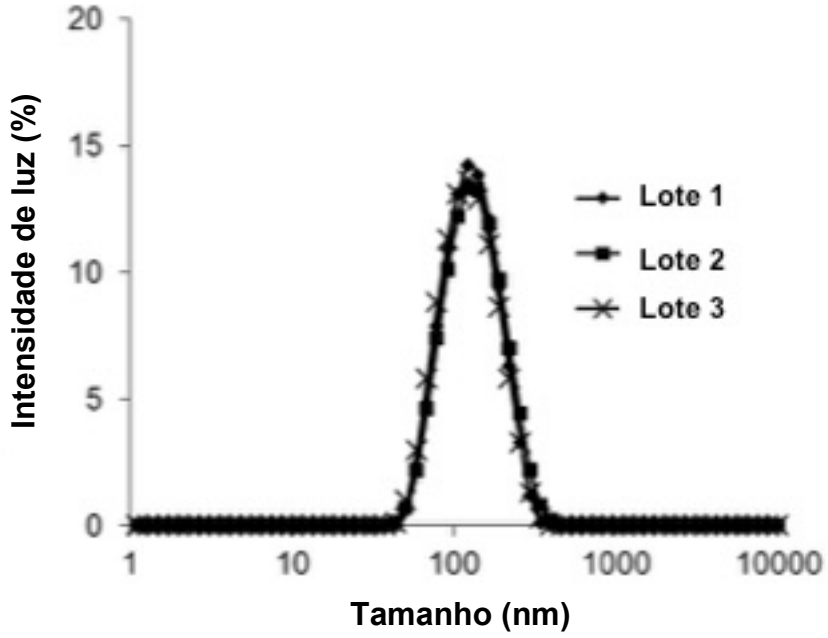


Figura 11: Perfil de distribuição do diâmetro médio das nanocápsulas de núcleo lipídico LNC. Distribuição do diâmetro médio (relação entre a intensidade de luz espalhada e o tamanho) das partículas (n = 3) por técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz em equipamento Zetasizer® Nano-ZS (Malvern Instruments, RU). Uma solução etanólica de 5 mL contendo 0,09 g de fosfatidilcolina de soja foi preparada e adicionada à uma fase orgânica, composta por 0,1 g de PCL, 0,04g de monoesterato de sorbitano, 0,120 g de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e 25 mL de acetona. As fases foram mantidas sob agitação por 1 hora a 40 °C. Dados fornecidos pelo grupo da Profa. Adriana Pohlmann (CAVALCANTE et al., em submissão, ANEXO 9).

A formulação de nanocápsulas MN, por sua vez, contendo 7 mg/mL de quitosana em solução de ácido acético a 1%, apresentou um pH de 4,1 e um

diâmetro médio (Figura 12) de 130 ± 3 nm, com índice de polidispersão igual a 1. O potencial zeta da formulação MN foi de 15,0 ± 1,8 mV (dados não apresentados, ADORNE, 2015).

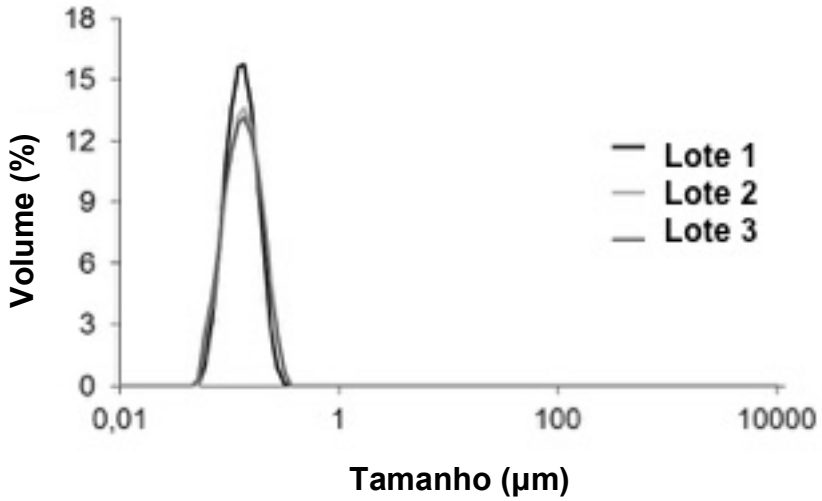


Figura 12: Perfil de distribuição do diâmetro médio das nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana (MN). Distribuição do diâmetro médio (relação entre o volume e o tamanho) das partículas (n = 3) por técnica de difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malverns Instruments, RU). As partículas foram preparadas a partir de uma solução de 7 mg/mL de quitosana em 1% de ácido acético. Dados fornecidos pelo grupo da Profa. Adriana Pohlmann (CAVALCANTE et al., em submissão).

A funcionalização da superfície das nanocápsulas MN com o scFv anti-LDL(-) foi realizada a partir da síntese de um complexo organometálico com íons Zinco (Zn^{2+}), a uma concentração de 25 µg/mL, formando as nanocápsulas MCMN-Zn. Foram realizados estudos para a determinação da concentração ideal de scFv anti-LDL(-) no sistema a fim de passivar a superfície das nanocápsulas (dados não apresentados, ADORNE 2015 e CAVALCANTE et al., em submissão). A concentração de scFv anti-LDL(-) eleita para compor a nanoformulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn foi de 300 µg/mL, com diâmetro médio de 121 ± 8 nm (Figura 13). A quantificação do scFv anti-LDL(-) que não se ligou às nanocápsulas MCMN-Zn (presente no ultrafiltrado após procedimento de ultrafiltração-centrifugação) foi inferior a 15% (dados não apresentados, ADORNE 2015 e CAVALCANTE et al., em submissão). Ao final, foi obtida uma nanoformulação altamente pura, em termos de

estrutura supramolecular, que confere confiabilidade nos resultados obtidos na avaliação do seu efeito biológico.

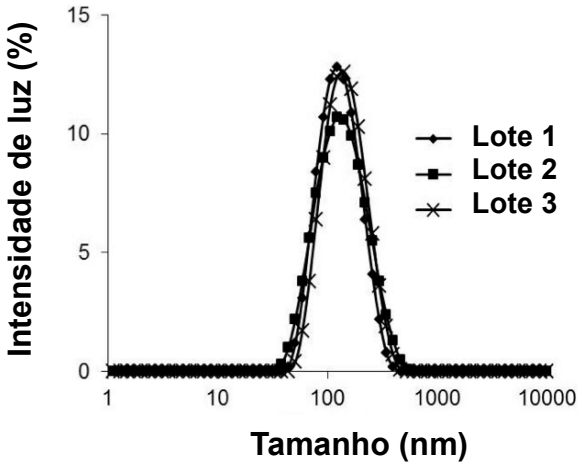


Figura 13: Perfil de distribuição do diâmetro médio da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Distribuição do diâmetro médio (relação entre a intensidade de luz espalhada e o tamanho) das nanocápsulas funcionalizadas com 25 μg/mL de Zn^{+2} (A) e 300 μg/mL de scFv anti-LDL(-) (B) (n = 3) por técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz em equipamento Zetasizer® Nano-ZS (Malvern Instruments, RU). Dados fornecidos pelo grupo da Profa. Adriana Pohlmann (CAVALCANTE et al., em submissão).

4.2 Estudos *in vitro*

4.2.1 Avaliação do efeito *in vitro* da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn em macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários sobre a formação de células espumosas

A avaliação do efeito *in vitro* da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn em macrófagos murinos primários (Figura 14A) e macrófagos humanos (Figura 14B) primários sobre a captação de LDL(-) e a formação de células espumosas foi iniciada por técnica de citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que após 3 horas de estímulo simultâneo com 37,5 μg/mL de LDL(-) e 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, as nanocápsulas sem o fragmento de anticorpo não alteraram a captação de LDL(-) por macrófagos murinos e por macrófagos humanos primários. ($p>0,05$). O tratamento das células com 6,25 μg/mL de scFv anti-LDL(-)

diminuiu de forma significativa (p<0,01) a captação dessas partículas apenas em macrófagos murinos, em relação ao controle tratado apenas com LDL(-). O tratamento com 6,25 µg/mL da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, por sua vez, diminuiu de forma significativa esse processo em relação ao controle tratado apenas com 37,5 µg/mL de LDL(-) tanto em macrófagos murinos (p<0,001) quanto em macrófagos humanos (p<0,01) primários.

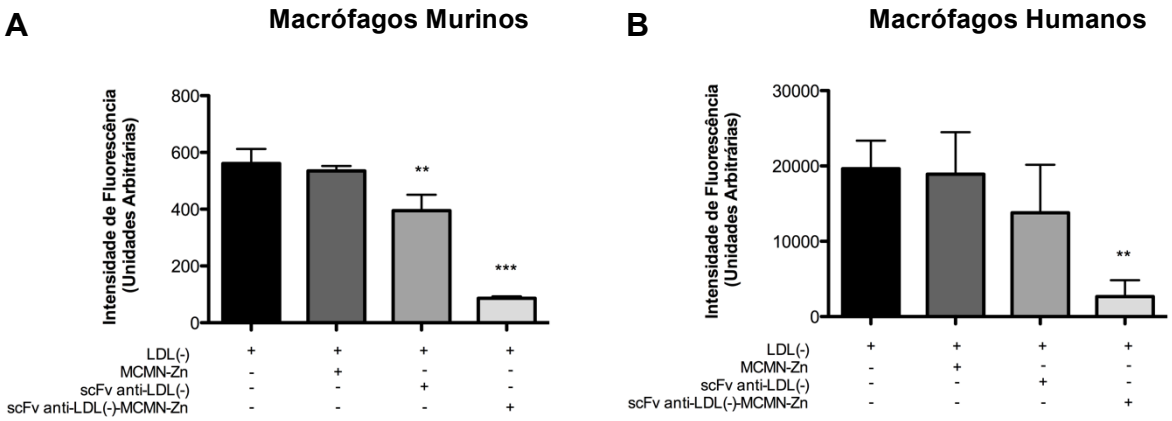


Figura 14: Avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a captação de LDL(-) em macrófagos murinos e humanos primários por citometria de fluxo. A: macrófagos murinos primários; e B: macrófagos humanos primários. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 3 horas com 37,5 µg/mL de LDL(-), 37,5 µg/mL de LDL(-) e 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) e 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. A LDL(-) foi marcada com o fluoróforo DiI(C_{18}) na proporção de 300 µg de DiI para cada 1 mg de LDL(-) durante 16 horas a 37 ºC. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Representação gráfica de dados provenientes de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. ** p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle de LDL(-).

A fim de confirmar os resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo, a captação de LDL(-) foi avaliada por microscopia confocal. Após 3 horas de estímulo com os mesmos grupos de tratamento, o resultado anterior foi satisfatoriamente confirmado em ambas as espécies estudadas. Observou-se a diminuição da captação de LDL(-) pelos macrófagos murinos (Figura 15) e pelos macrófagos humanos (Figura 16) tratados com LDL(-) e scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn simultaneamente em relação ao controle tratado apenas com LDL(-), comprovando o efeito benéfico apresentado por essa formulação. Foi também visualizada uma diminuição na quantidade de LDL(-), representada pela redução da coloração

vermelha no interior das células, em macrófagos murinos tratados com o scFv anti-LDL(-) (Figura 15). As nanocápsulas MCMN-Zn não conjugadas ao fragmento também não modificaram a quantidade de LDL(-) marcada no interior das células avaliadas, o que pode ser evidenciado nas imagens abaixo.

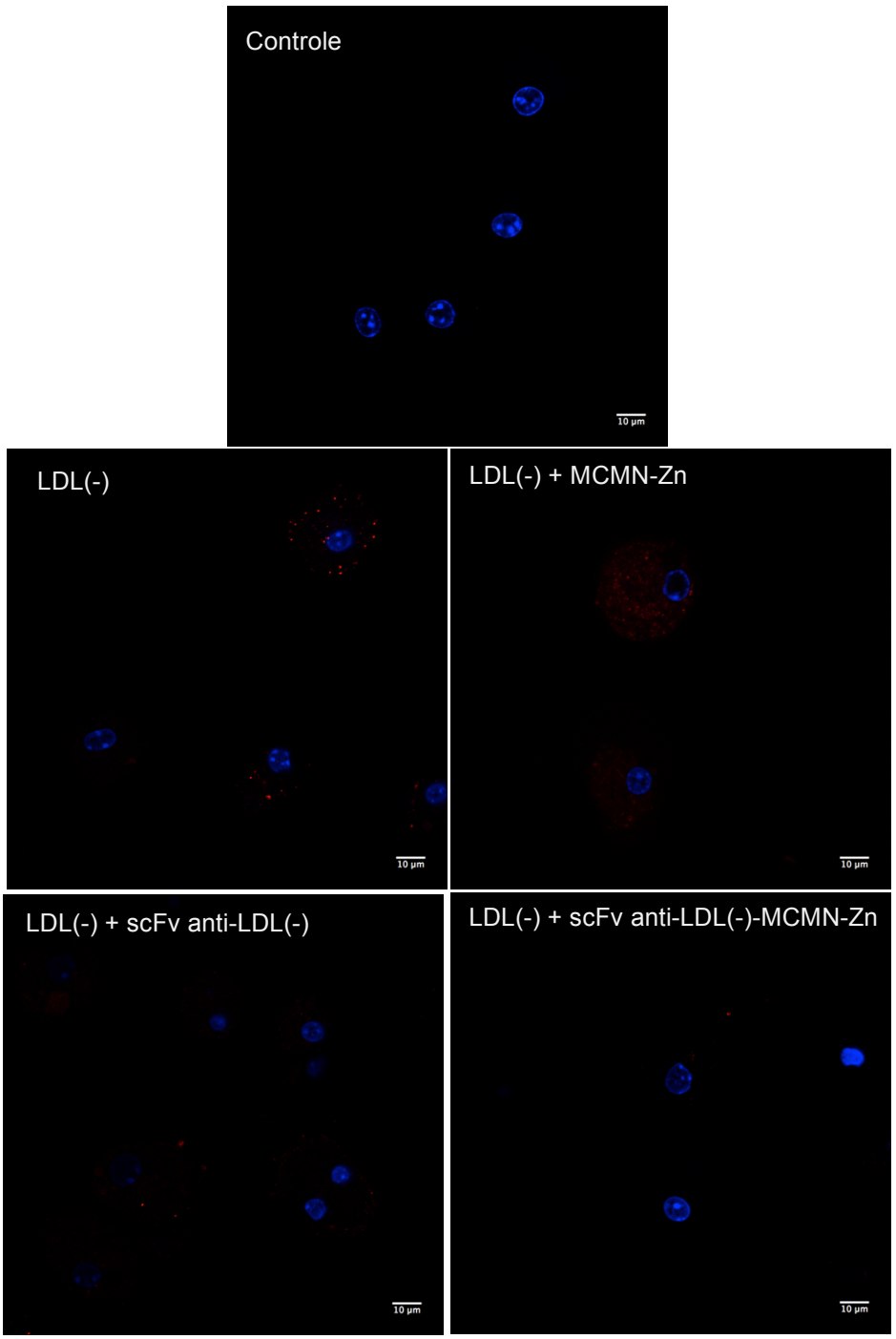


Figura 15: Avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a captação de LDL(-) em macrófagos murinos primários por microscopia confocal. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 3 horas com 37,5 µg/mL de LDL(-), 37,5 µg/mL de LDL(-) e 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) e 37,5 µg/mL de

LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. A LDL(-) foi marcada com o fluoróforo DiI(C_{18}) na proporção de 300 µg de DiI para cada 1 mg de LDL(-) durante 16 horas a 37 ºC. O fluoróforo DAPI foi utilizado para a coloração do núcleo dos macrófagos. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Foram executados 4 experimentos independentes, sendo as imagens provenientes de apenas um deles. Imagens obtidas com lente objetiva com aumento de 63x.

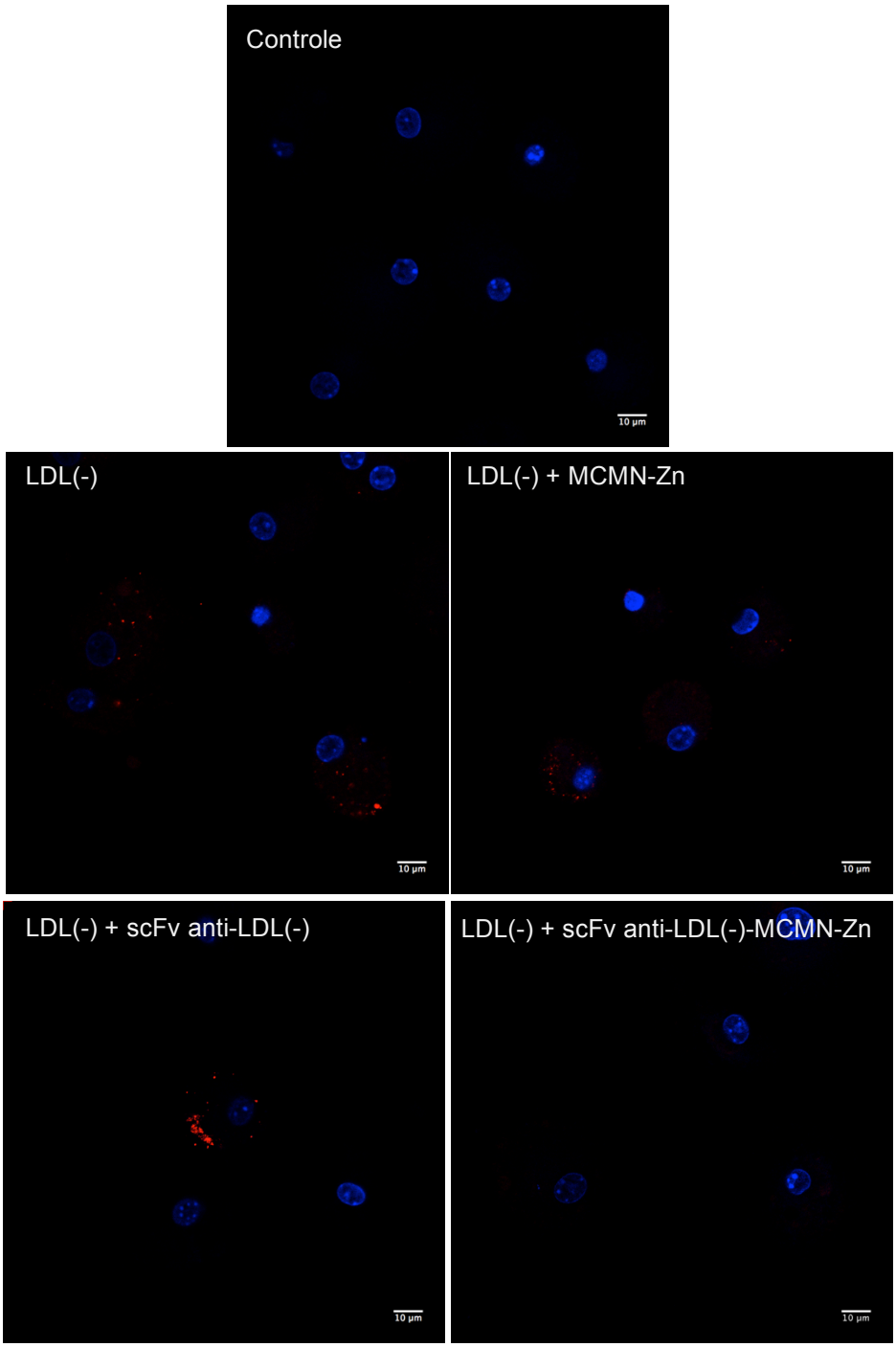


Figura 16: Avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a captação de LDL(-) em macrófagos humanos primários por microscopia confocal. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 3 horas com 37,5 µg/mL de LDL(-), 37,5 µg/mL de LDL(-) e 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) e 37,5 µg/mL de

LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. A LDL(-) foi marcada com o fluoróforo DiI(C_{18}) na proporção de 300 µg de DiI para cada 1 mg de LDL(-) durante 16 horas a 37 ºC. O fluoróforo DAPI foi utilizado para a coloração do núcleo dos macrófagos. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Foram executados 4 experimentos independentes**,** sendo as imagens provenientes de apenas um deles. Foi utilizada uma lente objetiva com aumento de 63x.

4.2.2 Avaliação da expressão gênica e proteica de citocinas pró e antiinflamatórias

Diante da importância de diversas citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias no processo aterogênico, foi analisada a expressão gênica de IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 e TNFα por macrófagos murinos e humanos primários. O tratamento com 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn não alterou a expressão gênica (Figura 17) de quaisquer das citocinas avaliadas em ambas as espécies de macrófagos ($p>0,05$). Esse resultado já era esperado, uma vez que as nanocápsulas sem o fragmento de anticorpo não devem reconhecer a lipoproteína e, assim, alterar o seu efeito. Já os tratamentos 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn diminuíram de forma significativa a expressão gênica de IL-1β tanto em macrófagos murinos (Figura 17A) quanto em macrófagos humanos primários (Figura 17B), em relação ao controle estimulado apenas com LDL(-). Nesses últimos, ambos os tratamento também reduziram a expressão de mRNA do MCP-1 (Figura 17C), em relação à LDL(-).

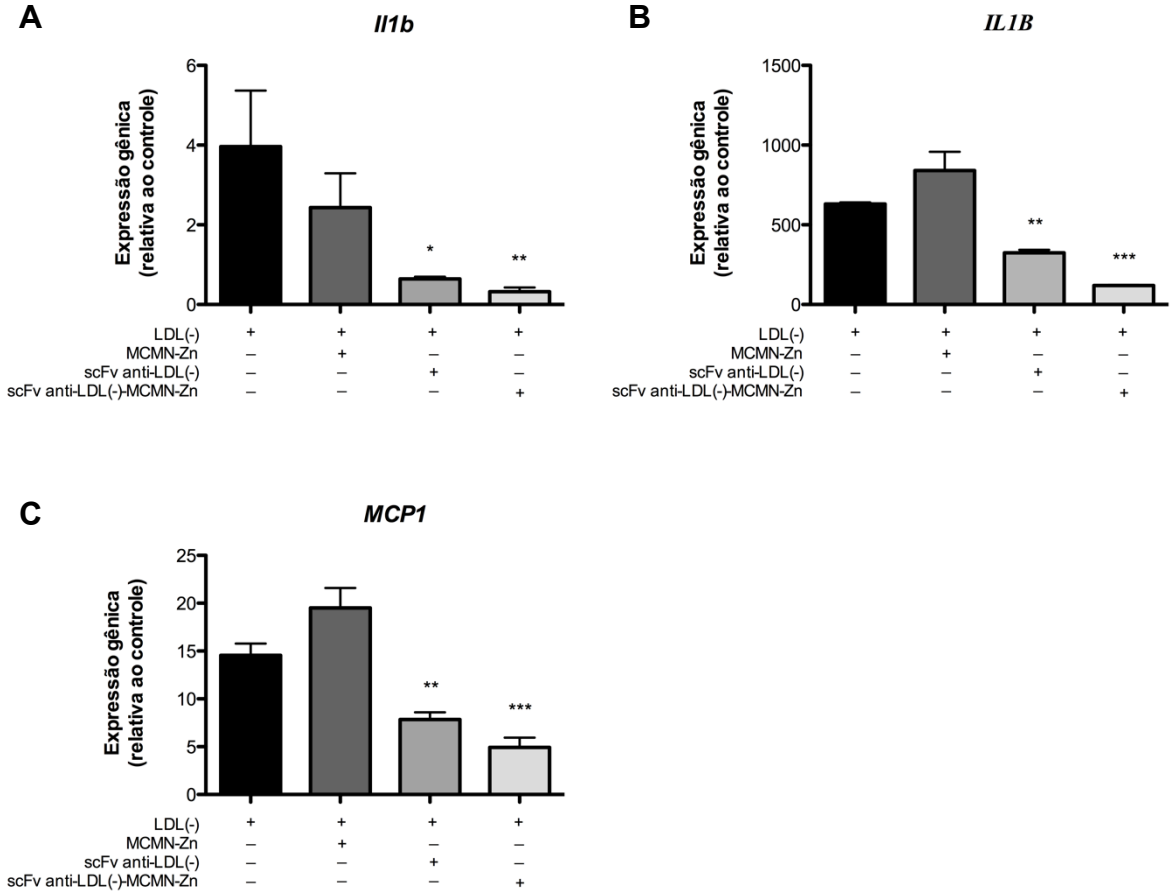


Figura 17: **Efeitos da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a expressão gênica de *Il1b* em macrófagos murinos e de *IL1B* e *MCP1* em macrófagos humanos primários**. Expressão gênica de *Il1b* (A) em macrófagos murinos primários e expressão gênica de *IL1B* (B) e de *MCP1* (C) em macrófagos humanos primários. 10^6 macrófagos por poço foram cultivados com 37,5 µg/mL de LDL(-), 37,5 µg/mL de LDL(-) e10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) ou 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por 24 horas. A análise dos dados resultantes das PCRs em tempo real foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$Ct). Representação gráfica de dados provenientes de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação à LDL(-).

Uma vez observada essa redução na expressão gênica de IL-1β por macrófagos tratados tanto com scFv anti-LDL(-) quanto com a nanoformulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, a expressão proteica dessa citocina foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (Figura 18). Em macrófagos murinos (Figura 18A), apenas o tratamento com a nanoformulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn (p<0,001) diminuiu de forma significativa a expressão de IL-1β em relação ao estímulo inflamatório da LDL(-). Ambos os tratamentos com scFv anti-LDL(-) (p<0,01) e scFv anti-LDL(-)-

MCMN-Zn (p<0,001) diminuíram significativamente a expressão de IL-1β em macrófagos humanos primários (Figura 18B).

Essas observações indicam que os potenciais efeitos ateroprotetores do scFv anti-LDL(-) sejam melhor visualizados quando este encontra-se conjugado às nanocápsulas, uma vez que essa ligação fornece uma maior estabilidade à estrutura do fragmento de anticorpo e facilita o reconhecimento da LDL(-) pela disposição do scFv nessas partículas.

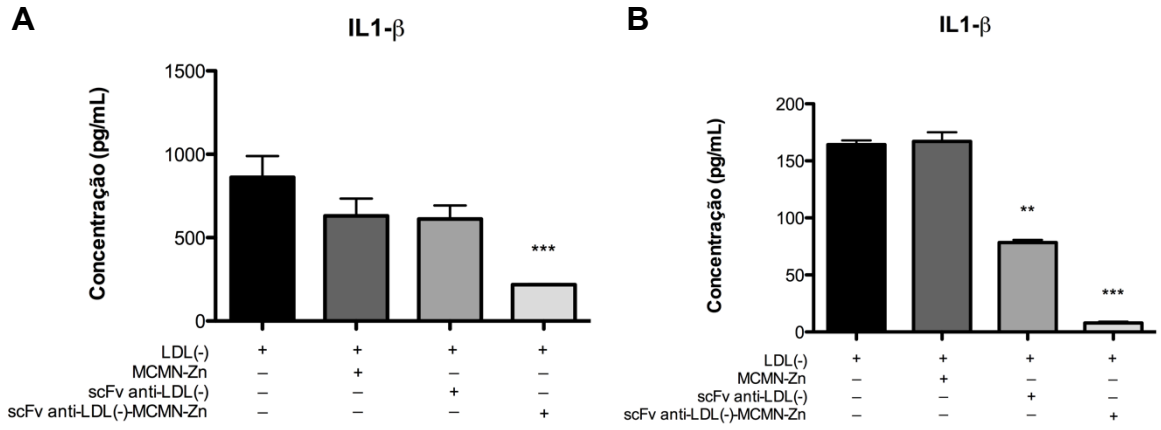


Figura 18: **Efeitos da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a expressão proteica de IL-1β em macrófagos murinos e humanos primários.** 10^6 macrófagos murinos (A) e humanos (B) primários por poço foram cultivados com 37,5 µg/mL de LDL(-) ou LDL nativa, 37,5 µg/mL de LDL(-) e10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn, 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-) ou 37,5 µg/mL de LDL(-) e 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por 48 horas. Representação gráfica de dados provenientes de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação à LDL(-).

4.2.3 Avaliação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários

Durante a execução dos ensaios de captação de LDL(-) por microscopia confocal, foi observada a internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos e humanos primários em teste realizado com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas estão marcadas com o fluoróforo Rodamina B. Foi, então realizada a avaliação da internalização de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos primários, após 3 horas de estímulo (Figura 19).

Macrófagos murinos primários (Figura 19A) internalizaram as nanocápsulas conjugadas ao scFv [formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn], na concentração de 6,25 µg/mL, de forma significativa em relação à internalização de nanocápsulas isoladas (MCMN-Zn) na concentração de 10^4 partículas/mL ($p<0,001$). Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação da internalização de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos humanos primários (Figura 19B). As células tratadas com scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na mesma concentração descrita anteriormente, demonstraram um aumento significativo na intensidade de fluorescência emitida em relação ao ao controle tratado apenas com nanocápsulas MCMN-Zn ($p<0,001$).

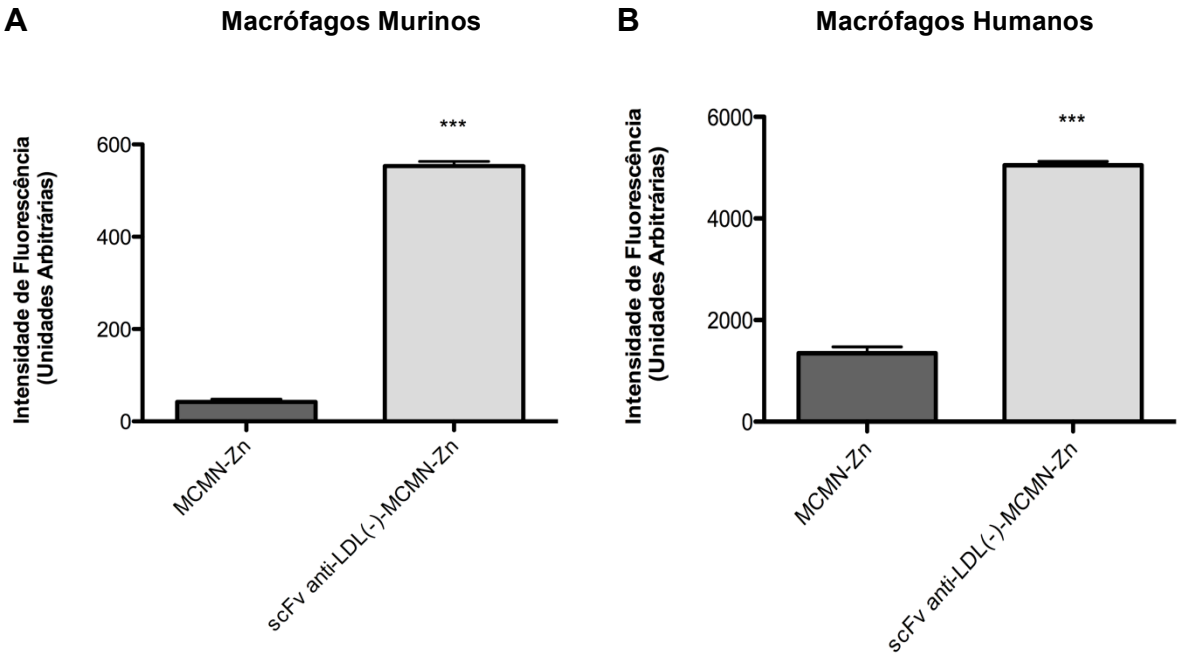


Figura 19: Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos e humanos primários por citometria de fluxo. A: macrófagos murinos primários; e B: macrófagos humanos primários. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 3 horas com 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, nas quais as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo (não apresentado nos gráficos). Representação gráfica de dados provenientes de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p<0,001$ em relação às nanocápsulas MCMN-Zn.

Os ensaios utilizando a técnica de microscopia confocal comprovaram a internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn observada por análise dos dados de citometria de fluxo. Ambos os macrófagos murinos (Figura 20) e humanos (Figura 21) primários captaram as partículas conjugadas ao fragmento de anticorpo. A marcação das nanocápsulas com Rodamina B possibilitou essa observação. As nanocápsulas MCMN-Zn marcadas com Rodamina B e não conjugadas ao scFv não foram internalizadas.

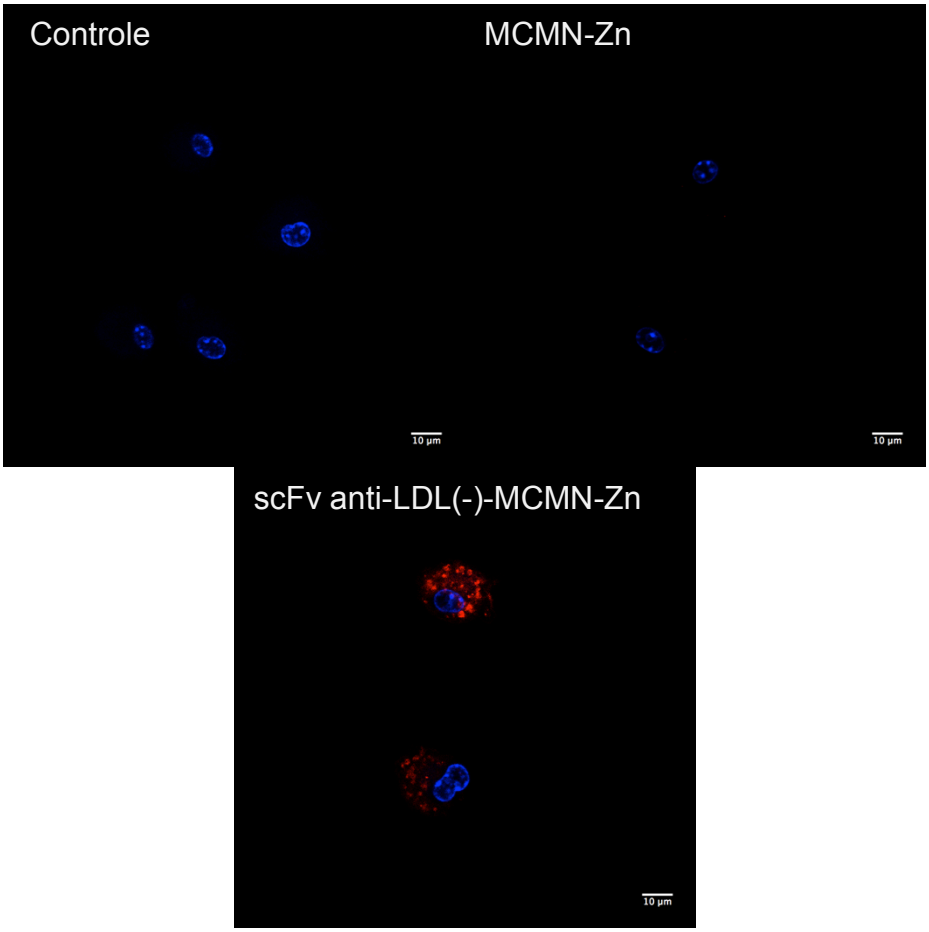


Figura 20: Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários por microscopia confocal. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 3 horas com 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn marcadas com Rodamina B, ou 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. O fluoróforo DAPI foi utilizado para a coloração do núcleo dos macrófagos. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Foram executados 4 experimentos independentes, sendo as imagens provenientes de apenas um deles. Imagens obtidas com lente objetiva com aumento de 63x.

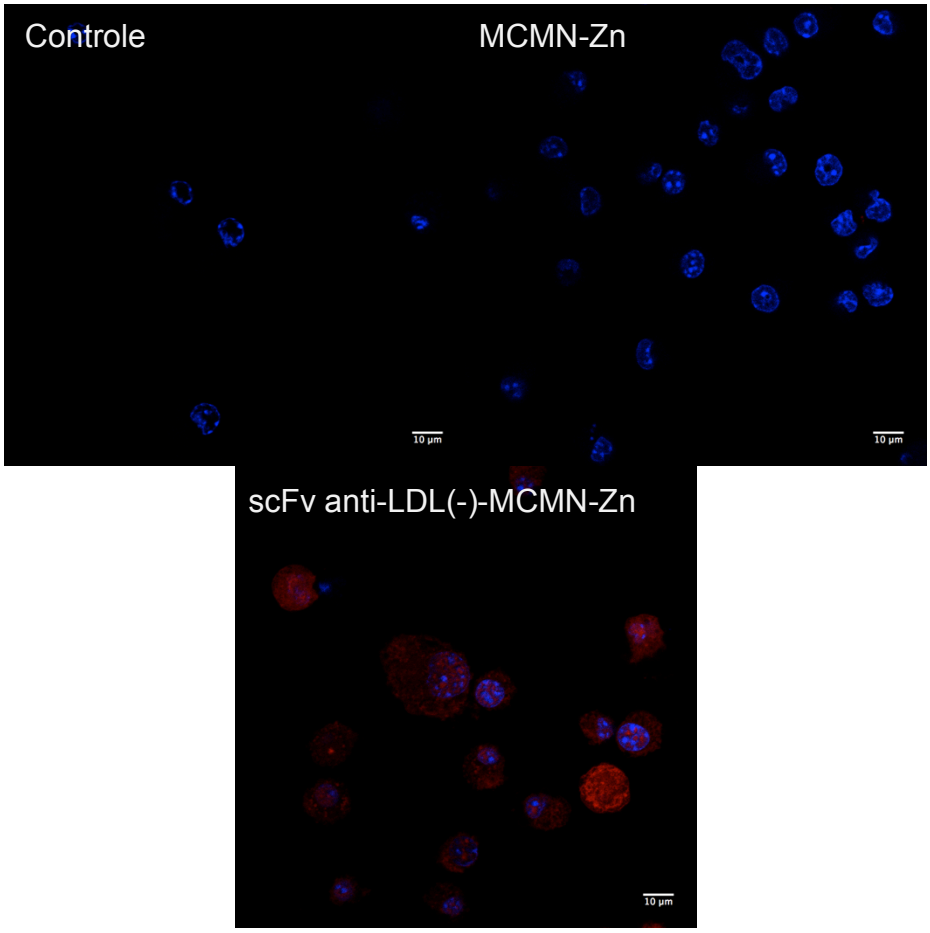


Figura 21: Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos humanos primários por microscopia confocal. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 3 horas com 10^4 partículas/mL de Nanocápsulas MCMN-Zn marcadas com Rodamina B, ou 6,25 µg/mL de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. O fluoróforo DAPI foi utilizado para a coloração do núcleo dos macrófagos. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Foram executados 4 experimentos independentes**,** sendo as imagens provenientes de apenas um deles. Imagens obtidas com lente objetiva com aumento de 63x.

O processo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn foi ainda confirmado por microscopia hiperespectral e de fluorescência em sistema CytoViva®. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência, que monitoraram a emissão vermelha do fluoróforo Rodamina B, mostraram claramente a presença das nanocápsulas no interior de macrófagos murinos (Figura 22A) e humanos (Figura 22B) primários.

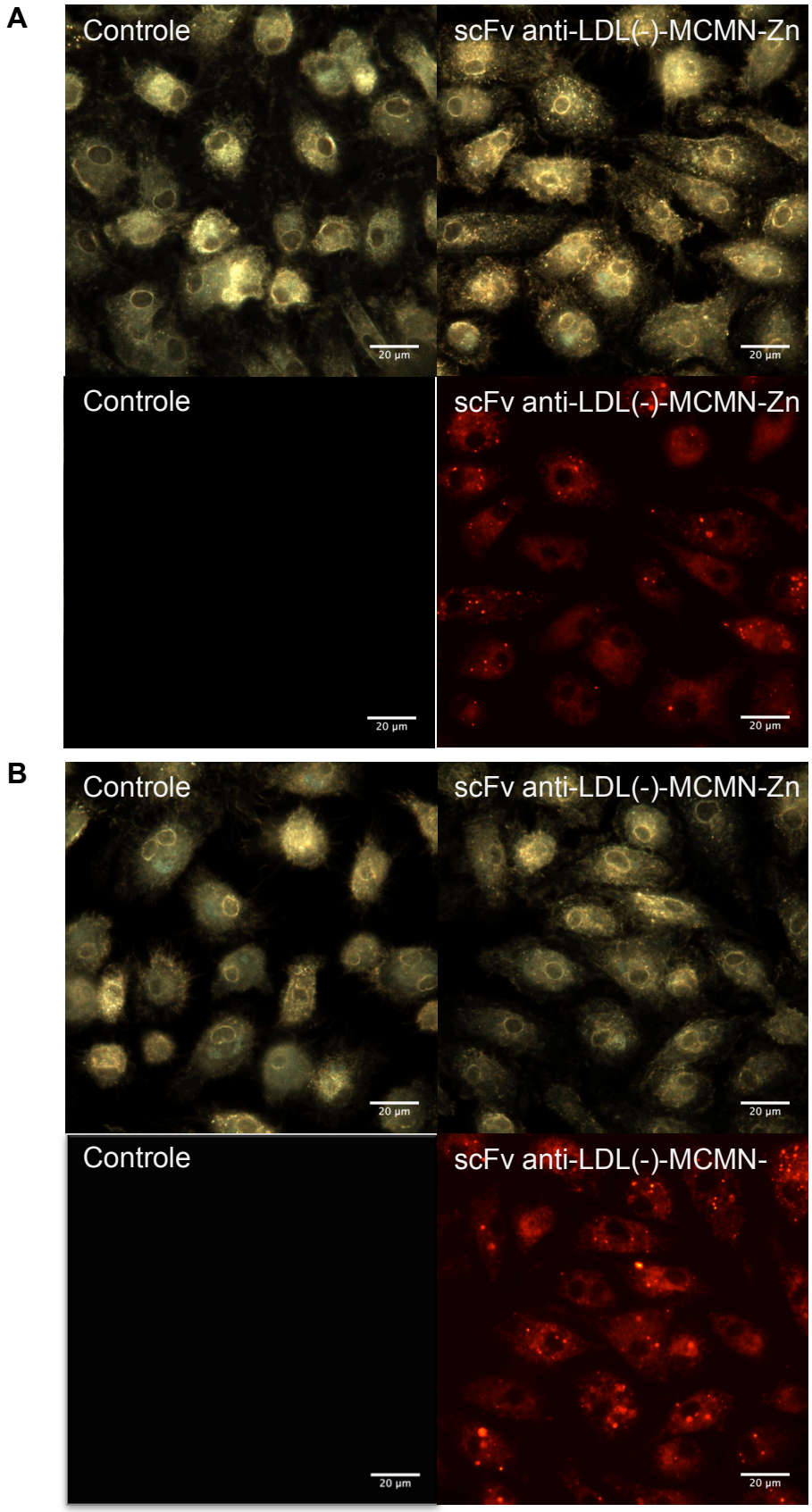


Figura 22: Avaliação da internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos primários por microscopia hiperespectral e de fluorescência em sistema

CytoViva®. Macrófagos murinos (A) e humanos (B) foram monitorados por fluorescência (emissão em vermelho) e microscopia de campo escuro de alta resolução e eficiência CytoViva® (CytoViva Inc, EUA). 4 x 10^5 células por poço foram tratados 3 horas com 6,25 ug/ml da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. As imagens obtidas com objetiva de 100x.

As imagens obtidas por microscopia de campo escuro em CytoViva® demonstraram a presença de um grande número de estruturas amareladas brilhantes no citoplasma dessas células, correspondendo às nanocápsulas da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. O espectro de absorção exibido por essas nanopartículas (Figura 23A) foi identificado e registrado no modo hiperespectral do microscópio, correspondendo a 600 nm e sendo identificado no interior das espécies de macrófago avaliadas (Figura 23B e Figura 23C).

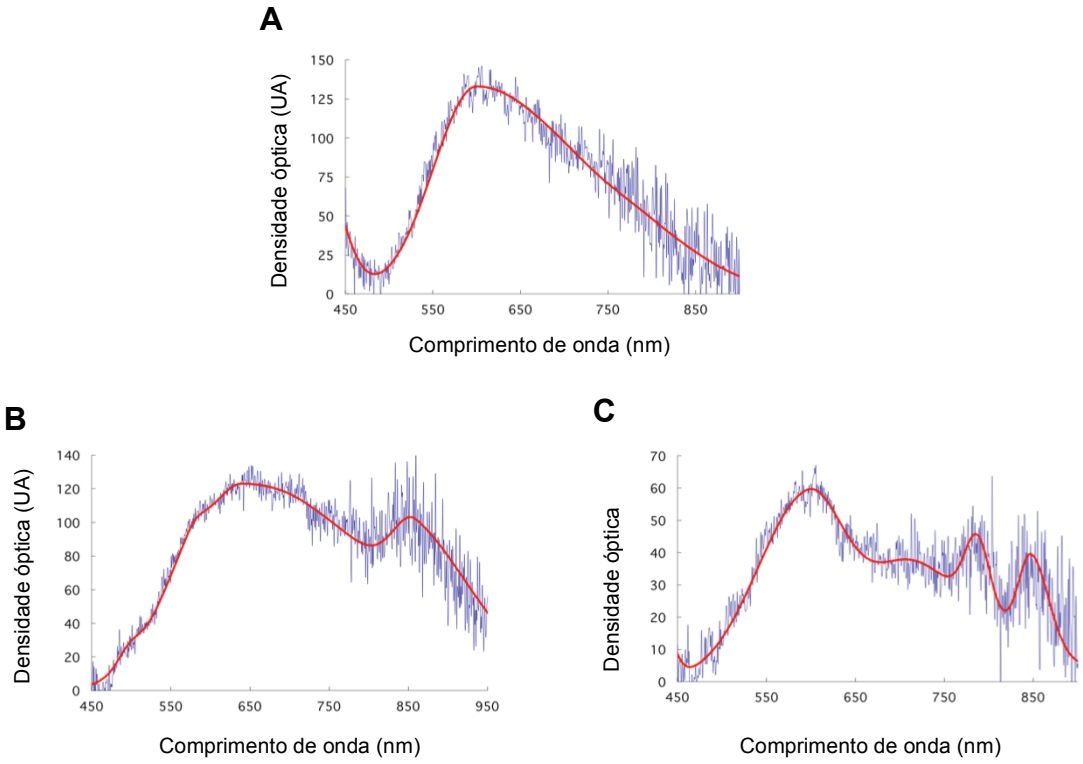


Figura 23: Espectro da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn no interior de macrófagos primários. Espectros da formulação scFv ant-LDL(-)-MCMN-Zn de forma isolada (A) e no interior de macrófagos murinos (B) e humanos (C). 4 x 10^5 células por poço foram tratados 3 horas com 6,25 ug/ml da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. Todos os espectros foram adquiridos em microscópio hiperespectral CytoViva® (CytoViva Inc, EUA).

A fim de entender o mecanismo envolvido na internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, foi proposto o tratamento das células com substâncias específicas que atuam inibindo o processo de endocitose. Os inibidores foram selecionados de modo a abranger diferentes vias endocíticas (seja por fagocitose, macropinocitose, endocitose dependente de clatrina etc) e, assim, o englobamento de partículas maiores ou menores.

Em macrófagos murinos primários (Figura 24A), foi observada uma maior diminuição no processo de internalização de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn em células tratadas com o inibidor de macropinocitose EIPA (50 μM) ($p<0,001$). Além disso, houve redução significativa da internalização da formulação por macrófagos tratados com: o inibidor de fagocitose (inibição da polimerização de filamentos de actina) Citocalasina D (40 μM) ($p<0,01$) e o inibidor do transporte intracelular de proteínas Brefeldina A (1 μM) ($p<0,05$) em relação ao controle tratado apenas com scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn e sem a ação de qualquer inibidor do processo de endocitose. Em macrófagos humanos primários (Figura 24B), observou-se a diminuição significativa da internalização de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn após 1 hora de tratamento com o inibidor de endocitose Cloroquina (50 μM) ($p<0,001$), o inibidor de fagocitose Citocalasina D ($p<0,01$), o inibidor de macropinocitose EIPA ($p<0,001$) e o inibidor de endocitose dependente de dinamina Dynasore (80 μM) ($p<0,01$) em relação ao controle de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.

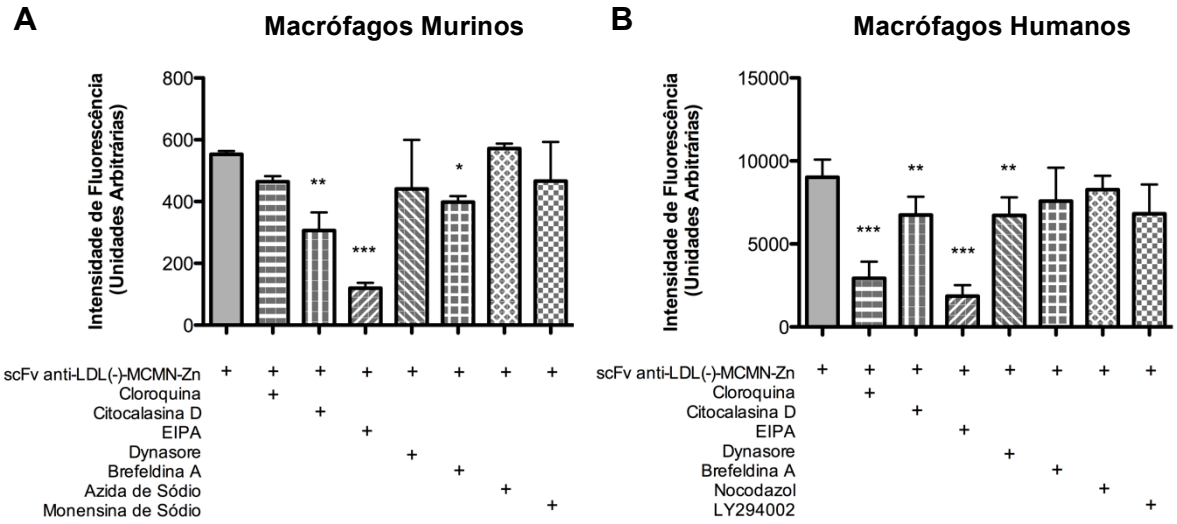


Figura 24: Investigação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos primários por citometria de fluxo. A: macrófagos murinos primários; e B: macrófagos humanos primários. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 1 hora com os

devidos inibidores e por 3 horas com 6,25 µg/mL da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. Foram utilizados um grupo controle sem qualquer estímulo e um grupo de nanocápsulas MCMN-Zn, mas não representados nessa figura. Representação gráfica de dados provenientes de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. *p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação à formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.

Os ensaios por microscopia confocal possibilitaram a confirmação visual dos resultados descritos acima, em macrófagos murinos (Figura 25) e humanos (Figura 26) primários.

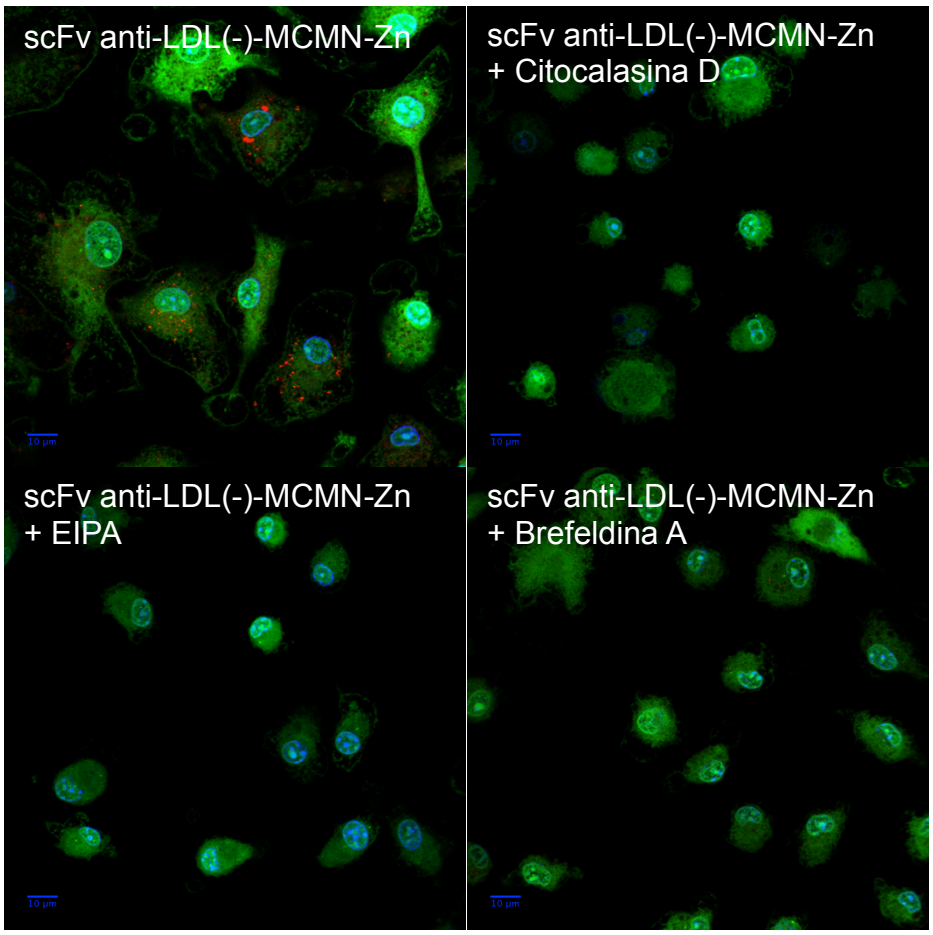


Figura 25: Investigação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos murinos primários por microscopia confocal. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 1 hora com os devidos inibidores e por 3 horas com 6,25 µg/mL da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. O fluoróforo DAPI foi utilizado para a coloração do núcleo dos macrófagos e o fluoróforo Cell Tracker Green, para a marcação do citoplasma das células. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Foram executados 4 experimentos independentes, sendo as imagens provenientes de apenas um deles. Imagens obtidas com lente objetiva com aumento de 63x.

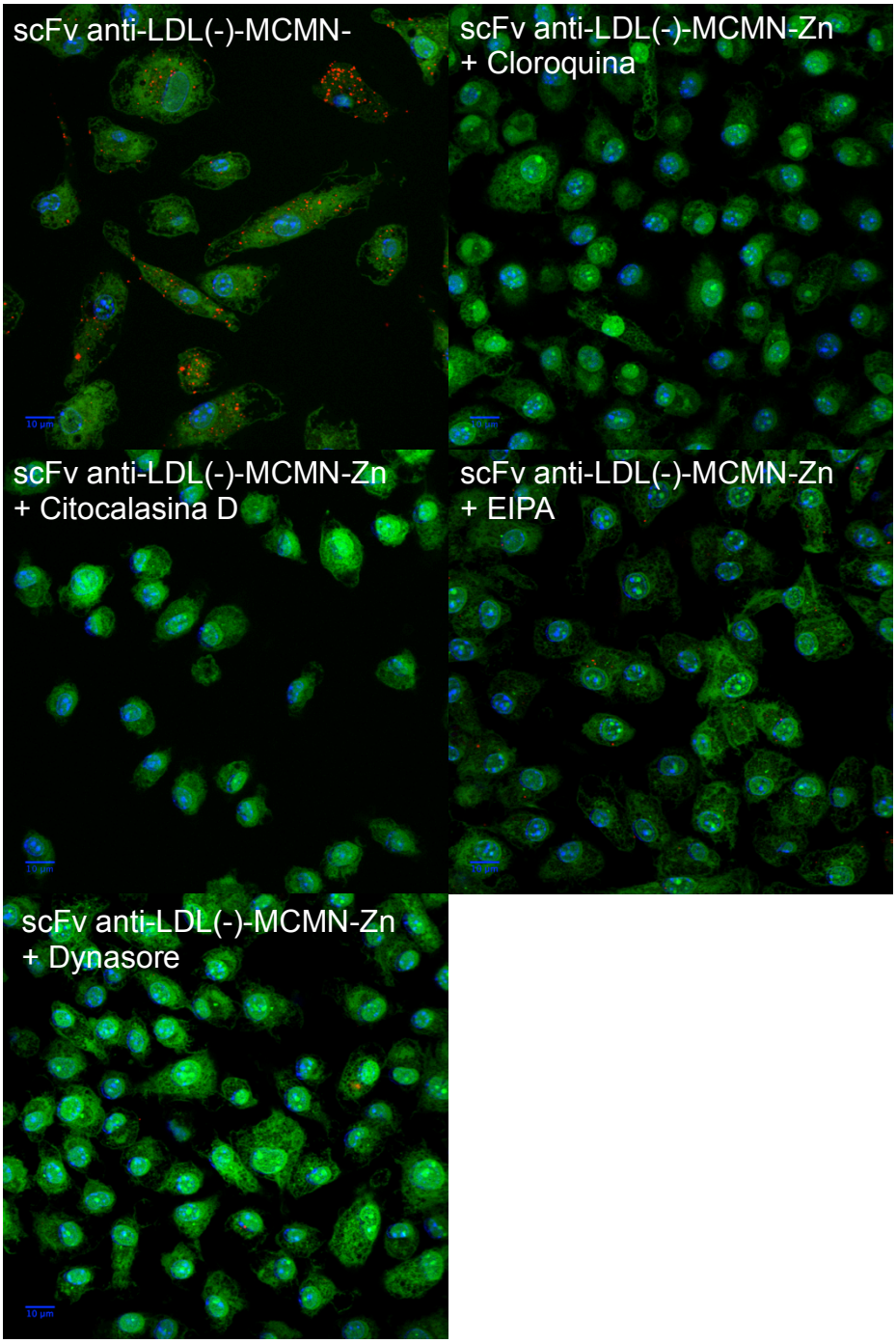


Figura 26: Investigação do mecanismo de internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por macrófagos humanos primários por microscopia confocal. 2,5 x 10^5 células por poço foram tratadas por 1 hora com os devidos inibidores e por 3 horas com 6,25 µg/mL da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na qual as nanocápsulas foram marcadas com Rodamina B. O fluoróforo DAPI foi utilizado para a coloração do núcleo dos macrófagos e o fluoróforo Cell Tracker Green, para a marcação do citoplasma das células. Foi utilizado um grupo controle sem qualquer estímulo. Foram executados 4 experimentos independentes, sendo as imagens provenientes de apenas um deles. Imagens obtidas com lente objetiva com aumento de 63x.

4.3 Estudos *in vivo*

4.3.1 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a interação leucócito-endotélio e sobre a permeabilidade vascular por técnica de microscopia intravital

Em relação à interação leucócito-endotélio, a qual é determinada pelo deslizamento de leucócitos circulantes e sua subsequente adesão ao endotélio vascular (UCHIYAMA et al., 2014), foi observado que os tratamentos com 5 x 10^5 partículas/Kg de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn não alteraram o número de leucócitos em rolamento ($p>0,05$) em relação ao grupo tratado com Salina em quaisquer dos tempos avaliados, tanto nos animais que receberam dieta padrão (Figura 27A), quanto nos animais que receberam dieta HC (Figura 27B). Os tratamentos também não promoveram qualquer alteração em relação à adesão de leucócitos nos tempos testados em ambas as dietas ofertadas (Figura 28). Cabe ainda ressaltar que a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn foi o único tratamento que não promoveu a adesão leucocitária nos tempos 0, 10 e 30 minutos após a administração do tratamento em camundongos que receberam dieta HC. Apenas no tempo de 60 minutos, foi observada a adesão de 2 leucócitos nas condições descritas (Figura 28B). Quanto à migração de leucócitos (dados não apresentados), nos animais alimentados com dieta padrão, foram visualizados apenas 2 leucócitos migrados ($p>0,05$) em 2 animais do grupo Salina, assim como do grupo Nanocápsulas MCMN-Zn, além da migração de 3 leucócitos em um animal tratado com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Também foram visualizados leucócitos migrados nos camundongos alimentados com dieta HC ($p>0,05$): 2 leucócitos em um animal do grupo Salina e 1 leucócito em um animal do grupo Nanocápsulas MCMN-Zn. A administração dos tratamentos pela via intravenosa não induziu hemólise, a formação de trombos ou de áreas hemorrágicas na microcirculação.

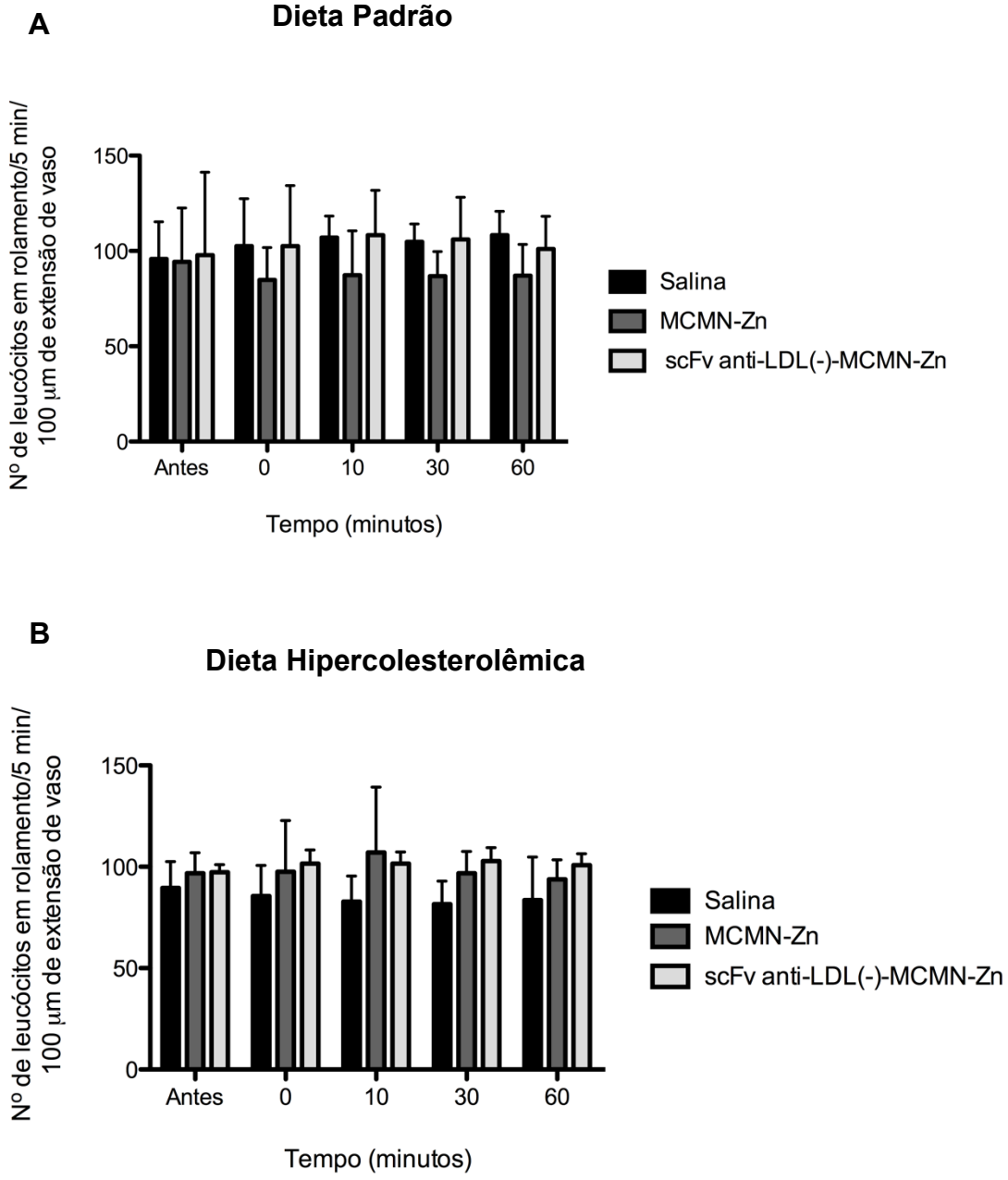


Figura 27: Avaliação da interação leucócito-endotélio em camundongos por microscopia intravital: leucócitos em rolamento. Camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos, com 12 semanas de idade foram divididos em 6 grupos (n=6) e alimentados com dieta padrão (A) do biotério ou com dieta hipercolesterolêmica (B) durante 8 semanas em protocolo de lesão inicial. Após decorrido o tempo de dieta, os animais receberam via intravenosa soluções contendo Salina 0,9%, 5 x 10^5 partículas/Kg de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Foram avaliados os parâmetros de número de leucócitos em comportamento de "rolling" ou rolamento, número de leucócitos aderidos, leucócitos migrados, formação de trombos e de áreas hemorrágicas, além da avaliação da velocidade do fluxo sanguíneo. Representação gráfica, na qual os dados estão apresentados como média ± DP (n = 4).

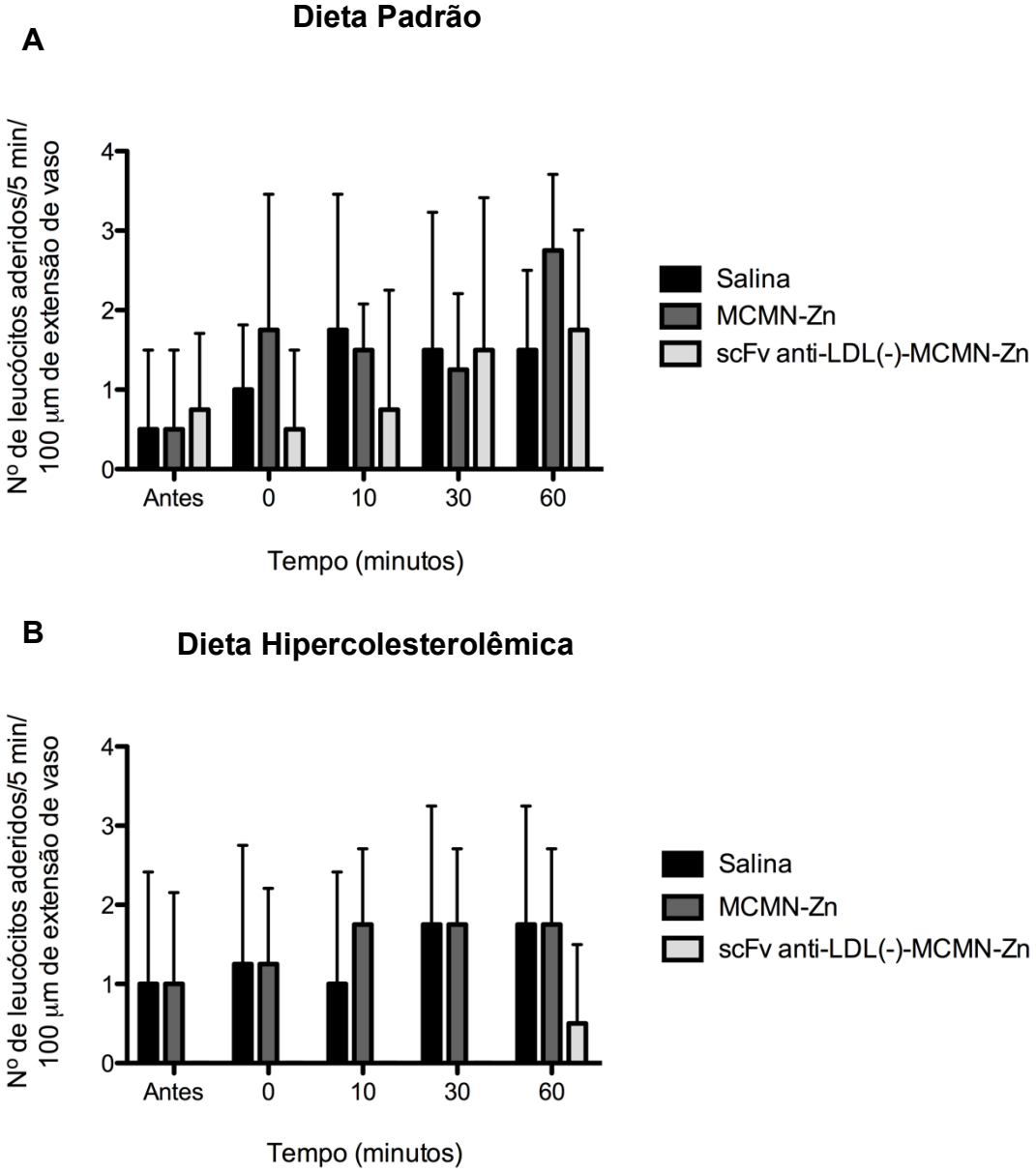


Figura 28: Avaliação da interação leucócito-endotélio em camundongos por microscopia intravital: leucócitos aderidos. Camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos, com 12 semanas de idade foram divididos em 6 grupos (n=6) e alimentados com dieta padrão (A) do biotério ou com dieta hipercolesterolêmica (B) durante 8 semanas em protocolo de lesão inicial. Após decorrido o tempo de dieta, os animais receberam via intravenosa soluções contendo Salina 0,9%, 5 x 10^5 partículas/Kg de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Foram avaliados os parâmetros de número de leucócitos em comportamento de "rolling" ou rolamento, número de leucócitos aderidos, leucócitos migrados, formação de trombos e de áreas hemorrágicas, além da avaliação da velocidade do fluxo sanguíneo. Representação gráfica, na qual os dados estão apresentados como média ± DP (n = 4).

Na avaliação do efeito da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a permeabilidade vascular (Figura 29) de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$, não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle tratado apenas com Salina, tanto no grupo que recebeu dieta padrão quando no grupo alimentado com dieta HC. As imagens em campo escuro (Figura 30), demonstraram que não houve qualquer extravasamento da albumina conjugada com FITC injetada nos animais de todos os grupos avaliados.

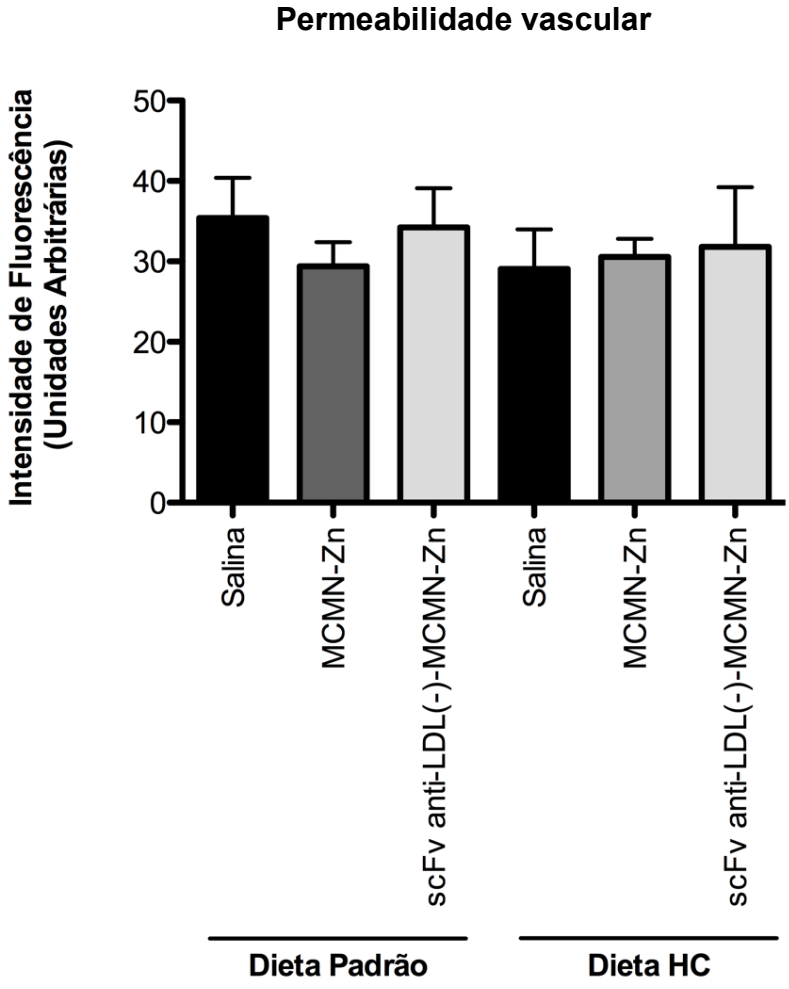


Figura 29: Avaliação da permeabilidade vascular por microscopia intravital: cálculo da mudança de intensidade óptica. Camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos, com 12 semanas de idade foram divididos em 6 grupos e alimentados com dieta padrão do biotério ou dieta hipercolesterolêmica durante 8 semanas em protocolo de lesão inicial. Após decorrido o tempo de dieta, os animais receberam via intravenosa soluções contendo Salina 0,9%, 5 x 10^5 partículas/Kg de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Representação gráfica, na qual os dados estão apresentados como média ± DP (n = 6). HC: hipercolesterolêmica.

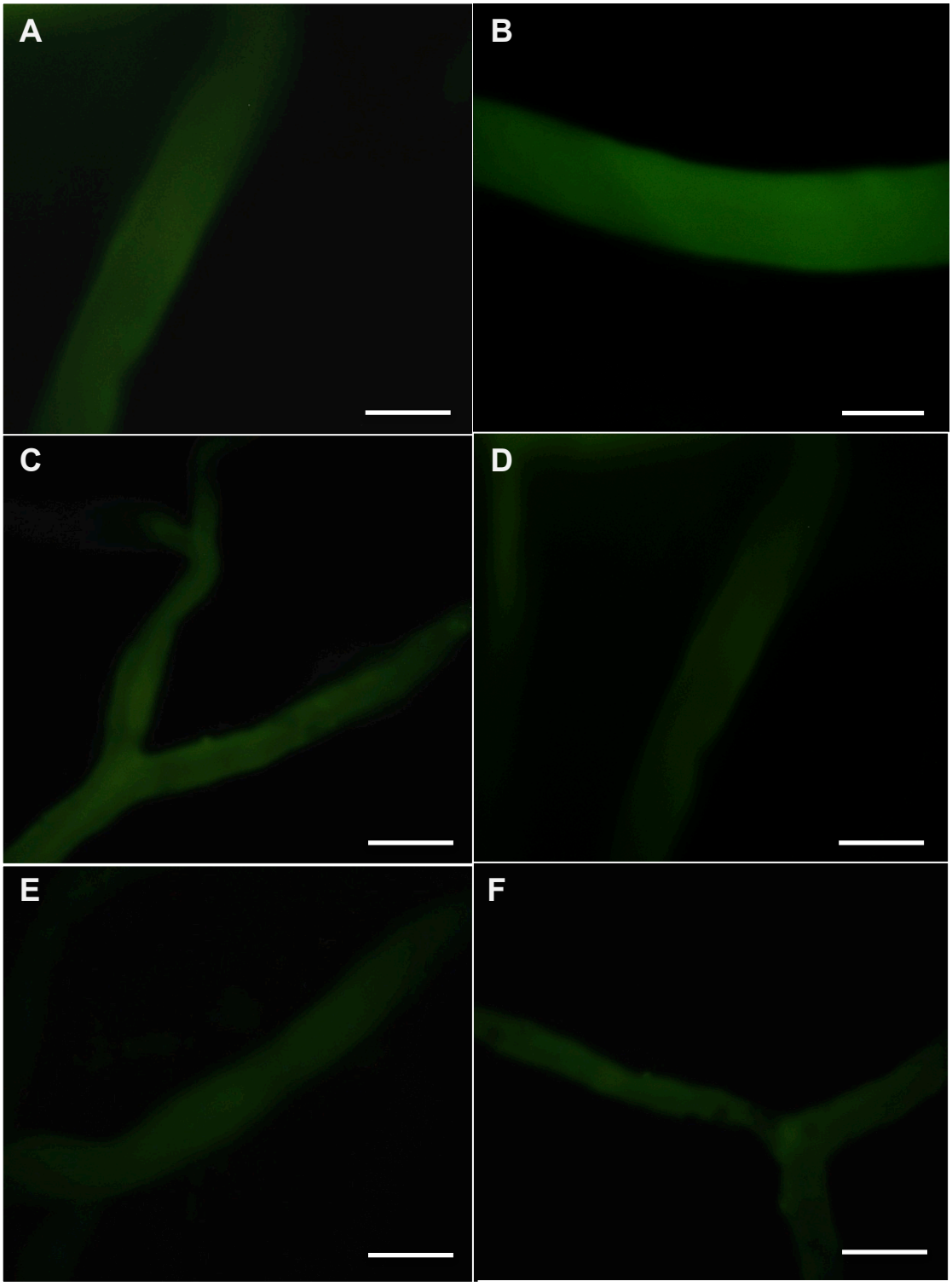


Figura 30: Avaliação da permeabilidade vascular por microscopia intravital: imagens em campo escuro. Camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos, com 12 semanas de idade foram divididos em 6 grupos (n=6) e alimentados com dieta padrão do biotério ou dieta hipercolesterolêmica durante 8 semanas em protocolo de lesão inicial. Após decorrido o tempo de dieta, os animais receberam via intravenosa soluções contendo Salina 0,9%, 5 x 10^5 partículas/Kg de Nanocápsulas MCMN-Zn ou 5 mg/Kg da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Imagens representativas de campo escuro, após administração de Albumina marcada com FITC, de um animal de cada grupo avaliado. Foi utilizada

uma objetiva de 40x de imersão em água. A: Grupo Salina com dieta padrão; B: Grupo MCMN-Zn com dieta padrão; C: Grupo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn com dieta padrão; D: Grupo Salina com dieta HC; E: Grupo MCMN-Zn com dieta HC; F: Grupo scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn com dieta HC. A barra branca corresponde a medida de 50 mm.

Os valores encontrados para o número absoluto de leucócitos e o número relativo de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos estavam dentro da faixa de normalidade para a espécie (PAIVA, 2013) e para a linhagem (FIGUEIREDO, 2006) utilizada, tendo sido semelhante em todos os grupos experimentais (Tabela 4). Como era esperado, diante dos resultados anteriores nos quais não houve promoção da adesão dos lecucócitos ou da migração dessas células, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de celularidade sanguínea dos grupos tratados e dos grupos controles.

Tabela 4: Celularidade sanguínea, após uma hora, de animais tratados com Salina, nanocápsulas MCMN-Zn e formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por via intravenosa, aos quais foi ofertada dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica.

	DIETA PADRÃO			**DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**		
	Salina	**MCMN-Zn**	**scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn**	**Salina**	**MCMN-Zn**	**scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn**
Leucócitos totais	4,05 ± 0,21	4,65 ± 0,46	4,4 ± 0,36	4,8 ± 0,62	4,5 ± 0,35	4,6 ± 0,54
Neutrófilos	30,7 ± 11	32,7 ± 6,45	30,75 ± 10,9	39,5± 1,65	35,5 ± 7,53	37,2 ± 3,3
Linfócitos	59 ± 7,7	58,5 ± 5,1	60 ± 7,1	56,25 ± 1,47	59,5 ± 5,93	57 ± 4,94
Monócitos	7,5 ± 2,69	7,75 ± 2,38	4 ± 1,58	4 ± 1,22	5,25 ± 1,47	5,5 ± 0,5
Eosinóflos	0,5 ± 0,5	1,25 ± 0,89	1,25 ± 0,43	1,25 ± 0,82	1,25 ± 0,43	1,25 ± 0,82

Leucócitos totais: $10^6/mm^3$; Neutrófilos: %; Linfócitos: %; Monócitos: %; Eosinófilos: %. Os dados estão representados como média ± DP (n = 6); p>0,05.

As amostras de urina dos animais tratados apresentaram resultados semelhantes (Tabela 5), para os parâmetros avaliados, às amostras dos animais controle, que receberam apenas Salina. Esses resultados foram evidenciados em ambos os grupos: dieta padrão e dieta HC. Não foi observada presença de sangue ou eritrócitos na urina dos animais, sugerindo que os tratamentos não ocasionaram hemólise intravascular. A ausência de traços de proteína na urina dos animais indica ainda que não houve qualquer dano glomerular significativo 1 horas após a administração de nanocápsulas MCMN-Zn ou da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Foram observados níveis elevados de glicose (acima de 1000 mg/dL) na urina de todos os animais avaliados, o que pode estar relacionado à utilização do anestésico Cloridrato de Cetamina neste ensaio e às doses de manutenção do mesmo que foram administradas durante os 60 minutos de avaliação.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos que receberam dieta padrão e os grupos aos quais foi ofertada a dieta hipercolesterolêmica em qualquer das avaliações realizadas nos ensaios de microscopia intravital.

Os dados aqui descritos e avaliados demonstraram que a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na dose de 5 mg/Kg, não causa qualquer alteração na interação leucócito-endotélio e na permeabilidade vascular de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$, não exercendo, portanto, toxicidade na microcirculação desses animais. Os resultados reforçam a utilização segura da nanoformulação, por administração intravenosa, em estudos de avaliação do seu efeito *in vivo* em camundongos a fim de comprovar seu uso como uma possível ferramenta terapêutica no contexto da aterosclerose.

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos da urina de animais tratados com Salina, nanocápsulas MCMN-Zn e formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn por via intravenosa, aos quais foi ofertada dieta padrão e dieta hipercolesterolêmica.

	DIETA PADRÃO			**DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**		
	Salina	**MCMN-Zn**	**scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn**	**Salina**	**MCMN-Zn**	**scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn**
Sangue	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinogênio	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Nitrito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cetonas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glicose	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
pH	5	5,5 ± 0,5	5,5 ± 0,5	5	5	5
Densidade	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030
Leucócitos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Sangue (eritrócitos/µL), Proteínas (mg/dL), Cetona (mg/dL), Glicose (mg/dL), Leucócitos (leucócitos/µL). Os dados estão representados como média ± DP (n = 6); p>0,05.

4.3.2 Avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn sobre a área da lesão aterosclerótica

4.3.2.1 Tomografia por Emissão de Pósitrons associada à Tomografia Computadorizada

Para avaliação do efeito do tratamento de camundongos C57BL/6 *Ldlr*$^{-/-}$ com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, o peso corpóreo dos animais (Tabela 6) e o consumo de ração (Tabela 7) foram acompanhados semanalmente durante todo o experimento. Apenas os animais do grupo Controle com dieta padrão (CC) apresentaram ganho de peso ao longo das 9 semanas de protocolo. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação a esse parâmetro ($p>0,05$). Quanto ao consumo de ração, o grupo CC demonstrou um maior consumo em relação a todos os outros grupos. Essa observação pode ser justificada diante do fato de que o grupo CC foi o único a receber a dieta padrão do biotério, à qual os animais estavam previamente adaptados. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto ao consumo de ração entre os grupos alimentados com a dieta hipercolesterolêmica ($p>0,05$).

Tabela 6: Controle de peso médio dos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial ao início e ao fim das 9 semanas, divididos por grupo de tratamento.

Grupo	Peso médio inicial	Peso médio final
CC	23,24 ± 3,19	27,30 ± 3,16
CHC	26,44 ± 1,29	26,40 ± 1,51
PBS	27,31 ± 1,68	25,14 ± 2,31
MCMN-Zn	26,75 ± 1,40	25,67 ± 1,44
scFv anti-LDL(-)	27,23 ± 2,02	23,36 ± 1,64
scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn	25,97 ± 1,61	25,37 ± 1,10

CC: Controle com dieta padrão; CHC: Controle com dieta hipercolesterolêmica. Os dados estão representados como média ± DP (n = 10); $p>0,05$.

Tabela 7: Controle do consumo médio semanal de ração pelos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial durante 9 semanas, divididos por grupos de tratamento.

Grupo	Consumo médio semanal de ração (por animal)
CC	22,98 ± 0,20
CHC	21,39 ± 2,43 *
PBS	21,15 ± 2,35 **
MCMN-Zn	20,23 ± 1,04 **
scFv anti-LDL(-)	18,33 ± 0,40 **
scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn	19,47 ± 0,96 **

CC: Controle com dieta padrão; CHC: Controle com dieta hipercolesterolêmica. Os dados estão representados como média ± DP (n = 10); *p<0,05 em relação ao Controle com dieta padrão (CC); **p<0,01 em relação ao Controle com dieta padrão (CC).

Uma análise preliminar das imagens referentes aos controles CC e CHC (Figura 31 e Figura 32) demonstrou valores de SUV compatíveis com o esperado para o modelo utilizado. O SUV é definido como a medida da atividade do radiotraçador em uma região topográfica da imagem corporal ou o volume de interesse normalizado pelo peso do animal e pela atividade do isótopo administrada a ele, caracterizando a concentração relativa do radiotraçador na lesão de interesse. Nesse contexto, o SUV relativo à captação do ^{18}F-FDG, calculado a partir de imagens de PET, na região do coração e da aorta de um camundongo do grupo Controle com dieta padrão foi de 8,3 %, enquanto o SUV da mesma região de um camundongo do grupo Controle com dieta HC foi de 30,63%, demonstrando que a técnica de PET/CT é suficientemente sensível para avaliação da área da lesão aterosclerótica no modelo de desenvolvimento de lesão inicial selecionado.

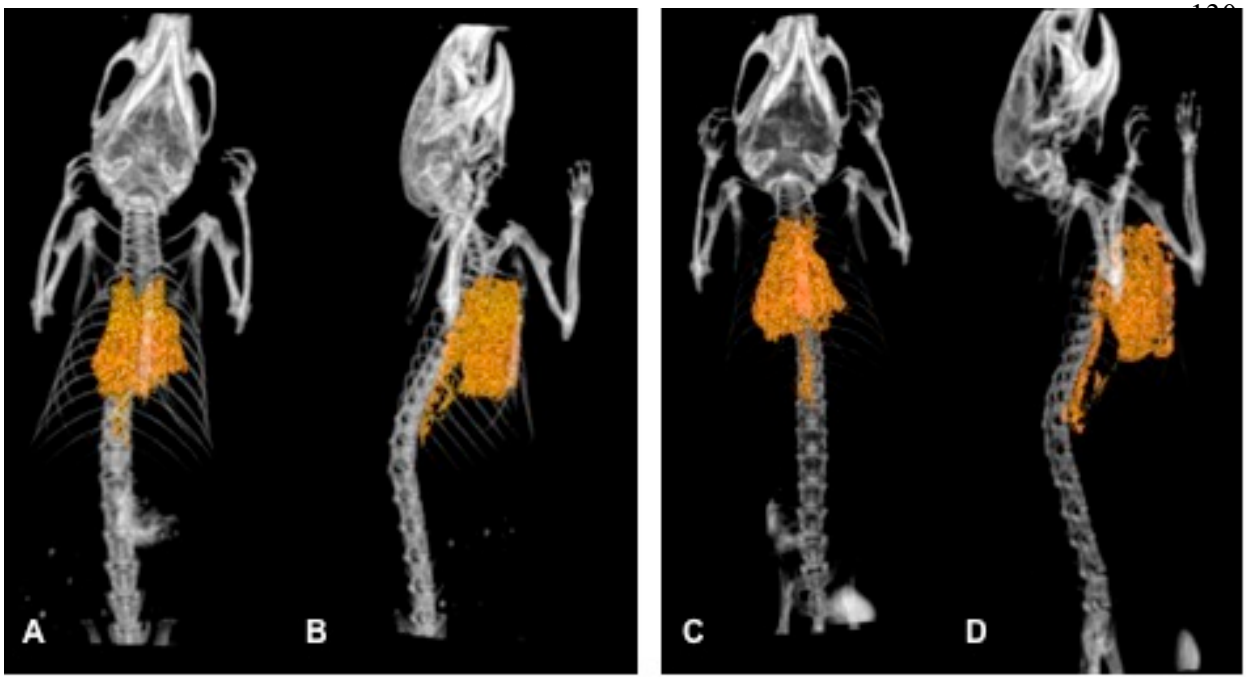


Figura 31: Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: reconstrução em 3D dos grupos CC e CHC. (A,B) Reconstrução em 3D das Imagens fusionadas PET/CT de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos do grupo Controle com dieta padrão (CC), com 12 semanas de idade, injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. SUV = 8,3% (região do coração e da aorta). Em A, visão coronal e em B, visão sagital. (C,D) Reconstrução em 3D das Imagens fusionadas PET/CT de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos do grupo Controle com dieta HC (CHC), com 12 semanas de idade, injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. SUV = 30,63% (região do coração e da aorta). Em C, visão coronal e em D, visão sagital.

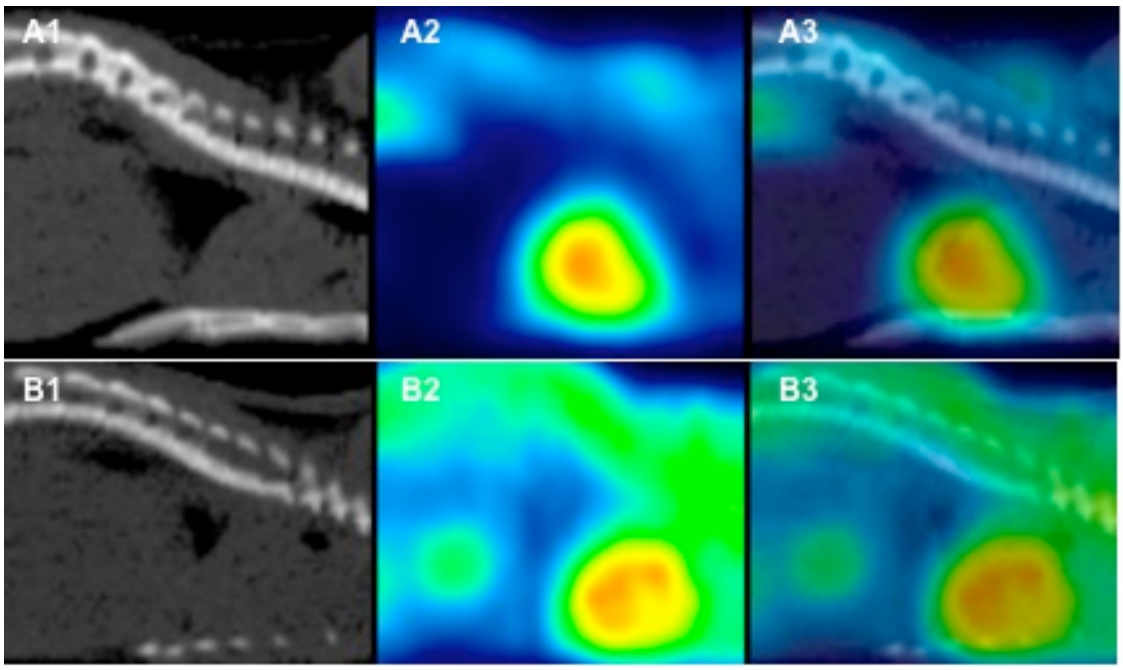


Figura 32: Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão do coração e da aorta dos grupos CC e CHC. (A) Imagens (visão sagital) do coração e da aorta de camundongos

C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos do grupo Controle com dieta padrão (CC), com 12 semanas de idade, injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. SUV = 8,3% (região do coração e da aorta). A1: Imagem obtida por CT; A2: Imagem obtida por PET; A3: Fusão de imagens PET + CT. (B) Imagens (visão sagital) do coração e da aorta de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos do grupo Controle com dieta HC (CHC), com 12 semanas de idade, injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. SUV = 30,63% (região do coração e da aorta). B1: Imagem obtida por CT; B2: Imagem obtida por PET; B3: Fusão de imagens PET + CT.

A partir da validação do modelo selecionado, todos os grupos tratados foram avaliados pela técnica de PET/CT a partir da medida da captação do ^{18}F-FDG em contador gama. Os dados brutos obtidos (Figura 33) indicaram que, aparentemente, o acúmulo de ^{18}F-FDG no grupo CC é maior no coração e no cérebro, enquanto em todos os outros grupos esse acúmulo é mais destacado no coração e na aorta, sendo compatível com a condição inflamatória à qual esses animais estão expostos.

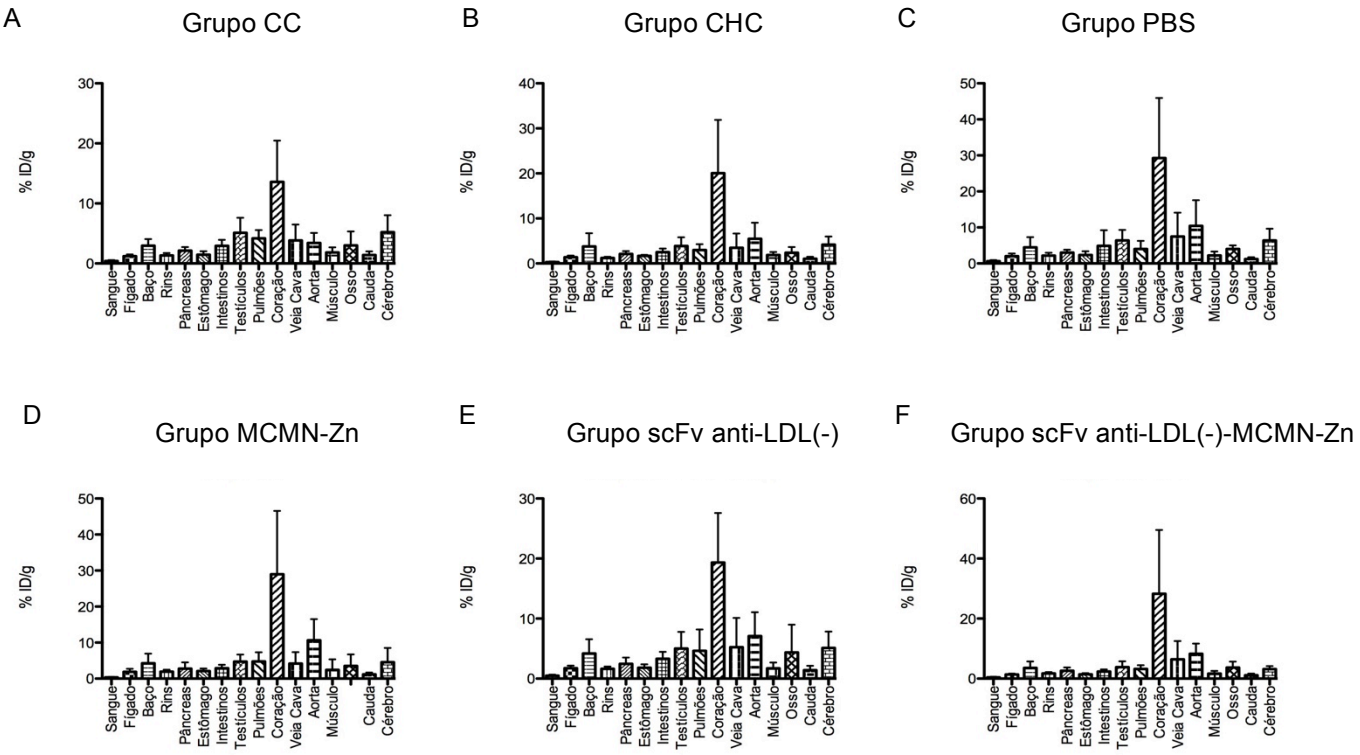


Figura 33: Distribuição do ^{18}F-FDG em modelo de desenvolvimento de lesão aterosclerótica inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$. Representação gráfica da distribuição do ^{18}F-FDG em sangue, fígado, baço, rins, pâncreas, estômago, intestinos, testículos, pulmões, coração, veia cava, aorta, músculo, osso, cauda e cérebro. A: Grupo Controle com dieta padrão (CC); B: Grupo Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC); C: Grupo Veículo (PBS); D: Grupo Nanocápsulas MCMN-Zn;

E: Grupo scFv anti-LDL(-); F: Grupo formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Os dados estão representados como média ± DP (n = 10).

A análise da captação do ^{18}F-FDG no coração e na aorta dos animais foi normalizada em relação à dose do radioisótopo presente no sangue, de modo a excluir o ^{18}F-FDG presente na circulação e que ainda não atingiu seus alvos. Os dados obtidos na relação Coração/Sangue não demonstraram qualquer diferença significativa entre todos os grupos avaliados, apresentando variações relevantes dessas medidas dentro de um mesmo grupo (Figura 34A). A avaliação da captação do ^{18}F-FDG na aorta em relação ao sangue (Figura 34B), por sua vez, demonstrou um aumento significativo desse parâmetro no grupo Controle alimentado com dieta HC ($p<0,05$) em relação do grupo Controle que ingeriu dieta padrão, um aumento significativo da captação do radiotraçador nos animais tratados apenas com o veículo PBS ($p<0,01$) em relação ao mesmo controle, e ainda uma redução significativa desse mesmo parâmetro nos animais tratados com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn ($p<0,01$) em relação ao grupo PBS.

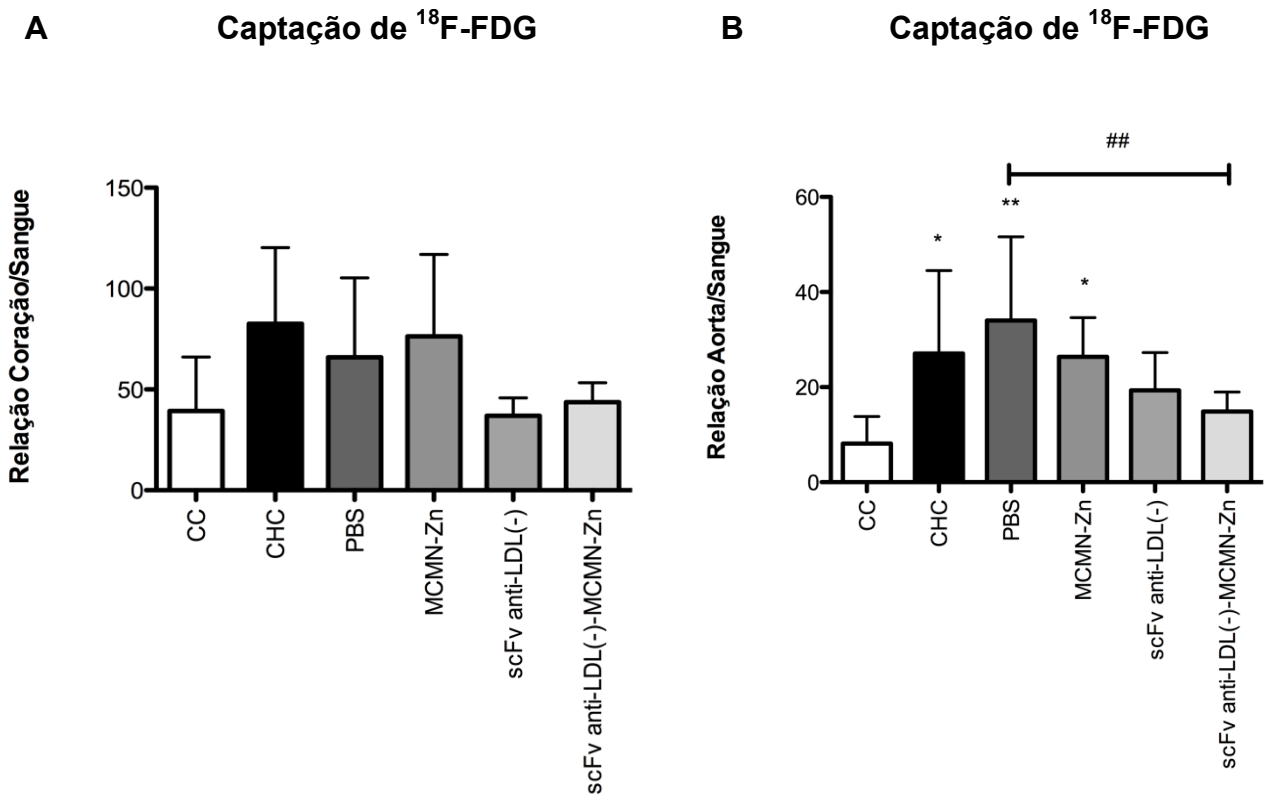


Figura 34: Captação do ^{18}F-FDG no coração e na aorta em relação ao sangue em modelo de desenvolvimento de lesão aterosclerótica inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$. Relação

coração/sangue (A) e aorta/sangue (B) da captação do ^{18}F-FDG em camundongos. Representação gráfica dos grupos Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-) e formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Os dados estão representados como média ± DP (n = 10); *p<0,01 e **p<0,001 em relação ao controle alimentado com dieta padrão (CC); ##p<0,01 em relação ao grupo PBS.

De forma a melhor visualizar o efeito dos tratamentos utilizados, realizou-se o cálculo das medidas de SUV (%ID/cm^3) na região do coração e da aorta a partir das imagens obtidas com PET, dando ênfase ao arco aórtico, região previamente descrita na Figura 10, (local preferencial de desenvolvimento da lesão aterosclerótica) e não ao órgão ou à artéria como um todo. Essa nova análise (Figura 35) demonstrou a diminuição da captação do ^{18}F-FDG no arco aórtico de animais tratados tanto com o scFv anti-LDL(-) ($p<0,01$) quanto com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn ($p<0,001$) em relação ao grupo PBS, tendo essa última reduzido a captação com uma magnitude de aproximadamente 50%. Foi possível observar ainda que o tratamento com as nanocápsulas MCMN-Zn não demonstra diferenças ($p>0,05$) na captação do ^{18}F-FDG no coração, na aorta ou no arco aórtico, em relação ao grupo tratado apenas com PBS, comprovando que o efeito benéfico das nanopartículas só é observado quando o scFv anti-LDL(-) está conjugado às mesmas.

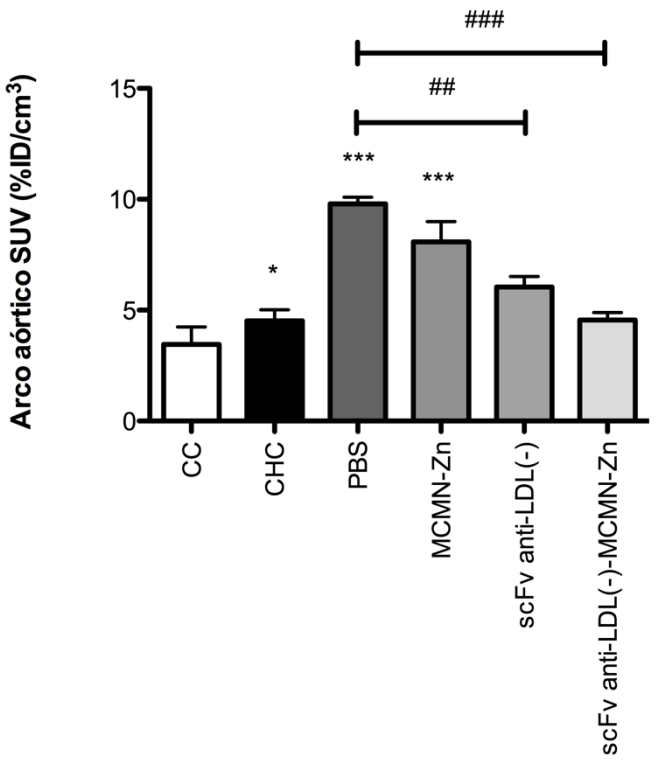


Figura 35: Captação do ^{18}F-FDG no arco aórtico de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ em modelo de lesão aterosclerótica inicial. O arco aórtico dos animais foi selecionado, seus volumes foram calculados e relacionados à captação do ^{18}F-FDG neste local. O SUV no arco aórtico foi calculado em porcentagem da dose injetada por centímetro cúbico (cm^3). Representação gráfica dos grupos Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-) e formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Os dados estão representados como média ± DP (n = 10); *p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle alimentado com dieta padrão (CC); ##p<0,05 e ###p<0,001 em relação ao grupo PBS.

Os dados apresentados acima podem ser visualizados, de forma representativa, nas imagens obtidas por PET/CT (Figura 36, Figura 37 e Figura 38). Para um melhor entendimento das imagens, é importante salientar que as diferentes colorações observadas indicam a intensidade de captação do radiotraçador. Em ordem decrescente de intensidade de captação, estão: vermelho, laranja, amarelo, verde e azul. Vale ressaltar que as imagens provenientes de diferentes orientações anatômicas podem apresentar intensidades de captação diferentes.

Além da maior captação do ^{18}F-FDG na região do coração e da aorta dos animais do grupo Controle alimentados com dieta HC, correspondente à coloração vermelha mais intensa nesta região (Figura 36), pode ser observada nas imagens obtidas por PET/CT dos animais que receberam apenas o veículo (PBS) uma maior captação do radiotraçador não só no coração como também em toda a extensão da aorta (torácica e abdominal), em relação aos grupos tratados com scFv anti-LDL(-) e com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, que pode ser visualizada em diferentes visões do corpo do animal (Figura 36 – visão sagital; Figura 37 – visão coronal; e Figura 38 – visão axial). A partir das imagens, é possível observar um perfil de captação do ^{18}F-FDG semelhante entre os animais tratados com as nanocápsulas MCMN-Zn e com o veículo PBS.

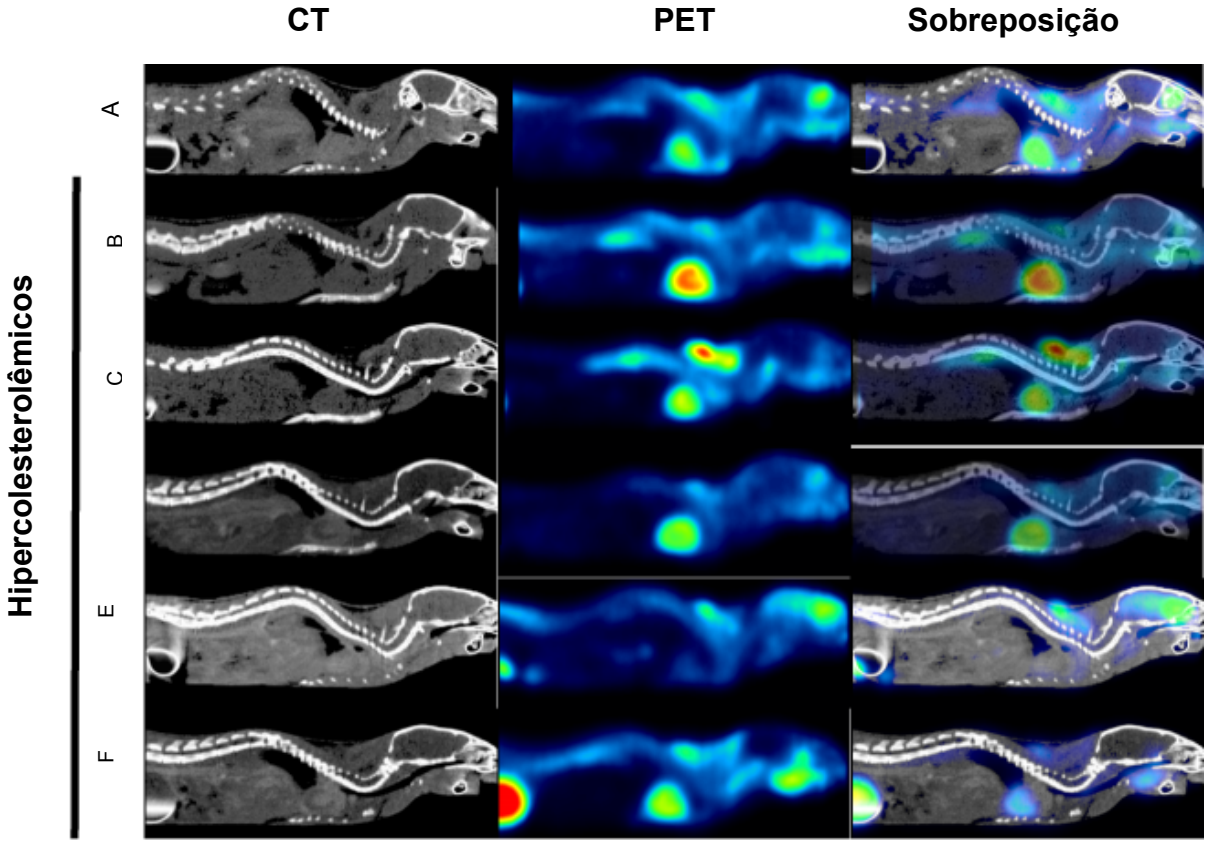


Figura 36: Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão sagital completa. Imagens (visão sagital) dos camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos dos grupos: A: Controle com dieta padrão (CC); B: Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC); C: Veículo (PBS); D: Nanocápsulas MCMN-Zn; E: scFv anti-LDL(-); e F: formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn com 12 semanas de idade, injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. Imagens obtidas por CT, por PET e fusão de imagens PET + CT.

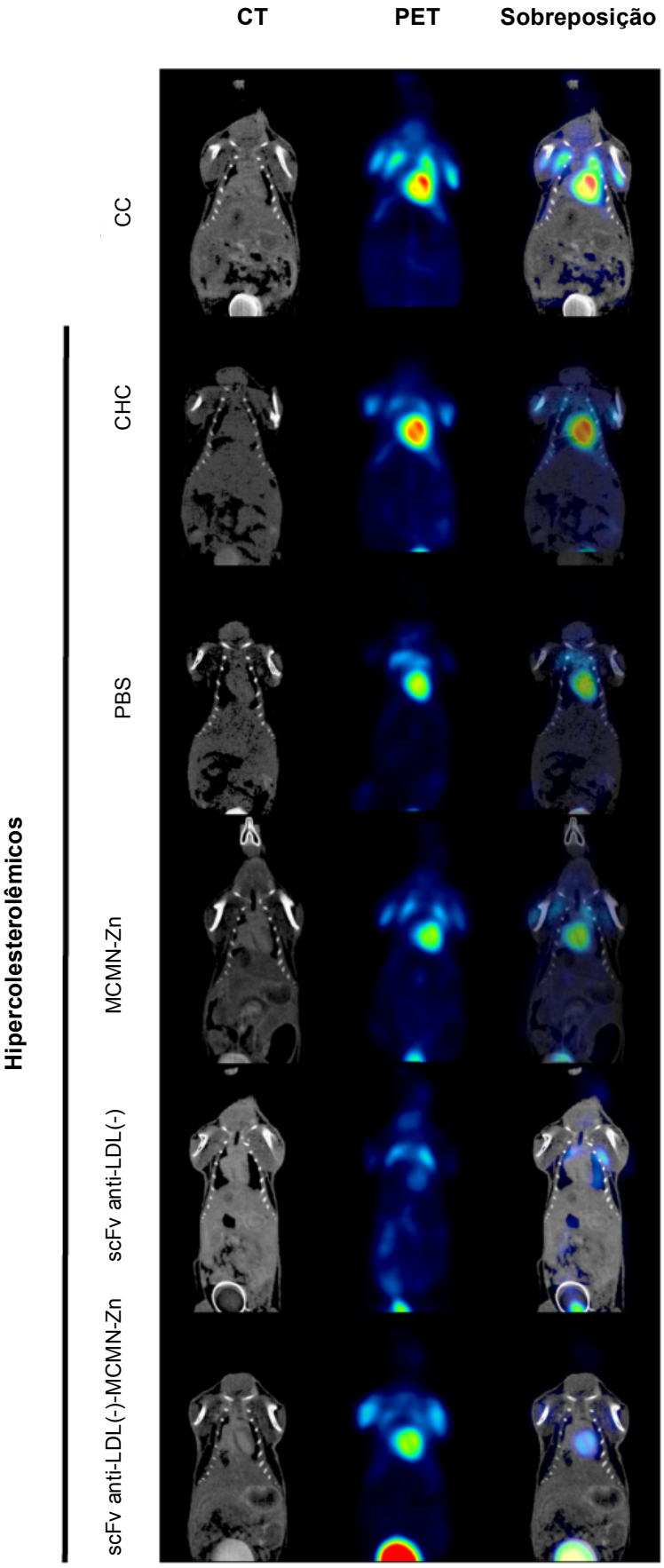


Figura 37: Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão coronal completa. Imagens (visão coronal) dos camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos dos grupos Controle com dieta

padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (não-tratado), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-) e formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn com 12 semanas de idade, injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. Imagens obtidas por CT, por PET e fusão de imagens PET + CT.

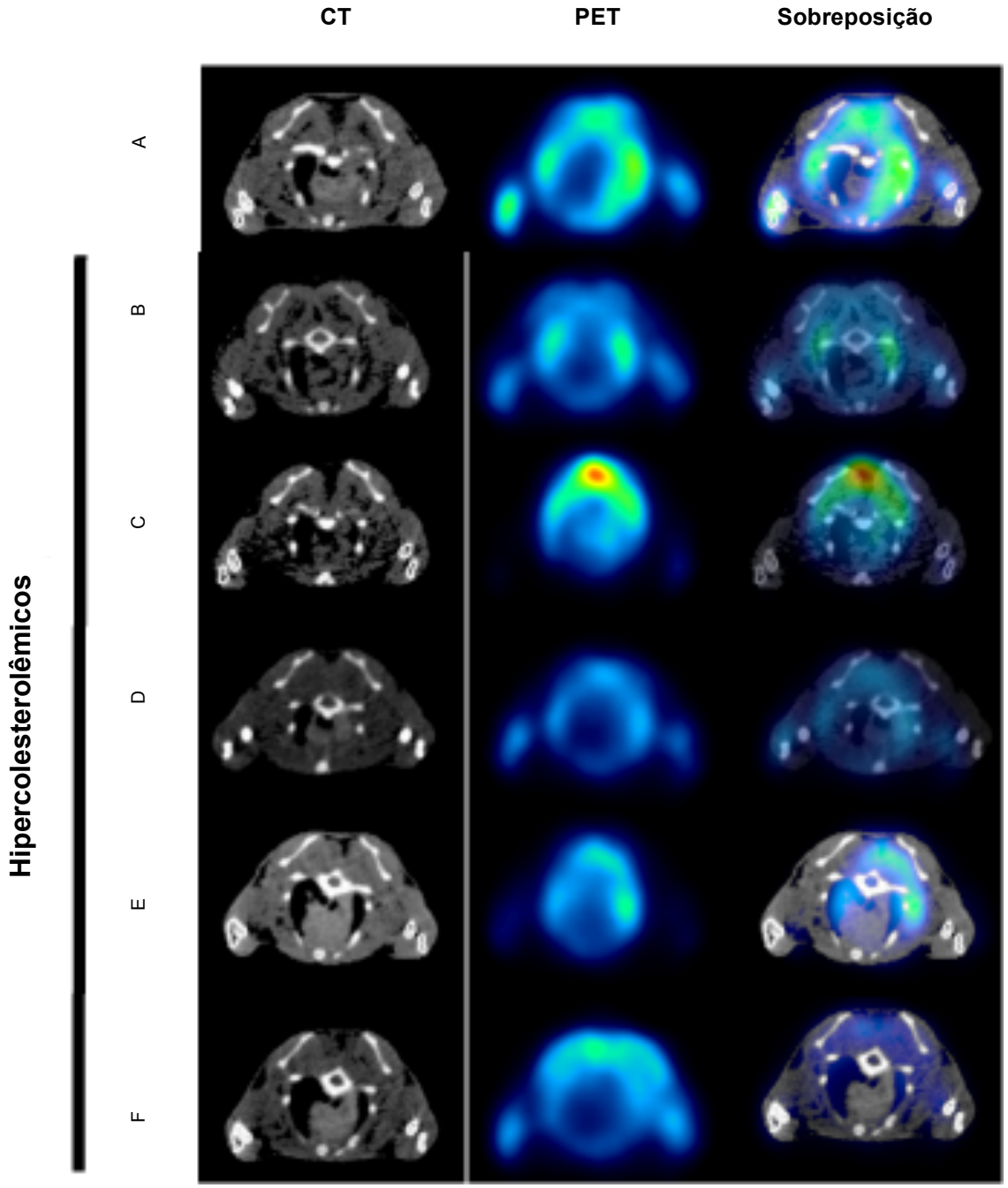


Figura 38: Avaliação da área da lesão aterosclerótica em modelo de desenvolvimento de lesão inicial em camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ por técnica de PET/CT: visão axial completa. Imagens (visão axial) dos camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ machos dos grupos: A: Controle com dieta padrão (CC); B: Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC); C: Veículo (PBS); D: Nanocápsulas MCMN-Zn; E: scFv anti-LDL(-); e F: formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn com 12 semanas de idade,

injetados com ^{18}F-FDG e contraste iodado. Imagens obtidas por CT, por PET e fusão de imagens PET + CT.

A celularidade sanguínea (Tabela 8) e os parâmetros bioquímicos da urina (Tabela 9) foram avaliados em todos os grupos e não foram observadas diferenças significativas entre os valores e os perfis encontrados entre os grupos tratados e os grupos controle. Os valores encontrados para o número absoluto de leucócitos e o número relativo de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos estavam dentro da faixa de normalidade para a espécie (HEIDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010; PAIVA, 2013) e para a linhagem (FIGUEIREDO, 2006) utilizada, tendo sido semelhantes em todos os grupos experimentais.

Tabela 8: Celularidade sanguínea dos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial ao fim das 9 semanas, divididos por grupo de tratamento.

	CC	CHC	PBS	MCMN-Zn	scFv anti-LDL(-)	scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn
Leucócitos totais	4,72 ± 13,7	4,6 ± 5,9	4,9 ± 9,8	4,77 ± 6,6	4,1 ± 6,1	4,1 ± 3,8
Neutrófilos	27,7 ± 4,1	22,6 ± 6,7	21,3 ± 1,6	23,6± 3,9	20,7 ± 5,0	19,7 ± 5,1
Linfócitos	65,9 ± 5,3	72,4 ± 6,3	74,9 ± 2,3	72,2 ± 3,5	75,7 ± 5,93	76,1 ± 5,1
Monócitos	5,6 ± 1,9	4,4 ± 1,6	3,1 ± 1,1	3,5 ± 1,22	2,8 ± 1,1	3,6 ± 0,7
Eosinóflos	0,9 ± 0,4	0,6 ± 0,5	0,7 ± 1,1	0,7 ± 1,2	0,8 ± 1,0	0,5 ± 0,8

Leucócitos totais: $10^6/mm^3$; Neutrófilos: %; Linfócitos: %; Monócitos: %; Eosinófilos: %. Os dados estão representados como média ± DP (n = 10); p>0,05. CC: Controle com dieta padrão; CHC: Controle com dieta hipercolesterolêmica.

Não foi observada presença de sangue na urina dos animais, sugerindo que os tratamentos não ocasionaram hemólise intravascular. Não foi evidenciada a presença de cetonas, nitrito ou leucócitos em quaisquer dos animais avaliados. Foi determinada a presença de glicose em apenas 2 animais [100 mg/dL animal do

grupo CC; e 500 mg/dL em animal do grupo scFv anti-LDL(-)] deste estudo, o que pode estar relacionado à utilização de uma dose mais elevada do anestésico Cloridrato de Cetamina nesses animais (mesmo após 15 minutos da administração da mistura de anestésicos, os animais respondiam a estímulos de dor quando proporcionados). A presença de proteína (desde traços até 500 mg/dL) na urina dos animais deve ser investigada a fim de descartar possíveis danos glomerulares após 8 semanas de tratamento.

Tabela 9: Parâmetros bioquímicos da urina dos camundongos submetidos ao protocolo de lesão inicial ao fim das 9 semanas, divididos por grupo de tratamento.

	CC	**CHC**	**PBS**	**MCMN-Zn**	**scFv anti-LDL(-)**	**scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn**
Sangue	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Leucócitos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteína	Traços 30 (2)	Traços 500 (1)	Traços	Traços 30 (1)	Traços 30 (1)	Traços
Nitrito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cetona	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glicose	Normal 100 (1)	Normal	Normal	Normal	Normal 500 (1)	Normal
pH	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Sangue (eritrócitos/µL), Leucócitos (leucócitos/µL), Proteína (mg/dL), Cetona (mg/dL), Glicose (mg/dL), Os dados estão representados como: [resultado da maioria dos animais; resultado da minoria (número de animais com esse resultado)]; (n = 10); p>0,05. CC: Controle com dieta padrão; CHC: Controle com dieta hipercolesterolêmica.

4.3.2.2 Análise morfométrica das lesões ateroscleróticas no arco aórtico

A fim de confirmar os resultados obtidos pela técnica de PET/CT, o coração dos animais foi submetido à análise histológica, de forma a quantificar a área da lesão aterosclerótica no arco aórtico por análise morfométrica (padrão ouro atual para obtenção dessa medida). Os dados obtidos (Figura 39A) demonstraram resultados muito semelhantes aos encontrados na análise da captação do ^{18}F-FDG por PET/CT (Figura 39B, gráfico já demonstrado anteriormente na Figura 35 e repetido aqui apenas com objetivo de facilitar a comparação). Os animais tratados com o scFv anti-LDL(-) e com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn demonstraram redução significativa da área da lesão aterosclerótica ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente) em relação aos animais tratados apenas com o veículo PBS, comprovando o efeito ateroprotetor de ambos os tratamentos.

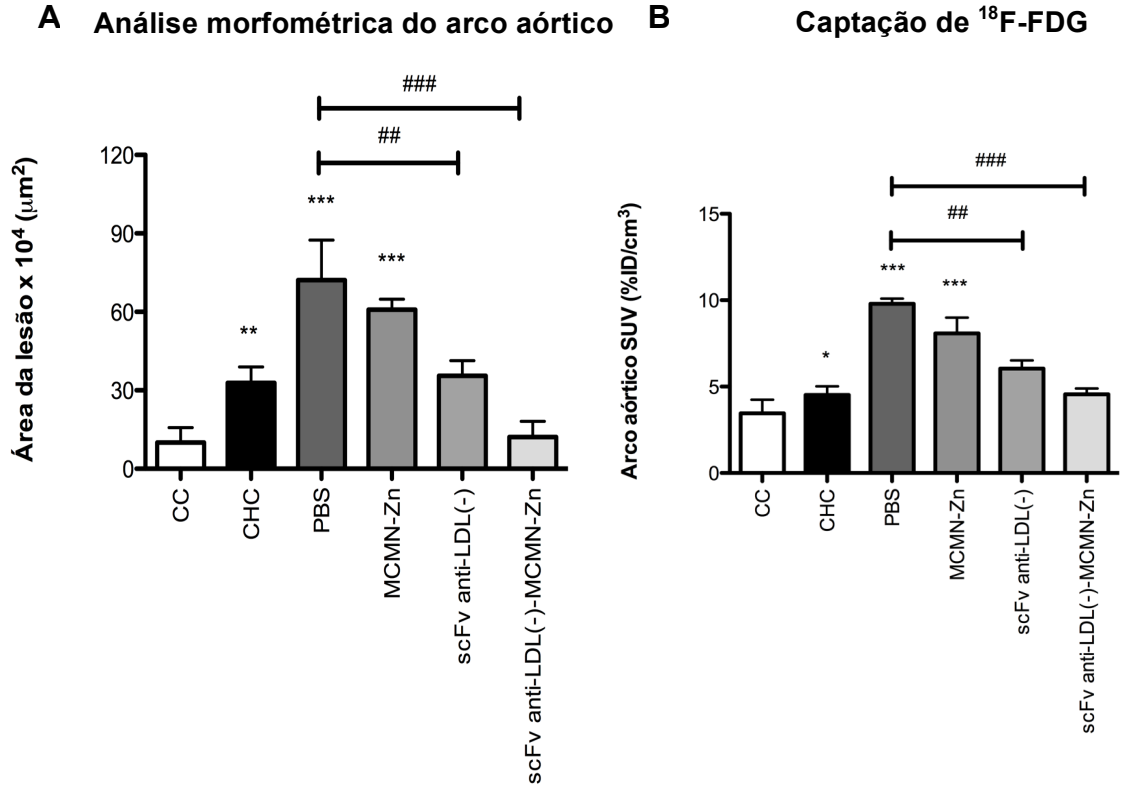


Figura 39: Comparação entre a análise morfométrica da área da lesão aterosclerótica (x 10^4 μm^2) e o SUV do ^{18}F-FDG (%ID/cm^3) no arco aórtico de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ em modelo de lesão inicial. Representação gráfica (n = 5) dos grupos Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-) e formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. A: Análise morfométrica e B: Medida do SUV. Os cortes foram analisados por microscópio óptico Nikon acoplado a uma câmera; a captura da imagem

foi feita utilizando-se um computador e o programa *NIS-Elements AR(tm)* versão 3.10 (Nikon, EUA). Foi utilizado o programa analisador de imagens *Image J* (versão para Mac, NIH, EUA) para a obtenção das medidas.); *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle alimentado com dieta padrão (CC); ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo PBS.

4.3.2.3 Quantificação do conteúdo de colágeno no arco aórtico

A fim de obter uma medida auxiliar à determinação da área da lesão aterosclerótica, foi realizada a quantificação do conteúdo de colágeno na região do arco aórtico. Essa medida pode ser relacionada à presença de lesão aterosclerótica no local e à estabilidade da placa de ateroma já pré-estabelecida. No contexto do nosso estudo, esse parâmetro serviu de suporte para comprovar o efeito benéfico da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn na redução do desenvolvimento e da progressão da lesão aterosclerótica (Figura 40).

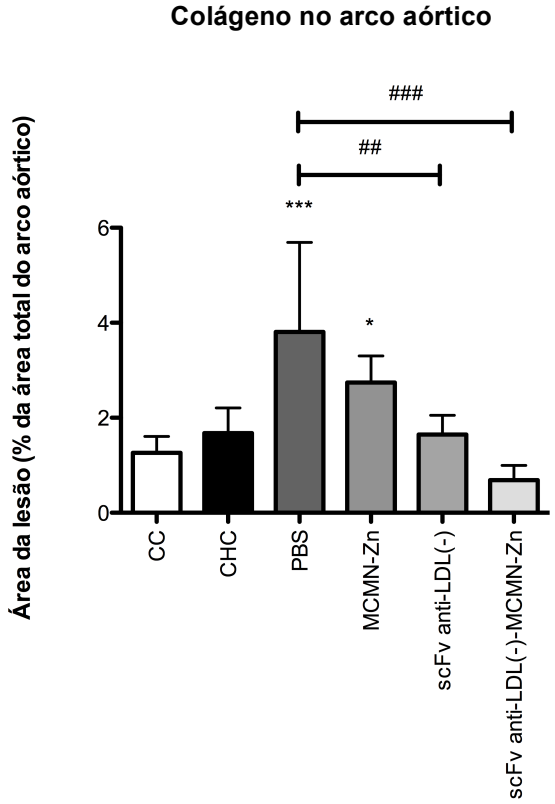


Figura 40: Quantificação do conteúdo de colágeno no arco aórtico de camundongos C57BL/6J *LdlR*$^{-/-}$ em modelo de lesão aterosclerótica inicial. Representação gráfica (n = 5) da porcentagem da área da lesão aterosclerótica (determinada pela presença de colágeno) em relação à área total do arco aórtico dos grupos Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica

(CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-) e formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. Os cortes foram corados com Picrosirius Red e contra-corados com Hematoxilina de Carrazi para avaliação do conteúdo de colágeno na região de interesse. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Olympus BX50, sob luz polarizada, acoplado a uma câmera digital Olympus E 330 (Olympus, Japão). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x e foram analisadas em software ImageJ, após reconhecimento das regiões coradas de cor alaranjada na área estudada.); *p<0,05 e ***p<0,001 em relação ao controle alimentado com dieta padrão (CC); ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo PBS.

Os animais tratados com o scFv anti-LDL(-) (p<0,01) e com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn (p<0,001) demonstraram de forma significativa um menor conteúdo de colágeno no arco aórtico em compração aos animais tratados apenas com o veículo PBS. O tratamento com as nanocápsulas MCMN-Zn (p>0,05) não apresentou alteração significativa dessa medida em relação ao grupo PBS. Apenas os grupos PBS (p<0,001) e MCMN-Zn (p<0,05) apresentaram aumento significativo do conteúdo de colágeno no arco aórtico em relação ao grupo CC (controle alimentado com dieta padrão).

4.3.2.4 Quantificação do conteúdo lipídico na aorta

Os animais que receberam dieta HC apresentaram maior conteúdo lipídico (quantificação do corante *Oil Red O*) em todos os fragmentos de aorta avaliados, em relação ao grupo CC, comprovando a influência da dieta HC no acúmulo dessas moléculas. O grupo tratado apenas com PBS apresentou resultados semelhantes a esses, assim como o grupo MCMN-Zn, cujo tratamento não alterou de forma significativa o acúmulo do corante no interior da aorta. Animais tratados com o scFv anti-LDL(-) não-conjugado às nanocápsulas apresentaram menor conteúdo lipídico no interior da aorta apenas na análise individual do arco aórtico (p<0,05) , em relação ao grupo PBS, não sendo possível estabelecer relação significativa em nenhum dos outros fragmentos avaliados. O efeito ateroprotetor da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn foi observado em todos os fragmentos avaliados (tanto na aorta como um todo – p<0,001; quanto no arco aórtico – p<0,001; na aorta abdominal – p<0,01; e nas artérias femorais – p<0,01) em relação aos animais tratados apenas com PBS.

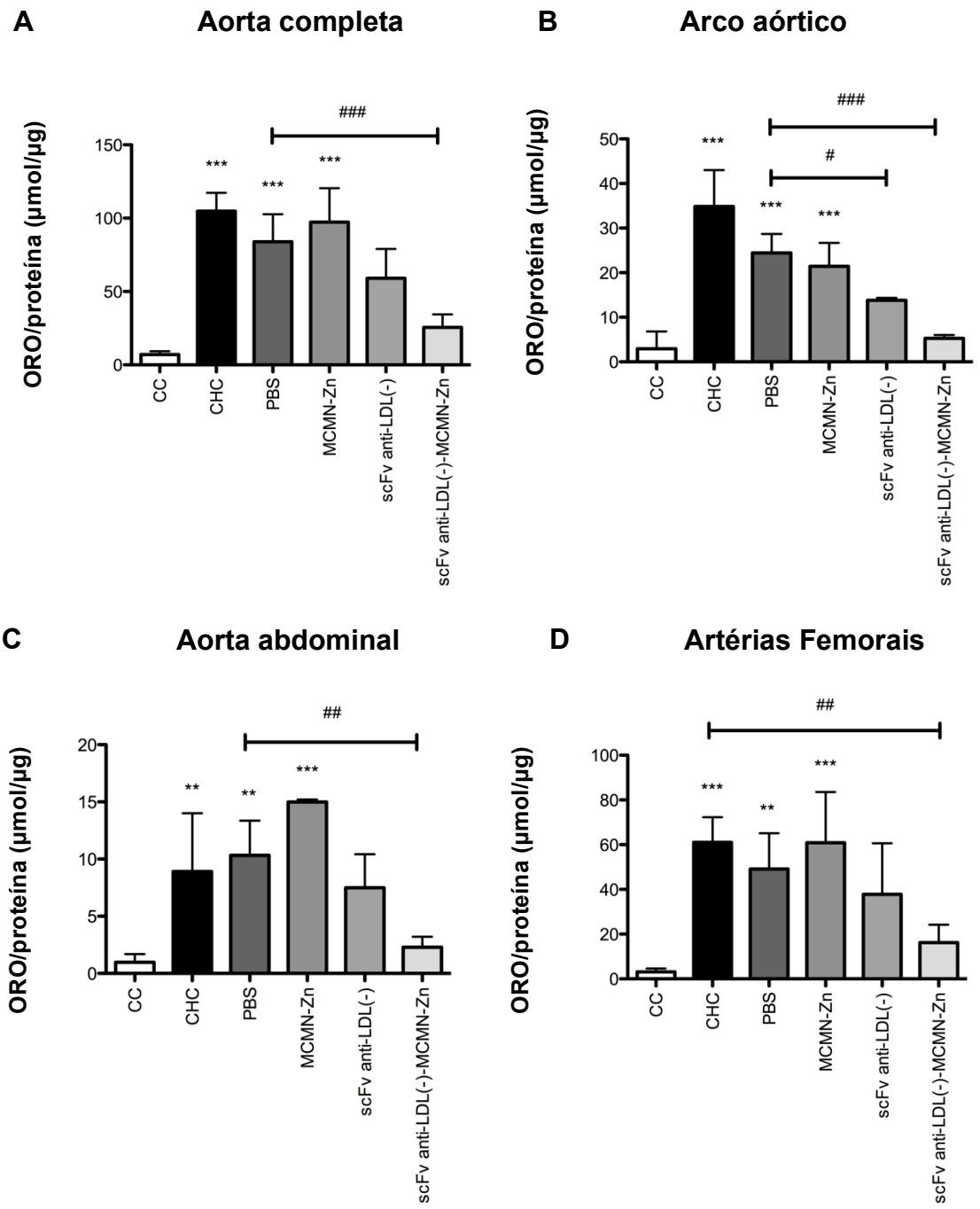


Figura 41: Quantificação do conteúdo lipídico na aorta de camundongos C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ em modelo de lesão aterosclerótica inicial. Representação gráfica (n = 5) dos grupos Controle com dieta padrão (CC), Controle com dieta hipercolesterolêmica (CHC), Veículo (PBS), Nanocápsulas MCMN-Zn, scFv anti-LDL(-) e formulação scfv anti-LDL(-)-MCMN-Zn. A: Aorta completa; B: Arco aórtico (1 cm da aorta torácica); C: Aorta abdominal; D: Artérias femorais. As aortas fragmentadas foram coradas com *Oil Red O*, e o conteúdo proteico das amostras de tecido foi avaliado pelo método de BCA e utilizado para normalização dos dados encontrados. Os resultados são expressos em µmol/µg – ORO/proteína); **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle alimentado com dieta padrão (CC); ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo PBS.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A LDL desempenha um papel fisiológico importante na manutenção de membranas celulares, produção de hormônios e na regulação de vias metabólicas e energéticas (MILLER et al., 2010). Entretanto, sob condições patológicas de hiperlipidemia, diabetes mellitus, estresse oxidativo e/ou doenças genéticas, a LDL torna-se mais suscetível a modificações (FRIEDMAN, 1982; LEVITAN et al., 2010; SCHMIDT; STERN, 2002). Dentre as possíveis modificações que essa lipoproteína pode sofrer, destaca-se a LDL eletronegativa, foco de estudo em nosso grupo.

Sabe-se que a LDL(-) está envolvida na formação de células espumosas e exerce um efeito inflamatório múltiplo em células endoteliais, estimulando a produção de diversos fatores, como citocinas e quimiocinas que atuam em vários estágios do desenvolvimento da aterosclerose, como o recrutamento leucocitário e a proliferação celular (PEDROSA et al., 2010). Nesse sentido, o estudo da LDL(-) é fundamental para uma compreensão completa do processo aterosclerótico.

A ideia de prevenir e tratar a aterosclerose através da modulação da resposta imune é bastante promissora (LAHOUTE et al., 2011; JUN et al., 2012). Os anticorpos que reconhecem formas modificadas da LDL são capazes de se ligar a estas partículas e neutralizar seus efeitos pró-inflamatórios e pró-aterogênicos (JAGER; KUIPER, 2011). Diversos estudos têm relatado, ao longo da última década, a utilização de anticorpos monoclonais e seus fragmentos (Fab, Fab2 e scFv) como agentes terapêuticos para a aterosclerose (CHYU; NILSSON; SHAH, 2007) relacionados principalmente ao reconhecimento de LDLox. Zhou e colaboradores (2012) desenvolveram vacinas de DNA para MCP-1 e seu receptor através da imunização de camundongos C57BL/6J semanalmente, por 3 semanas. Observou-se a inibição significativa da migração de macrófagos tratados com soro obtido dos animais imunizados em ensaio envolvendo a ativação de células endoteliais com TNF-α. Em outro estudo, o tratamento com um fragmento Fab e um scFv, ambos anti-LDLox (LDL contendo fosfolípides oxidados) inibiram a formação *in vitro* de células espumosas e diminuíram a progressão *in vivo* de lesões ateroscleróticas em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ através do bloqueio da ligação com a LDLox e da consequente captação dessas partículas pelos macrófagos (TSIMIKAS et al., 2011).

A proteína recombinante scFv anti-LDL(-), desenvolvida pelo nosso grupo, além de ser uma ferramenta singular para o reconhecimento da LDL(-), uma das modificações da LDLn que ocorre *in vivo* mais prejudiciais ao organismo, tem demonstrado grande potencial de utilização como agente terapêutico para a aterosclerose. O tratamento de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 com LDL(-) em presença do scFv anti-LDL(-), demonstrou redução da formação de células espumosas e da expressão de mRNA de *Cd36, Tlr4* e *Cox2* (KAZUMA et al., 2013), dois receptores importantes no reconhecimento de frações de LDL modificada e uma enzima importante no processo inflamatório. Adicionalmente, o tratamento *in vivo* com o scFv anti-LDL(-) durante 4 semanas diminuiu a área da lesão aterosclerótica no arco aórtico em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ (KAZUMA et al., 2013).

Na aterosclerose, diversos tipos de nanopartículas têm sido estudadas com finalidades terapêuticas. Os lipossomas revestidos por polietileno glicol (PEG), são utilizados como carreadores de fármacos, devido às suas propriedades de baixa imunogenicidade, alta biocompatibilidade biodisponibilidade. Fármacos como glicocorticóides têm sido encapsulados em lipossomas, aumentando sua meia-vida na circulação sistêmica. Joner e colaboradores (2008) utilizaram fosfato de prednisolona encapsulado em um lipossomo revestido com PEG e obtiveram uma redução significativa da lesão aterosclerótica em coelhos. Nesse estudo, a liberação do fármaco foi obtida por endocitose do lipossomo, que teve como resultados benéficos a utilização de uma menor dose de prednisolona e a diminuição dos seus efeitos colaterais. Estudos realizados por Maranhão e colaboradores também têm demonstrado diversas aplicações para uma nanoemulsão rica em colesterol com estrutura lipídica semelhante à lipoproteína de baixa densidade, denominada LDE (MARANHÃO et al., 1997), incluindo potencial ação benéfica no tratamento da aterosclerose (TAVARES et al., 2011).

Uma das grandes vantagens do uso da nanotecnologia na Medicina, no entanto, está na habilidade de desenvolver dispositivos que possam interagir com diferentes tipos de células ou ainda com substratos específicos, permitindo a veiculação sítio dirigida de fármacos ou moléculas bioativas (PSARROS et al., 2012), através da utilização de nanopartículas funcionalizadas (FERRARI, 2005). Um exemplo bem sucedido é o desenvolvimento de um sistema formado por nanopartículas de ácido polilático (do inglês PLA, *polylatic acid*) conjugadas a um anticorpo monoclonal anti-apoB-100 cujo tratamento *in vitro* de macrófagos diminuiu

a captação de LDL por essas células (MAXIMOV et al., 2010). Nos últimos anos, substituindo o uso de anticorpos completos, diferentes fragmentos de anticorpo (e.g., scFv) foram utilizados para construção de nanodispositivos com fins terapêuticos (LAGINHA et al., 2008). Devido ao pequeno tamanho de scFvs em comparação com o anticorpo, a conjugação entre o scFv e nanopartículas promove uma menor variação no diâmetro de partículas e maior homogeneidade dos sistemas nanoparticulados, principalmente em relação ao tamanho dos sistemas formados (FORCE; PUGMIRE; CULBERTSON, 2010).

Neste trabalho, foi demonstrado o desenvolvimento da nanoformulação funcionalizada com fragmentos de anticorpo anti-LDL(-), a partir de uma abordagem inovadora baseada na formação do complexo organometálico quitosana-Zinco II-scFv anti-LDL(-) na superfície de nanocápsulas. Além de ser produzida por um processo simples e rápido de síntese, sem necessidade de passos adicionais de purificação, a nanoformulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn otimizou os efeitos benéficos *in vitro* e *in vivo* apresentados pelo scFv anti-LDL(-), o que pode estar relacionado à presença de várias moléculas de scFv na superfície das nanocápsulas.

Além de proporcionar a diminuição da captação da LDL(-) por macrófagos murinos e humanos primários e, consequentemente, a formação de células espumosas, a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn ocasionou diminuições significativas na expressão gênica de IL-1β (em macrófagos murinos e humanos) e de MCP-1 (em macrófagos humanos) e nos níveis de IL-1β (em macrófagos de ambas as espécies) em relação à ação da LDL(-). A IL-1β é uma citocina pró-inflamatória e pró-aterogênica relacionada à ativação de linfócitos T (GREAVES; CHANNON, 2002) e à produção de IL-6 (ZOHLNHÕFER et al., 2000), atuando como um importante mediador na resposta inflamatória em processos de proliferação e diferenciação celular (revisado por TEDGUI; MALLAT, 2006) além de desempenhar funções diretas na formação e estabilidade da placa aterosclerótica. IL-1β atua ainda estimulando a produção de outras citocinas e enzimas proteolíticas por macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas, apresentando grande importância na amplificação do processo inflamatório (BHASKAR et al., 2011). Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos *knockout* para o gene do receptor de IL-1β apresentaram diminuição das lesões ateroscleróticas (aproximadamente 33%) em relação a animais sem a deleção do alelo do gene do receptor de IL-1β, sugerindo

seu papel na promoção da aterosclerose (KIRII et al., 2003). Em macrófagos, a LDL(-) promove a secreção de IL-1β biologicamente ativa por meio de dois mecanismos principais: i) a ativação dos receptores CD14 e TRL-4, conhecida como iniciação ou *priming*; e ii) a ativação do inflamassoma NRLP3 (do inglês, *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 OR Nod-like receptor protein 3*), com formação do complexo NRLP3-ASC e ativação da caspase-1 (ESTRUCH et al., 2015; 2016). Assim, o acúmulo de LDL(-) na circulação sanguínea induz a produção de pró-IL-1β através do reconhecimento dessas partículas de lipoproteína modificada por TLR-4 e CD14 e da consequente ativação de NF-κB, fornecendo o primeiro sinal para a ativação do inflamassoma NLRP3 e aumento da expressão dessa proteína (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). Em uma segunda etapa, ocorre a desubiquitinação da proteína NLRP3 e a formação do complexo NLRP3-ACS por ligação à proteína adaptadora ACS (*apoptosis associated speck-like protein containing* CARD), composta por um domínio de recrutamento de caspase (do inglês CARD) e um domínio de pirina. O complexo NLPR3-ACS se liga à caspase 1 e induz a produção de IL-1β (GUO; CALLAWAY; TING, 2015). Foi demonstrado que a administração intraperitoneal de cristais de colesterol em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ induziu o desenvolvimento de um processo inflamatório agudo a partir da ativação do inflamassoma NLRP3 com a consequente secreção de IL-1β, ocasionando a ruptura das lesões ateroscleróticas previamente formadas (DUEWELL et al., 2010).

A MCP-1 é uma quimiocina produzida por diversos tipos de células, incluindo endoteliais, epiteliais, fibroblastos e monócitos (revisado por DESHMANE et al., 2009), exercendo um papel importante na regulação da migração e da infiltração de monócitos e macrófagos da circulação sanguínea através do endotélio vascular durante a resposta inflamatória (revisado por YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Sua expressão também pode ser induzida por uma variedade de mediadores como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TNFα, IFN-γ, VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) e ainda IL-1 e IL-4 (SHEIKINE; HANSSON, 2005). Essa quimiocina está intimamente associada a processos inflamatórios, sendo, por esse motivo, considerada por alguns autores um potencial marcador da aterosclerose (COLL; VILLAVERDE; JOVEN, 2007; CHEN et al., 2014). Há décadas, estudos demonstram a importância de MCP-1 no desenvolvimento da aterosclerose como um ponto chave não só no início da migração subendotelial de monócitos

como também na amplificação desse processo (GERSZTEN et al., 1999). Em 1991, Nelken e colaboradores relataram a presença de MCP-1 em placas ateroscleróticas humanas, e Cushing e colaboradores (1990) demonstraram a indução da produção de MCP-1 por células endoteliais e células musculares lisas da parede arterial na presença de partículas de LDL minimamente oxidada. Estudos recentes, envolvendo monócitos humanos provenientes de placa aterosclerótica, mostraram o aumento da produção de MCP-1 nessas células em relação a monócitos isolados de sangue periférico (ZOHARA et al., 2013). O aumento da expressão de MCP-1 também foi observado no arco aórtico de coelhos em modelo de lesão aterosclerótica inicial, induzida por dieta hipercolesterolêmica (com adição de 1% de colesterol) (HUO et al., 2014), associado ao aumento de TNFα, VCAM-1 e IL-1β (BULGARELLI et al., 2013). Esse conjunto de evidências não só demonstra a importância de IL-1β e de MCP-1 na progressão da aterosclerose, como ressalta o potencial antiinflamatório da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn.

Essa nanoformulação (com aproximadamente 130 nm de diâmetro médio) foi internalizada tanto por macrófagos murinos primários quanto por macrofágos humanos primários, observando-se diminuição significativa da sua internalização ao se inibir a endocitose de forma inespecífica (Cloroquina), com pequena contribuição das vias dependentes de dinamina (Dynasore) e com maior participação da macropinocitose (EIPA ou *5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride*), com $p<0,001$).

O mecanismo de internalização celular de nanopartículas ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que esses materiais interagem de forma diferenciada com as células e seus elementos em relação às moléculas em solução (SOM et al., 2011). Tendo em vista que a membrana fosfolipídica das células atua na regulação do transporte de moléculas para dentro das células, protegendo as estruturas internas do material extracelular (revisado por SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010), e que nanopartículas geralmente possuem massa molecular acima de 1 kDa, descreve-se que a interação entre as nanopartículas e a membrana plasmática das células envolve mecanismos de transporte ativo (KUMARI; MG; MAYOR, 2010), o que leva ao seu acúmulo intracelular (KETTINGER et al., 2013).

A internalização de partículas geralmente ocorre por fagocitose ou por endocitose. A fagocitose é predominantemente realizada por células especializadas do sistema imune (macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas) a fim de proteger o organismo de agentes infecciosos e partículas exógenas inertes, tais

como sistemas nano-carreadores (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Os passos principais desse processo são a opsonização (feita por proteínas denominadas opsoninas, tais como as imunoglobulinas e as proteínas do complemento) (VONARBOURG et al., 2006) e a formação do fagossomo, o qual é capaz de transportar partículas pelo citoplasma e, posteriormente, fundir-se a lisossomos a fim de formar os fagolisossomos. Os fagolisossomos formados tornam-se acidificados e adquirem um conteúdo enzimático essencial para a degradação de polímeros presentes em nanopartículas sintéticas, visando, por exemplo, a liberação de fármacos ou moléculas ativas do interior dessas nanopartículas (CLAUS et al., 1998). A fagocitose, geralmente, envolve a internalização de partículas com tamanho superior a 500 nm (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009), por mecanismo dependente de actina (ADEREM; UNDERHILL, 1999) e relacionado a receptores específicos, como receptores Fc, *scavenger* ou de manose (PATEL et al., 2010; ZIELLO; HUANG; JOVIN, 2010; WANG; WU; REINHARD, 2012). Nesse processo são formadas vesículas intracelulares ou fagossomos, com diâmetro entre 0,5 e 1 μM, onde as partículas são degradadas por um tempo que varia de 30 minutos até muitas horas (KRPETIC et al., 2010). O tamanho das partículas, no entanto, não é a única característica determinante na fagocitose e, propriedades de superfície (como a presença de moléculas adsorvidas) também devem ser consideradas (DOHERTY; MCMACHON, 2009).

A endocitose, por outro lado, ocorre em quase todos os tipos de células e está relacionada à internalização de fluidos, podendo captar partículas com dezenas ou até centenas de nanômetros. A endocitose é subdividida em macropinocitose, endocitose mediada por clatrina e endocitose mediada por caveolina, ambas dependentes do recrutamento de dinamina, assim como outros mecanismos independentes de clatrina e caveolina ainda pouco esclarecidos (CONER; SCHMID, 2003). A macropinocitose ocorre, geralmente em conjunto com outro mecanismo de captação, em diversas células, incluindo macrófagos, e envolve a formação de protrusões que se fundem umas às outras e à membrana celular (DHARMAWARDHANE et al., 2000). Embora não haja qualquer seletividade nesse processo, uma vez que internaliza partículas grandes gerando macropinossomos de formato irregular com tamanho superior a 1 μM, independentemente do conteúdo exposto em sua superfície, a macropinocitose é considerada uma das melhores vias para o transporte de fármacos (RIMA et al., 2013). A endocitose mediada por clatrina

e caveolina gera invaginações na memebrana de até 150 nm e 50-80 nm, respectivamente. São dois mecanismos diferentes de internalização de moléculas e dependem de um componente comum e essencial para a formação de vesículas (mediada por clatrina) e na internalização das mesmas (mediada por caveolina), uma GTPase denominada dinamina (HINSHAW, 2000). Na endocitose mediada por clatrina, a internalização de partículas é seguida pela formação de lisossomas ácidos e ricos em enzimas que promovem a degradação das partículas (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009). Nessa via, pode ocorrer a ligação de partículas de forma inespecífica à superfície da célula carregada negativamente ou via receptor específico, como é o caso da LDL, da transferrina, da insulina e de alguns fatores de crescimento (KETTINGER et al., 2013). A endocitose mediada por caveolina, por sua vez, é iniciada com a ligação de partículas à superfície da célula e sua migração para invaginações de caveolina, seguida da formação de uma vesícula caveolar (DOHERTY; MCMACHON, 2009; BAREFORD; SWAAN, 2007).

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram que a internalização da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn ocorreu principalmente por fagocitose (demonstrado pela inibição da polimerização dos filamentos de actina mediada pela Citocalasina D) e por macropinocitose (cerca de 80% de inibição da internalização de scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn foi mediada por EIPA, considerada a melhor via para o transporte de fármacos e substâncias bioativas (RIMA et al., 2013). A internalização da nanoformulação por essas vias pode estar relacionada a alguns fatores: i) nanopartículas compostas pelo mesmo material e provenientes de uma mesma preparação podem diferir quanto ao seu tamanho, formato e porosidade, interagindo de diversas formas com as células, o que induz sua internalização por diferentes mecanismos endocíticos (KRUG; WICK, 2011); ii) a adsorção de proteinas ou petídeos à superfície dessas nanopartículas pode alterar as propriedades originais das mesmas, como tamanho e carga, de forma significativa (MONOPOLI et al., 2012), sendo necessária a utilização de um controle de nanopartículas livres ou não-conjugadas às proteínas, peptídeos ou anticorpos em todos os ensaios em questão (KETTINGER et al., 2013); iii) diferentes tipos ou espécies de células apresentam diferentes estratégias de captação (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011); iv) os inibidores farmacológicos usualmente utilizados nesse tipo de estudo geralmente não possuem alta especificidade para cada mecanismo estudado e podem influenciar rotas alternativas de internalização. Adicionalmente, alguns

desses compostos interferem em funções celulares vitais, promovendo um efeito tóxico relevante (IVANOV, 2008). No caso da formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, como a forma e a superfície das partículas são constantes, o parâmetro que influencia de forma relevante o mecanismo de internalização a ser seguido é, provavelmente, a distribuição do tamanho dessas partículas.

A comprovação dos efeitos ateroprotetores demonstrados pelo tratamento *in vitro* com a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, assim como o fato de estarmos diante de um sistema polimérico biodegradável (formado por nanocápsulas de núcleo lipídico), que permite a encapsulação de uma maior quantidade de fármaco em relação a outros sistemas nanométricos (KONAN et al., 2002), fornece controle adequado de liberação de fármacos (lipo ou hidrossolúveis) inseridos em sua composição (JÄGER et al., 2009), direciona-os ao local desejado (órgão-alvo ou célula-alvo) e permite, assim, a veiculação sítio-dirigida dos mesmos, estimulam seu estudo como um candidato a biofármaco. No entanto, atualmente, diversos grupos têm demonstrado preocupação com a toxicidade que esses sistemas podem apresentar, podendo ocasionar um desequilíbrio entre sua ação terapêutica e seu potencial tóxico.

Sabe-se que nanocarreadores, quando administrados *in vivo*, podem sofrer variações em suas características físico-químicas, levando à sua degradação, agregação ou até à formação de corona em sua superfície (JIANG et al., 2009; SHARIFI et al., 2012), alterando a forma como são reconhecidos pelas células e como interagem com as mesmas (WINZEN et al., 2015). Essas interações entre as nanopartículas podem ocorrer especialmente na circulação sanguínea, na qual as partículas tendem a ser captadas de forma inespecífica por células circulantes, promovendo um efeito tóxico indesejável (LIOPO et al., 2012). Esses efeitos tóxicos sofrem influência direta das características das nanopartículas, no que se refere ao seu tamanho, área superficial e até a características químicas e morfológicas da superfície das mesmas, trazendo à tona a necessidade da realização de testes específicos com cada nanossistema desenvolvido (GIL et al., 2010; SHARIFI et al., 2012).

Pela técnica de microscopia intravital, que permite a observação direta da rede microvascular de tecidos transiluminados ou não, é possível a observação da dinâmica dos eventos em tempo real na microcirculação em animais vivos, de modo a avaliar aspectos celulares e vasculares envolvidos na inflamação (GAVINS, 2012).

Essa metodologia é útil para a avaliação da toxicidade aguda, utilizando-se parâmetros relacionados ao comportamento dos leucócitos circulantes, à presença de trombos ou hemorragias e à velocidade do fluxo sanguíneo, uma vez administrado um tratamento específico pela via intravenosa. Pode ser realizada ainda a medida da intensidade de fluorescência emitida dentro e fora dos vasos, após a administração de uma dose de albumina marcada com o fluoróforo FITC, de modo a avaliar a permeabilidade do endotélio vascular na presença do tratamento em questão.

Em condições ideais, um nanocarreador não deve interagir com as células da circulação sanguínea, a menos que seja dirigido às mesmas, de modo a permitir sua administração pela via intravenosa (WINZEN et al., 2015). Em nosso estudo, realizado em colaboração com o Laboratório de Toxicologia Experimental coordenado pela Profa. Sandra H. P. Farsky, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn na dose de 5 mg/Kg não promoveu qualquer alteração significativa quanto ao número de leucócitos em rolamento, ao número de leucócitos aderidos, ao número de leucócitos migrados, à formação de trombos ou de áreas hemorrágicas e a velocidade do fluxo sanguíneo, após 60 minutos da administração intravenosa do tratamento em relação ao grupo controle (no qual foi administrada apenas solução salina). Resultados semelhantes foram encontrados em ambos os grupos, que receberam dieta padrão ou dieta hipercolesterolêmica. Adicionalmente, a administração pela via intravenosa não induziu hemólise, que teria sido evidenciada pela presença de sangue na urina. A presença de altos níveis de glicose na urina pode ser explicada pela utilização do fármaco anestésico Cetamina, que induz o aumento dos níveis plasmáticos de glicose, excedendo seu limiar renal, mesmo em animais não-diabéticos, e aumentando a sua excreção urinária (FERREIRA et al., 2008). O conjunto de dados obtidos comprova que a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn, na dose de 5 mg/Kg, não induziu toxicidade na microcirculação, além de não ocasionar qualquer alteração significativa na permeabilidade do endotélio vascular. A confirmação de que a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn não apresentou qualquer toxicidade aos animais avaliados permitiu a continuidade dos estudos de avaliação dos efeitos *in vivo* dessa formulação, agora voltados à observação dos efeitos sobre o desenvolvimento e a progressão da lesão aterosclerótica.

Nos últimos anos, tem ocorrido uma expansão notável na tecnologia de obtenção de imagens do sistema cardiovascular de forma não-invasiva, ampliando o espectro de modalidades de imagem e permitindo um maior número de informações a respeito da fisiopatologia de doenças, especialmente da aterosclerose. Essas tecnologias permitem a identificação de pacientes de alto risco e a predição do risco cardiovascular nesses indivíduos, possibilitando intervenções eficazes e rápidas, a identificação de placas vulneráveis, a realização de medidas de atividade de processos inflamatórios e ainda o cálculo do escore de cálcio no interior das artérias (DWECK et al., 2016).

A Tomografia por Emissão de Pósitrons tem sido utilizada para a obtenção de imagens moleculares de lesões ateroscleróticas, principalmente com a utilização do radiotraçador ^{18}F-FDG. O ^{18}F-FDG é considerado um marcador de inflamação vascular e tende a se acumular em regiões específicas acometidas por essa patologia, como coração, artérias carótidas e aorta. Vale ressaltar que esse radiotraçador também tem demonstrado importância no prognóstico de doenças cardiovasculares, atuando na identificação de pacientes com risco de recorrência de acidente vascular cerebral (MARNANE et al., 2012) e na predição de ocorrência de eventos cardiovasculares em pacientes submetidos a exame de PET/CT para acompanhamento oncológico e sem doença cardiovascular prévia (FIGUEROA et al., 2013).

Uma outra abordagem de uso do ^{18}F-FDG está relacionada ao acompanhamento de estudos clínicos a fim de avaliar os efeitos de fármacos anti-ateroscleróticos por PET/CT. Nesses casos, a captação do radiotraçador é mensurada e pode ser utilizada para avaliar alterações na atividade inflamatória, monitorada a partir de mudanças na captação do mesmo nas artérias (LEE et al., 2008). A vantagem da utilização do ^{18}F-FDG em PET/CT em estudos clínicos de fármacos está na sua capacidade de detectar alterações moleculares precoces no interior das placas, fornecendo uma medida semi-quantitativa de eficácia farmacoterapêutica. Além disso, tais estudos tendem a ser mais curtos (3 a 6 meses) e requerem uma menor quantidade de pacientes para alcançar a mesma significância estatística dos testes convencionais (TARKIN; JOSHI; RUDD, 2014), demonstrando excelente reprodutibilidade e tendo, portanto, um custo relativamente baixo em relação ao tempo dedicado ao estudo (RUDD et al., 2007). Estudos objetivando avaliar o efeito de estatinas sobre lesões ateroscleróticas observaram

reduções significativas ($p<0,01$) do SUV em aortas de pacientes tratados durante apenas 3 meses (TAHARA et al., 2006; RUDD et al., 2007; ISHII et al., 2010). Em alguns estudos, os resultados ainda são controversos, uma vez que a ávida captação de ^{18}F-FDG pelo ventrículo esquerdo pode limitar a detecção precisa e específica de doenças (JOSHI et al., 2014). Por esse motivo, tem sido recomendada a avaliação de artérias como as carótidas, a aorta torácica e a aorta ascendente a fim de correlacionar a captação desse radiotraçador com os efeitos das terapias em estudo (ROGERS et al., 2010; JOSHI et al., 2015).

Em modelos experimentais de aterosclerose em camundongos, o grande desafio na obtenção de imagens se dá pelo tamanho reduzido dos órgãos em estudo (coração, aorta e arco aórtico), sendo necessária uma maior resolução espacial. Os novos escâneres de PET existentes no mercado, no entanto, já permitem o uso de modelos murinos para acompanhamento da aterosclerose, possibilitando a observação de vasos com cerca de 1 mm de diâmetro, como a aorta (ORBAY et al., 2013). O ^{18}F-FDG tem sido o radiotraçador mais indicado, e estudos envolvendo a avaliação de lesões ateroscleróticas em animais relatam o tempo ideal entre a administração de ^{18}F-FDG e a aquisição de imagens em PET/CT como sendo de 3 horas. Por ser um radiofármaco pouco específico, esse tempo se torna relevante para permitir um acúmulo significativo de ^{18}F-FDG na parede arterial e para reduzir os níveis sanguíneos do radiofármaco, reduzindo, assim, o *background* das imagens (RUDD et al., 2002; 2008).

O acúmulo de ^{18}F-FDG em artérias, geralmente, indica a presença de macrófagos metabolicamente ativos como resultado de um processo inflamatório no local e estudos *ex vivo* em camundongos demonstraram uma forte correlação entre a captação de ^{18}F-FDG, a quantidade de macrófagos e o aumento da expressão gênica de marcadores relacionados à glicólise e à inflamação, o que explica a observação de um sinal aumentado de ^{18}F-FDG em lesões ateroscleróticas (GRABE et al., 2009; PEDERSEN et al., 2010). Foi demonstrado ainda que o sinal de ^{18}F-FDG tende a ser mais proeminente em estágios iniciais da aterosclerose, durante a formação de células espumosas, diminuindo uma vez que o processo de calcificação da placa é estabelecido (OGAWA et al., 2012), o que pode ser confirmado por evidências de que o acúmulo de ^{18}F-FDG é maior em macrófagos M1 pró-inflamatórios, sendo este o subtipo predominante de macrófagos em lesões durante este período, em relação aos macrófagos M2 (PELLO et al., 2011).

Nosso estudo comprovou que a utilização do modelo descrito para avaliação dos efeitos de terapias anti-ateroscleróticas sobre a área da lesão aterosclerótica em camundongos *Ldlr*$^{-/-}$ por PET/CT com o radiotraçador ^{18}F-FDG apresenta resultados tão significativos quanto os obtidos pela avaliação desses efeitos pela técnica considerada como padrão ouro, a análise morfométrica do arco aórtico. Essa observação garante a substituição da técnica histológica tradicional pela avaliação de imagens moleculares, fornecendo informações que permitem a observação de lesões em outros locais além do arco aórtico e permitindo o acompanhamento da evolução da doença ou de sua regressão durante o tempo de tratamento estabelecido.

De forma geral, o enorme interesse em reduzir o risco cardiovascular em pacientes tem dirigido a busca por novas estratégias terapêuticas que possam modular o processo aterosclerótico. Tendo em vista que o desenvolvimento desse processo está intimamente relacionado ao metabolismo de lipoproteínas e à inflamação ocasionada por essas partículas, é de extrema importância que essas terapias sejam voltadas à diminuição dos níveis sanguíneos dessas lipoproteínas assim como da sua captação por células do sistema immune (LADEIRAS-LOPES et al., 2015). Nesse contexto, o conjunto de resultados obtidos neste estudo apresentou a formulação scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn como uma abordagem biotecnológica inovadora, tendo como alvo a LDL(-), para a prevenção e o tratamento da aterosclerose, abrindo caminho para novas investigações do seu uso como um nano-carreador de fármacos ateroprotetores.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A formulação scFv ani-LDL(-)-MCMN-Zn:

- diminui a captação de LDL(-) por macrófagos murinos primários e macrófagos humanos primários;

- diminui a expressão gênica de *Il1b* em macrófagos murinos primários e de *IL1B* e *MCP1/CCL2* em macrófagos humanos primários tratados simultaneamente com LDL(-);

- diminui a expressão proteica de IL1-β em macrófagos murinos e humanos primários tratados simultaneamente com LDL(-);

- é internalizada por macrófagos murinos e humanos primários por diferentes mecanismos de endocitose: fagocitose, macropinocitose e endocitose dependente de dinamina; o que suporta a realização de estudos futuros com veiculação de fármacos anti-ateroscleróticos;

- não induz resposta pró-inflamatória em camundongos C57BL6/J *Ldlr*$^{-/-}$, característica desejável em um sistema nanoestruturado com possíveis aplicações terapêuticas;

- diminui a área da lesão aterosclerótica no arco aórtico de camundongos C57BL6/J *Ldlr*$^{-/-}$ tratados durante 8 semanas e avaliados por análise morfométrica e por tomografia por emisão de pósitrons combinada à tomografia computadorizada (PET/CT).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA D. S. P.; APOLINARIO E.; DAMASCENO N. R. T. Anticorpo monoclonal anti-LDL eletronegativa: processo de obtenção do anticorpo; conjuntos diagnostic para detecção de LDL no plasma sanguíneo e em lesões ateroscleróticas; composição farmacêutica para combate e/ou prevenção a doenças crônico-degenerativas e método de aplicação dos fármacos preparados à base do anticorpo no combate e prevenção de doenças crônico-degenerativas. **INPI,** Brasil, 2002.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p.782–787, 2000.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 593–623, 1999.

ADORNE MD. **One-pot sintese de nanocápsulas multiparedes funcionalizadas com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL(-): otimização do processo e seleção de formulação**. 2014. 145f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

AIT-OUFELLA, H. et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. **Nat Med**, v. 12, n. 2, p. 178–180, 2006.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell,** v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALMUHAIDEB, A.; PAPATHANASIOU, N.; BOMANII, J. 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. **Ann Saudi Med**, v. 31, n. 1, p. 3-13, 2011.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Subcommittee on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics D. Wong, Danie Woo and Melanie B. Turner Reeves. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: a report from the American Heart Association. **Circulation,** v. 129, p. e28-e292, 2014.

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

ANDRÉS V, DORADO B. **Methods in mouse atherosclerosis**. New York: Humana Press, 2015.

APOLINÁRIO, E.; RODRIGUES, R. J.; ABDALLA, D. S. P. Minimmally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes**. Clin. Biochem,** v. 39, p. 708-714, 2006.

ARMAN, A et al. Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene VNTR Polymorphism is Associated with Coronary Artery Disease. **Arq Bras de Cardiologia**, v. 91, n. 5, p. 268-273, 2008.

AVOGARO, P.; BON, G. B.; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 8, p. 79-87, 1988.

BANCELLS, C et al. Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. **Journal of Lipid Research,** v. 51, p. 3508-3515, 2010.

BAREFORD LM, SWAAN PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev,** v. 59, p. 748-758, 2007.

BARROS, M. R. A. C. et al. Identification of mildly oxidized low-density lipoprotein (electronegative LDL) and its auto-antibodies IgG in children and adolescents hypercholesterolemic offsprings. **Atherosclerosis,** v. 184, p. 103-107, 2006.

BEATTIE J.H. et al. Rapid Quantification of Aortic Lesions in *ApeE*$^{-/-}$ Mice. **J Vasc Res,** v. 46, p. 347–352, 2009.

BECKER, T.; VOLCHUK, A.; ROTHMAN, J. E. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. **PNAS**, v. 102, n. 11, p. 4022-4026, 2004.

BENAGIANO, M. et al. Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. **J Immunol**, v. 174, n. 10, p. 6509-17, 2005.

BENDER, E. A. et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules. **Pharm Res**, v. 31, n. 11, p. 2975-2987, 2014.

BENÍTEZ, S. et al. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 1, p. 223-32, 2002.

BENÍTEZ, S. et al. Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjectsis proatherogenic and unrelated to flycemic control, **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, p. 26-34, 2007.

BERLINER, J.A.M. et al. Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**, v. 91, p. 2488–2496, 1995.

BHASKAR, V. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of

atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p.313-320, 2011.

BICKER, H. et al. A Simple Assay to Measure Phagocytosis of Live Bacteria. **Clinical Chemistry,** v. 54, n. 5, p. 911-915, 2008.

BRAUNWALD, E. 50 th anniversary historical article. Myocardial oxygen consumption: the quest for its determinants and some clinical fallout. **J Am Coll Cardiol,** v. 34, n. 5, p. 1365-1368, 1999.

BRILEY-SAEBO, K. C. et al. Targeted iron oxide particles for in vivo magnetic resonance detection of atherosclerotic lesions with antibodies directed to oxidation-specific epitopes. **J Am Coll Cardiol**, v. 57, p. 337–347, 2011.

BROWN, B.E. et al. 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.

BUETTNER, C.; RUDD, JHF.; FAYAD, Z. A. Determinants of FDG uptake in atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol Img**, v. 4, p. 1302–1304, 2011.

BULGARELLI, A. et al. Anti-atherogenic effects of Methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in choslesterol fed rabbits. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 27, p. 531-539, 2013.

BURG S, et al. Partial volume effect estimation and correction in the aortic vascular wall in PET imaging. **Phys Med Biol**, v. 58, p. 7527–7542, 2013.

BYLUND, J. et al. Cytochalasin B triggers a novel pertussis toxin sensitive pathway in TNF-alpha primed neutrophils **BMC Cell Biology**, v. 5, n. 21, 2004.

CARVALHO, J. F.; PEREIRA, R. S. R.; SHOENFELD, Y. Vaccination for Atherosclerosis. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 38, p. 135-140, 2010.

CAVALCANTE, M. F. et al. A nanoformulation containing a scFv reactive to electronegative LDL inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **Eur J Pharm Biopharm** 2016.. *In press*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.002>. Acesso em: 8 ago. 2016.

CAZZOLATO, G.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G. Characterization of a more electronegative-charged LDL subfraction by íon change HPLC. **Free Radic. Biol. Med**, v. 11, p. 247-253, 1991.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p.45-66, 2000.

CHAABANE, C.; COEN, M.; BOCHATON-PIALLAT, M. L. Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. **Curr Opin Lipidol,** v. 25, p. 374-379, 2014.

CHAMES, P.; BATY, D. Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. **Microbiology Letters,** v. 189, p. 1-8, 2000.

CHANG, Y. H.; ABDALLA, D. S.; SEVANIAN, A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein, **Free Radical Biol Med,** v. 2, p. 202–214, 1997.

CHEN, J.; et al. ER stress triggers MCP-1 expression through SET7/9-induced histone methylation in the kidneys of db/db mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 8, p. F916-925, 2014.

CHEN, P. M.; GOMBART, Z. J.; CHEN, J. W. Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads tolysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration. **Cell & Bioscience**, v. 1, n. 10, 2011.

CHYU, K. Y.; NILSSON, J.; SHAH, P. K, Immunization for atherosclerosis. **Curr Atheroscl Rep**, 9: 104-109, 2007.

CLAUS, V. et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. **J Biol Chem,** v. 273, p. 9842–9851, 1998.

COLL, B.; ALONSO-VILLAVERDE, C.; JOVEN, J. Monocyte chemoattractent protein-1 and atherosclerosis: is there room for a additional biomarker? **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 21-29, 2007.

CONNER, S.D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell, **Nature**, v. 422, p. 37–44, 2003.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

CUSHING, S. D. et al. Monimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endotelial cells and smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p. 5134-5138, 1990.

CYTOVIVA® HOME. Disponível em: <http://www.cytoviva.com>. Acesso em 14 set 2016.

DAHLÖF, B. Cardiovascular Disease Risk Factors: Epidemiology and Risk Assessment. **Am J Cardol**, v. 105, p. 3^{A}-9^{A}, 2010.

DAMASCENO, N. R. T. **Influência das isoflavonas extraídas da soja na hipercoles- terolemia e na aterosclerose experimental induzida pela caseína.** 150f. 2001. Tese de Doutorado - Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

DE AZEVEDO, M. M. M.- **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos.** 2003. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química,
UNICAMP, São Paulo, 2003.

DE CASTELLARNAU, C. et al. Chemotactic Protein Secretion by Human Endothelial Cells **Arterioscler. Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 2281-2287, 2000.

DE CASTELLARNAU, C. et al. 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.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, p. 313–326, 2009.

DHAR, S. et al. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA–PEG nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 105, 17356-17361, 2008.

DHARMAWARDHANE, S. et al. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. **Mol Biol Cell,** v. 11, p. 3341–52, 2000.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 469-478, 2007.

DOHERTY, G. J.; MCMACHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annu Rev Biochem,** v. 78, p. 31.1-31.46, 2009.

DREWES CC. **Efeitos das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo**

acetileugenol em melanomas: estudos *in vivo* e *in vitro*. 2015. 260f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 347-60, 2003.

Duewell P1, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. **NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals.** Nature. 2010 Apr 29;464(7293):1357-61. doi: 10.1038/nature08938.

DWECK, M. R. et al. Noninvasive Molecular Imaging of Disease Activity in Atherosclerosis. **Circ Res,** v. 119, p. 330-340, 2016.

EDFELDT, K. et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation**. Circulation**, v. 105, p. 1158–1161, 2002.

ENDEMANN, G et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. **J Biol Chem**, v. 268, p. 11811–11816, 1993.

ESC/EAS. EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY/EUROPENA ATHEROSCLEROSIS SOCIETY ESC COMMITTEE FOR PRACTICE GUIDELINES (CPG) 2008–2010 AND 2010–2012 COMMITTEES: JEROEN BAX et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dislipidaemias. **European Heart Journal**, v. 32, p. 1769-1818, 2011.

ESTRUCH, M. et al. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. **Atherosclerosis,** v. 229, p. 356-362, 2013.

ESTRUCH, M. et al. Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1β release in human monocytes and macrophages**. Biochim Biophys Acta,** v. 1851, p. 1442-1449, 2015.

ESTRUCH, M. et al. Inflammatory intracellular pathways activated by electronegative LDL in monocytes. **Biochim Biophys Acta,** v. 1861, p. 963-969, 2016.

EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. JOEP PERK et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 19, n.4, p. 585-667, 2012.

FARSKY, S. H. P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation: A direct vital microscopic

study. **J Leukoc Biol.,** v. 57, n. 3, p. 379-386, 1995.

FAULIN, T. E. S. et al. Validation of a novel ELISA for measurement of Electronegative LDL. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, n. 12, p. 1769-1775, 2008.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 161-171, 2005.

FERREIRA, M. S. S. et al. Efeito de diferentes fármacos anestésicos na glicemia e colesteronemia de camundongos (Mus musculus) diabéticos. **Encontro de Engenharia de Sistemas**, v. 1, p. 632-637, 2008.

FIGUEIREDO, R. C. **Efeitos da gradisina sobre o sistema hematopoético em camundongos.** 2006. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2006.

FIGUEROA, A. L. et al. Measurement of arterial activity on routine FDG PET/CT images improves prediction of risk of future CV events. **JACC Cardiovasc Imaging**, v. 6, p. 1250–1259, 2013.

FITCH, J. C. K.; ROLLINS, S.; MATIS, L. Pharmacology and biological efficacy of recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. **Circulation,** v. 100, p. 2499–2506, 1999.

FORCE, R. W.; PUGMIRE, B. A.; CULBERTSON, V. L, Comparing medical cost of care for patients with MBC receiving taxane therapy: claims analysis. **American Health and Drug Benefits**, v. 3, p. 276–284, 2010.

FOWLER, J. S.; IDO, T. Initial and subsequent approach for the synthesis of ^{18}FDG. **Semin Nucl Med**, v. 32, n. 1, p. 6–12, 2012.

FRIEDMAN, E. A. Diabetic nephropathy: strategies in prevention and management. **Kidney Int,** v. 21, p. 730–738, 1982.

GALLAGHER, B. M. et al. Metabolic trapping as a principle of oradiopharmaceutical design: some factors resposible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. **J Nucl Med**, v. 19, n. 10, p. 1154–61, 1978.

GAO, H. et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. **Scientific Reports**, v. 3, p. 25-34, 2013.

GAVINS, F. N. Intravital microscopy: new insights into cellular interactions. **Curr**

Opin Pharmacol, v. 12, n. 5, p. 601-607, 2012.

GEORGE, J. et al. Adoptive Transfer of ß2-Glycoprotein I–Reactive Lymphocytes Enhances Early Atherosclerosis in LDL Receptor–Deficient Mice. **Circulation,** v. 102, p. 1822-1827, 2000.

GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718-723, 1999.

GIL, P. R. et al. Correlating Physico-Chemical with Toxicological Properties of Nanoparticles: the present and the future. **ACS Nano**, v. 4, n. 10, p. 5527-5531, 2010.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, v. 104, p. 503–516, 2001.

GRÆBE, M. et al. Molecular pathology in vulnerable carotid plaques: correlation with [18]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET). **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 37, p. 714–721, 2009.

GREAVES, D. V.; CHANNON, K. M. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 535-541, 2002.

GROSSO, D. M. et al. Antibodies against electronegative LDL inhibit atherosclerosis in LDLr-/- mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 12, p. 1086-1092, 2008.

GU, L. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Mol Cell**, v. 2, p. 275–281, 1998.

GUO, H. et al. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. **Nat Med**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.

HAFNER, A. et al. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1005-1023, 2014.

HAGEMANN, C. et al. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. **World J Clin Oncol**, v. 3, n. 5, p. 67–79, 2012.

HANSSON, G. K. Immune Mechanisms in Atherosclerose. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1876-1890, 2001.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K.; SODERBERG-NAUCLER, C. Inflammation

and Atherosclerosis. **Annu Rev Pathol Mech Dis**, v. 1, p. 297–329, 2006.

HERMANSSON, A. et al. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. **J Exp Med,** v. 207, n. 5, p. 1081-1093, 2010.

HERMANSSON, A. et al. Immunotherapy with tolerogenic apolipoprotein B-100-loaded dendritic cells attenuates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Circulation,** v. 123, p. 10, p. 1083-1091, 2011.

HEVONOJA, T. et al.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.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarreiers entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cell Mol Life Sci,** v. 66, n. 17, p. 2873-2896, 2009.

HINSHAW, J.E. Dynamin and its role in membrane fission. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 483-519, 2006.

HOESCHEN, C.; RAFECAS, M.; ASPELMEIER, T. **Radiation Physics for Nuclear Medicine**, New York: Springer, p. 211–232, 2011.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat Biotechnol**, v.23, p. 1126-1136, 2005.

HONGHUI, Y. et al. Scavenger receptor A (SRA) is required for LPS-induced TLRa mediated NF-kB activation in macrophages. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, p. 1192-1198, 2012.

HUO, Q. P. et al.. Effects of Wenxiao decoction on the expression of IL-6, ICAM-1, MCP-1 in experimental atherosclerotic rabbits. **Chin J. Integr. Med,** v. 20, n. 6, p. 445-449, 2014.

IMAGEJ. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/pdfs/examples.pdf ImageJ.nih.gov>. Acesso em 14 set 2016.

IRVING B. Nanoparticle drug delivery systems. *Inno. Pharm. Biotechnol.* 2007; 24: 58–62.

ISHII, H. et al. Comparison of atorvastatin 5 and 20 mg/d for reducing F-18 fluorodeoxyglucose uptake in atherosclerotic plaques on positron emission tomography/computed tomography: a randomized, investigator-blinded, open-label, 6-month study in Japanese adults scheduled for percutaneous coronary intervention. **Clin Ther**, v. 32, p. 2337–2347, 2010.

ITABE, H. Oxidative Modification of LDL: Its Pathological Role in Atherosclerose. **Clinic. Rev. Allerg. Immunol**, v. 37, p. 4-11, 2008.

IVANOV, A. I. Pharmacological inhibition of endoytic pathways: is it specific enough to be useful? **Methods Mol. Biol.,** v. 44, p. 15-33, 2008.

IVERSEN, T. G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. **Nano Today,** v. 6, n. 2, p. 176-185, 2011.

IZQUIERDO-GARCIA, D. et al. Comparison of methods for magnetic resonance-guided [18-F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography in human carotid arteries: reproducibility, partial volume correction, and correlation between methods. **Stroke**, v. 40, p. 86–93, 2009.

JAGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by barying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

JAGER, S. C.; KUIPER, J. Vaccination strategies in atherosclerosis. **Thromb Haemost**, v. 106, p. 796-803, 2011.

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**. v. 358, p. 37-54, 2005.

JIANG, J.; OBERDOORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J Nanopart Res,** v. 11, p. 77-89, 2009.

JONER, M. H, et al.. Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 1960–1966, 2008.

JOSHI, N. V. et al. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. **Lancet**, v. 383, p. 705–713, 2014.

JOSHI, N. V. et al. Systemic Atherosclerotic Inflammation Following Acute Myocardial Infarction: Myocardial Infarction Begets Myocardial Infarction. **J Am Heart Assoc**, v. 4, p. e001956, 2015.

JUN, L. et al. Effects of nasal immunization of multi-target preventive vaccines on atherosclerosis. **Vaccine**, v. 30, p. 1029-1037, 2012.

JUN-JUN, W. et al. Correlation between susceptibility of LDL subfractions to in vitro oxidation and in vivo oxidized LDL. **Clin Biochem**, v. 33, n. 1, p. 71-73, 2000.

KAZUMA, S. M. et al. Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. **MAbs,** v. 5, n. 5, p. 763-775, 2013.

KETELHUTH, D. et al. Cell-based Therapies for Atherosclerosis. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 33, p. 5850-5858, 2013.

KETELHUTH DF, HANSSON GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: Break of tolerance in the artery wall. **Thromb Haemost,** v. 106, n. 5, p. 779-86, 2011.

KETELHUTH, D. et al. Identification of a Danger-Associated Peptide From Apolipoprotein B100 (ApoBDS-1) That Triggers Innate Proatherogenic Responses. **Circulation**, v. 124, n. 22, p. 2433-2443, 2011.

KETTIGER, H.; SCHIPANSKI, A.; WICK, P.; HUWYLER, J. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. **Intern Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3255-3269, 2013.

KHOEE, S.; YAGHOOBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 6, p. 2392-2399, 2010.

KIRI, H. et al. Lack of Interlecukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis inApoE-deficiente mice. **Arterioscler Thromb Vas. Biol**, v. 23, p.656-660, 2003.

KLINGENBERG R, KETELHUTH DF, STRODTHOFF D, GREGORI S, HANSSON GK. Subcutaneous immunization with heat shock protein-65 reduces atherosclerosis in Apoe(-/-) mice. **Immunobiology**, v. 217, n. 5, p. 540-547, 2011.

KOBAYASHI, K. et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. **J Lipid Res**, v. 44, n. 4, p. 716-26, 2003.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B.**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KOVANEN, P. T.; PENTIKAINEN, M. O. Ciruclating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. **Curr Opin Lipidol**, v.14, n. 5, p. 411-419, 2003.

KEMMERER, M. et al. AMP-Activated protein kinase interacts with the peroxisome proliferator-activated receptor delta to induce genes affecting fatty acid oxidation in human macrophages. **Plos One,** v. 10, p. e0130893. 2015.

KRPETIC, Z. et al. Phagocytosis of biocompatible gold nanoparticles. **Langmuir,** v. 26, n. 18, p. 14799-14805, 2010.

KRUG, H. F.; WICK, P. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. **Angew Chem Int Ed Eng,** v.50, n.6, p. 1260-1278, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins e Cotran: patologia, bases patológicas de doenças.** Tradução da 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap.11, p. 549, 2005.

KUMARI, S.; MG, S.; MAYOR, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. **Cell Res,** v. 20, n. 3, p. 256-275, 2010.

KUNJATHOOR, V. V. et al. 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, p. 49982– 49988, 2002.

KZHYSHIKOWSKA, J.; NEYEN, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. **Immunobiology**, v. 5, p. 492-502, 2012.

LADEIRAS-LOPES, R. et al. Atherosclerosis: Recent trials, new targets and future directions. **International Journal of Cardiology**, v. 192, p. 72–81, 2015.

LAGINHA, K. M. et al. Bioavailability and therapeutic efficacy of HER2 scFv-targeted liposomal doxorubicin in a murine model of HER2-overexpressing breast cancer. **Journal of Drug Targetin**. v. 16, p. 605–610, 2008.

LAHOUTE, C. et al. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. **Nat. Rev. Cardiol.** v. 8, p. 348–358, 2011.

LATZ, E.; XIAO, S.; STUTZ, S. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 10.1038/nri3452, 2013.

LEE, F. H. et al. The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. **F. Nutr**., v.119, p. 1893-1899, 1989.

LEEUWEN, M. V. et al. Accumulation of Myeloperoxidase-Positive Neutrophils in Atherosclerotic Lesions in LDLR/Mice. **Artheroscl Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 84-

89, 2008.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P. V. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 1, p. 39-75, 2010.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature,** v. 420, p. 868-874, 2002.

LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, sup. 456S-460S, 2006.

LIBBY, P.; LICHTMAN, A. H.; HANSSON, G. K. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. **Immunity**, v. 38, p. 1092-1104, 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation,** v. 105, p. 1135-1143, 2002.

LIOPO, A. et al. Biocompatible Gold Nanorod Conjugates for Preclinical Biomedical Research. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 3, n. S2, 2012.

LIU, G. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4+CD25+ T cells in mice. **Immunol. Cell Biol,** v. 89, p. 130–142, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOBATTO, M. E. et al. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.10, p.835-852, 2011.

LOBO, J. et al. Electronegative LDL and lipid abnormalities in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. **Nephron Clin Pract,** v. 108, n. 4, p. 298-304, 2008.

LUNDBERG, A. M.; HANSSON, G. K. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clinical Immunology**, v. 134, p. 5–24, 2010.

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

MACIA, E. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. **Dev Cell,** v. 10, n. 6, p. 839-850, 2006.

MALLAT, Z. et al. Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. **Circulation**

Research, v. 85, p. 17-24, 1999.

MALLAT, Z. et al. Inhibition of Transforming Growth Factor-β Signaling Accelerates Atherosclerosis and Induces an Unstable Plaque Phenotype in Mice. **Circulation Research**, v. 89, p. 930-934, 2001.

MARANHÃO, A.; BRIGIDO, M. M. Anticorpos Humanizados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 38-43, 2001.

MARANHÃO, R. C. et al. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids,** v. 32, n. 6, p. 627-633, 1997.

MARNANE, M. et al. Carotid plaque inflammation on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts early stroke recurrence. **Ann Neurol**, v. 71, p. 709–718, 2012.

MAXIMOV, V. D. et al. Protein–nanoparticle conjugates as potential therapeutic agents for the treatment of hyperlipidemia. **Nanotechnology,** v. 21, n. 26, p. 265103, 2010.

MC MAHON, M.; HAHN, B. H. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus mechanistic basic of the association. **Current Opinion in Imunnology**, v. 19, p. 633-639, 2007.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, p. 135–145, 2001.

MELLO, A. P. et al. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact in health and disease. **Atherosclerosis**, v. 2, p. 257-265, 2011.

METHE, H. et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive mono- cytes in patients with acute coronary syndrome. **Circulation**, v. 111, p. 2654–2661, 2005.

MILIOTI, N. et al. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin Dev Immunol**, v. 723539, 2008.

MILLER, Y. I. et al. 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. 1561-1568, 2003.

MILLER, Y. I. et al. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. **Subcell Biochem**, v. 51, p. 229-51, 2010.

MITRA, S. et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. **Am J Med Sci**, v. 342, n. 2, p. 135–142, 2011.

MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Physical approaches to biomaterial design. **Nature Mater**, v. 8, p. 15–23, 2009.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONOPOLI, M. P. et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nat.Nanotechnol,** v. 7, n. 12, p. 779-786, 2012.

MOTOYAMA, S. et al. Computed tomographic angiography characteristics of atherosclerotic plaques subsequently resulting in acute coronary syndrome. **J Am Coll Cardiol** 54: 49–57, 2009.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis Beyond Lipid Uptake. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, p. 1702- 1711, 2006.

NAGAO, G. et al. Role of Lipid Rafts in Phagocytic Uptake of Polystyrene Latex Microspheres by Macrophages. **Anticancer Research**, v. 30, p. 3167-3176, 2010.

NAGLE, T. et al. The further evolution of biotech. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 75-9, 2003.

NEVES, S. M. P. et al. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.** São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Química, Biotério de Produção e Experimentação**.** v. 1, p. 216, 2013.

NICCOLI, G. et al. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. **Atherosclerosis**, v. 223, p. 166-170, 2012.

NILSSON, J.; HANSSON, G. K. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control? **J Inter Med**, v. 263, p. 464-478, 2008.

NILSSON, J.; HANSSON, G. K.; SHAH, P. K. Immunomodulation of Atherosclerosis: Implications of Vaccine Development. **Atheroscler Thromb Vasc. Bio,** v. 25, p. 18-28, 2005.

NOLTING, D. D. et al. Molecular imaging probe development: a chemistry perspective. **Am J Nucl Med Mol Imaging**, v. 2, n. 3, p. 273-306, 2012.

OBAID, D. R. et al. Atherosclerotic plaque composition and classification identified by

coronary computed tomography: assessment of computed tomography-generated plaque maps compared with virtual histology intravascular ultrasound and histology. **Circ Cardiovasc Imaging**, v. 6, p. 655–664, 2013.

OGAWA, M. et al. What can be seen by 18F-FDG PET in atherosclerosis imaging? The effect of foam cell formation on 18F-FDG uptake to macrophages in vitro. **J Nucl Med,** v. 53, p. 55–58, 2012.

OLIVEIRA, J. A. et al. Minimally modified (electronegative) LDL- and anti-LDL-autoantibodies in diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. **Intern J Atheros**, v. 1, p. 42-44, 2006.

O'NEIL, C. P. et al. Extracellular matrix binding mixed micelles for drug delivery applications. **J Control Release,** v. 137, p. 146–151, 2009.

ONOUE, S.; YAMADA, S.; CHAN, H. K. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety, **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1025-1037, 2014.

ORBAY, H. et al. Positron emission tomography imagin of atherosclerosis. **Theranostics**, 3 (11): 894-902, 2013.

OTSUI, K. et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. **Heart Vessels**, v. 22, p. 416–422, 2007.

PAIGEN, B. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. **Atherosclerosis**, v. 64, p. 215-221, 1987.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório.** Salvador: FIOCRUZ, 2013.

PARASASSI, T. et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). **Free Radic Biol Med**, v.31, n.1, p.82-89, 2001.

PATEL, P. C. et al. Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. **Bioconjug Chem,** v. 21, n. 12, p. 2250-2256, 2010.

PEDERSEN, S. F. et al. Gene expression and 18FDG uptake in atherosclerotic carotid plaques. **Nucl Med Commun**, v. 31, p. 423–429, 2010.

PEDROSA, A. M. C. et al. Electronegative LDL-induction of apoptosis in macrophages. Involvement of Nrf2. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1801, n. 4, p. 430-437, 2010.

PELUFFO, G.; RADI, R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovasc Res**, v.75, n.2, p.291-302, 2007.

PEREIRA, I. R. et al. Effects of soy germ isoflavones and hormone therapy on nitric oxide derivatives, low-density lipoprotein oxidation, and vascular reactivity in hypercholesterolemic postmenopausal women. **Menopause,** v. 13, p. 942-950, 2006.

PEREIRA, E. C. et al. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. **Clin Biochem,** v. 41, p. 1454-60, 2008.

PETERSON, E.; OWENS, S. M.; HENRY, R. L. Anticorpo monoclonal Forma e Função: Produção de Anticorpos direito para tratar do Abuso de Drogas. **AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E383-E390, 2006.

PFEIFFER, A. et al. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. **Eur J Immunol**, v. 31, p. 3153- 3164, 2001.

POLETTO, F. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Uma pequena grande revolução. Artigo de revista. **Ciência Hoje**, v. 43, n. 255, p 26-31, 2008.

PSARROS, C. et al. Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis. **Nanomedicine,** v. 8, p. S59-S68, 2012.

QUINTANAR, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 24, p.1113–1128, 1998.

RE, F. et al. Functionalization of liposomes with ApoE-derived peptides at diferente density affects cellular uptkae and drug transport across a blood-brain barrier model. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, p. 551-559, 2011.

REAPE, T. J.; GROOT, P. H. Chemokines and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 147, p. 213-225, 1999.

REFF, M.; HEARD, C. A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 40, p. 25-35, 2001.

RIMA, W. et al. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 181-195, 2013.

ROBERT, R. et al. Identification of Human scFvs Targeting Atherosclerotic Lesions: Selection by single round in vivo phage display. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40135–40143, 2006.

ROGERS, I. S. et al. Feasibility of FDG imaging of the coronary arteries: comparison between acute coronary syndrome and stable angina. **JACC Cardiovasc Imaging**, v. 3, p. 388–397, 2010.

ROMINGER, A. et al. 18F-FDG PET/CT identifies patients at risk for future vascular events in an otherwise asymptomatic cohort with neoplastic disease. **J Nucl Med**, v. 50, p. 1611-1620, 2009.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos components do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem Inst Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

ROSKOS, L. K.; DAVIS, C. G.; SCHWAB, G. M. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies. **Drug Dev Res**, v. 61, n. 108-120, 2004.

RUDD, J. H. F. et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. **Circulation**, v. 105, n. 23, p. 2708-2711, 2002.

RUDD, J. H.; MACHAC, J.; FAYAD, Z. A. Simvastatin and plaque inflammation. J**. Am Coll Cardiol**, v. 49, p. 1991, 2007.

RUDD, J. H. F. et al. Atherosclerosis inflammation imaging with 18F-FDG PET: carotid, iliac and femoral uptake reproducibility, quantification methods and recommendations. **J Nucl Med**, v. 49, n. 6, p. 871-878, 2008.

SAHA, P. et al. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in aterosclerosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 109-118, 2009.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release,** v. 145, p.182–195, 2010.

SALVAYRE, R. et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1585, n. 2–3, p. 213–221, 2002.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. **Diabetologia**, v. 39, n. 12, p. 1469-76, 1996.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Effect of sinvastatin 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. et al. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 7, p. 3243-9, 2001.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Density distribution of eletronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. **Journal of Lipidic Research**, v. 43, p. 699-705, 2002.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. 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.; VILLEGAS, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoclycan binding. **Curr Opin Lipidol**, v. 23, p. 479-486, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIOPU, A. et al. Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis. **Circulation**, v. 10, p. 2047-2052, 2010.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. **Curr Atheroscler Rep**, v. 2, p. 430–436, 2002.

SCHOENHAGEN, P.; TUZCU, E. M. Métodos por Imagem da Aterosclerose em Estudos de Progressão/Regressão: Marcador Substituto ou Janela Direta para o Processo Patológico da Aterosclerose? **Arq Bras Cardiol**, v. 91, n. 6, p. 418-431, 2008.

SHAH, S. V. et al. Novel mechanisms in accelerated atherosclerosis in kidney disease. **J Ren Nutr,** v. 1, p. 65-69, 2008.

SHARIFI, S. et al. Toxicity of nanomaterials. **Chem Soc Rev.**, v. 41, n. 6, p. 2323-2343, 2012.

SHASHKIN, P.; DRAGULEV, B.; LEY, K. Macrophage Differenciation to Foam Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 3061-3072, 2005.

SHEIKINE, Y.; HANSSON, G. K. Chemokines and atherosclerosis. **Ann Med**, v. 36, p. 98–118, 2004.

SHEN, Z. et al. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Anal Chem**, v. 80, n. 6, p. 1910-7, 2008.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 50, p. 334-343, 2006.

SNIDERMAN, A. D. et al. The causal exposure model of vascular disease. **Clin Sci**, v.122, p. 369e-373e, 2012.

SNIDERMAN, A.; KWITEROVICH, P. O. Update on the detection and treatment of atherogenic low-density lipoproteins. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes,** v. 20, p. 140-147, 2013.

SOM, C. et al. Enviromental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings. **Envirom Int,** v. 37, n. 6, p. 1131-1142, 2011.

STEPHAN, Z. F.; YURACHEK, E.C. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 325-330, 1993.

STOCKER, R.; KEANEY, J. R. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiol Rev.**, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

STOLL, G.; BENDSZUS, M. Inflamation and Atherosclerosis: Novel Insights Into Plaque Formation and Destabilization. **Journal of the American Heart Association**, v. 37, p. 1923-1032, 2006.

SUN, B. et al. Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. **J Lipid Res,** v. 48, p. 2560–2570, 2007.

TAHARA, N. et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. **J Am Coll Cardiol**, v. 48, p. 1825–1831, 2006.

TANSIL, N. C.; GAO, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **Nanotoday**, v. 1, n. 1, p. 28-37, 2006.

TARKIN, J. M.; JOSHI, F. R.; RUDD, J. H. F. Pet imaging of inflammation in atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 11, p. 443-457, 2014.

TAVARES, E. R. et al. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with

etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **Nanomedicine**, v. 6, p. 2297-2304, 2011.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol Rev**, v. 86, p. 515–581, 2006.

THIE, J. A. Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1431–1434, 2004.

THIM, T. et al. Wall shear stress and local plaque developmente in stenosed carotid arteries of hypercholesterolemic minipigs. **Journal of Cardiovascular Disease Research**, v. 3, n. 2, p. 76-83, 2012.

TOTH, P. P. et al. Cardiovascular risk in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol and particle targets. **Atherosclerosis**, v. 235, p. 585-591, 2014.

TSIMIKAS, S. et al. Human oxidation-specific antibodies reduce foam cell formation and atherosclerosis progression. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, n. 16, p. 1715-1727, 2011.

UCHIYAMA, M. K. et al. In vivo and in vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticles bioconjugates to the vascular system. **Toxicol Sci**, v. 142, n. 2, p. 497-507, 2014.

VANHEULE, E. et al. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. **Int J Exp Pathol,** v. 89, n. 6, p. 419-32, 2008.

VIGOR, K. L. et al. Nanoparticles functionalised with recombinant single chain Fv antibody fragments (scFv) for the magnetic resonance imaging of cancer cells. **Biomaterials**, v. 31, p. 1307–1315, 2010.

VONARBOURG, A. et al. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials,** v. 27, p. 4356–4373, 2006.

WAKATSUKI, T. et al. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 1025-1036, 2001.

WANG, H.; WU, L.; REINHARD, B. M. Scavenger receptors mediated endocytosis of silver nanoparticles into J774.1 macrophages is heterogeneous. **ACS Nano,** v. 6, n. 8, p. 7122-7132, 2012.

WANROOIJ, E. J. A. et al. Interruption of the Tnfrs4/Tnfs4 (OX40/OX40L) Pathway

Attenuates Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, p. 204-210, 2006.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.3, n.12, p.1-6, 2008.

WILLY ORGANIC CHEMISTRY. Disponível em: <https://sites.google.com/a/edmail.edcc.edu/willy-organic-chemistry-e-portfolio/cholesterol/5-low-density-lipoprotein-ldl-a>. Acesso em 16 set 2016.

WINZEN, S. et al. Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition. **Nanoscale**, v. 7, n. 7, 2015 10.1039/c4nr05982d.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Causes of death 2008**. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/ global_burden_disease/ cod_2008_sources_methods.pdf, 2008>. Acesso em: 15 set 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Causes of death 2008**. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/ global_burden_disease/ cod_2010_sources_methods.pdf., 2011>. Acesso em: 10 set de 2016.

XU, X. H. et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. **Circulation**, v. 104, p. 3103–3108, 2001.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clin Chim Acta,** v. 411, p. 1570-1579, 2010.

YAMAGUCHI, K. et al. Activating transcription factor 3 and early growth response 1 are the novel targets of LY294002 in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 2376-2384, 2006.

YANG, H.; MOHAMED, A. S. S.; ZHOU, S. Oxidized low density lipoprotein, stem cells and atherosclerosis. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 85, 2012.

YU, S. Review of 18F-FDG Synthesis and Quality Contol. **Biomed Imaging Interv J**, v. 2, n. 4, p. e57, 2006.

ZIELLO, J.; HUANG, Y.; JOVIN, I. S. Cellular Endocytosis and Gene Delivery. **Mol Med**., v. 16, n. 5-6, p. 222-229, 2010.

ZIOUZENKOVA, O. et al. 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.

ZHOU, J. J. et al. DEC205-DC target DNA vaccine to CX3CR1 and CCL2 are potent and limit macrophage migration. **Int J Clin Exp Med**, v. 5, n. 1, p. 24-33, 2012.

ZOHARA, S.; GHANIM, H.; GILLOTTI, K. M. et al. Flow cytometry and gene expression profiling of immune cells of the carotid plaque and peripheral blood. **Atherosclerosis,** v. 229, p. 338-347, 2013.

ZOHLNHÖFER, D. et al. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1β–Dependent Expression of Interleukin-6 in Endothelial Cells. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 353-359, 2000.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 – SOLUÇÕES E TAMPÕES

Isolamento e caracterização de LDL(-):

- **Coquetel antioxidante**

BHT (Hidroxitolueno butilado) 0,2 M
Aprotinina 2 µg/mL
Benzamidina 0,02 M
Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,01 M

- **Tampão A para purificação por FPLC**

Tris-HCl 0,2 M
EDTA 0,01 M
pH = 7,4

- **Tampão B para purificação por FPLC**

Tris-HCl 0,2 M
NaCl 1 M
EDTA 0,01 M
pH = 7,4

- **Tampão de amostra para gel de agarose 10X**

Tampão de corrida TAE 20X 50% (v/v)
Glicerol 50% (v/v)
Azul de bromofenol 0,1% (p/v)
Xileno cianol 0,1% (p/v)

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

Tris-acetato 2M
Ácido acético 1 M
EDTA 0,5 M

pH 8,4 - Concentração de uso 1x.

- **Solução corante para coloração de gel por *Comassie Brilliant Blue***

Etanol 30% (v/v)

Ácido Acético 10% (v/v)

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

- **Solução descorante para coloração de gel por *Comassie Brilliant Blue***

Etanol 30% (v/v)

Ácido Acético 10% (v/v)

Expressão de scFv anti-LDL(-) em *Pichia pastoris*:

- **Meio de crescimento- BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*)**

Extrato de levedura 1%

Peptona de Caseína 2%

Tampão Fosfato 0,1 M pH 6,0

YNB 13,4%

Biotina $4x10^{-5}$ % (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

Casaminoácidos 2%

- **Meio de crescimento- BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*)**

Extrato de levedura 1%

Peptona de Caseína 2%

Tampão Fosfato 0,1 M pH 6,0

YNB 13,4%

Biotina $4x10^{-5}$ % (p/v)

Casaminoácidos 2%

Metanol 3% (v/v)

O tampão fosfato de potássio e o glicerol devem ser esterilizados em autoclave, enquanto biotina, casaminoácidos e YNB devem ser esterilizados por filtração em membrana de 0,22µm. Se necessário, o volume deve ser completado com água estéril.

- **YNB (Yeast Nitrogen Base) - Solução estoque 10x**

YNB (Sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) 3,4% (p/v)

Sulfato de Amônio 10% (p/v)

H_2O qsp 100 mL

- **Biotina - Solução estoque 500x**

Biotina 0,02% (p/v)

H_2O qsp 100 mL

- **Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0**

K_2HPO_4 0,132 M

KH_2PO_4 0,868 M

H_2O qsp 1000 mL

- **Solução estoque para inibidor de protease**

PMSF 0,2 M

Dissolução em isopropanol. Concentração de uso de 0,01 M.

Purificação de scFv anti-LDL(-) em resina de Níquel:

- **Tampão de ligação**

NaH_2PO_4 20 mM

NaCl 0,5 M

Imidazol 30 mM

H_2O qsp 1000 mL

pH = 7,4

- **Tampão de eluição**

NaH_2PO_4 de sódio 20 mM

NaCl 0,5 M

Imidazol 500 mM

H_2O qsp 1000 mL

pH = 7,4.

Purificação de proteínas glicosiladas em resina de Concanavalina A:

- **Tampão de ligação**

Tris-HCl 0,02 M
NaCl 0,5 M
MnCl2 0,001 M
CaCl2 0,001 M
H_2O qsp 1000 mL
pH = 7,4

- **Tampão de Eluição**

Tris-HCl 0,02 M
NaCl 0,5 M
Metil-α-D-manopiranosídeo 0,5 M
H_2O qsp 1000 mL
pH = 7,4

Eletroforese de proteínas:

- **Tampão de corrida para SDS-PAGE 10x**

Tris Base 0,25 M
Glicina 2,5 M
SDS 1% (p/v)
H_2O qsp 1000 mL.
pH = 7,4

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 2x**

Tris pH 6,8 100 mM
SDS 4%
Glicerol 20%
Bromofenol 0,2%
β -mercaptoetanol 5%
H_2O qsp 10 mL

- **Gel para SDS-PAGE**

Solução A:
Acrilamida 30%
Bis-acrilamida 8%
H_2O qsp 100 mL

Solução B:
Tris-HCl 0,5 M
SDS 0,4% (p/v)
H_2O qsp 100 mL
pH 8,8

Solução C:
Tris-HCl 1,5 M
SDS 0,4% (p/v)
H_2O qsp 100 mL
pH 8,8

- **Gel concentrador para SDS-PAGE**

Solução A 13% (v/v)
Solução B 25 % (v/v)
Persulfato de amônio 10% (v/v)
Temed 0,001% (v/v)
H_2O qsp 2,5 mL

- **Gel de separação (12% de acrilamida) para SDS-PAGE**

Solução A 40% (v/v)
Solução C 25 % (v/v)
Persulfato de amônio 10% (v/v)
Temed 0,003% (v/v)
H_2O qsp 7,5 mL

Coloração de gel com prata:

- **Solução Fixação e Preservação**

Metanol 50% (v/v)
Ácido Acético 12% (v/v)
Formaldeído 0,05% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

- **Solução de Lavagem**

Etanol 50% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

- **Solução de Sensibilização**

Tiossulfato de sódio 0,03% (p/v)
Etanol 50% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

- **Solução de Coloração**

Nitrato de Prata 0,2% (p/v)
Formaldeído 0,07% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

- **Solução de Revelação**

Na_2CO_3 6% (p/v)
Formaldeído 0,05% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

- **Solução de Bloqueio**

Metanol 50% (v/v)
Ácido Acético 12% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

- **Solução de Fixação**

Metanol 50% (v/v)
H_2O qsp 250 mL

O formaldeído deve ser adicionado às soluções em questão apenas no momento do uso.

Western Blotting:

- **Tampão PBS 10x**

$Na_2HPO_4.H_2O$ 0,07 M
KH_2PO_4 0,01 M
NaCl 1,4 M
KCl 0,02 M
H_2O qsp 1000 mL
pH 7,4

- **PBST (PBS- Tween)**

PBS 1x
Tween 20 0,05%
pH 7,4

- **Tampão de Transferência para *Western Blotting***

Glicina 1,44% (p/v)
Tris Base 0,3% (p/v)
Metanol 20% (v/v)
H_2O qsp 1000 mL

Isolamento de monócitos humanos primários:

- **Tampão de lavagem**

PBS 1X
EDTA 0,5 M

- **Tampão de corrida**

PBS 1X
EDTA 0,5 M
BSA 0,5% (v/v)

Coloração por Oil Red O:

- **Solução estoque de Oil Red**

Oil Red O 0,5%
Diluído em isopropanol.

- **Solução de trabalho de Oil Red**

Solução estoque 6 mL
Diluído em 6 mL de água destilada. Esta solução foi filtrada em papel filtro Whatman® e foi preparada somente no momento do uso.

- **Solução de fixação das células**

Formaldeído 10% (v/v) diluído em PBS 1X

Coloração por Light Green:

- **Solução corante**

Light Green 2% (p/v)
Ácido acético glacial 2% (v/v)
H_2O qsp 1000 mL

Outras soluções:

- **Solução Ringer-Locke**

NaCl 0,9% (p/v)
KCl 0,042% (p/v)
$CaCl_2.2\ H_2O$ 0,024% (p/v)
$NaHCO_3$ 0,02% (p/v)
Glicose 1 % (p/v)
H_2O qsp 1000 mL

- **Água DEPC**

DEPC (Dietilpirocarbonato) 0,1% (p/v)

H_2O qsp 1000 mL

Incubar a 37 °C durante 12 horas. Em seguida, autoclavar para remover quaisquer traços de DEPC.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE QUALIDADE EM BIOSSEGURANÇA

Ministério da Ciência e Tecnologia
BRASIL UM PAÍS DE TODOS

Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio
Secretaria Executiva

comissão técnica nacional CTNBio de biossegurança

Ofício CTNBio 1266 /2010

Brasília,23 de agosto de 2010

Ao Senhor
MARIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP.
Av. Prof. Lineu Prestes 580, Blocos 13A, Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira",
05508–900 – SÃO PAULO – SP

Assunto: **Encaminhamento de Pareceres Técnicos**

Ciente. Encaminhe-se cópia à Profa. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, para ciência do credenciamento do Laboratório de Bioquímica Clínica.

São Paulo, 02 / 09 / 2010

Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
Presidente da CIBio - FCF/USP
Nº USP 72297

Prezado Senhor,

Encaminhamos, anexas, cópias do Extrato de Parecer Técnico 2538/2010, publicado no DOU n.º155, Seção 1, p.12, de 13 de agosto de 2010, emitido pela CTNBio referente ao processo 01200.003570/1998-08 e a integra do Parecer Técnico.

Comunicamos que, conforme dispõe o inciso XI do artigo 5º, o artigo 39 e o § 2º do artigo 45 do Decreto 5.591/05, cópias da referida documentação foram encaminhadas aos órgãos de fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, do Ministério da Saúde e do Ministério do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

Atenciosamente,

Jairon Alcir Santos do Nascimento
Coordenador Geral da CTNBio

34668110

SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 10 - 14
Brasília , DF – CEP: 70610-200
Fones: (55)(61) 411 5151 / 411 5003 / 411 5516 FAX: (55)(61) 317.7475

A 90

Ministério da Ciência e Tecnologia

Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio
Secretaria Executiva

comissão técnica nacional CTNBio de biossegurança

PARECER TÉCNICO Nº 2538/2010

Processo nº: 01200.003570/1998-08
Requerente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
CQB: 090/98
Assunto: Solicitação de Extensão de CQB / NB-1
Data de Protocolo: 27/04/10
Próton: 16151/10
Extrato Prévio: 2359/10 publicado em 12/05/10
Reunião: 134ª Reunião ordinária da CTNBio, realizada em 24 de junho de 2010
Decisão: **DEFERIDO**

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à Solicitação de Extensão do CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança), concluiu pelo **deferimento**, nos termos deste Parecer Técnico.

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

PARECER TÉCNICO

1) Fundamentação técnica

O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da instituição solicitou a extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança nº 090/98, para credenciar o Laboratório de Bioquímica Clínica – Nível de Biossegurança 1 para pesquisa em regime de contenção, transporte, descarte, ensino e armazenamento de microrganismos geneticamente modificados da classe de risco 1. Foi enviada na documentação a declaração do responsável legal, planta baixa, descrição pormenorizada das instalações e informações relativas à biossegurança.

Trata-se de anexação de uma área de 35,61 m^2, constituindo o Laboratório referido acima, de nível NB 1, nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, para extensão do CQB. Será destinada no momento à realização de 3 projetos envolvendo o estudo da expressão de uma proteína recombinante denominada GFP5-scFv em bactéria que será usada para estudo imunológico do LDL eletronegativo, que pode ser útil na terapêutica da aterosclerose, entre outras alternativas. Foi anexada planta física do local, bem como a extensa lista de equipamentos que serão utilizados.

Os organismos serão *Escherichia coli* DH5-alfa, *Escherichia coli* BL21(DE3) e *Escherichia coli* SMD1168.

2) Medidas de biossegurança descritas no processo

Embora não haja descrição de detalhes, entendemos que as medidas de biossegurança são as mesmas que já vêm sendo tradicionalmente usadas na Faculdade, cuja CIBio conta com 7 membros (dos quais 5 professores) e 4 suplentes (dos quais 3 professores), cuja relação foi anexada ao processo.

A CTNBio esclarece que este parecer não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Dr. Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

ANEXO 3 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

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

Of. CIBio/0122012/FCF

5ão Paulo, 03 de julho de 2012

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Estudos *in vitro* e *in vivo* com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizados em nanocápsulas na aterosclerose experimental".

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

Atenciosamente,

Profa. Dra. TELMA MARY KANEKO
Membro da CIBio

Ilma. Sra.
Profa. Dra. DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP
NESTA

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadfcf.usp.br

ANEXO 4- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/114/2010
Protocolo CEP/FCF/557
CAAE: 0019.0.018.000-10

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	**Efeito da imunização passiva com nanopartículas derivatizadas com fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL**
Pesquisador Responsável:	**Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla**
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
Área Temática Especial:	Biossegurança
Patrocinadores:	CNPq

II - Sumário Geral do Protocolo:

As doenças coronárias estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo e a aterosclerose encontra-se no topo dessas doenças, sendo responsável por mais vítimas fatais do que todos os tipos de câncer combinados. A aterosclerose é uma doença crônico-inflamatória multifatorial com o envolvimento do sistema imunológico, tendo atuação da imunidade inata e adaptativa e sendo o resultado da interação de diferentes elementos celulares como linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. A LDL eletronegativa, uma fração modificada da LDL nativa, desempenha um papel-chave na aterosclerose, uma vez que as modificações sofridas pela molécula são capazes de induzir o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos e a subsequente formação de células espumosas. Uma vez confirmado o envolvimento do sistema imunológico no processo aterogênico, faz-se necessário manipular a sua ação, através do emprego de alternativas, como: a utilização de drogas imunossupressoras ou realização de uma imunização, seja ela passiva ou ativa. Anticorpos recombinantes têm sido gerados nas últimas décadas, através de técnicas de engenharia genética de anticorpos. Atualmente, além da utilização de anticorpos monoclonais (proteínas produzidas a partir de camundongos ou ratos e utilizadas em humanos), de uso limitado por sua significativa imunotoxicidade, também têm sido gerados anticorpos humanizados, como o F(ab')2 e fragmentos de anticorpos ativos, como o scFv, que podem ser gerados em bactérias como *Escherichia coli* e leveduras como a *Pichia pastoris*. O scFv representa a menor unidade funcional do anticorpo e acredita-se que possa ser utilizado como novas alternativas de tratamento contra o desenvolvimento da aterosclerose ou ainda como um fator preventivo para o surgimento da lesão. No intuito de aumentar a eficiência da ação do scFv no organismo, nanopartículas têm sido desenvolvidas e conjugadas a esses fragmentos, pois existe grande probabilidade deste sistema ter baixa imunogenicidade, adequada meia-vida na circulação, controle para o reconhecimento molecular do antígeno e remoção dos imunocomplexos pelo sistema imunológico.

Os objetivos do presente estudo são:

Geral: Investigar o efeito da imunização passiva pelo scFv 2C7 anti-LDL(-) e por nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) em camundongos *knockout* para receptor da LDL ($LDLR^{-/-}$) no modelo aterogênico.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Específico:

- Comparar o efeito do tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) em relação ao tratamento com as nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-).
- Investigar os efeitos do tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) e com as nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) sobre a expressão e atividade de Metaloproteinases (MMPs).
- Investigar os efeitos do tratamento com o scFv 2C7 anti-LDL(-) e com as nanopartículas conjugadas ao scFv 2C7 anti-LDL(-) sobre a expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos, presentes nas lesões ateroscleróticas.

Tipo de estudo: Transversal

Descrição da Casuística:

Serão selecionados 10 indivíduos, voluntários, número semelhante de homens e mulheres, para a coleta de sangue e a consequente obtenção de LDL(-). Os participantes serão convidados a participar do projeto por meio da divulgação interna da Universidade. O sujeito será instruído quanto ao objetivo e métodos do presente estudo, dará seu consentimento por escrito para sua inclusão na pesquisa, e serão coletados 30 mL de sangue.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Serão incluídos no estudo indivíduos sem doença cardiovascular, não-diabéticos (tipo I e II), não-fumantes, com pressão arterial normal (sistólica até 140 mmHg e diastólica até 90 mmHg), níveis de colesterol total até 200mg/dL e que não façam uso de medicamentos para diminuir lipídios, idade igual ou superior a 25 anos. Serão adotados cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador se sintam obrigados a participarem do estudo.

Serão critérios de exclusão:

Não serão incluídos no estudo indivíduos com doença cardiovascular, diabéticos (tipo I e II), fumantes, hipertensos (sistólica acima de 140 mmHg e diastólica acima de 90 mmHg), hipercolesterolêmicos (colesterol acima de 200mg/dL), usuários de medicamentos para diminuir lipídios, idade inferior a 25 anos, mulheres grávidas.

III – SITUAÇÃO DO PROTOCOLO: APROVADO em reunião de 27 de setembro de 2010.

O presente estudo será encaminhado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP para análise, por se tratar de área temática especial "Biossegurança" e o pesquisador responsável deverá aguardar a aprovação do projeto pela CONEP para dar início à pesquisa.

São Paulo, 29 de setembro de 2010.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

ANEXO 5 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 122013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto "**Estudos in vitro e in vivo com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizados em nanocápsulas na aterosclerose experimental: estudos com camundongos C57BL/6 LDLR-/-.**" (Protocolo CEUA/FCF/392), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Marcela Frota Cavalcante**, sob orientação/supervisão do(a) **Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 18 de fevereiro de 2013.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO 6 - DEPÓSITO DA PATENTE PI1106193-6

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 0624 / 2012

São Paulo, 20 de junho de 2012.

REF.: DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO "PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCAPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS"

Senhor(a) Professor(a),

Informamos a V.Sa. que o(s) pedido(s) de patente(s) em referência recebeu(ram) o(s) nº ***P.I. 1.106.193-6.***

Em 19.06.12 foi publicado na Revista Propriedade Industrial - RPI Nº. 2163, pág. 65, o item 2.10 (REQUERIMENTO DO PEDIDO DE PATENTE), conforme cópia(s) anexa.

Outrossim, comunicamos para os devidos fins que este pedido está sendo gerenciado pela equipe UFRGS.

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Cleide do Nasc. G. Vieira
Téc. Adm. de Apoio a Inovação

Ilmº(ª). Sr(ª).
Prof(ª). Dr(ª). DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
DEPTO: Análises Clínicas e Toxicológicas

AGÊNCIA USP INOVAÇÃO
AV. BRASIL, 1971- JARDIM PAULISTA - SÃO PAULO - S. P. 01431 – 001
TEL.: (11) 3091.4474 / 4415 - http://www.inovacao.usp.br - e-mail: inovacao@usp.br

ANEXO 7 - DEPÓSITO DA PATENTE 10 2012 025132-9

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 0398 / 2013

São Paulo, 12 de junho de 2013.

REF.: "BR 10 2012 025132-9 DE 02.10.2012"

Senhor(a) Diretor(a)

Informamos a V.Sa. que em 04.06.13 foi publicado na Revista da Propriedade Industrial - RPI Nº. 2213, pág. 109 o item 2.1 (NOTIFICAÇÃO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE), do(s) pedido(s) de patente(s) em referência, conforme cópia(s) anexa.

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Jussara S. Ferreira
Ch. Seç. Apoio a Inovação

Ilmº(ª). Sr(ª).
Prof(ª). Dr(ª). DULCINEIA SAES PARRA ABDALA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
DEPTO.: Análises Clínicas e Toxicológicas

c.c.

Ilmº(ª). Sr(ª).
ADALBERTO CHEIRAN - Assistente de Propriedade Intelectual
SEDETEC/UFRGS
Praça Argentina, s/n, Prédio Chateau
Porto Alegre – RS – 90040-020

Ilmº(ª). Sr(ª).
MÁRCIA ADJUTO BOAVENTURA ABRITTA AGUIAR – D.D. Coordenadora
Núcleo de Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia – NUPITEC
Gerência de Inovação e Transferência de Tecnologia – GITT
Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy Ribeiro - Edifício CDT - 70910-900

ANEXO 8 - ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Pharm Res
DOI 10.1007/s11095-014-1392-5

RESEARCH PAPER

New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(−) -functionalized nanocapsules

Eduardo A. Bender • Marcela F. Cavalcante • Márcia D. Adorne • Letícia M. Colomé • Sílvia S. Guterres • Dulcinéia S. P. Abdalla • Adriana R. Pohlmann

Received: 24 January 2014 / Accepted: 15 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

ABSTRACT

Purpose In general, the surface functionalization of polymeric nanoparticles is carried out by covalently bounding ligands to the nanoparticle surface. This process can cause a lack or decrease of the ligand specificity to its target receptor, besides the need of purification steps. We proposed a ligand-metal-chitosan-lecithin complex as a new strategy to functionalize the surface of biodegradable nanoparticles.

Methods One pot synthesis of scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules was carried out by self-assembly and interfacial reactions. Particle sizing techniques, lipid peroxidation and molecular recognition by enzyme linked immuno sorbent assays were carried out.

Results The selected formulation had unimodal size distribution with mean diameter of about 130 nm. The metals in the complex did not enhance the oxidative stress, and the scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules recognized LDL(−) and did not react with native LDL indicating the maintenance of the active site of the fragment.

Conclusions The one pot synthesis, using the ligand-metal-chitosan-lecithin complex to functionalize the surface of the biodegradable nanocapsules, maintained the active site of the antibody fragment making the device interesting for applications in nanomedicine.

KEY WORDS LDL single-chain fragment variable · ligand-metal-chitosan-lecithin · lipid-core nanocapsules · polycaprolactone

ABBREVIATIONS

DLS	Dynamic light scattering
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
LD	Laser diffractometry
LDE	Laser Doppler electrophoresis
LDL	Low density lipoprotein
LDL(−)	Electronegative low density lipoprotein
LNC	Lipid-core nanocapsules
MCMN	Metal complex multi-wall nanocapsules
MDA	Malondialdehyde
MN	Multi-wall nanocapsules
nLDL	Native low density lipoprotein
NTA	Nanoparticle tracking analysis
PCL	Poly(ε-caprolactone)
PDI	Polydispersity index
Phe	Phenylalanine

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11095-014-1392-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

E. A. Bender · M. D. Adorne · L. M. Colomé · S. S. Guterres
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS, Brazil

M. F. Cavalcante · D. S. P. Abdalla
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo
São Paulo, SP, Brazil

A. R. Pohlmann (✉)
Departamento de Química Orgânica and Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Instituto de Química
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PBOX 15003,
Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil
e-mail: pohlmann@iq.ufrgs.br

Published online: 08 May 2014

scFv anti-LDL(−)	Anti-electronegative LDL single-chain fragment variable
SPAN	Polydispersity
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEM	Transmission electron microscopy

INTRODUCTION

Nanotechnology has been impacting the development of new products in the past 20 years. Specifically in the field of human health, the evolution in nanomedicine has assumed an important role to improve therapy and diagnosis with potential applications in research, biomedicine or pharmaceutical and chemical industries (1–5). Different materials have been proposed to constitute the nanoparticles acting as drug delivery systems or diagnosis agents.

The use of nanoparticles for passive targeting based on the drug encapsulation, as well as for drug active targeting by nanoparticle surface functionalization and the use of nanoparticles suitable for *in vivo* monitoring have provided several advantages over methods traditionally employed (4–6). Among the main advantages of those nanoparticles, we can cite the development and/or improvement of diagnose or therapeutic methods, which provide better protection of drugs, nucleic acids, peptides, antibodies and other biomolecules, when compared to conventional approaches (7–9).

Different materials can be used to prepare nanoparticles such as ceramic, carbon nanotubes, organic polymers, lipids, metal oxides and metals. Nanomaterials (nanostructured materials) are in general formed by elements or organic molecules (1).

Among the biological applicability of metal nanostructures, their use to identify or combat microorganisms such as bacteria, fungi and viruses has been widely investigated (10). Furthermore, antibody-coated gold nanoparticles or other nanoparticles for viral detection as agents for images and for the development of immunodiagnostic kits have been described (5,11).

The active or passive targeting of nanoencapsulated drugs in the body depends on the physico-chemical characteristics of the nanocarriers rather than those of the drugs. Passive targeting is dependent of the distribution size, shape and wettability (hydrophilic surface) of the nanoparticles. Whereas, active targeting involve the use of site specific conjugates peripherally bound to the nanostructures, which allow the connections on particular sites in the body according to the specificity of the ligand with the target molecular system (4,6).

The nanoparticle surface functionalization with ligands, such as peptides, antibodies or antibody fragments is carried out primarily by conjugation methods (12). Those ligands are in general covalently bound either to the nanoparticle surface or to a linker molecule, such as poly(ethylene glycol) (6,13). Conjugation of the antibody can be random or site specific. Random conjugation can cause a lack of the ligand specificity, since the new chemical bond may occur exactly on the active site of the binding antigen. In this case, the ability of those particles to specifically binding to its target receptor might be decreased (4). On the other hand, a strategy of site specific binding assures full ligands activity. Besides, the one-pot syntheses of surface functionalized nanoparticles may constitute a versatile strategy to have different nanoparticles prepared with similar core-structures with a variety of ligands at their surface. The advantage of this strategy is the rapid and economic synthesis of surface-functionalized nanoparticles. Nevertheless, the challenge of that approach is to obtain the products in one-pot synthesis with no need of purification steps.

In the past few years, we developed two different structures: the lipid-core nanocapsules (14,15) and the spray-dried chitosan-metal microparticles (16). The former are nanocapsules containing a dispersion of caprylic/capric triglyceride and sorbitan monostearate, as core, poly(ε-caprolactone), as polymer hydrophobic wall, and polysorbate 80 micelles, as coating material to give the necessary wettability to prevent agglomeration of the nanoparticles in the aqueous phase. The latter structures are spray-dried microparticles of chitosan-metal complexes, which surface was cross-linked with glutaraldehyde. Earlier studies had investigated a metal complexation with chitin (chitosan precursor) by infrared and Mössbauer spectroscopy (17). The metal complex is formed as a chelate by coordinating with the oxygen and nitrogen atoms of the polysaccharide. Besides, recently we developed chitosan-coated lipid-core nanocapsules in aqueous turbid solution (18) demonstrating the technological feasibility of coating lipid-core nanocapsules, when lecithin is a co-surfactant. Moreover, we demonstrated the blood compatibility of those nanocapsules.

To raise our hypothesis we considered that the lipid-core nanocapsules are kinetically stable colloids (19) and showed to be a promising platform as drug delivery systems (20); additionally, we took into consideration that the spray-dried chitosan-metal microparticles are able to chemically bound ciprofloxacin by coordination with the metal complexed with the polysaccharide (16). In this way, we hypothesized that a lipid-core nanocapsule could constitute the core of a new nanoparticle having lecithin-chitosan, as coating, complexed with metals, which, in turns, could complex molecules or macromolecules having different organic functional groups containing heteroatoms such as oxygen, nitrogen, sulfur and phosphorus. The new nanoparticles were called "Metal Complex Multi-wall Nanocapsules" (MCMN).

Taking all above into consideration, our objective was to synthesize a new surface-functionalized nanoparticle by preparing lipid-core nanocapsules stabilized with lecithin-

polysorbate 80, coated with chitosan, which is complexed with iron or zinc to bind an antibody fragment. To validate our hypothesis, phenylalanine was used as ligand model to develop the nanoparticles, and the anti-electronegative LDL single-chain fragment variable [scFv anti-LDL(−)] was selected as example to demonstrate the application of the approach. To evaluate the potential contribution of the new nanoparticles to the oxidative stress, an *in vitro* lipid peroxidation assay, using liposomes as substrate, was carried out. Furthermore, to evaluate and guarantee the viability of the ligand, molecular recognition assays against native LDL (nLDL) and electronegative LDL subfraction [LDL(−)] were performed. If the tertiary structure of scFv anti-LDL(−) is intact after binding to the metal at the surface of the MCMN, the new nanoparticles would be able to distinguish native LDL and LDL(−), since this antibody fragment is specific for the latter. To validate the result, the molecular recognition was also performed using 2C7 monoclonal antibody to detect the specific binding in an enzyme linked immuno sorbent assay.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Poly(ε-caprolactone) (PCL) (α,ω-dihydroxy functional polymer; Mn: 10,000 g mol^{-1}, Mw: 14,000 g mol^{-1}), sorbitan monostearate (Span 60®), chitosan low molar weight (Mw: 50,000–190,000 g mol^{-1}, 75–85% deacetylated polymer), zinc acetate and iron (II) chloride tetrahydrate were supplied by Sigma-Aldrich Co. Caprylic/capric triglyceride and polysorbate 80 were delivered by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Lipoid S75 (soybean lecithin) was obtained from Lipoid (Germany). All aqueous solutions were prepared using deionized water (resistivity of 18.2 MΩ) obtained with a Millipore Direct-Q® system. Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, was obtained from Laborclin (Brazil). The solvents, acetone (analytical grade) and ethanol (analytical grade), were obtained from Nuclear (Brazil). All reagents were used as received.

One-pot Synthesis of the Surface-Functionalized Metal-Complex Multi-Wall Nanocapsules (MCMN)

In a flask, poly(ε-caprolactone) (0.1 g), sorbitan monostearate (0.04 g), caprylic/capric triglyceride (0.120 g) were dissolved in acetone (25 mL) (1 h at 40°C). Then, a solution of soybean phosphatidylcholine (Lipoid S 75®) (0.03 g) in ethanol (5 mL) was added. This organic phase was poured into a round bottom flask containing polysorbate 80 (0.08 g) in water (50 mL) under magnetic stirring at room temperature. After 10 min, the round bottom flask was connected to a rotative evaporator to eliminate acetone and concentrate the turbid solution under reduced pressure (35–40°C) to a volume of 9 mL. In a separate flask, a 0.3% chitosan aqueous solution was prepared using 1% acetic acid. This chitosan solution was filtered and slowly added (1 mL) over the turbid solution under moderate magnetic stirring. After 4 h, the iron (II) chloride tetrahydrate aqueous solution or the zinc acetate aqueous solution was slowly added into the reaction medium under magnetic stirring (500 rpm) and, then, the ligand aqueous solution was added using an excess (3:1 mol/mol, ligand/metal) to passivate the nanocapsule surface and stabilize the colloids.

A variety of formulations was prepared using two different concentrations of Fe^{2+} (50 and 100 μg mL^{-1}) and four different concentrations of Zn^{2+} (10, 25, 50 and 100 μg mL^{-1}).

To develop and optimize the synthesis, phenylalanine was used as model ligand. To demonstrate the applicability of the synthesis, scFv anti-LDL(−) was used at 100 or 200 μg mL^{-1} as ligand at the surface of the MCMN.

Physicochemical Characterization of the Surface-Functionalized Metal-Complex Multi-Wall Nanocapsules (MCMN)

The pH values of the MCMN were determined using a potentiometer B474 (Micronal, Brazil). The nanocapsule aqueous suspensions were characterized with respect to their mean diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potencial (ζ) by dynamic light scattering (DLS) and laser Doppler electrophoresis (LDE) measured at 25°C (Zetasizer® Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). Samples were previously diluted with MilliQ® water and 0.01 mol L^{-1} NaCl aqueous solution, respectively. The dilution media were filtered (0.45 μm) before analyses, but each sample was directly used without filtration or any other treatment avoiding sample selection. The measurements were carried out using three different batches for each formulation. Each analysis was carried out using 20 scans for zeta potential and ten scans for mean diameter. Mean values were obtained considering triplicate of analysis for three batches. In this way, the standard deviations were calculated by the mean values among the batches. The mean values of size distribution width were calculated by the software Dispersion Technology Software (version 4.00, 2002, Malverns Instruments ltd) using data from three different batches analyzed in triplicate ($n=3$).

The size distribution measurement was also determined by laser diffraction (LD) (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, UK) and nanoparticle tracking analysis (NTA) (NanoSight LM10 & NTA 2.0 Analytical Software, NanoSight Ltd). The latter also provided visual information of the light scattered by the particle in solution. The video images of the light scattered by the particle in Brownian motion were followed in real-time via CCD camera. The MCMN were diluted 5,000 times and each video clip was captured over 120 s. NTA 2.0 Analytical Software

(NanoSight®) was used for calculations. All measurements were performed in triplicates.

Transmission Electron Microscopy

MCMN-Zn (25 μg mL^{-1} of zinc), MCMN-Fe (50 μg mL^{-1} of iron), and Phe-MCMN-Zn (25 μg mL^{-1} of zinc) and Phe-MCMN-Fe (50 μg mL^{-1} of iron) prepared with phenylalanine/metal at 3:1 molar ratio were diluted with water and deposited on specimen grid (Formvar Carbon support film, Electron Microscopy Sciences). Uranyl acetate solution (2%, w/v) was used as contrast agent (negatively stained). The transmission electron microscope (TEM; JEM 1200 Exll) was operating at 80 kV at the *Centro de Microscopia Eletrônica* from the Federal University of *Rio Grande do Sul* (UFRGS).

Evaluation of *In Vitro* Lipid Peroxidation

In this assay, phosphatidylcholine (Lipoid S-75) liposomes (50 mg mL^{-1}) were prepared by reverse-phase evaporation to act as substrate to lipid peroxidation. *In vitro* lipid peroxidation experiments were conducted as previously described (21) with some modifications.

The extent of lipid peroxidation was determined by the thiobarbituric acid method. The amount of lipid peroxidation was quantified by interpolating the experimental absorbance with the malondialdehyde responses obtained using the correlation curve of malondialdehyde substance reference and expressed as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The curve had a correlation coefficient of 0.997, a slope of 0.165 and an intercept of −0.0055.

We prepared different controls: one positive and two negative controls. The positive control consisted of a buffered reaction medium containing 10 μL of 500 mmol L^{-1} $FeSO_4$; 10 μL of 10 mmol L^{-1} ascorbic acid and 53.6 μL of phosphatidylcholine liposomes. The negative controls were: (**1**) control of background absorbance: medium containing ascorbic acid and liposomes in buffered medium, and (**2**) control of absorbance due to the chitosan reactivity: medium containing ascorbic acid, liposomes in buffered medium added of MN formulation.

We also compared the lipid peroxidation response of $FeCl_2.4H_2O$ and zinc acetate aqueous solutions at the same concentrations of the metals in the formulations. Additionally, we also compared the Phe-MCMN-Zn and Phe-MCMN-Fe formulations with those metals free (LNC and MN). The test samples were prepared by adding 20 μL of 1 M Tris–HCl buffer, pH 7.4, in test tubes. Then, 5.86 μL of the samples [LNC, MN, Phe-MCMN-Zn (25 μg mL^{-1} of zinc) and Phe-MCMN-Fe (50 μg mL^{-1} of iron)] were added in each test tube. All formulations were diluted in the same concentration of particles per volume.

All reaction media had a final volume of 200 μL, after adding all reagents using distilled water to adjust the volume when needed. In this case, the positive control received 106.4 μL; the negative controls (**1**) and (**2**), 116.4 μL and 110.5 μL, respectively; and all other samples [LNC, MN, Phe-MCMN-Zn (25 μg mL^{-1} of zinc) and Phe-MCMN-Fe (50 μg mL^{-1} of iron)] received 100.4 μL of distilled water.

Each test sample reaction was initiated by adding, in each test tube, 10 μL of 500 mmol L^{-1} $FeSO_4$ solution, 10 μL of 10 mmol L^{-1} ascorbic acid and 53.6 μL of phosphatidylcholine liposome. All reaction media were incubated for 30 min at 37 °C. Then, 200 μL of TCA (trichloroacetic acid 12%) and of TBA (thiobarbituric acid 0.73%) were added under stirring and maintained for 30 min at 100 °C. Each reaction medium was centrifuged (15,300×*g*) for 10 min at room temperature (Sigma 1–14, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Germany) and analyzed by spectrophotometry at 535 nm (UV-1601 PC Spectrophotometer, Schimadzu, Japan). The experimental absorbance for the reactions of $FeCl_2.4H_2O$ and zinc acetate aqueous solutions, as well as of LNC was obtained by subtracting the absorbance observed from the absorbance of the negative control (**1**). Furthermore, the experimental absorbance for the reactions of MN, Phe-MCMN-Zn (25 μg mL^{-1} of zinc) and Phe-MCMN-Fe (50 μg mL^{-1} of iron) was obtained by subtracting the absorbance observed from the absorbance of the negative control (**2**). The solutions and formulations were prepared in triplicate batches, and one replicate of each batch was reacted with $FeSO_4$ and ascorbic acid in the presence of phosphatidylcholine liposome.

Molecular Recognition Against Native LDL and LDL(−)

Ethics Approval

The LDL subfractions were isolated from human blood, which experimental protocols were approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of Sao Paulo.

Dynamic Light Scattering

Two subfractions of low density lipoprotein [native LDL and LDL(−)] were used in order to evaluate the selective reactivity of scFv anti-LDL(−) after complexation at the MCMN surface. Both LDL subfractions were isolated from human plasma as previously reported (22). The *in vitro* molecular recognition assay was based on the reactivity of LDL(−) with scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules. In this way, dynamic light scattering (DLS) was used to evaluate the reactivity by observing the variation of mean particle diameter and polydispersity index (PDI) as a function of the concentration of LDL(−).

The first step consisted of incubating LDL(−) or native LDL with scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules [prepared with zinc at 25 mg mL^{-1} and scFv anti-LDL(−) at 25, 50 or 100 μg mL^{-1}]. In separate flasks, 25 μL of the LDL(−) solution (361.6 μg mL^{-1}) were added of 25 μL of each formulation [scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn]. In parallel, the same procedure was carried out using 25 μL of the native LDL solution (690 μg mL^{-1}) and 25 μL of each formulation [scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn at 25, 50 or 100 μg mL^{-1}]. Using an automated pipettor, each sample was mixed thoroughly for 10× and subsequently incubated at 25°C for 2 min prior to DLS evaluation. The mean sizes (z-average) and size distributions were calculated by the Dispersion Technology Software (version 4.00, 2002 Malverns Instruments ltd) using data from three different batches analyzed in triplicate (n=3).

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ELISA assays were carried out according to a previous work (23) with modifications. The 96-well plates were coated with 25 μg mL^{-1} of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn or scFv anti-LDL(−) solution (positive control) at 4°C overnight. Then, 2C7 monoclonal antibody, developed as previously described (23), was added at a concentration of 10 μg mL^{-1} and incubated for 1 h at 37°C to recognize the LDL(−) binding to scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn. In parallel, an assay using nLDL was performed as negative control. A goat anti-mouse HRP (diluted 1:1,500 with 1% skim milk; Immuno Tools; Cat. N. 22339919) was added for 1 h at 37°C. Specific binding was detected with tetramethyl benzidine (TMB) substrate for color development, and the absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Apollo LB 911; Berthold Technologies). The data from two independent experiments, performed in triplicate, were analyzed using ANOVA test and all calculations were performed using GraphPad Prism software.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of the Metal-Complex Multi-wall Nanocapsules

The metal-complex multi-wall nanocapsules, represented schematically in Fig. 1, are formed by an organogel as core, poly(ε-caprolactone) as first wall, polysorbate 80 and lecithin as stabilizer system, chitosan as second wall complexed with metals (iron or zinc). We selected iron and zinc as metals in this approach because they are biocompatible and essential elements for the body (24).

The coating of lipid-core nanocapsules (LNC) with the cationic polymer (chitosan) is a critical step to reach the supramolecular structure of multi-wall nanocapsules (MN).

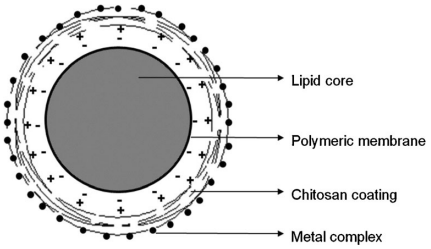
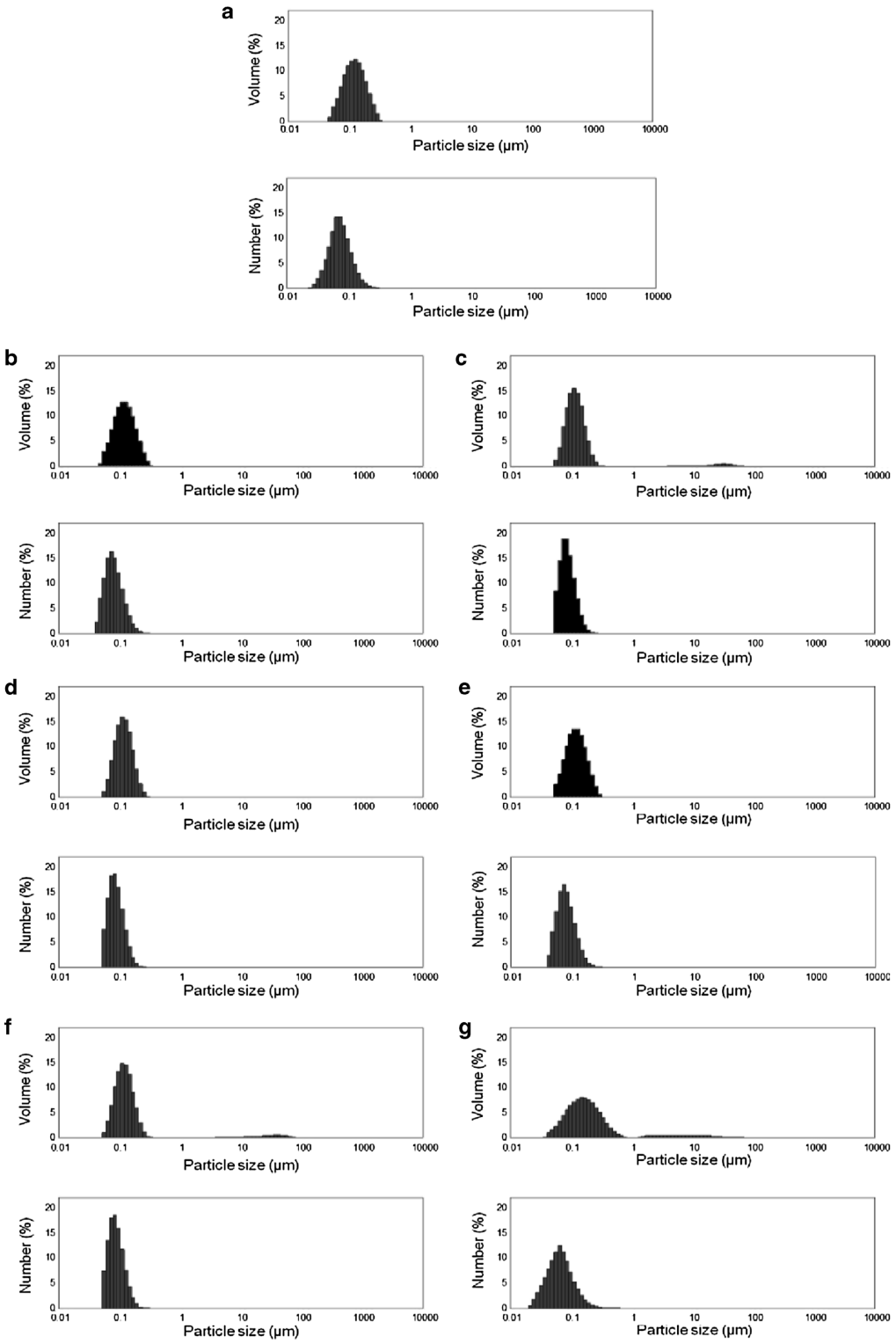


Fig. 1 Schematic representation of the MCMN structure containing iron or zinc as metal complex at the surface.

Initially, we tried unsuccessfully reacting LNC with 1% and 2% chitosan aqueous solutions. Then, better results were obtained using chitosan solutions at 0.3% and 0.5%. Chitosan at 0.3% produced better reproducible MN formulations having unimodal and nanoscopic particle size profiles (Fig. 2a). The almost superimposed granulometric profiles comparing the size distribution by volume to the size distribution by number of particles indicated a high homogeneity of the sample in particle sizes. The formation of multi-wall nanocapsules is based on the electrostatic interactions at their surface between the ammonium groups of chitosan and the negatively charge groups present in Lipoid S75 (lecithin) as impurities. The addition of the Fe^{+2} or Zn^{+2} solution into the suspension containing the multi-wall nanocapsules leads to the chitosan-metal complex formation. This complex is highly reactive, and, then, capable of combining with different molecular or macromolecular compounds.

At a first approach, the aminoacid phenylalanine was used to passivate the surface of the metal-complex multi-wall nanocapsules (MCMN). In all formulations, the aminoacid was used in excess in relation to the stoichiometry of the metal (3:1, mol/mol) to guarantee the passivation of the surface, avoiding aggregation of the nanoparticles. For Phe-MCMN-Fe, we observed unimodal distributions when 50 μg mL^{-1} iron was added with a volume-weighted mean diameter (D[4,3]) of 130 nm and polydispersity (SPAN) of 0.96 (Fig. 2b). However, when 100 μg mL^{-1} iron was used a bimodal profile was observed (Fig. 2c). As a consequence, D[4,3] was 1.10 μm with a SPAN of 1.02 for the latter. Both formulations had unimodal granulometric profiles calculated by number of particles indicating that the latter is contaminated with few micrometric particles. In this case, the results indicated that 100 μg mL^{-1} iron was in excess compared to the concentration of chitosan. This excess caused aggregation of the particles in suspension and as a consequence the microscopic contamination.

In parallel, MN added of zinc at concentrations equal or lower than 25 μg mL^{-1} followed by the addition of phenylalanine (3:1, mol/mol) showed unimodal granulometric profiles for the Phe-MCMN-Zn formed with narrow size distributions (Fig. 2d and e). Whereas, MN added of 50 μg mL^{-1} or


a
Volume (%)
Particle size (µm)
Number (%)
Particle size (µm)
b
c
d
e
f
g
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

◀ **Fig. 2** Granulometric profiles obtained by laser diffractometry (Mastersizer 2000) of (**a**) MN, (**b**) Phe-MCMN-Fe 50 μg.mL^{-1}, (**c**) Phe-MCMN-Fe 100 μg.mL^{-1}, (**d**) Phe-MCMN-Zn 10 μg.mL^{-1}, (**e**) Phe-MCMN-Zn 25 μg.mL^{-1}, (**f**) Phe-MCMN-Zn 50 μg.mL^{-1} and (**g**) Phe-MCMN-Zn 100 μg.mL^{-1}. Measurements were made in triplicate of batches.

100 µg mL^{-1} zinc and phenylalanine (3:1, mol/mol) favored the aggregation of the particles with consequent instability of the colloidal system (Fig. 2f and g). The D[4,3] and SPAN values for Phe-MCMN-Zn after adding zinc (10 µg mL^{-1}, 25 µg mL^{-1}, 50 µg mL^{-1} and 100 µg mL^{-1}) and phenylalanine (3:1, mol/mol) were respectively 124 nm and 0.87; 128 nm and 0.87; 1,300 nm and 1.01; and 1,420 nm and 2.65.

MCMN systems containing iron or zinc were also investigated without adding phenylalanine to surface passivation. MN samples were added exclusively of zinc or iron at the same concentrations described above. MCMN-Fe and MCMN-Zn showed polymodal granulometric profiles (Fig. 3). Thus, the metal complexed with MCMN is highly reactive easily combining with near nanocapsules causing an aggregation process, and consequently the formation of the microparticles. This process was increasingly evident as higher was the concentrations of the metals in the formulations.

Considering the high reactivity of the surface of MCMN, passivation is crucial to reach kinetically stable colloidal suspensions. Phenylalanine was essential for blocking the cross-linking of chitosan between neighboring particles. In our study, phenylalanine was added exactly 1 min after the addition of the metal ions in solution. Preliminary studies showed the lack of stability testing the addition of phenylalanine after 30 min, 15 min or 5 min.

The pre-formulation study was carried out using Laser diffractometry as technique to distinguish satisfactory the particle size profiles (unimodal at the nanoscopic scale from multimodal and/or presence of microscopic contaminants). Two formulations were selected for further analysis in order to better characterize their nanoscopic populations: Phe-MCMN-Fe prepared using iron at 50 µg mL^{-1}, and Phe-MCMN-Zn prepared using zinc at 25 µg mL^{-1}. In this way, the particle size distributions were investigated using Zetasizer® ZS and NanoSight®.

The zeta potential values varied from −10.1 ± 0.6 mV (LNC) to +8.2 ± 0.3 mV (MN) after coating the nanocapsules with chitosan. It is interesting to note that unimodal peaks of zeta potential distributions were observed for both LNC and MN formulations with reproducible profiles for different

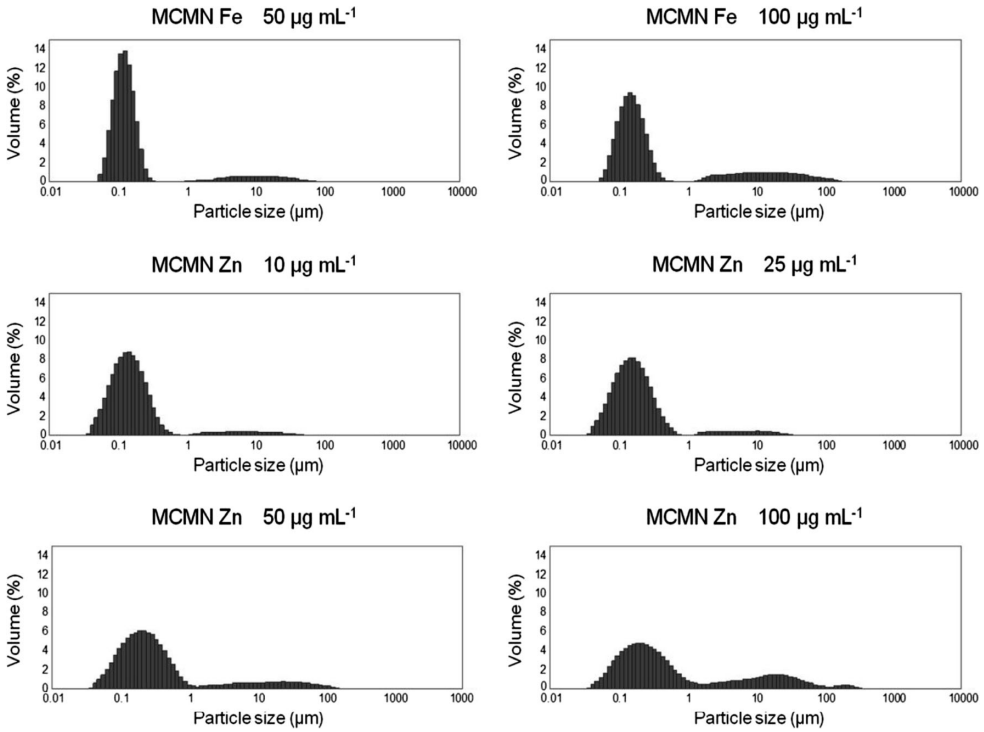


Fig. 3 Granulometric profiles by laser diffractometry (Mastersizer 2000) of MCMN-Fe and MCMN-Zn obtained with different concentrations of iron and zinc. Measurements were made in triplicate of batches ($n = 3$) without adding phenylalanine.

Table I Particle Size Distributions for LNC, MN, Phe-MCMN-Fe (50 μg.mL^{-1}) and Phe-MCMN-Zn (25 μg.mL^{-1})

Particle diameters							
Formulation	z-average[a] (nm)	Intensity[b]		Volume		Number	
		Peak[c] (nm)	Width (nm)	Peak[c] (nm)	Width (nm)	Peak[c] (nm)	Width (nm)
LNC	123 ± 1.05	141	53	117	53	80	27
MN	133 ± 3.11*	160	70	130	71	76	29
Phe-MCMN-Fe	133 ± 0.78*	161	74	129	75	75	28
Phe-MCMN-Zn	139 ± 0.42*	159	54	128	56	77	30

[a] Mean diameter calculated by the method of cumulants and standard deviations obtained from triplicate batches ($n = 3$)

[b] Mean diameter calculated by the CONTIN algorithm

[c] Unimodal particle size distributions

*$p < 0.05$, Tukey Test

batches (Supplementary material). The results indicated the high homogeneity of coating by the cationic polymer.

Regarding the dynamic light scattering analysis (Zetasizer®), a single exponential was fit to the correlation functions (Cumulants analysis). In this way, the z-average diameters showed an increase in the mean size of the particles after coating them with chitosan (about 10 to 15 nm, $p < 0.05$) remaining constant with the addition of the metal (Table I). In addition, the particle size distributions by intensity were calculated by fitting a multiple exponential to the correlation functions (CONTIN algorithm). The results showed an increase of 20 nm after coating the LNC with the cationic polysaccharide, chitosan (Table I). The metal complexation at the nanocapsule surface had no influence on the size distributions ($p > 0.05$). The polydispersity indexes (PDI) were lower than 0.21 for all formulations corroborating that those formulations have a great homogeneity and narrow particle size distributions.

In parallel, comparing the size distributions of the formulations by intensity, volume and number (Zetasizer®), high homogeneity in particle sizes were verified since the mean diameters varied few nanometers for each formulation (Table I). The slight decrease in the mean sizes regarding the distributions by intensity, volume and number was expected considering that the intensity of scattering is proportional to d^6 from Rayleigh approximation compared to d^3 for volume and d^1 each particle interacting with the laser beam.

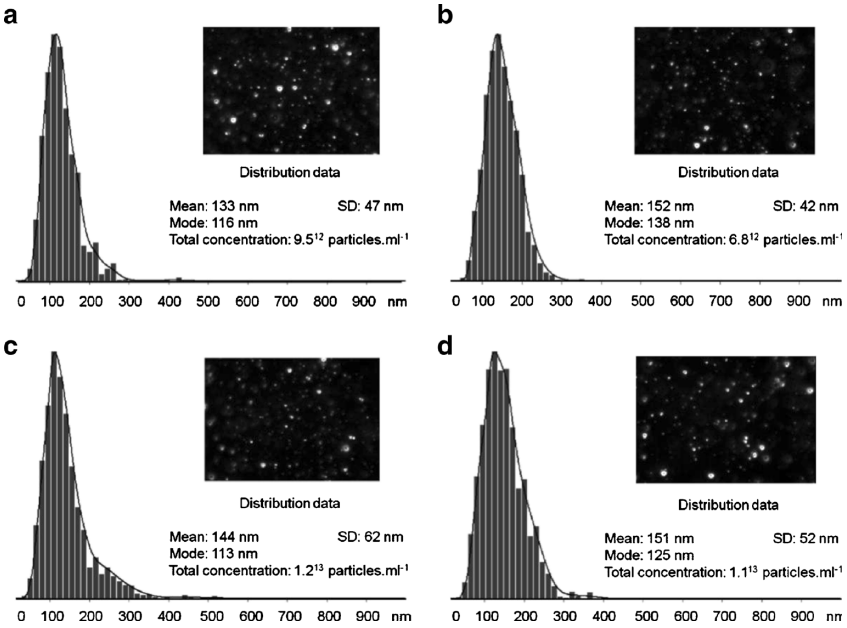


Fig. 4 Particle size distributions (nm), sample video frame (picture in black) and distribution data by NTA of LNC (**a**), MN (**b**), Phe-MCMN-Fe (50 μg.mL^{-1}) (**c**) and Phe-MCMN-Zn (25 μg.mL^{-1}) (**d**).

Nanoparticle tracking analysis (NanoSight®) can be used as an alternative to Dynamic Light Scattering (DLS) to determine the size distribution profiles of the formulations. The advantage of this technique is that the measurements are carried out by observing the light scattered from individual nanoparticles. In this way, the results are expressed in number of particles (25,26). NTA analysis is also based on the diffusional coefficient of the particles in Brownian motion relating this movement to their equivalent hydrodynamic diameters. Due to the particle-by-particle measurement basis, NTA is able to characterize better the polydisperse samples. The particle-by-particle approach allows the resolution of discrete populations of similar sizes. The formulations were diluted in water showing mean diameters of 133 nm (LNC), 152 nm (MN), 144 nm [Phe-MCMN-Fe (50 μg mL^{-1} of iron)] and 151 nm [Phe-MCMN-Zn (25 μg mL^{-1} of zinc)] (Fig. 4).

All formulations presented narrow size distributions. An increase in the particle size was observed comparing LNC to MN samples. The addition of iron (50 μg mL^{-1}) and zinc (25 μg mL^{-1}) did not affect the width of the distributions. The mean size diameters by NTA are slightly higher than the values obtained by Zetasizer® analysis. The difference could be attributed to the different particle counts between each technique (26). Spectroscopic analysis (Fourier transform infrared and nuclear magnetic resonance) carried out to elucidate the structure of the nanocapsules did not show any peak relative to chitosan (data not shown). The results can be explained by the lack of sensitivity of those techniques considering the small mass of chitosan in our formulations compared to the mass of the other constituents. The mass of chitosan is distributed at the surface of the nanocapsules causing an increase about 10 to 20 nm (cumulants or CONTIN) in their

Table II Lipid Peroxidation Expressed as Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) for the Formulations (LNC, MN, Phe-MCMN-Fe and Phe-MCMN-Zn) and the Iron and Zinc Solutions (Fe^{2+} and Zn^{2+})

Formulations	Lipid peroxidation* (nmols TBARS mL^{-1})
Positive control	12.9 ± 0.1^{a}
Fe^{2+} solution	15.2 ± 1.3^{a}
Zn^{2+} solution	12.7 ± 0.8^{a}
LNC	5.1 ± 2.1^{b}
MN	6.9 ± 0.9 [6.6 ± 0.9]^{b}
Phe-MCMN-Fe	8.0 ± 0.8 [7.6 ± 0.5]^{b}
Phe-MCMN-Zn	7.3 ± 0.6 [6.9 ± 0.6]^{b}

*Values in brackets calculated by discounting the background absorbance generated by the chitosan reactivity

Different letters indicate statistically different values ($p < 0.05$, Tukey test)

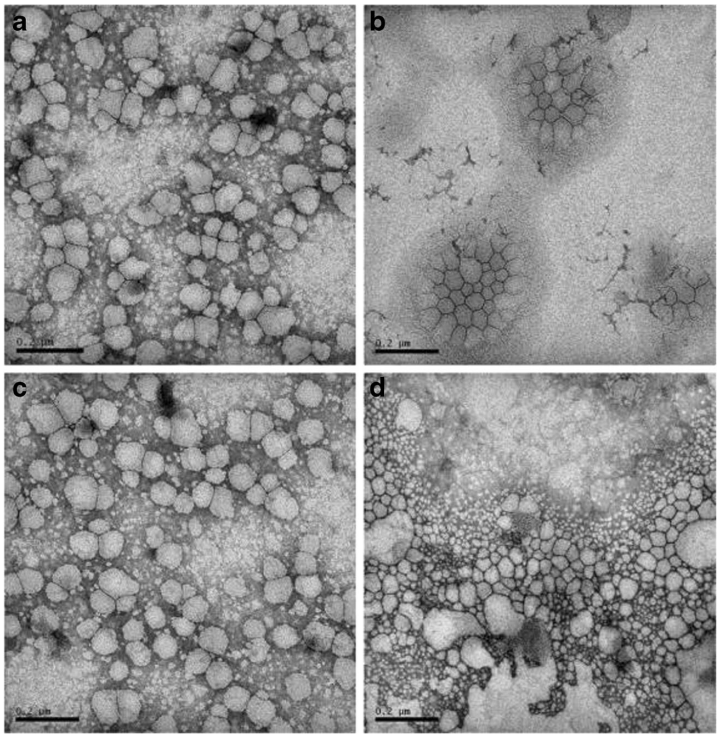


Fig. 5 Photomicrographs obtained by TEM of Phe-MCMN-Fe (**a**) and MCMN-Fe (**b**), and of Phe-MCMN-Zn (**c**) and MCMN-Zn (**d**) (bar = 200 nm).

average diameters, as well as an inversion in the zeta potential from negative to positive.

Images obtained by TEM for MCMN-Fe and Phe-MCMN-Fe at 50 μg mL^{-1} of iron and for MCMN-Zn and Phe-MCMN-Zn at 25 μg mL^{-1} of zinc showed the influence of phenylalanine in avoiding aggregation. Phe-MCMN-Fe and Phe-MCMN-Zn had particles spherically shaped (Fig 5a and c), while MCMN-Fe and MCMN-Zn showed agglomerates (Fig 5b and d). The images illustrate the results obtained by Laser diffractometry. The Phe-MCMN-Fe and Phe-MCMN-Zn had similar particle mean diameters to those determined by DLS and NTA (below 200 nm).

Different mechanisms have being proposed for the metal-chitosan complex. Zimmermann and co-workers (27) have proposed a hexacoordinate complex for iron-crosslinked chitosan and Tang and Hon (28) have considered a tetrahedral coordination as plausible mechanisms for the zinc-chitosan complex. We could envisage that similar mechanisms could occur to form Phe-MCMN-Fe and Phe-MCMN-Zn considering the metal complexation with the nitrogen atoms from the chitosan portion and the oxygen atoms from the carbonyl moieties of Phe.

In vitro Lipid Peroxidation

In vitro lipid peroxidation was investigated to determine the applicability of the new carriers specially the MCMN prepared with iron, since the nanoparticle could act as potential oxidant enhancing the oxidative stress and, therefore, being inadequate for medical purposes. Oxidative processes are related to the occurrence of a variety of changes in biological and biochemical steps at the cellular level (29). The presence of antioxidants in pharmaceutical dosage forms, such as nanoparticles, helps to avoid the incidence of these events (29,30). Tests assessing lipid peroxidation can be used to evaluate the *in vitro* occurrence of oxidative processes (21,31). In this study, we determined the extent of lipid peroxidation by the thiobarbituric acid method using liposomes as substrate (Table II).

The experimental absorbances obtained for Fe^{2+} and Zn^{2+} solutions and LNC were subtracted from the absorbance of the negative control (**1**) (0.51 ± 0.04 nmol TBARS mL^{-1}). Likewise, the experimental absorbances obtained for MN, Phe-MCMN-Zn and Phe-MCMN-Fe were subtracted from the negative control (**2**) (0.49 ± 0.06 nmol TBARS mL^{-1}).

The measurements are based on the presence of a secondary product from the oxidation of polyunsaturated fatty acids, known as malondialdehyde (MDA), and its complexation with

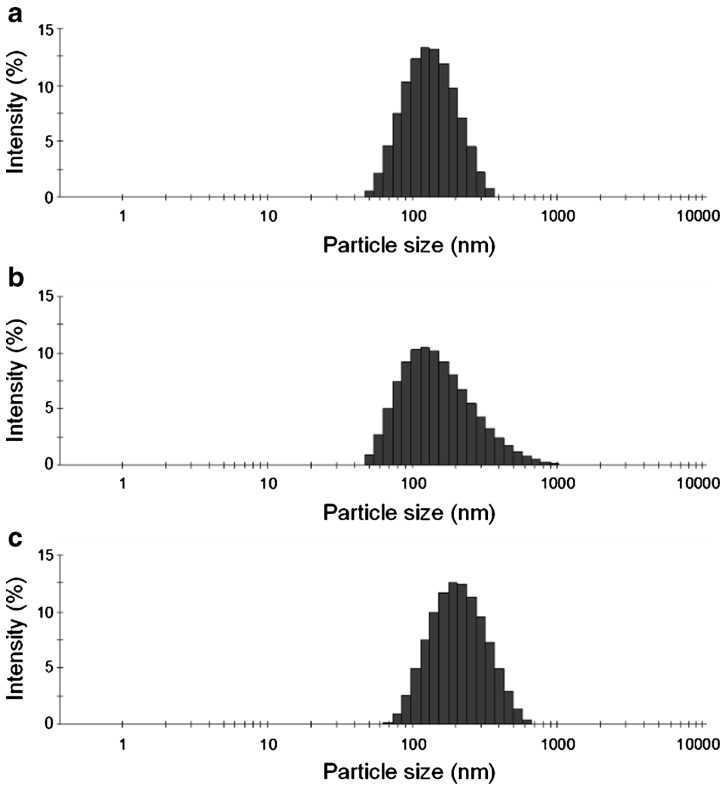


Fig. 6 Particle size distributions by dynamic light scattering (Zetasizer® ZS) (**a**) MN, (**b**) scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (at 25 $\mu g.mL^{-1}$ of zinc and 100 $\mu g.mL^{-1}$ of scFv), (**c**) scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (at 25 $\mu g.mL^{-1}$ of zinc and 200 $\mu g.mL^{-1}$ of scFv).

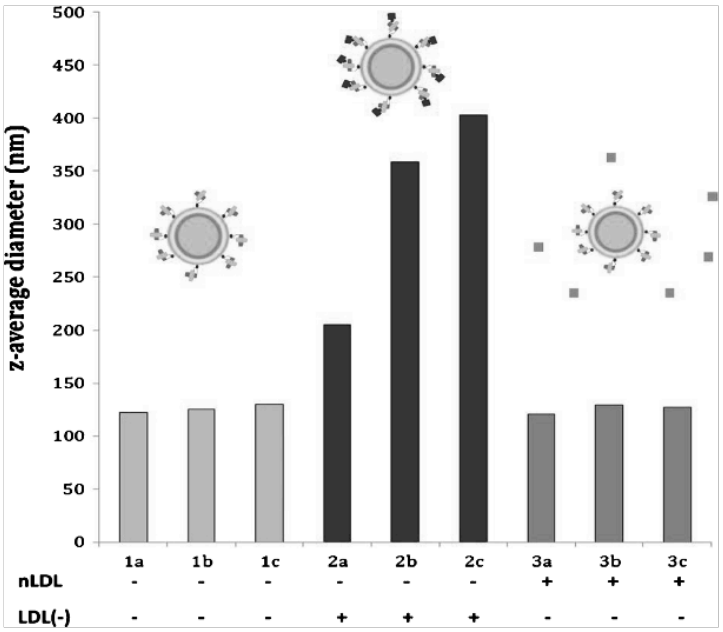


Fig. 7 Mean particle diameter (z-average) by dynamic light scattering (Zetasizer® ZS) of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn [prepared with zinc at 25 mg mL^{-1} and scFv anti-LDL(−) at 25 $\mu g\ mL^{-1}$ (**a**), 50 $\mu g\ mL^{-1}$ (**b**) or 100 $\mu g\ mL^{-1}$ (**c**)] after no addition of LDL(−) or nLDL (**1**), after addition of LDL(−) (**2**) and after addition of nLDL (**3**).

the nucleophile group thiobarbituric acid (TBA). The reaction promotes the formation of a chromophore with high molar absorptivity in the visible spectrum (21,32). The results showed that the Fe^{2+} and Zn^{2+} solutions had similar values to the positive control (12.9±0.1 TBARS mL^{-1}). However, the Phe-MCMN-Zn and Phe-MCMN-Fe showed lower values of lipid peroxidation in relation to the respective Fe^{2+} and Zn^{2+} solutions ($p<0.05$). An important observation is that the extent of lipid peroxidation caused by the formulations containing metals (Phe-MCMN-Zn and Phe-MCMN-Fe) was similar to that determined for LNC and MN, in which the metals are not present ($p>0.05$), indicating that iron and zinc were not free in solution but complexed with the nanocapsules. The formulations decreased the ascorbyl radical formation and thereby limited the peroxidation of the substrate (liposomes). Thus, the results suggested that Phe-MCMN-Fe and Phe-MCMN-Zn are not potential formulation to enhance the oxidative stress.

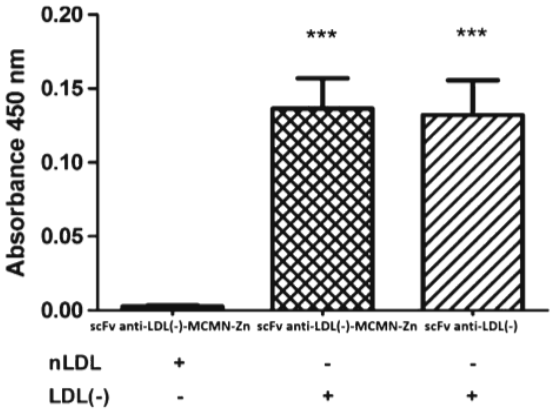


Fig. 8 Evaluation of the specificity of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn to LDL(−) by ELISA. LDL(−) or nLDL were added at a concentration of 10 μg/mL to 96-well microplate coated with 25 $\mu g.mL^{-1}$ of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn or scFv anti-LDL(−). A goat anti-mouse HRP was diluted 1:1,500 and incubated for 1 h. TMB was used as substrate for color development and the absorbance was measured at 450 nm. The results of two independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SD ***$p<0.001$ compared with control [scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn + nLDL]; ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

Synthesis of scFv Anti-LDL(−)-Functionalized Nanocapsules

The *in vitro* lipid peroxidation assay gave us evidence of possible applications of these new nanocapsules in therapeutics. However, considering the possibility of *in vivo* release of iron after i.v. administration in further investigations, we firstly selected the zinc, as metal, specifically to synthetize the scFv anti-LDL(−) surface functionalized nanocapsules, since the future application of those nanoparticles in an atherosclerosis experimental model could be compromised by the potential iron release.

Anti-electronegative LDL single-chain fragment variable [scFv anti-LDL(−)], expressed in *P. pastoris* (23), was added just after the addition of zinc acetate solution in the MN formulation. The recombinant antibody fragment contains

the complete binding site to the [LDL(−)] antigen. Furthermore, the C-terminal portion of the protein has an insertion of six histidine residues (hexahistidine) which can specifically bind to zinc at the MCMN-Zn surface.

MCMN-Zn samples were added of two different concentrations of scFv anti-LDL(−) (Fig. 6). The mean particle diameters (z-average) and PDI were 146 nm and 0.16 after adding 100 μg mL^{-1} of scFv anti-LDL(−), and 197 nm and 0.25 after adding 200 μg mL^{-1} of scFv anti-LDL(−). For both formulations, we observed an increase in the mean particle size as compared to MN (133 nm and 0.12). For each formulation, the narrow peak and the absence of secondary peaks in the size distribution profiles suggested the effective binding of the antibody fragments to the nanoparticle surfaces.

Molecular Recognition

Once formed, the complex scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn should maintain the ability to bind with LDL(−). Thus, *in vitro* tests were carried out comparing the reactivity of LDL(−) to native LDL with scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn.

The mean particle size of 22 nm was previously determined for LDL(−) (33,34). Therefore, because LDL(−) is highly specific to scFv anti-LDL(−) our strategy was based on the increase in the mean particles size of the colloids after reacting LDL(−) with scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (positive recognition). Because of the lack of specificity of native LDL for scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn, no size variation was expected to be observed (negative recognition). To verify this hypothesis, we assay scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn [prepared with zinc at 25 mg mL^{-1} and scFv anti-LDL(−) at 25, 50 or 100 μg mL^{-1}] with native LDL and LDL(−) (Fig. 7).

In the recognition assay, the size variation (DLS) was compared to the initial particle mean sizes (Fig. 7, 1a–c). The particle mean sizes did not vary with the increase in the scFv concentration in the formulation. Continuing our study, the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn added of native LDL or LDL(−) showed significant ($p<0.05$) different mean particle diameters (z-average) (Fig. 7, 2a–c and 3a–c). Moreover, scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn added of LDL(−) showed increased mean particle diameters ($p<0.05$) as a function of the concentration of scFv anti-LDL(−) in the formulation. After adding LDL(−), the mean particle diameter and PDI for the complex LDL(−)-scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (prepared at 100 μg mL^{-1} of scFv) were 403 nm and 0.26, while for the colloidal solution of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn added of native LDL those values were 127 nm and 0.18, respectively. On the contrary, we observe that all reactions carried out with scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn added of native LDL showed similar particle sizes ($p>0.05$) (Fig. 7, 3a–c) due to the lack of receptor in native LDL for a specific binding with scFv anti-LDL(−). Our hypothesis was validated and the results indicated the maintenance of reactivity for scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn added of LDL(−).

To verify quantitatively the reactivity, we performed an ELISA assay in order to compare the reactivity of scFv anti-LDL(−) to the reactivity of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn with LDL(−) (Fig. 8). The statistical analysis demonstrated that scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn added of LDL(−) had similar reactivity and specificity to scFv anti-LDL(−) added of LDL(−). On the other hand, the reactivity of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn with LDL(−) was statistically significant higher ($p<0.001$) compared to its reactivity with native LDL. The results showed that either reactivity or specificity of the scFv were preserved after its binding to the MCMN-Zn surface.

The results open the possibility of applying this new strategy as an interesting tool to bind diverse molecules or macromolecules at the nanocapsule surface envisaging a broad application for those new nanoparticles, including active drug targeting or new theranostics. The new nanocapsules could be administered by i.v., nasal, pulmonary and oral routes.

CONCLUSIONS

We proposed a new strategy to functionalize the surface of nanoparticles. The new metal-complex multiwall nanocapsules are innovative considering the one-pot synthesis of a completely biodegradable structure. The diverse response of scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules after adding either LDL(−) or native LDL indicate the maintenance of the active site of the fragment after reacting with the metal at the MCMN surface. Furthermore, the reactivity and the specificity of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn in recognizing LDL(−) was unequivocally demonstrated. The new approach to bind ligands at the surface of biodegradable polymeric nanoparticles did not affect the native conformation or the active site of the antibody fragment. The performance of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn makes this supramolecular structure interesting for applications in nanomedicine. Furthermore, the synthetic approach is a solvent free process of surface decoration with no need of further purification of the product. Finally, the new strategy is an interesting tool to bind diverse molecules or macromolecules at the nanoparticle surface envisaging a broad use for those new nanoparticles in Pharmaceutical Nanotechnology.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

EAB thanks CAPES/Brazil for his fellowship. The authors thank PRONEX e PRONEM FAPERGS/CNPq, FAPESP, INCT-IF/CNPq, CNPq/Brasilia/Brazil, Universal CNPq/MCTI and Rede Nanotecnologia Farmaceutica CAPES (Brazil) for grant financial supports.

REPORT

mAbs 5:5, 763–775; September/October 2013; © 2013 Landes Bioscience

Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis

Soraya M. Kazuma,[1,†] Marcela F. Cavalcante,[1,†] Andréia E.R. Telles,[1] Andrea Queiroz Maranhão[2] and Dulcineia S.P. Abdalla[1,*]

[1]Department of Clinical Analysis; Faculty of Pharmaceutical Sciences; University of Sao Paulo; Sao Paulo, Brazil; [2]Molecular Immunology Laboratory; Department of Cell Biology; University of Brasilia; Distrito Federal, Brazil

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: single-chain fragment variable, *Pichia pastoris*, atherosclerosis, electronegative LDL, macrophage, foam cell

Abbreviations: scFv, single chain variable fragment; nLDL, native LDL; LDL(-), electronegative LDL; *Cd36,* cluster of differentiation 36; *Tlr-4,* toll like receptor 4; *Cox-2,* cyclooxygenase 2

The in vivo modified forms of low-density lipoprotein (LDL) are important for the formation of foam cells and as mediators of the immuno-inflammatory process involved in the progression of atherosclerosis. Electronegative LDL, LDL(-), is a LDL subfraction with pro-inflammatory properties that is present in human blood. To investigate possible atheroprotective effects, an anti-LDL(-) single-chain variable fragment (scFv) was expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its activity was evaluated in vitro against macrophages and in experimental atherosclerosis in *Ldlr*$^{-/-}$ mice. The recombinant 2C7 scFv was produced in a yield of 9.5 mg of protein/L. The specificity and affinity of purified 2C7 scFv against LDL(-) was confirmed by ELISA. To assess the activity of 2C7 scFv on foam cell formation, RAW 264.7 macrophages were exposed to LDL(-) in the presence or absence of 2C7 scFv. The 2C7 scFv inhibited the uptake of LDL(-) by macrophages in a dose-dependent manner, and internalization of LDL(-) by these cells was found to be mediated by the CD36 and CD14 receptor. In addition, compared with untreated cells, lipid accumulation in macrophages was decreased, and the expression of Cd36, Tlr-4 and Cox-2 was downregulated in macrophages treated with 2C7 scFv. Importantly, compared with untreated mice, the treatment of *Ldlr*$^{-/-}$ mice with 2C7 scFv decreased the atherosclerotic lesion area at the aortic sinus. In conclusion, our data show that 2C7 scFv inhibits foam cell formation and atherosclerotic plaque development by modulating the expression of genes relevant to atherogenesis. These results encourage further use of this antibody fragment in the development of new therapeutic strategies that neutralize the pro-atherogenic effects of LDL(-).

Introduction

Recombinant monoclonal antibodies (mAbs) are used as therapeutic agents to treat autoimmune and inflammatory diseases because of their high specificity and capacity to function as high-affinity targeting reagents.[1,2] As of January 2013, 19 mAbs were in Phase 3 clinical trials for non-cancer purposes, including AMG145 and alirocumab for high cholesterol treatment, and an additional 10 mAbs were in Phase 3 studies as treatments for cancer.[3] Although widely used for numerous indications, full length mAb therapeutics have disadvantages due to their large size, pharmacokinetics and restricted access to some tissues. Molecular biology strategies thus have been used to generate monovalent antigen-binding (Fab) or single chain variable (scFv) fragments and divalent (e.g., Fab_2', diabodies, minibodies) antibody fragments that may also have clinical utility.[4]

The scFv contains the smallest functional unit of the antibody. It is composed of the variable domains of antibody light and heavy chains joined by a hydrophilic and flexible spacer peptide that is 10 to 25 amino acid residues in length.[4] The antibody binding site is kept intact within the scFv, and there is usually no significant loss of specificity.[5] Pharmacokinetic properties, however, are changed; for example, scFv are rapidly cleared from the blood and have lower retention time in non-target tissues.[6] A potential advantage conferred by the small size of the scFv is access to hidden epitope regions where full-length mAbs cannot reach. In addition, the cytoxicity of scFv is reduced due to their faster removal from the circulation and better disposal of immune complexes that are formed.[1] Because they can be fused with proteins and peptides, the production of scFvs against virtually any important therapeutic target could provide biopharmaceuticals capable of neutralizing key soluble proteins involved in the initiation and progression of diseases such

*Correspondence to: Dulcineia S.P. Abdalla; Email: dspa@usp.br
Submitted: 02/19/13; Revised: 07/19/13; Accepted: 07/23/13
http://dx.doi.org/10.4161/mabs.25817

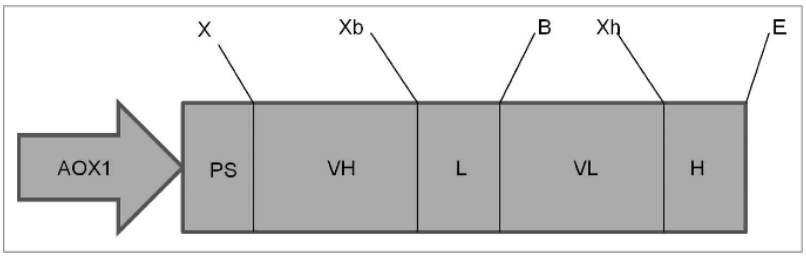


Figure 1. Schematic representation of the 2C7 scFv expression cassette. The scFv expression is driven by the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase 1 promoter. The *Saccharomyces cerevisiae* α-mating type pre-pro-protein leader sequence (PS) is upstream of the 2C7 scFv coding region. The VH gene is flanked by XmaI (X) and Xba I (Xb) restrictions sites. After the linker peptide coding region (L), the VL coding sequence is found in between BglII (B) and Xho I (Xh) sites. A hexahistidine tag (H) is found at the 3' end of the gene followed by a stop codon just before the EcoRI (E) site.

as chronic inflammation and cancer.[7] The size and simplicity of scFv allow these molecules to be produced in simple heterologous expression systems like *Pichia pastoris*, which is a methylotrophic yeast capable of metabolizing methanol as its sole carbon source that is widely used for high-yield recombinant protein expression.

LDL(-) is an endogenous, minimally modified LDL subfraction found in blood plasma.[8] Modified forms of LDL are immunogenic and activate both cell-mediated and humoral immune responses, which are pro-inflammatory and likely act in the progression of the chronic inflammatory reaction that is characteristic of atherosclerosis.[9] The concentration of LDL(-) is elevated in the plasma of patients at high risk for cardiovascular disease as a result of hypercholesterolemia,[10,11] hypertriglyceridemia,[12] diabetes[13] or coronary artery disease.[14,15] LDL(-) has demonstrated pro-inflammatory and pro-atherogenic properties that contribute to the development of atherosclerosis by inducing the recruitment of monocytes to the arterial wall, the secretion of pro-inflammatory mediators by macrophages and endothelial cells, and the induction of autoantibodies.[16] Macrophages retained in the vascular wall accumulate large amounts of modified LDL and become foam cells.[17] Moreover, macrophages produce pro-inflammatory cytokines and participate in functions that integrate the innate and adaptive immune responses during atherosclerosis, including expression of scavenger receptors, such as CD36, and Toll-like receptors (TLRs), such as TLR-4.[18]

We previously reported that passive immunization using an anti-LDL(-) mAb in *Ldlr*$^{-/-}$ mice decreased both the cross-sectional area and the number of foam cells in atherosclerotic lesions.[19] In this study, we cloned and expressed an anti-LDL(-) 2C7 scFv in *P. pastoris* and determined its anti-atherogenic activity on 264.7 RAW macrophages and in LDL receptor gene knockout mice (*Ldlr*$^{-/-}$). Our findings reinforce the potential of novel antibody-based immunotherapeutic approaches that can lead to therapies for complex diseases such as atherosclerosis.

Results

Obtention of the 2C7 scFv. The cDNAs that code for the VH and VL of 2C7 mAb were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction using specific immunoglobulin primer libraries that recognize all VH and VL chain V regions from murine families. The analysis of the sequences in the GenBank and Kabat databanks showed that 2C7 mAb uses a VH segment from Vmu 3.2 (J558) and a Jh4 segment, while VL uses an 8.24/Jk5 segment. The 2C7 scFv was assembled based in the pIg16 vector, a vector for bacterial expression, and then it was subcloned into the *P. pastoris* expression vector pPIgLE, downstream of the AOX1 promoter (**Fig. 1**). The expression of 2C7 scFv by recombinant *P. pastoris* SMD1168 clone was induced by adding 1% methanol and 0.1 M PMSF every 24 h, at a temperature of 20°C. Under these conditions, we obtained a yield of 9.5 mg/L scFv. The protein was purified by nickel affinity chromatography and two bands were detected in the silver-stained polyacrylamide gels and with western blotting (**Fig. 2**). The apparent affinity of 2C7 scFv for LDL(-) was assayed by direct ELISA using nLDL as a negative control and 2C7 mAb as a positive control. The results showed that either recombinant 2C7 scFv or mAb were able to bind specifically to LDL(-) (**Fig. 3**).

Analysis of glycosylation of the 2C7 scFv. The purified 2C7 scFv showed two bands in SDS-PAGE with apparent expected MWs of 30 and 28 kDa, respectively, that were immunoreactive with anti-His antibody. To investigate whether the two purified bands were produced due to hyperglycosylation, the protein was deglycosylated with Endo H. Only one putative N-glycosylation site at CDR-1 of 2C7 scFv light chain was predicted using the BioEdit software. The Endo H-treated material was analyzed by gel electrophoresis and western blotting. The results showed that the deglycosylation treatment of 2C7 scFv converted the two bands into a single band, confirming the predicted glycosylation (**Fig. 4**).

Detection of negatively charged LDL subfraction in blood plasma of *Ldlr*$^{-/-}$ mice. The anion exchange FLPC chromatography used to separate the LDL subfractions (**Fig. 5A**) showed three peaks where the first corresponds to the components of the antioxidant cocktail used to prevent oxidation of samples. A second peak corresponds to the native LDL subfraction, similar to the chromatogram of human LDL (**Fig. 5B**). The third peak contains the LDL subfraction with the highest negative charge (**Fig. 5A-B**) with a retention time similar to the human LDL(-) subfraction. Thus, the peaks 2 and 3 detected in the fast protein liquid chromatography (FPLC) chromatogram correspond to mouse unmodified LDL(or nLDL) and to LDL(-), respectively. To confirm the identity of the mice LDL subfractions isolated by FPLC, ELISA assays were done with each of these LDL subfractions and compared with nLDL and LDL(-) separated from human LDL by using the 1A3 and 2C7 monoclonal antibodies and the 2C7 scFv, developed by our group. The reactivity profiles of both mouse and human LDL subfractions to the antibodies were similar (**Fig. 5C**). The reactivity of the 1A3 mAb was lower

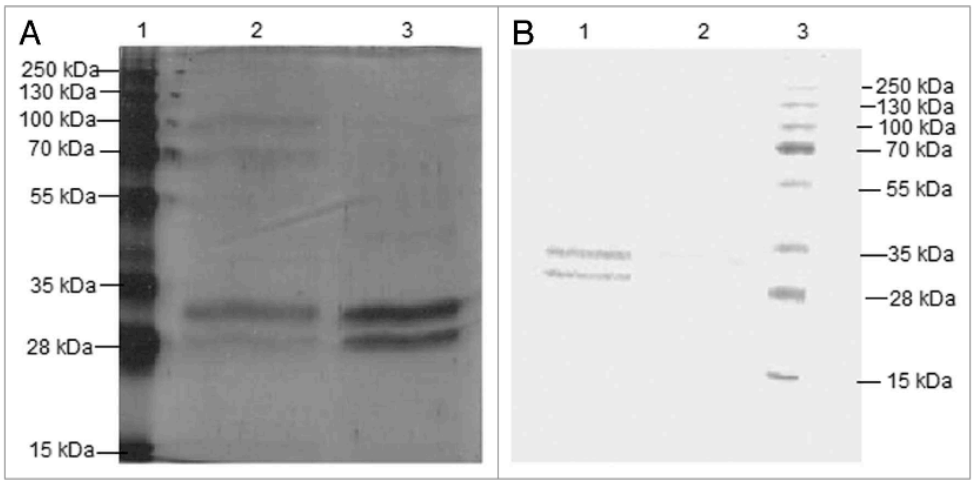


Figure 2. Recombinant protein purification. (**A**) SDS-PAGE analysis of the protein purified by affinity chromatography from the crude supernatant in line 2 and purified scFv protein from previously concentrated and dialyzed supernatant in line 3. Line 1 corresponds to molecular weight marker. (**B**) Western blotting analysis. Line 1: purified scFv protein from previously concentrated and dialyzed supernatant. Line 2: purification from the crude supernatant. Line 3: molecular weight marker.

to human and murine LDL(-) compared with the 2C7 mAb and the 2C7 scFv. Thus, the presence of LDL(-) in the LDL fraction of *Ldlr*$^{-/-}$ mice was confirmed by physical chemical and antigenic characteristics.

Macrophage viability. The MTT assay showed that cell viability was not affected in the presence of up to 6.25 μg/mL 2C7 scFv (**Fig. 6A**). At the highest concentration tested (100 μg/mL 2C7 scFv), cell viability was approximately 60%. In the flow cytometry assays, only 2C7 scFv concentrations higher than 6.25 μg/mL induced death compared with non-treated macrophages (**Fig. 6B**). The percentage of cell death relative to the log of the concentration of 2C7 scFv is shown in **Figure 6C**; 50% of total cell death (apoptosis + necrosis) occurred at 29.12 μg/mL 2C7 scFv. At 6.25 μg/mL 2C7 scFv, no significant changes were observed in any stage of the cell cycle in relation to the control (**Fig. 6D**).

LDL(-) uptake by RAW macrophages. The effect of 2C7 scFv on the formation of foam cells by RAW 264.7 macrophages is shown in **Figure 7A**. The macrophages incubated with LDL(-) in the presence of 2C7 scFv showed a decrease in intracellular lipid droplets compared with the macrophages treated with LDL(-) in the absence of 2C7 scFv. The semi-quantification of foam cells showed lower LDL(-) uptake by the macrophages when treated with 2C7 scFv compared with untreated cells (**Fig. 7B**).

Receptor binding studies. To investigate the binding of LDL(-) to RAW 264.7 macrophage receptors, studies were done by flow cytometry and measurement of fluorescence intensity of DIL-labeled LDL(-) to assess the uptake of LDL(-) by macrophages. **Figure 8A–F** show representative flow cytometry analyses with median fluorescence intensity (MFI) illustrating the autofluorescence of cells. The uptake of LDL(-)-DIL by macrophages (positive control) was inhibited by antibodies reacting with CD36 and CD14 (**Fig. 8G**). MFI values in **Table 1** show

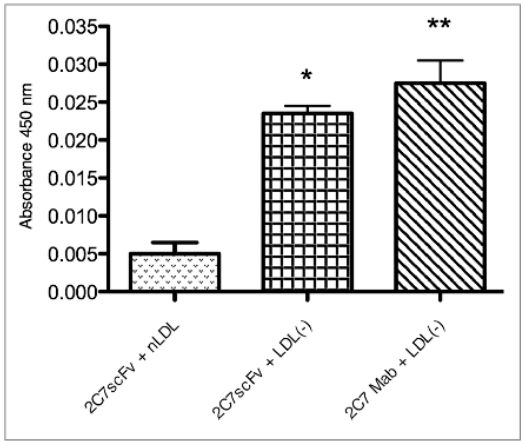


Figure 3. Evaluation of the specificity of 2C7 scFv to LDL(-) by ELISA. 2C7 scFv was added at a concentration of 20 μg/mL to ELISA microplate coated with 1 μg/mL of LDL(-) or nLDL. The microplate was incubated with an anti-His mouse IgG antibody and HRP-conjugated anti-mouse IgG. The absorbance was measured at 450 nm. The results of independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SEM *$p < 0.05$; **$p < 0.01$ compared with control; ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

that anti-CD36 and anti-CD14 antibodies were able to reduce the uptake of LDL(-) by macrophages compared with the control. As expected, the anti-TLR4 antibody did not decreased fluorescence intensity compared with control. In cells preincubated with sets of anti-CD36/CD14 and anti-CD14/TLR4 antibodies, there was greater reduction in LDL(-) uptake compared with the incubation of anti-CD36/TLR4 antibodies, which showed higher LDL(-) uptake compared with anti-CD14 antibody alone.

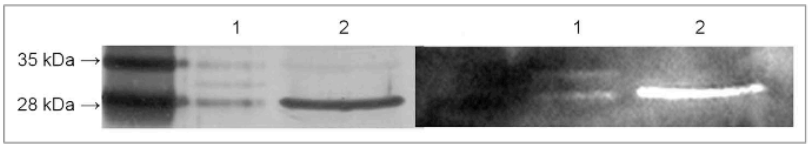


Figure 4. Recombinant protein glycosylation profile. The affinity-purified recombinant 2C7 scFv was treated with Endoglucanase H. The eletrophoretic profile was analyzed by SDS-PAGE (left) and western blotting (right) using anti-His IgG Mouse, anti-mouse IgG-HRP and detection with ECL substrate. A protein of one band is observed after endoglucanase treatment (line 2) and compared with the two bands shown in the untreated samples (line 1).

The DIL-labeled LDL(-) uptake by RAW macrophages was decreased by 2C7 scFv in relation to the uptake of DIL-LDL(-) alone (**Fig. 9A–C**). The higher the 2C7 scFv concentration, the lower the uptake of LDL(-), as shown in **Figure 9D**. Also, treatment of LDL(-) and 2C7 scFv induced low death in cells by apoptosis and necrosis assays, so the results with only viable cells were demonstrated (**Fig. 9E**).

Expression of pro-atherogenic genes in macrophages. To understand the mechanisms of action of 2C7 scFv on RAW macrophages treated with LDL(-), the expression of several genes linked to the development of atherosclerosis was analyzed, and the results are shown in **Figure 10**. The incubation of RAW macrophages with 6.25 μg/mL 2C7 scFv did not induce a significant effect on mRNA expression levels. In contrast, the incubation of macrophages with 37.5 μg/mL LDL(-) induced a statistically significant increase of *Cd36*, *Cox-2* and *Tlr-4* mRNA levels. When RAW macrophages were incubated with LDL(-) in the presence of 2C7 scFv, however, significant inhibition of the LDL(-) induced effects on the atherogenic gene mRNA levels was observed.

Effect of 2C7 scFv on experimental atherosclerosis. The atherosclerotic lesions at aortic sinus of *Ldlr*$^{-/-}$ mice treated with 2C7 scFv are shown in **Figure 11A**. The morphometric analysis of the atherosclerotic plaques demonstrated that the lesion area was significantly decreased ($p < 0.05$) following passive immunization of *Ldlr*$^{-/-}$ mice with 2C7 scFv compared with controls treated with the PBS vehicle (**Fig. 11B**). The percentages of the atherosclerotic lesion areas of treated groups relative to the control group (vehicle) are represented in **Figure 11C**. The lipid profile data showed no significant changes of lipid levels among the studied groups (**Table 2**).

Discussion

In this study, we described the construction, expression and characterization of the recombinant 2C7 scFv antibody fragment and its effect on macrophages and atherosclerotic lesions. Recombinant antibodies, including scFv, are good alternatives for the treatment of various diseases because they are targeted therapeutics that generally show good pharmacokinetics and biodistribution. In addition, their production can be rapid and economical.[20]

Our 2C7 scFv was expressed in *P. pastoris*, an eukaryotic organism capable of producing secretable soluble proteins with modifications such as disulfide bridges and glycosylation,[21] and showed an apparent affinity for LDL(-) only slightly lower than that of the parental 2C7 mAb. This result was expected because scFvs are monovalent, whereas the full length mAb harbors two binding sites for the antigen. Importantly, the 2C7 scFv maintained the same parental antibody specificity for LDL(-), and it is not reactive to native LDL.

Although a 28 kDa protein was detected in the culture supernatant, we observed the presence of two bands with molecular weights of ~28 and 30 kDa in polyacrylamide gels after purification with nickel affinity chromatography. Some studies also reported the expression of two bands of scFv in *P. pastoris*; however, they attributed this to degradation[22,23] or to incomplete cleavage of the signal sequence.[24] Other studies indicate that the additional bands detected may be due to the glycosylation of recombinant proteins with the addition of mannose residues that increase the recombinant protein molecular weight.[25,26] Yeast can perform glycosylation of the amide nitrogen of asparagine residues in the consensus sequence Asn-X-Thr/Ser, providing N-linked glycosylation. This sequence was found in the 2C7 scFv VL CDR1. The electrophoretic profile of the 2C7 scFv was modified after treatment with Endo H and showed one band. This suggests that the presence of two bands after nickel purification was a result of glycosylation, and not proteolytic degradation.

Wild-type mice contain a low level of cholesterol in the IDL/LDL fraction. *Ldlr*$^{-/-}$ mice, however, show marked increase in the IDL/LDL fraction with high LDL-cholesterol, accompanied by an increase in the amount of apoB-100 and apoE in the plasma.[27] In *Ldlr*$^{-/-}$ mice, there is also a reduction in LDL clearance (half-life of 5 h) compared with wild-type mice (half-life of 2 h).[27] This increase in the permanence of LDL in blood circulation, combined with the higher LDL level in this animal model, should contribute to the modification of the LDL particles, which allowed their recognition by the 2C7 mAb and scFv, as was observed in the ELISA assay.

The MTT assay showed that glycosylation did not affect the cell viability for 24 h, as the treatment with RAW macrophages was performed for 16 h. Experimental data suggest that glycosylation was not observed in the murine Fab portion derived from anti-LDL(-) mAb because only one band was visualized in polyacrylamide gel (unpublished results). Thus, glycosylation may be a result of the heterologous expression in *P. pastoris*; this did not interfere with scFv binding specificity to LDL(-) or with its in vitro biologic activity.

In a cytotoxicity assay using RAW 264.7 macrophages, flow cytometry data showed no induction of either apoptosis or necrosis at concentrations up to 6.25 μg/mL 2C7 scFv. Thus, this concentration was used for further experiments with the macrophages. We previously reported that LDL(-) stimulates the expression of *Cd36*, promoting the accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of macrophages and transforming them into foam cells.[28] Here, it is clearly shown that 2C7 scFv inhibited

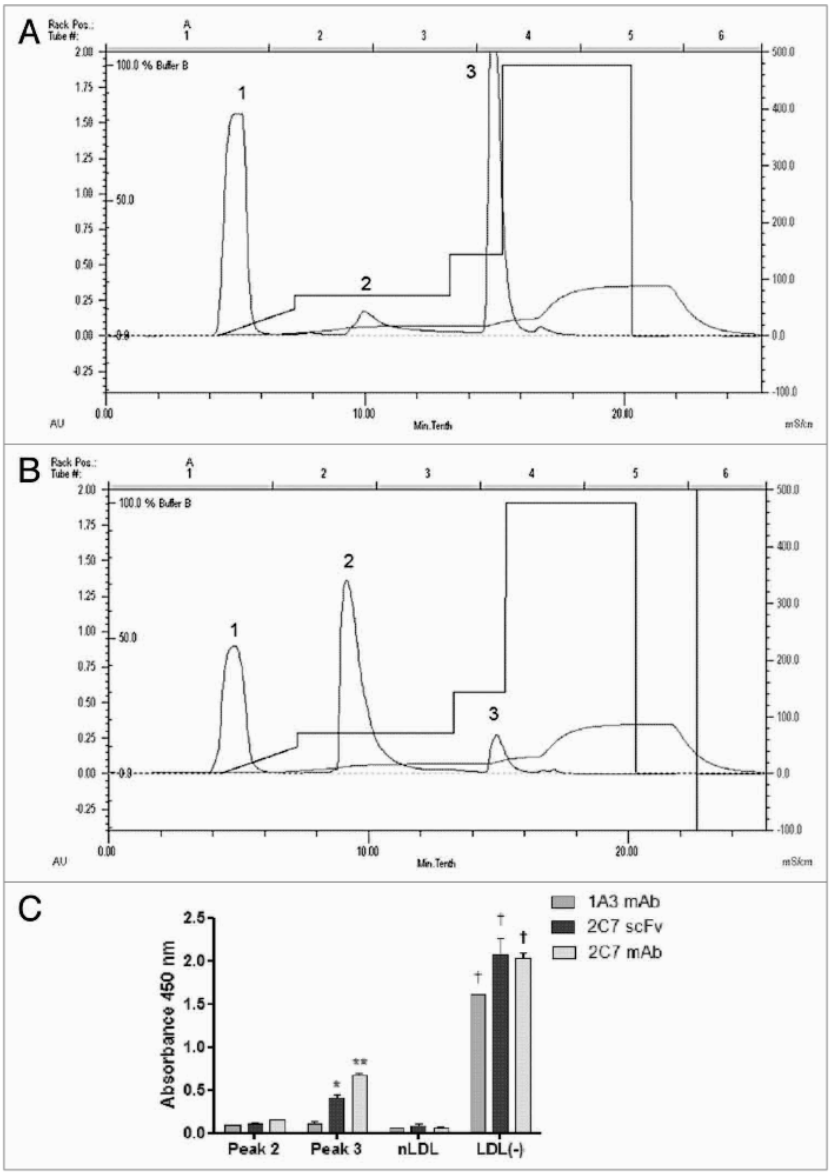


Figure 5. Isolation of LDL(-) from *Ldlr*$^{-/-}$ mice. FPLC chromatographic analysis of mice LDL (**A**) and human LDL (**B**), fractionated into peaks 1, 2 and 3. Mice LDL samples were fractionated by anion exchange liquid chromatography based on differences of superficial charges of LDL subfractions. The peak 1 contains components of the antioxidant cocktail used to avoid in vitro LDL oxidation. The reactivity of peaks 2 and 3 to 1A3 and 2C7 monoclonal antibodies and 2C7 scFv were tested by (**C**) ELISA assays with anti-his and HRP-conjugated anti-mouse antibodies. Absorbance was measured at 450 nm.

LDL(-) uptake by macrophages and downregulated the mRNA expression of *Cd36*. These findings suggest a possible inhibitory action by this recombinant scFv on atherogenesis because it could prevent formation of foam cells in arterial intima. Moreover, 2C7 scFv inhibited the overexpression of pro-inflammatory genes that play an important role in the atherogenic process. We have shown here that LDL(-) induces an upregulation of *Tlr-4* and *Cox-2* mRNA expression in RAW 264.7 macrophages. In contrast, 2C7 scFv was able to inhibit these LDL(-) actions by blocking the increase of both *Tlr-4* and *Cox-2* mRNA expression. The inhibition of TLR-4 by 2C7 scFv is highly relevant[29,30] because it has been shown that minimally modified LDL induces the pro-atherogenic activation of macrophages by a TLR-4-dependent mechanism, stimulating the expression of pro-inflammatory

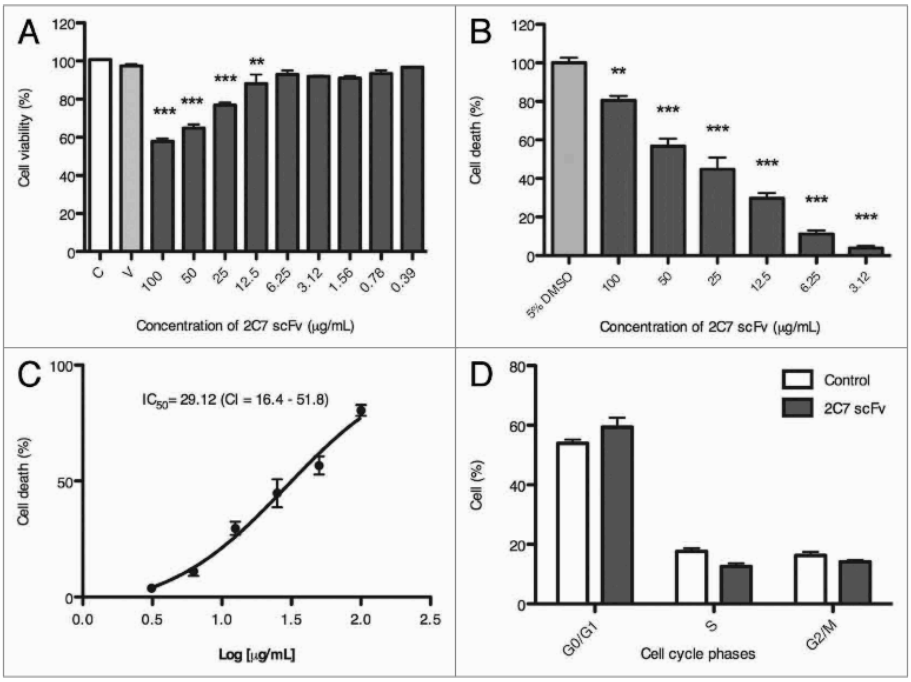


Figure 6. Effect of 2C7 scFv on RAW macrophages. (**A**) Cell viability evaluated by MTT. (**B**) Relative cell death results normalized in relation to DMSO control (100%). (**C**) Percentage of cell death relative to the log of 2C7 scFv concentration. (**D**) Cell cycle data. The results of independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SEM *p < 0.05; **p < 0.01 compared with control; ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

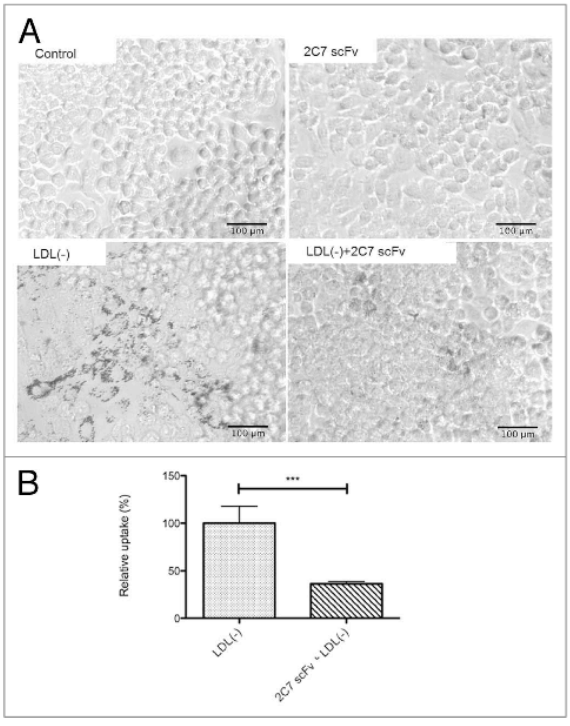


Figure 7. LDL uptake by RAW macrophages. RAW macrophages (10^5 cells/well) were incubated in the presence of LDL(-) and 2C7 scFv for 16 h. (**A**) Representative images show macrophages stained with Oil Red O. Images were obtained using the Motic Images Plus version 2.0 program at a 20× magnification. (**B**) Semi-quantification of lipid droplet accumulation in macrophages treated with 2C7 scFv and LDL(-) compared with macrophages treated only with LDL(-). Representative images are from three independent experiments.

cytokines.[30] The COX-2 gene is expressed in the foam cell macrophages present in atherosclerotic lesions,[31] and its overexpression induces the formation of early atherosclerotic lesions in *Ldlr*$^{-/-}$ mice[32] and probably in human atherosclerotic lesions.[33] Therefore, the effect of 2C7 scFv on RAW 264.7 macrophages, which promotes the downregulation of *Cox-2*, *Tlr-4* and *Cd36* mRNA expression, indicates that this recombinant antibody fragment is able to block the pro-inflammatory and pro-atherogenic actions of LDL(-).

The receptor binding assays done in the present study showed that the entry of LDL(-) in RAW macrophages can occur through CD14 and CD36 receptors, which could be a route by which LDL(-) was able to induce proinflammatory effects on macrophages. In fact, a previous report showed that minimally modified LDL can bind to CD14, making it a likely candidate receptor for LDL(-).[29] Recently, a relationship has been established between the increase of CD14 and CD36 expression in circulating human

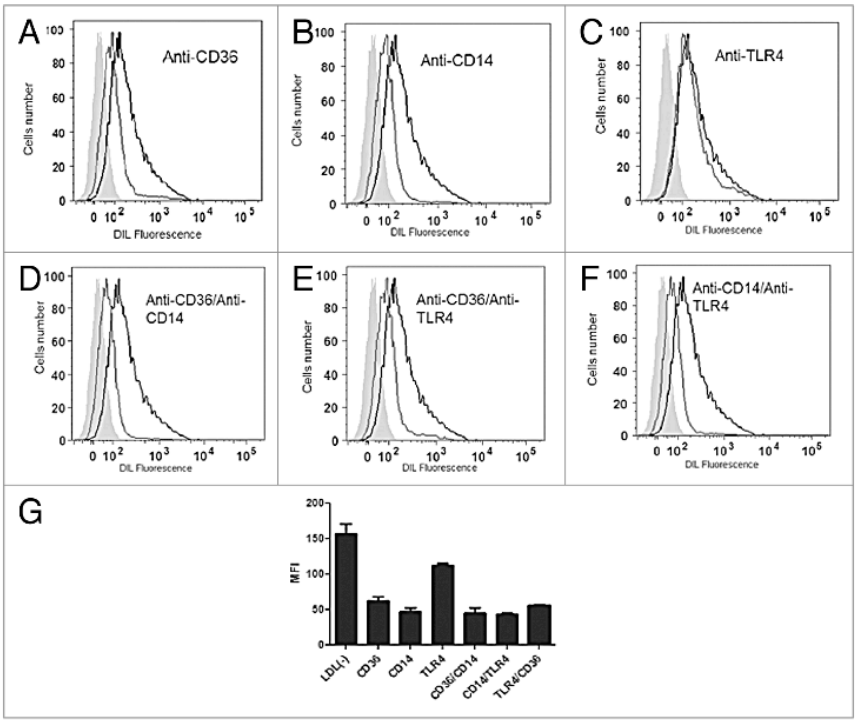


Figure 8. Representative images from flow cytometry analysis of the fluorescence intensity of LDL(-)-DIL taken up by RAW 264.7 macrophages blocked with the following antibodies: (**A**) anti-CD36, (**B**) anti-CD14, (**C**) anti-TLR4, (**D**) anti-CD36/CD14, (**E**) anti-CD36/TLR4, (**F**) anti-CD14/TLR4. (**G**) Graph showing the decrease of LDL (-)-DIL uptake with blocking antibodies specific to CD36, CD14, and TLR4 receptors. Data are represented as mean of MFI values.

monocytes and the risk of coronary artery disease in patients with cardiovascular disease.[34] CD14 is also able to induce the release of pro-inflammatory cytokines in monocytes and macrophages after stimulation by mmLDL.[35] We demonstrated that at 6.25 μg/mL 2C7 scFv reduced the uptake of LDL(-)-DIL by macrophages, and the reduction was greater at higher concentrations of 2C7 scFv. Although cell viability was decreased in the presence of 12.5 and 25 μg/mL 2C7 scFv, cell viability was unaffected by the co-incubation of LDL(-) and 2C7 scFv at all concentrations used in the flow cytometry analysis. Thus, a dose-dependent effect occurs for the inhibition of LDL(-) uptake by 2C7 scFv.

The atheroprotective action of the 2C7 scFv was confirmed by our studies with *Ldlr*$^{-/-}$ mice. The antibody fragment was able to decrease the atheroma area in the aortic sinus of these animals by approximately 44% with a single weekly dose. Moreover, the atheroprotective action of 2C7 scFv was unrelated to changes in lipid concentrations in blood plasma. Recombinant antibodies against peptides of MDA-modified apoB 100 have been shown to significantly decrease atherosclerosis.[36] As previously reported, scFv and Fab against in vitro oxidized LDL inhibited foam cell formation and the progression of atherosclerotic lesions by blocking the binding of oxLDL to macrophages and their subsequent internalization.[37] Moreover, passive immunization with anti-tumor necrosis factor and anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa antibodies have been reported for the treatment of unstable angina and the prevention of restenosis, respectively, as reviewed elsewhere.[38]

Table 1. Fluorescence intensity of LDL(-)-DIL taken up by RAW macrophages in the presence of anti-CD36, anti-CD14 and anti-TLR4 antibodies

Treatment	MFI
LDL(-)	178.5
CD36	83.9
CD14	68.2
TLR4	133.5
CD36/CD14	66.9
CD14/TLR4	64.0
TLR4/CD36	77.1

Values are shown as median fluorescence intensity (MFI) using the treatment of LDL(-)-DIL as control. Treatments with blocking antibodies were compared with the control.

In conclusion, this study, which focused on the production and assessment of a recombinant antibody fragment that recognizes negatively charged LDL particles, showed that 2C7 scFv

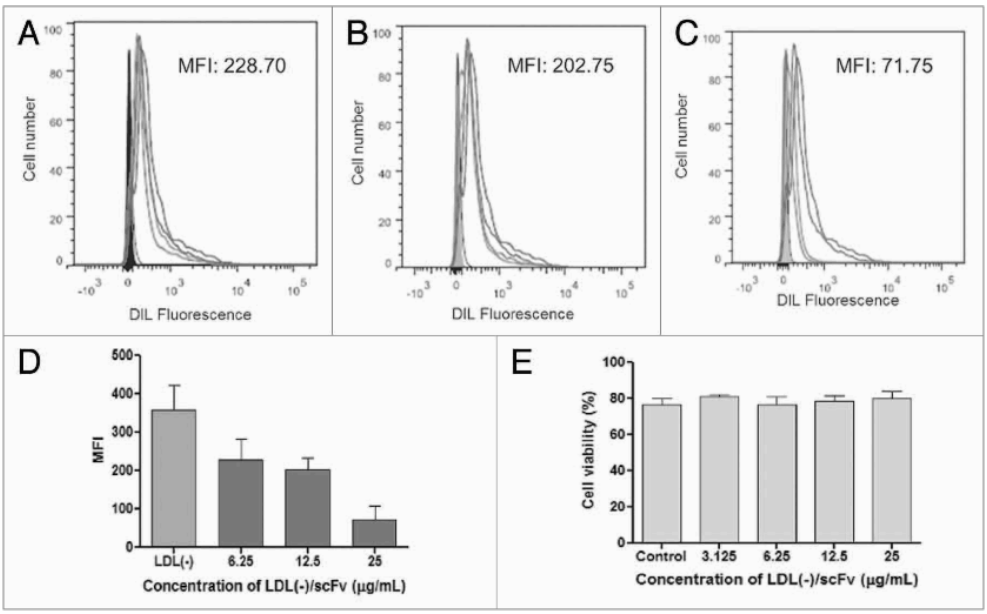


Figure 9. Inhibition of LDL (-)-DIL uptake by different concentrations of 2C7 scFv. The concentrations (**A**) 6.25, (**B**) 12.5, and (**C**) 25 µg/mL were tested. (**D**) represents quantitative data of uptake inhibition, from the mean of MFI values and (**E**) cell viability with co-incubation of LDL(-) and 2C7 scFv measured by flow cytometry analysis.

was able to inhibit the formation of macrophage-derived foam cells, the expression of pro-inflammatory factors and the progression of atherosclerosis in *Ldlr*$^{-/-}$ mice. Based on these data, the 2C7 scFv has potential value for future studies on the prevention or treatment of atherosclerosis.

Materials and Methods

Bacteria strains, yeast strains and plasmids. *Escherichia coli* DH5α was used for all plasmid manipulations. SMD1168 strain *P. pastoris* was purchased from Invitrogen Life Technologies (Cat# C17500). For the assembly of the expression cassette, pGEM-T Easy plasmid was purchased from Promega (Cat# A1360). The pIg16 and pPIG16 plasmids were previously described.[39,40]

Cloning of the 2C7 scFv. The hybridoma 2C7D5F10 (2C7)[41] was cultivated in bottles containing RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 100 U/mL penicillin G sodium and 0.25 µg/mL amphotericin B. The bottles were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere at 95% relative humidity until 10^6 cells were obtained. To isolate the total RNA, the cells were treated with 1 mL of TRIzol (Cat# 15596–026, Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs coding for the antibody variable heavy-chain gene (VH) and the variable light-chain gene (VL) were synthesized using 1 µM each of the primers κ18 (5'-TACAGTTGGT GCAGCATC-3') and 1 (5'-TGGACAGGGA TCCAGAGTTC CAGGTCACT-3') to prepare Cκ and Cγ, respectively. For the amplification of the VH and VL region cDNA, we used a library of sense primers and the anti-sense primers that were previously described.[42-44] Amplified VH and VL cDNAs were cloned in the pGEM-T Easy plasmid following the manufacturer's instructions. Five clones from each variable region were sequenced in both directions with the T7 (5'-TAATACGACT CATATAGGG-3') and SP6 (5'-GATTTAGGTG ACACTATAG-3') primers using an automatic sequencer MegaBACE 1000 (GE Healthcare) and a DYEnamic ET Dye Terminator Kit (with Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase, Cat# US81095, GE Healthcare). For the assembly of murine scFv, the sequences were analyzed by Electropherogram Quality Analysis (available at www.biomol.unb.br/phph/) using the GenBank and Kabat databanks (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

The murine scFvs genes were assembled using the pIg16 plasmid expression cassette framework.[45] This plasmid encodes the gene for Z22 scFv fused to the staphylococcal protein A domain (SpA).[46] The 2C7 VH and VL genes were reamplified using oligonucleotides that created specific restriction sites. The assembly was performed by replacing the Z22 VH and VL genes with the anti-LDL(-) VH and VL genes and by introducing a hexahistidine tag at the 3' terminus of 2C7 VL. This final sequence was inserted into pPIgLE yeast expression vector, a plasmid modified from pPIg 16 vector.

Production of 2C7 scFv in *Pichia pastoris*. *P. pastoris* SMD1168 cells were electroporated with a BTX electroporator model ECM 830, in the presence of linearized plasmid DNA. His$^+$ transformants were screened and cultured using the method previously described.[47] 2C7 scFv was expressed in 200 mL of

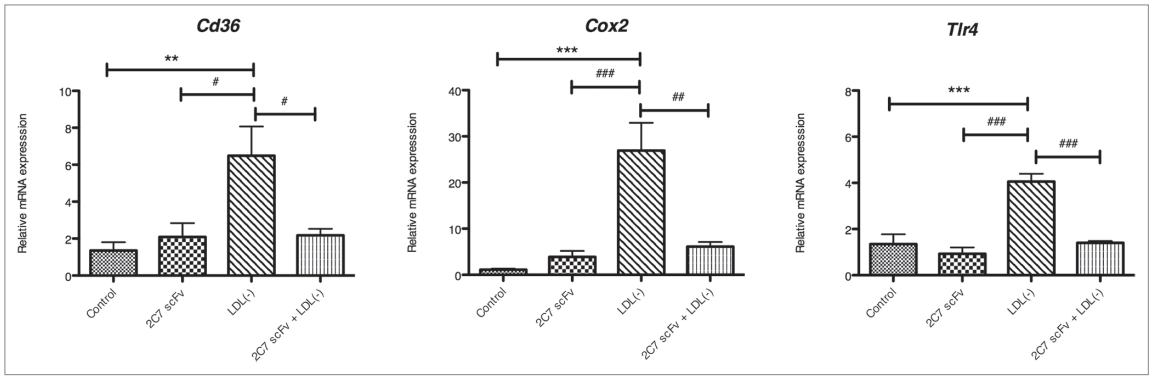


Figure 10. Effect of 2C7 scFv on the relative expression of *Cd36*, *Cox-2* and *Tlr-4* mRNA. Cells were treated with 2C7 scFv (6.25 μg/mL), LDL(-) (37.5 μg/ml) or 2C7 scFv + LDL(-) for three hours. The results of independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SEM *$p < 0.05$ vs. control; #$p < 0.05$ compared with treatment with LDL(-); ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

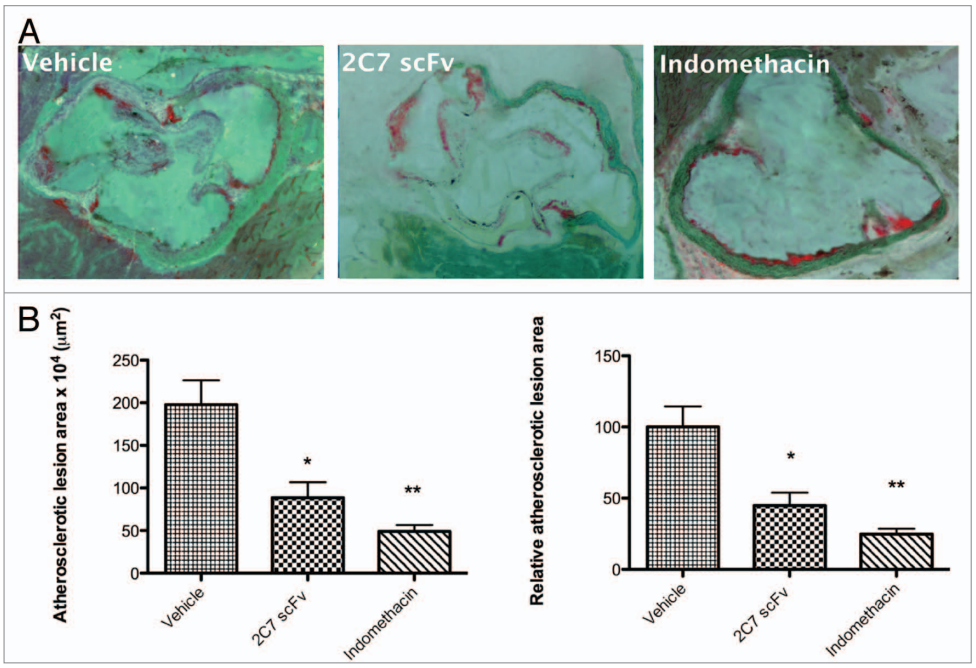


Figure 11. Effect of passive immunization of *Ldlr*$^{-/-}$ male mice with 2C7 scFv on the atherosclerotic lesion development at the aortic sinus. (**A**) Representative sections of the aortic sinus from the control, 2C7 scFv and positive control groups are shown. Images were obtained using the NIS-Elements AR(tm) version 3.10 at a 10× magnification. (**B**) Mean ± SEM of atherosclerotic lesion area. (**C**) Percent of atherosclerotic lesion area in relation to the control. $p < 0.05$ compared with control; ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

BMGY medium at 30°C at 200 rpm until an OD_{600} of 2–6 was reached. The cells were then centrifuged and resuspended in 200 mL of BMMY medium, with an addition of 1% methanol and 1 mM PMSF every 24 h, and were then incubated for 2 d at 20°C with agitation. The supernatant was harvested by centrifugation, and the cells were resuspended in another 200 mL of BMMY medium. The culture was incubated for an additional 2 d in the same conditions. The supernatant of the culture was harvested by centrifugation, filtered through a 0.45 μm filter, and 1 mM PMSF was added. The supernatants were added to 1 mL of Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (Cat# 17–5318–01, GE Healthcare). The supernatant (flow through) was decanted, and the resin was poured

Table 2. Lipid profile of *Ldlr*$^{-/-}$ mice after passive immunization with 2C7 scFv

Groups	TC	HDL-C	LDL-C	TG	VLDL-C
Control (PBS)	1860 ± 283	33.4 ± 7.52	1730 ± 267	474.0 ± 113	94.8 ± 22.7
Anti-LDL(-) 2C7 scFv	1630 ± 226	26.3 ± 10.4	1520 ± 209	404 ± 136	80.8 ± 27.1
Indomethacin	1710 ± 314	26.3 ± 4.5	1590 ± 295	465 ± 178	93.0 ± 35.6

The concentrations of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG) and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) were determined in the following studied groups: PBS control, 2C7 scFv treatment and indomethacin (positive control). Data are shown in mg/dL as Mean ± S. D. ($p < 0.05$ compared with controls).

into a 1.5 cm × 12 cm (20 mL) Econo-Pac Chromatography column (Cat# 732–1010, Bio-Rad Laboratories). 2C7 scFv was eluted with binding buffer containing 500 mM imidazole. The appropriate fractions were pooled, and the buffer was exchanged with PBS and concentrated using centrifugal filtration devices (Vivaspin MWCO 10,000, Cat# 28–9323–60, GE Healthcare). The purified proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membrane was blocked for 16 h with 5% skim milk in PBS at 4°C and subsequently incubated with the following antibodies for 1 h at room temperature: anti-His mouse IgG (Cat# 27–4710–01, GE Healthcare) and anti-mouse IgG-HRP (Cat# A1055, Zymed). The target proteins were detected using an ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Cat# RPN2135, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

Deglycosylation of 2C7 scFv. For enzymatic deglycosylation, 1 μg of purified 2C7 scFv was denatured with 0.5% SDS and 0.04 M dithiothreitol (DTT) and heated at 100°C for 10 min. It was then added to a reaction buffer (0.5% sodium citrate, pH 5.5) with 1000 units of endoglycosidase H (Cat# P0702S, Endo H, New England Biolabs), which hydrolyzes a single N-acetyl-d-glucosamine (GlcNAc) sugar residue, to cleave high-mannose glycans. The digestion was incubated at 37°C for 16 h and assayed by SDS-PAGE and western blotting as described above.

ELISA assay for 2C7 scFv affinity. The isolation of LDL(-) from human plasma was performed as previously reported.[41] ELISA assays were done according to a previous work[41] with minor modifications including the addition of anti-His mouse IgG (diluted 1:1,000 with 1% skim milk; GE Healthcare) to recognize 2C7 scFv. Specific binding was detected with tetramethyl benzidine (TMB) substrate for color development, and the absorbance was measured at 450 nm. All experiments were approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of Sao Paulo.

Analysis of LDL subfractions from *Ldlr*$^{-/-}$ mice. A pool of blood samples was obtained from *Ldlr*$^{-/-}$ mice treated with hypercholesterolemic diet. Blood was collected with heparinized syringes and the blood plasma was separated by centrifugation. Then, the total LDL fraction was isolated from plasma by ultracentrifugation at 56,000 rpm for 7 h at 4°C. After removing the triglycride-rich fractions in the supernatant, the infranatant was submitted to a second ultracentrifugation to isolate the LDL fraction. The subfractions of LDL were then separated by FPLC according to the protocol previously described.[41]

For the ELISA assay, a 96-well microplate was coated with 10 μg/mL of the following samples: 2 and 3 peaks of FPLC chromatogram of mice samples, human nLDL and LDL(-) for 16 h at 4°C in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. After blocking the microplate with 2% milk diluted in PBS, the samples were incubated with 10 μg/mL of 1A3 and 2C7 mAbs and 2C7 scFv for 1 h and 30 min at 37°C. Then, the microplate was incubated with anti-mouse-HRP antibody (diluted 1:1,000 in 1% milk, CAT#1706516, BioRad) for detection with 1A3 and 2C7 mAbs and anti-His (diluted 1: 1,000 with 1% milk, CAT#27471001, GE Healthcare) for detection with 2C7 scFv. The binding of samples to the antibodies was evaluated by using TMB as substrate and measuring the absorbance at 450 nm.

Cell culture conditions. Murine macrophages of the RAW264.7 cell line were obtained from the cell bank of the Federal University of Rio de Janeiro (Cat# 0212, UFRJ). RAW 264.7 macrophages were cultured in RPMI media containing 2 mM L-glutamine, 100 μg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 10% fetal bovine serum at 37°C in 5% CO_2 in fully humidified air.

Cell viability, cell death and cell cycle assays. The MTT assay was performed as previously described.[48] For the apoptosis and necrosis assays (cell death), wells containing 1 × 10^5 RAW macrophages were treated with different concentrations (3.12 to 100 μg/mL of 2C7 scFv, 12.5 to 62.5 μg/mL of LDL(-) and 37.5 μg/mL of LDL(-) with 3.125 to 25 μg/mL of 2C7 scFv). The cell death and cell cycle assays were performed by flow cytometry. Following 24 h of treatment, the cells were resuspended in the reaction buffer supplied with the kit for the detection of apoptosis and necrosis (APOAF, Cat# A9210, Sigma-Aldrich); 0.625 μg of annexin V - FITC and 2.0 μg of propidium iodide (Cat# P2667, Sigma-Aldrich) were added to the cells according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated for 10 min at room temperature, protected from light, and analyzed with a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences). Dimethyl sulfoxide (5%, DMSO, Cat# D8418, Sigma-Aldrich) was used as the positive control for cell death and 10,000 events were observed. For the cell cycle analysis, 2 × 10^5 cells per well of RAW macrophage were incubated under the same conditions mentioned previously, but the wells were only treated with a concentration of 6.25 μg/mL 2C7 scFv. The cells were lysed with 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton, treated with 10 mg/mL RNase A (Cat# 12091–039, Invitrogen Life Technologies) and stained with 1 mg/mL propidium iodide for 30 min, with protection from light, before taking measurements. Data analysis was performed using FlowJo version 9.5.1 software (TreeStar).

LDL uptake assay. The LDL(-) uptake assay for RAW 264.7 macrophages was performed according to previous reports.[49] Macrophages were exposed to the following treatments: 37.5 μg/mL native LDL (nLDL), 37.5 μg/mL LDL(-) and 37.5 μg/mL LDL(-) plus 6.25 μg/mL 2C7 scFv. Untreated cells were used as the control. The cells were treated for 16 h and evaluated for their level of LDL uptake. The cells were fixed in PBS containing 10% formaldehyde for 30 min at room temperature. Subsequently, the intracellular lipid droplets were stained with Oil Red O (Cat# O0625, Sigma-Aldrich) for 1 h, and their images were obtained with Motic Images Plus 2.0 software (Micro-Optics) for semi-quantification of the foam cells.

Gene expression analysis by qRT-PCR. The LDL uptake assay was used for gene expression analysis. RNA from the treated cells was isolated with TRIzol according to the manufacturer's recommendations. The cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA using oligo-dT 12–18 and Superscript III (Cat# 12574–018, Invitrogen Life Technologies). For the real time-PCR reactions, 20 ng of cDNA and specific primers were used. The reactions were performed according to the SYBR Green Master Mix (Cat# 4364346, Applied Biosystems) instructions. The following primers were used: CD36 scavenger receptor (*Cd36*) gene: sense primer, 5'-TTTCCTCTGA CATTTGCAGG TCTA-3', and anti-sense primer, 5'-AAAGGCATTG GCTGGAAGAA-3'; toll-like receptor-4 (*Tlr-4*): sense primer, 5'-TCATGGCACT GTTCTTCTCCT-3' and anti-sense primer, 5'-CATCAGGGAC TTTGCTGAGT T-3'; cyclooxygenase-2 (C*ox-2*) enzyme: sense primer, 5'-TGGTGCCTGG TCTGATGATG-3' and anti-sense primer, 5'-GTGGTAACCG CTCAGGTGTT G-3' and 18S rRNA: sense primer, 5'-GTAACCCGTT GAACCCCATT-3' and anti-sense primer, 5'-CCATCCAATC GGTAGTAGCG-3'. The expression levels of mRNA were evaluated by the ΔΔCt method.[50]

1,1'-diotadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(DIL) labeling of LDL(-). One mg of LDL(-) was incubated with 150 μg of DIL (CAT#D282, Life Technologies) diluted in 2 mL of lipoprotein deficient serum[51] and this mixture was incubated at 37°C for 8 h. After incubation, the mixture was separated by ultracentrifugation at 56,000 rpm for 7 h at 4°C to separate the LDL(-) from the excess of free DIL. LDL(-)-DIL was dialyzed against PBS and quantified by BCA method (CAT #23225, Thermo Scientific).

Receptors binding studies in macrophages. For binding studies, 10×10^5 macrophage cells were plated per well and 21 h later the cells were pre-incubated with 10 μg/mL of blocking antibodies against CD36 (CAT#Ab78054, Abcam), CD14 (CAT#Ab78313, Abcam) and TLR-4 (CAT#Ab47093, Abcam) receptors. After 3 h, 37.5 μg/mL LDL(-)-DIL was added to the cells and maintained for 16 h as mentioned for cell culture conditions described in the Materials and Methods section. To measure the inhibition of LDL(-)-DIL uptake, RAW macrophages were treated with a predetermined concentration of 37.5 μg/mL LDL(-) and varying concentrations of 2C7 scFv (6.25, 12.5 and 25 μg/mL) for 16 h. The medium was then removed and cells were detached from the plate using cold PBS and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The cells were washed 2 times with PBS. Finally, cells were resuspended in 200 μL of PBS and the fluorescence of LDL(-)-DIL was determined by flow cytometry. The signals from DIL were shown in a logarithmic fluorescence intensity, expressed as the difference in the MFI captured from cells treated with blocking antibodies or 2C7 scFv compared with cells treated only with LDL(-)-DIL.

Animals, chow and experimental design. Male C57BL/6J homozygous LDL receptor-deficient mice (*Ldlr*$^{-/-}$) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor). The animals were maintained in individual cages at 22°C on a 12 h light–dark cycle. A total of 24 *Ldlr*$^{-/-}$ mice (n = 8 per group, 12 weeks old) were divided into three groups and were intravenously administered a single dose per week of one of the following: vehicle (PBS), 2C7 scFv (5 mg/kg of body weight) and anti-inflammatory positive control (indomethacin, 1 mg/kg of body weight). The experiments were performed using an initial atherosclerotic lesion protocol as previously described.[19] All mice were fed a semi-synthetic chow that was based on a Western-type diet containing 20% fat, 0.5% (w/w) cholesterol (Sigma-Aldrich), 0.5% (w/w) colic acid (Sigma-Aldrich), 16.5% casein, vitamins and minerals according to the recommendations of American Institute of Nutrition (AIN)-93.[52] All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Studies of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo in agreement with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation.

Biochemical assessment of serum lipid profile. After treatment, mice were anesthetized with xylazine hydrochloride (2.0 g/100 ml; Vetbrands) and ketamine hydrochloride (1.0 g/10 ml; Vetnil) at doses of 5 mg/Kg and 10 mg/kg, respectively, and blood was collected by cardiac puncture. The blood samples were then centrifuged at 1500× g for 15 min at 4°C to obtain serum. The mice serum was utilized for determination of lipid profile [total cholesterol, triglyceride, cholesterol high-density lipoprotein (HDL-C), cholesterol low-density lipoprotein (LDL-C) and cholesterol very low-density lipoprotein (VLDL-C)]. All determinations were done with commercial kits from Labtest Diagnóstica, by direct methods without previous treatment of the samples. The results of the lipid profile were expressed in mg/dL.

Preparation of histological sections and measurement of atherosclerotic lesion area. The preparation of histological sections and the measurement of atherosclerotic lesion area were performed as previously reported.[53] The inclusion of the tissue for slicing was performed in three solutions of different concentrations of gelatin: initially 5% solution of gelatin for three hours, then a 10% solution for three hours and finally a 25% solution for 16 h, with all steps occurring in a water bath (temperature between 40–50°C). The ventricles were sectioned from the apex and base in a plane parallel to a line defined by the edges of the lateral atria. Consecutive cuts with 6 mm thick were collected between the aortic sinus and the aortic onset with an average length of 250–300 microns.[54] The slides were stained with Oil Red-O (Sigma) and the sections were analyzed by Nikon optical microscope coupled to a camera for image capture program performed by the NIS-Elements AR (tm) version 3.10. To obtain the area of the lesions and quantify atherosclerotic lesions close

to the aortic valve in the aortic root, Axio Vision® was used for image acquisition, processing and analyses of all histological sections. All analyses were double-blind and were performed independently by two observers.

Statistical analysis. Results were expressed as the means ± SEM. The mRNA expression data were analyzed using ANOVA and Student t-tests. Tukey's test was used for the analysis of paired comparisons. All calculations were performed using GraphPad Prism software. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflict of interest was disclosed.

Acknowledgments

The authors wish to thank M.Sc. Alejandro Esteban Cuevas Villegas for adjustment of the images, M.Sc. Elaine Moura Augusto for the isolation of LDL(-) and M.Sc. Renata Albuquerque for collaboration with flow cytometry. This research was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo) and INCT_if/CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). SMK and MFC received scholarships from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

References

1. Kipriyanov SM, Le Gall F. Generation and production of engineered antibodies. Mol Biotechnol 2004; 26:39-60; PMID:14734823; http://dx.doi.org/10.1385/MB:26:1:39
2. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nat Rev Immunol 2010; 10:301-16; PMID:20414204; http://dx.doi.org/10.1038/nri2761
3. Reichert JM. Which are the antibodies to watch in 2013? MAbs 2013; 5:1-4; PMID:23254906; http://dx.doi.org/10.4161/mabs.22976
4. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol 2005; 23:1126-36; PMID:16151406; http://dx.doi.org/10.1038/nbt1142
5. Shen Z, Yan H, Zhang Y, Mernaugh RL, Zeng X. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. Anal Chem 2008; 80:1910-7; PMID:18290668; http://dx.doi.org/10.1021/ac7018624
6. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. Clin Dev Immunol 2012; 2012:980250; PMID:22474489; http://dx.doi.org/10.1155/2012/980250
7. Quiroz FG, Sinclair SM. Engineering antibody fragments: replicating the immune system and beyond. Revista Ingenieria Biomedica 2010; 4:39-51
8. Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. Arteriosclerosis 1988; 8:79-87; PMID:3341993; http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.8.1.79
9. Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. J Cell Mol Med 2010; 14:70-8; PMID:19968738; http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00978.x
10. Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Avogaro P. Probucol protects low-density lipoproteins from in vitro and in vivo oxidation. Pharmacol Res 1994; 29:337-44; PMID:7971685; http://dx.doi.org/10.1016/1043-6618(94)80055-3
11. Sánchez-Quesada JL, Otal-Entraigas C, Franco M, Jorba O, González-Sastre F, Blanco-Vaca F, et al. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. Am J Cardiol 1999; 84:655-9; PMID:10498134; http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00411-7
12. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Otal C, Franco M, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. J Lipid Res 2002; 43:699-705; PMID:11971940
13. Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Rigla M, Payés A, Benítez S, et al. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:3243-9; PMID:11443196; http://dx.doi.org/10.1210/jc.86.7.3243
14. Mello AP, da Silva IT, Abdalla DS, Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. Atherosclerosis 2011; 215:257-65; PMID:21292266; http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.028
15. Niccoli G, Bacà M, De Spirito M, Parasassi T, Cosentino N, Greco G, et al. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. Atherosclerosis 2012; 223:166-70; PMID:22640815; http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.005
16. Faulin TES, Cavalcante MF, Abdalla DSP. Role of electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Lipidol 2010; 5:719-29; http://dx.doi.org/10.2217/clp.10.52
17. Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. Med Res Rev 2008; 28:483-544; PMID:18000963; http://dx.doi.org/10.1002/med.20118
18. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). Annu Rev Immunol 2009; 27:165-97; PMID:19302038; http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132620
19. Grosso DM, Ferderbar S, Wanschel ACBA, Krieger MH, Higushi ML, Abdalla DSP. Antibodies against electronegative LDL inhibit atherosclerosis in $LDLr^{-/-}$ mice. Braz J Med Biol Res 2008; 41:1086-92; PMID:19148370; http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2008001200007
20. Peterson E, Owens SM, Henry RL. Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse. AAPS J 2006; 8:E383-90; PMID:16796389
21. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast 2005; 22:249-70; PMID:15704221; http://dx.doi.org/10.1002/yea.1208
22. Tanfous NGB, Kallel H, Jarboui MA, Fathallah DM. Expression in *Pichia pastoris* of a recombinant scFv form of MAb 107, an anti human CD11b integrin antibody. Enzyme Microb Technol 2006; 38:636-42; http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.014
23. Shi X, Karkut T, Chamankhah M, Alting-Mees M, Hemmingsen SM, Hegedus D. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 2003; 28:321-30; PMID:12699697; http://dx.doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00706-4
24. Eldin P, Pauza ME, Hieda Y, Lin G, Murtaugh MP, Pentel PR, et al. High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. J Immunol Methods 1997; 201:67-75; PMID:9032410; http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00213-X
25. Heimo H, Palmu K, Suominen I. Human placental alkaline phosphatase: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization of the enzyme. Protein Expr Purif 1998; 12:85-92; PMID:9473461; http://dx.doi.org/10.1006/prep.1997.0808
26. Sainz-Pastor N, Tolner B, Huhalov A, Kogelberg H, Lee YC, Zhu D, et al. Deglycosylation to obtain stable and homogeneous Pichia pastoris-expressed N-A1 domains of carcinoembryonic antigen. Int J Biol Macromol 2006; 39:141-50; PMID:16678252; http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.022
27. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest 1993; 92:883-93; PMID:8349823; http://dx.doi.org/10.1172/JCI116663
28. Pedrosa AMC, Faine LA, Grosso DM, de Las Heras B, Boscá L, Abdalla DSP. Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: involvement of Nrf2. Biochim Biophys Acta 2010; 1801:430-7; PMID:20005974; http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.001
29. Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. J Biol Chem 2003; 278:1561-8; PMID:12424240; http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209634200
30. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. Circ Res 2009; 104:210-8, 21p, 218; PMID:19096031; http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.181040
31. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. Nat Med 2002; 8:1235-42; PMID:12411950; http://dx.doi.org/10.1038/nm1102-1235
32. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. Circulation 2002; 105:1816-23; PMID:11956125; http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000014927.74465.7F
33. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol 1999; 155:1281-91; PMID:10514410; http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65230-3
34. Maiwald S, Zwetsloot PP, Sivapalaratnam S, Dallinga-Thie GM. Monocyte gene expression and coronary artery disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2013; 16:411-7; PMID:23739627
35. Chávez-Sánchez L, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Zenteno E, Ledesma-Soto Y, Montoya-Díaz E, et al. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1β, IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. Lipids Health Dis 2010; 9:117; PMID:20946675; http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-9-117

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 107 (2016) 120–129

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

A nanoformulation containing a scFv reactive to electronegative LDL inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice

Marcela Frota Cavalcante [a,1], Soraya Megumi Kazuma [a,1], Eduardo André Bender [b], Márcia Duarte Adorne [b], Mayara Ullian [a], Mariana Matera Veras [c], Paulo Hilário Nascimento Saldiva [c], Andrea Queiroz Maranhão [d], Silvia Stanisçuaski Guterres [e], Adriana Raffin Pohlmann [b], Dulcineia Saes Parra Abdalla [a,*]

[a] Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil
[b] Department of Organic Chemistry, Chemistry Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
[c] LIM5, Department of Pathology, Medicine School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil
[d] Molecular Immunology Laboratory, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Distrito Federal, Brazil
[e] Department of Production and Control of Medicines, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 January 2016
Revised 24 June 2016
Accepted in revised form 1 July 2016
Available online 1 July 2016

Keywords:
Atherosclerosis
Nanocapsules
Single chain fragment variable
Electronegative LDL
Macrophage
Foam cell

ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease responsible for the majority of cases of myocardial infarction and ischemic stroke. The electronegative low-density lipoprotein, a modified subfraction of native LDL, is pro-inflammatory and plays an important role in atherogenesis. To investigate the effects of a nanoformulation (scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn) containing a scFv reactive to LDL(−) on the inhibition of atherosclerosis, its toxicity was evaluated *in vitro* and *in vivo* and further it was also administered weekly to LDL receptor knockout mice. The scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation did not induce cell death in RAW 264.7 macrophages and HUVECs. The 5 mg/kg dose of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn did not cause any typical signs of toxicity and it was chosen for the evaluation of its atheroprotective effect in $Ldlr^{-/-}$ mice. This nanoformulation significantly decreased the atherosclerotic lesion area at the aortic sinus, compared with that in untreated mice. In addition, the *Il1b* mRNA expression and CD14 protein expression were downregulated in the atherosclerotic lesions at the aortic arch of $Ldlr^{-/-}$ mice treated with scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn. Thus, the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation inhibited the progression of atherosclerotic lesions, indicating its potential use in a future therapeutic strategy for atherosclerosis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular disease is the most frequent cause of death worldwide [1], accounting for almost 30% of all deaths [2]. Although several diseases can affect the cardiovascular system, atherosclerosis predominates as the major cause of myocardial infarction and ischemic stroke [3]. Atherosclerosis originates from a chronic inflammation into large- and medium-sized arteries, as a result of the accumulation of modified cholesterol-rich lipids in the arterial wall that mediate an immune-inflammatory response [4]. Upon accumulation in the arterial intima, modified low-density lipoprotein (LDL) particles can activate the endothelium to express leukocyte adhesion molecules and chemokines, leading to the recruitment of immune cells, such as monocytes and T cells. In the presence of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF),

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ATCC, American Type Culture Collection; CD14, cluster of differentiation 14; CD36, cluster of differentiation 36; DLS, dynamic light scattering; DMSO, dimethylsulfoxide; DTT, dithiothreitol; Fab, monovalent antigen-binding; Fab'_2, divalent antigen-binding; HC, hypercholesterolemic; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IL-1β, interleukin 1 beta; LDE, laser Doppler electrophoresis; LDL, low-density lipoprotein; LDL(−), electronegative low-density lipoprotein; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; MCMN, metal-complex multi-wall nanocapsules; M-CSF, macrophage-colony stimulating factor; MDA, malondialdehyde; nLDL, native low-density lipoprotein; PBS, phosphate buffered saline; PDI, polydispersity index; PGs, proteoglycans; scFv, single chain fragment variable; SDS, sodium dodecyl sulfate; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; TLR-4, toll-like receptor 4; VLDL-C, very low-density lipoprotein cholesterol.

* Corresponding author.
E-mail address: dspabdalla@gmail.com (D.S.P. Abdalla).

[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.002
0939-6411/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

monocytes differentiate into macrophages and, in association with the up-regulation of scavenger and Toll-like receptors, mediate the uptake of modified LDL particles [5]. This process leads to one of the key events on atherosclerosis, the formation of foam cells. Further, the death of these cholesterol-overloaded macrophages promotes the formation of a necrotic and lipid core, and the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells to the intima layer promotes the growth of atherosclerotic lesions [6].

The electronegative LDL [LDL(−)], a subfraction of the native LDL that can be found in both blood plasma [7] and the subendothelial space [8] is strongly associated with the development of atherosclerosis [9]. LDL(−) has demonstrated pro-inflammatory and pro-angiogenic properties leading to the production of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules by endothelial cells [10] that mediate leukocytes recruitment into the intima [11–13], and to increased differentiation of monocytes to macrophages expressing scavenger receptors, such as CD36, the main responsible for the recognition and internalization of oxidized LDL (oxLDL) by these cells [14].

The use of monoclonal antibodies and their fragments (Fab, Fab_2 and scFv) as therapeutic agents for atherosclerosis has been reported [15]. Treatment of male $apoE^{-/-}$ mice with a scFv with specificity for malondialdehyde (MDA)-modified apoB-100-derived peptides significantly reduced the extent of atherosclerosis and the plaque content of oxidized LDL epitopes and macrophages [16]. Moreover, a Fab and an anti-oxLDL scFv (single chain fragment variable) inhibited the *in vitro* formation of macrophage-derived foam cells and decreased the progression of atherosclerotic lesions in $Ldlr^{-/-}$ mice by blocking the binding and subsequent uptake of oxLDL particles by macrophages [17]. The scFv described here has high specificity and affinity for LDL(−) [18]. It has been demonstrated that treatment with the 2C7 scFv anti-electronegative LDL inhibited the LDL(−) uptake by murine macrophages and decreased the expression of *Cd36*, *Tlr4* and *Cox2* mRNA. In addition, the *in vivo* treatment of $Ldlr^{-/-}$ mice with this scFv decreased the atherosclerotic lesion area at the aortic sinus [18], indicating its potential as a therapeutic tool in atherosclerosis.

Although the use of peptides, antibodies and proteins is a promising approach for the prevention and treatment of diseases, such as atherosclerosis and cancer [19], this therapy still has some disadvantages, such as their short half-life, lack of stability and, in some cases, potential immunogenicity [20]. To improve the effectiveness of these potential biodrugs, some strategies have emerged in the nanotechnology field such as the use of synthetic polymer nanoparticles and nanoparticle-protein conjugates as nanocarriers [21]. These strategies have provided extremely promising characteristics, such as precise control of the pharmacokinetics and bioavailability and improved stability of drugs and biodrugs [22], greater cell interaction, due to both their larger contact surface [23], and the better targeting for drug delivery [24], and the ability to use nanodevices, a combination of nanomaterials and bioactive molecules.

In an effort to contribute to this therapeutic arsenal, a nanoformulation containing the 2C7 scFv anti-electronegative LDL has been developed [25]. This nanoformulation is composed of biodegradable multiwall polymeric nanocapsules with a functionalized surface completely covered with 2C7 scFv anti-LDL(−) molecules and is named scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn [25]. The innovative approach to surface functionalization is based on an organometallic complex chitosan-zinc II-scFv anti-LDL(−) formed *in situ* at the nanocapsule-water interface. The synthesis is an easy and fast process with no need of any further purification step. Here, we demonstrate the atheroprotective effect of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn in LDL receptor knockout mice, indicating its potential promising use as a therapeutic nanodevice.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(ε-caprolactone) (PCL) (density 1.146 g mL^{-1}, α,ω-dihydroxy functional polymer; Mn 10,000 g mol^{-1}, Mw 14,000 g mol^{-1}), sorbitan monostearate (Span 60®, density 1.00 g mL^{-1}), low molar weight chitosan (Mw 50,000–190,000 g mol^{-1}, 75–85% deacetylated polymer) and zinc acetate were supplied by Sigma-Aldrich (Sao Paulo, Brazil). Caprylic/capric triglyceride (density 0.98 g mL^{-1}) and polysorbate 80 were delivered by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Lipoid S75 (soybean lecithin) was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). All aqueous solutions were prepared using deionized water (resistivity of 18.2 MΩ) obtained from a Millipore Direct-Q® system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The solvents, acetone (analytical grade) and ethanol (analytical grade), were obtained from Nuclear (Porto Alegre, Brazil). All reagents and solvents were used as received.

2.2. Nanoparticle design

2.2.1. Preparation of scFv anti-LDL(−)-surface functionalized nanocapsules

The nanocapsules were prepared by the interfacial deposition of the preformed polymer method, as previously described [25]. In one flask, Lipoid S75 (0.075 g) was dissolved in ethanol (10 mL) (Solution A). In another flask, PCL (0.250 g), sorbitan monostearate (0.100 g) and caprylic/capric triglyceride (0.300 mL) were dissolved in acetone (62.5 mL) under magnetic stirring at 40 °C (Solution B). Solution A was added to Solution B under magnetic stirring at 40 °C. Then, this organic phase was injected into Solution C which contained polysorbate 80 (0.200 g) dispersed in ultrapure water (125 mL) under magnetic stirring at 40 °C. After 10 min, the turbid solution was evaporated under reduced pressure at 40 °C to approximately 23 mL, eliminating the organic solvents (acetone and ethanol) and concentrating the formulation by partial removal of water. The final volume of the formulation was adjusted to 25.0 mL in a volumetric flask (lipid-core nanocapsules in aqueous dispersion, LNC).

A 3 mg mL^{-1} chitosan solution in 1% acetic acid (10 mL) was prepared and filtered (filter unit, 0.45 μm, Millipore®, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) (Solution D). Separately, 9 mL of LNC was added dropwise of 1 mL of Solution D under high magnetic stirring (900 rpm) at room temperature. The resulting mixture remained under magnetic stirring for 2 h at room temperature (20 °C). The theoretical concentration of chitosan in the multiwall nanocapsules [chitosan-coated lipid-core nanocapsules (MN)] formulation is 0.3 mg mL^{-1}.

A 1 mg mL^{-1} Zn^{2+} solution (Solution E) was prepared by dissolving 28 mg of zinc acetate in ultrapure water (10 mL). Solution E (50 μL) was added into 1.950 mL of MN aqueous dispersion, under magnetic stirring (900 rpm) at room temperature (MCMN-Zn). After 1 min, 567 μL of MCMN-ZN aqueous dispersion was transferred to an amber flask for immediate addition to 433 μL of 462.39 μg mL^{-1} 2C7 scFv anti-LDL(−) aqueous solution under magnetic stirring. The aqueous dispersion of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn remained under moderate magnetic stirring (400 rpm) for 5 min at room temperature (20 °C). The theoretical concentrations of Zn^{2+} and 2C7 scFv anti-LDL(−) in the formulation are 25 μg mL^{-1} and 200 μg mL^{-1}, respectively. A control formulation was prepared as described, but phenylalanine was reacted with Zn^{2+} instead of 2C7 scFv anti-LDL(−). This formulation was termed Phe-MCMN-Zn.

Physicochemical analysis was performed to validate the process, and the formulations were prepared in reproducible triplicate batches (n = 3). For the biological evaluation, we prepared new triplicate batches of both chitosan-coated lipid-core nanocapsules (MN) and of Solution E, which were mixed for the reaction with the 2C7 scFv anti-LDL(−) aqueous solution just before the experiment.

2.3. Physicochemical characterization of scFv anti-LDL(−)-surface functionalized nanocapsules

2.3.1. Laser diffraction analysis

Initially, the size distribution profile of the scFv anti-LDL(−)-surface functionalized nanocapsules in aqueous dispersion was determined by laser diffraction (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). The formulation was inserted directly into the wet sample dispersion unit (Hydro 2000SM - AWM2002, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) containing approximately 100–150 mL of distilled water (2000 rpm). The background signal was measured before analysis. Mie scattering model was used to calculate the particle diameters. The mean particle diameter is described as the volume-weighted mean diameter D[4,3] and as the Sauter mean diameter D[3,2]. The specific surface area ($m^2\,g^{-1}$) was determined by assuming a particle density of $1\,g\,cm^{-3}$. The 10th, 50th and 90th percentiles of the cumulative undersize distribution curve gave the diameters D(0.1), D(0.5) and D(0.9), respectively, which were used to calculate the polydispersity (SPAN) (Eq. (1)). The sample was analyzed in triplicate batches.

$$SPAN = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad (1)$$

2.3.2. Photon correlation spectroscopy analysis

After confirming the absence of microaggregates in the chitosan-coated lipid-core nanocapsules (MN) by laser diffraction, the formulations were characterized by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). The formulation was adequately diluted 250 times and analyzed (10 scans for each analysis). The hydrodynamic diameter was determined in triplicate batches by fitting the correlation function using the method of cumulants. The z-average diameter and the polydispersity index (PDI) values were calculated using Dispersion Technology Software (version 4.00, 2002, Malvern Instruments ltd, Malvern, UK).

2.4. Production and characterization of 2C7 scFv anti-LDL(−)

SMD1168 strain *Pichia pastoris* was purchased from Invitrogen Life Technologies (Cat# C17500, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and used for the production of 2C7 scFv anti-LDL(−). The 2C7 scFv anti-LDL(−) was expressed in the yeast, which was grown in BMMY (buffered methanol-complex) medium for 72 h at 20 °C and 200 rpm in an incubator shaker (Cat# AG CH-4103, Minitron, Infors HT, Bottmingen, Switzerland), with the addition of 1% methanol and 1 mM PMSF every 24 h. The supernatant obtained from the culture of *P. pastoris* was added to a Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (Cat# 17-5318-01, GE Healthcare Life Sciences, Sao Paulo, Brazil) and the 2C7 scFv anti-LDL(−) was eluted with binding buffer containing 500 mM imidazole (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil). For enzymatic deglycosylation and cleavage of high-mannose glycans, the purified 2C7 scFv anti-LDL (−) was denatured with 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) and 0.04 M dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) for 10 min at 100 °C. A 0.5% sodium citrate buffer containing 1000 units of endoglycosidase H (Cat# P0702S, Endo H, New England Biolabs, Massachusetts, USA) was added to the digestion system for 1 h at 37 °C. A SDS-PAGE using two polyacrylamide gels was performed to separate the purified proteins. One gel was stained with silver for protein visualization, and the second one was transferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (Cat# RPN82D, GE Healthcare Life Sciences, Massachusetts, USA) for Western blotting analysis. All the procedures described here were performed as indicated in previous work [18].

2.5. Cell lines and cell culture conditions

The RAW 264.7 murine macrophages were acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (Cat# 0212, BCRJ/UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased from American Type Culture Collection (Cat# CRL-1730, ATCC, Virginia, USA). Both cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Cat# 11875-093, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) containing 2 mM L-glutamine, 2 g/L sodium bicarbonate (Cat#S5761, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil), and a mix of 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin (Cat# 15070-063, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and 10% fetal bovine serum (Cat#12483-020, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) at 37 °C and 5% CO_2 in fully humidified air.

2.6. In vitro toxicity

Cell death (apoptosis and necrosis) and cell cycle assays were performed by flow cytometry to evaluate the effect of Phe-MCMN-Zn and scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn after 24 h of treatment at 37 °C. For the cell death assays, 1×10^5 RAW 264.7 or HUVECs per well were treated with several concentrations of Phe-MCMN-Zn (10^4–10^9 particles/mL) and scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (3.125–100 µg/mL) each time. Following the treatment, the cells were detached with trypsin-EDTA (0.05%) (Cat# 25300-054, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), washed with PBS and resuspended in the reaction buffer provided in the APOAF kit (Cat# A9210, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), for the detection of apoptosis and necrosis processes. Cells were incubated with annexin V FITC conjugate (apoptosis) at 0.625 µg/mL and propidium iodide solution (necrosis) at 2.5 µg/mL for ten minutes while protected from light at room temperature. Cells without any treatment were used as the control and cells treated with 5% DMSO (dimethylsulfoxide) (Cat# D8418, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) were used as the positive control for cell death. For the cell cycle assays, 2×10^5 RAW 264.7 or HUVECs, in each well, were exposed to 10^4 Phe-MCMN-Zn particles/mL or 6.25 µg/mL scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn under the same time and temperature conditions described above. Before sample analysis, the cells were treated with a lysis buffer containing 0.1% sodium citrate and 0.1% triton and with a 10 mg/mL RNase A solution (Cat# 12091-039, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and stained with propidium iodide at 1 mg/mL for 30 min while protected from light at room temperature. All samples were analyzed with a FACS-Canto flow cytometer (Becton, Dickson and Company Biosciences, New Jersey, USA) and the data analysis of 10,000 events, for each experimental condition, was performed using Flow Jo software (version 9.5.1, Tree Star Inc., Oregon, USA).

2.7. Animals and chow

Male C57BL/6J homozygous low-density lipoprotein receptor-deficient mice (*Ldlr*$^{-/-}$) were maintained at 22 °C on a 12 h light and dark cycle. It was provided a semi-synthetic hypercholes-

terolemic diet (0.5% w/w cholesterol), based on a Western-type diet (Rhoster, Sao Paulo, Brazil), consisting of 20% fat, 0.5% cholic acid (Cat# 135240, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil), 16.5% casein, and vitamins and minerals according to the American Institute of Nutrition AIN-93 recommendations [26], to mice employed in the initial atherosclerotic lesion protocol. All experiments were approved (CEUA/FCF/266) by the Animal Research Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of The University of Sao Paulo in agreement with the Brazilian College for Animal Experimentation guidelines.

2.8. Acute toxicity evaluation

The guideline for testing of chemicals no. 423 (OECD, Organization for Economic Co-operation and Development) was followed for the acute toxicity evaluation. Male C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice received an intravenous administration via the tail vein of a single dose of phosphate-buffered saline (PBS; vehicle group), or of 2.5 mg/kg (of body weight), 5 mg/kg, 10 mg/kg or 25 mg/kg scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn. The control group was not administered any of the proposed treatments. The mice were monitored and parameters such as bristly hair, dyspnea, tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, coma and death were evaluated 1, 3, 6, 9, 18, 24 and 48 h after the treatment administration. Three animals were employed for each experimental group, for a total of eighteen mice. To assess the possibility of hepatic impairment, animals continued to receive weekly doses of the same treatments described for 4 weeks. After this time, the mice were euthanized with 30 mg/kg of ketamine hydrochloride (1.0 g/10 mL) (CEVA, Sao Paulo, Brazil) and 15 mg/kg of xylazine hydrochloride (2.0 mg/100 mL) (CEVA, Sao Paulo, Brazil) according to the American Veterinary Medical Association (AVMA) recommendations [27]. Liver tissue samples were taken, fixed in 10% buffered formalin for 48 h and embedded in paraffin. The tissue samples were cut into three-micrometer sections and stained for histopathology with hematoxylin and eosin, which were both obtained from Sigma-Aldrich (Sao Paulo, Brazil).

2.9. Treatment of C57BL/6J Ldlr$^{-/-}$ mice

A total of 45 males, 12-week-old, C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice, divided into three groups (n = 15 per group), received one of the following treatments via intravenous administration, by tail vein once a week for 4 weeks: PBS (vehicle group), 10^{5} particles/kg Phe-MCMN-Zn and 5 mg/kg scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn. The first dose of these nanoformulations was administered one week prior to the beginning of the hypercholesterolemic diet. The experiments were performed according to an initial atherosclerotic lesion protocol (Fig. S1 - Supplementary data) that has been described previously [28]. After 28 days, mice were anesthetized with 10 mg/kg of ketamine hydrochloride (1.0 g/10 mL) and 5 mg/kg of xylazine hydrochloride (2.0 mg/100 mL). Blood was collected by cardiac puncture and then centrifuged at 1500g for 15 min at room temperature to obtain serum. The serum lipid profile [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] and the levels of the hepatic enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined using direct methods with commercial kits from *Labtest Diagnostica* (Sao Paulo, Brazil).

2.10. Measurement of atherosclerotic lesion area

The hearts of 5 mice from each group were collected to evaluate the effect of the treatments on the atherosclerotic lesion area. The heart samples were perfused with PBS, fixed in 10% buffered formalin for at least 48 h and embedded at 40–50 °C in gelatin solutions with three different concentrations: 5% for three hours, 10% for three hours and 25% gelatin for 16 h [28]. The samples were frozen in mounting medium (KILLIK, Cat# EP-9801 EasyPath, Sao Paulo, Brazil) and the aortic arch at the heart was sectioned in consecutive cuts of 5 μm thickness, with an average interval between cuts of 250–300 μm [29]. The slides were stained with Oil Red O (Cat# O0625, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil), Light Green SF Yellowish (Cat# 861200, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) and Harris Hematoxylin (Cat# HHS128, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) in order to stain and identify lipids (red color), collagen fibrils (green color) and nuclei (blue color) respectively. The sections were analyzed under a Nikon optical microscope coupled to a camera. The program NIS-Elements AR™ version 3.10 was used for image capture, and Image J software (version 1.46r for Mac, National Institute of Health, Maryland, USA) was used to determine the atherosclerotic area. All analyses were double blind and carried out by two independent observers.

2.11. Gene expression analysis by qRT-PCR

The expression levels of mRNA were determined by real-time quantitative PCR using the aortic arch of 5 mice from each experimental group. Total RNA was isolated from an atherosclerotic lesion area with TRIzol reagent (Cat# 15596-018, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's recommendations. For the synthesis of a single-stranded cDNA, 2 μg of total RNA was treated with High Capacity RNA to cDNA Master Mix (Cat# 4387406, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) for 5 min at 25 °C, 30 min at 42 °C and 5 min at 85 °C, according to the manufacturer's instructions. The real-time quantitative PCR reactions were performed with 20 ng of cDNA using the SYBR Green Master Mix (Cat# 4364346, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and specific primers for IL-1β gene (*Il1b*): sense primer, 5′TTCCCATTAGACAACTGCACTAC3′, and anti-sense primer, 3′GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT5′, RPL13a were used as a normalization gene (*Rpl13a*): sense primer, 5′TCCTCAA GACCAACGGACTCCT3′, and anti-sense primer, 3′AACCTTTGGTCCC CACTTCCCT5′. The reactions were measured in a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The relative mRNA expression levels were calculated by the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method [30].

2.12. Immunohistochemical analysis

To evaluate the expression of CD14 and TLR-4, the heart tissue samples of 5 mice from each group were collected, fixed in 10% buffered formalin for 48 h and embedded in paraffin. The hearts were cut into 5 μm sections between the aortic sinus and the aortic root as described above. CD14 and TLR-4 were detected with anti-CD14 (1:400) (Cat# ab133335) and anti-TLR4 (1:80) (Cat# ab13556), respectively, which were both obtained from Abcam (Cambridge, UK). The CD14 and TLR-4 staining was quantified using Image J software. All analyses were double blind and the data were independently extracted by two observers.

2.13. Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA and the results are reported as mean values ± SD. Tukey's test was used for paired comparisons analysis. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Preparation and characterization of the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation

The lipid-core nanocapsules (LNC) and the chitosan-coated lipid-core nanocapsules (MN) showed unimodal size distribution profiles by laser diffraction (Fig. S2). The values of the volume-weighted mean diameter D[4,3] and Sauter mean diameter D[3,2] were similar for both formulations (Table 1) indicating narrow particle size distributions. The chitosan coating in MN caused a slight increase in both D[4,3] and in D[3,2] compared with the LNC values. Both formulations had a specific surface area between 53 and 55 $m^2 g^{-1}$.

Metal-complex multi-wall nanocapsules (MCMN) were formed after the MN formulation was reacted with Zn^{2+}. The complex was highly reactive and, thus, scFv anti-LDL(−) was immediately added to form the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn in aqueous dispersion. Fig. 1 shows an illustrative model of the scFv anti-LDL(−)-surface functionalized nanocapsules [scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn]. Photon correlation spectroscopy analysis of LNC, MN and scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn showed that the z-average particle diameters increased after the coating with chitosan and the reaction with Zn^{2+} and scFv anti-LDL(−) (Table 2). The PDI values were lower than 0.20 for all samples (Table 2) demonstrating that the narrow size distribution was preserved after the interfacial reactions were conducted in LNC. The results suggested that no aggregation occurred after the nanocapsule surface functionalization.

3.2. In vitro toxicity

In both the RAW 264.7 and HUVEC cell lines, the nanocapsules Phe-MCMN-Zn caused no significant changes in the cell death (apoptosis + necrosis) percentage at any evaluated concentrations (10^4–10^9 particles/mL) relative to that in the main control (Fig. 2A and B). The scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation did not induce cell death in the RAW 264.7 macrophages (Fig. 2C) and HUVEC (Fig. 2D) treated with concentrations of 6.25 μg/mL or lower and with 25 μg/mL or lower, respectively, compared with non-treated cells. No significant changes were observed at any cell cycle stage for RAW 264.7 macrophages (Fig. 2E) and HUVECs (Fig. 2F) treated with the selected concentrations of Phe-MCMN-Zn (10^4 particles/mL) and of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (6.25 μg/mL) compared with the control. In addition to these results, a previous report from our group [18] demonstrated that at 6.25 μg/mL, 2C7 scFv anti-LDL(−) is not toxic to RAW 264.7 macrophages.

Table 1
Laser diffraction analysis: volume-weighted mean diameter D[4,3], Sauter mean diameter D[3,2] and specific surface area for the LNC and MN formulations.

Sample	D[4,3] (nm)	D[3,2] (nm)	Specific surface area ($m^2 g^{-1}$)
LNC	120 ± 4.5	109 ± 3.5	55 ± 1.8
MN	130 ± 3.5	114 ± 0.6	53 ± 0.1

Table 2
Photon correlation spectroscopy analysis: z-average diameter and polydispersity index (PDI) of lipid-core nanocapsules (LNC), multi-wall nanocapsules [chitosan-coated lipid-core nanocapsules (MN)] and scFv anti-LDL(−)-surface functionalized multi-wall nanocapsules [scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn].

Sample	z-average diameter (nm)	PDI (dimensionless)
LNC	112 ± 1.3	0.16 ± 0.03
MN	124 ± 3.4	0.16 ± 0.02
scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn	182 ± 6.5	0.23 ± 0.03

3.3. Acute toxicity evaluation

At 1, 3, 6, 9, 18, 24 and 48 h after the intravenous administration of the nanoformulations, none of the monitored mice presented the typical signs of toxicity (bristly hair, dyspnea, tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, coma and death). In regard to liver toxicity that was evaluated using histopathological analysis of the liver samples, only the control mice, which received no treatment, showed no changes. The histopathological analysis of all the other groups, including the PBS-treated vehicle group, indicated the presence of cytoplasmic lipid droplets and inflammatory infiltrate in the centrilobular region of the liver (Fig. S3 – Supplementary data). Based on these data and on the previous report of our group showing that 5 mg/kg 2C7 scFv anti-LDL(−) was atheroprotective [18], the 5 mg/kg dose of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn was chosen to evaluate the effect of the nanoformulation on the initial atherosclerotic lesions of C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice.

3.4. Effect of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn on atherosclerosis in *Ldlr*$^{-/-}$ mice

No significant differences among the groups were observed for the weight and food intake (Table S1, Supplementary data). The

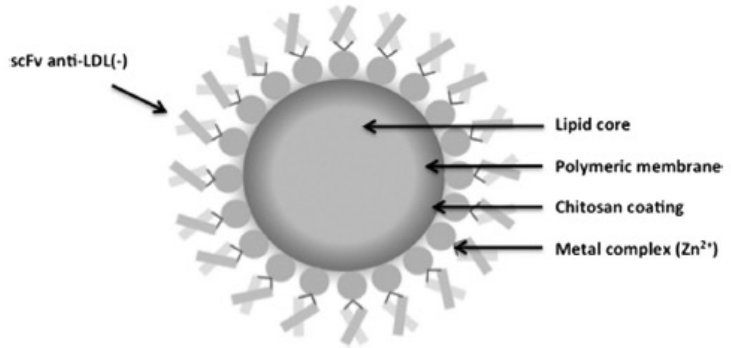


Fig. 1. Illustrative model of scFv-anti-LDL(−)-surface functionalized nanocapsules [scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn] binding to the LDL(−). From the inner to the outer pseudo-phases: lipid-core composed of sorbitan monostearate and capric/caprylic triglyceride, polymer wall composed of poly(ε-caprolactone), negative region composed of lecithin containing phosphatidic acid, positive region composed of chitosan, black dots composed of Zn^{2+} and surface composed of scFv-anti-LDL(−) and polysorbate 80 (omitted).

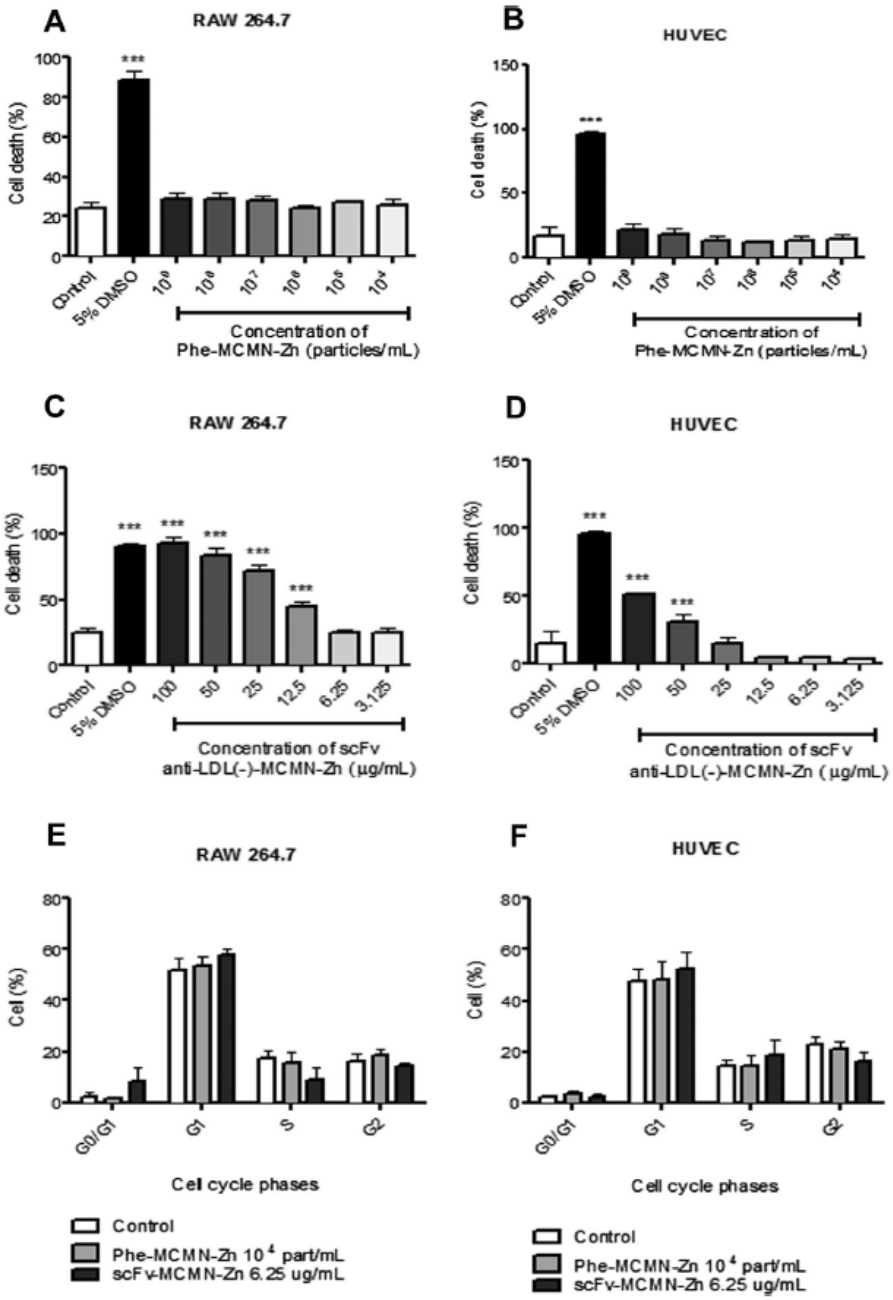


Fig. 2. *In vitro* toxicity of Phe-MCMN-Zn nanoparticles and of the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation. Cell death percentage of (A) RAW 264.7 macrophages (2×10^5 cells/well) and (B) HUVECs (2×10^5 cells/well) treated with several concentrations of Phe-MCMN-Zn (10^4–10^9 particles/mL). Cell death percentage of (C) RAW 264.7 macrophages and (D) HUVECs treated with several concentrations of scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn (100–3.125 µg/mL). Cell cycle data from (E) RAW 264.7 macrophages and (F) HUVECs treated with Phe-MCMN-Zn at 10^4 particles/mL or scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn at 6.25 µg/mL, which is labeled scFv-MCMN-Zn. Data from three independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SD $^{***}p < 0.001$ compared with control; ANOVA followed by the Tukey-Kramer test.

lipid profile (Table 3) and the plasma activity of hepatic enzymes (Table 4) were not affected by the nanoformulations: no changes were found in the studied groups. The atherosclerotic lesions at the aortic sinus of the C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice induced by using the initial atherosclerotic lesion protocol are shown in Fig. 3A and can be identified by red staining which indicates the accumulation of cholesterol-rich lipids in the arterial wall. The administration of 5 mg/kg scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn promoted a significant

Table 3
Lipid profile of C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice after treatment. The concentrations of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG) and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) were determined in all studied groups: Vehicle (PBS), Phe-MCMN-Zn nanocapsules and scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation. Data are expressed in mg/dL as the means ± SD ($p > 0.05$ compared with vehicle).

Groups	TC (md/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)
Vehicle (PBS)	1860 ± 283	33.4 ± 7.52	1730 ± 267	474 ± 113	94.8 ± 22.7
Phe-MCMN-Zn	1910 ± 520	28.4 ± 8.57	1790 ± 505	476 ± 118	95.2 ± 23.6
scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn	2090 ± 295	27.7 ± 5.55	1960 ± 283	532 ± 114	106 ± 23.0

Table 4
Plasma levels of hepatic enzymes in C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice after treatment. The concentrations of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined in all studied groups: Vehicle (PBS), Phe-MCMN-Zn nanocapsules and scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation. Data are expressed in U/L as the means ± SD ($p > 0.05$ compared with vehicle).

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)
Vehicle (PBS)	149 ± 63.9	177 ± 125
Phe-MCMN-Zn	144 ± 57.5	179 ± 96.2
scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn	166 ± 47.7	151 ± 71.8

decrease in the atherosclerotic lesion area (Fig. 3B) compared with that of the vehicle treated control mice ($p < 0.01$) and the Phe-MCMN-Zn treatment group ($p < 0.01$). In addition, the treatment with scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn caused a significant downregulation ($p < 0.05$) of *Il1b* mRNA expression (Fig. 3C) and decreased ($p < 0.001$) the expression of CD14 protein (Fig. 3D) in the atherosclerotic lesions at the aortic arch of the *Ldlr*$^{-/-}$ mice. The TLR-4 protein was not affected by the nanoformulation (Fig. 3E).

4. Discussion and conclusion

Atherosclerosis is considered to be a complex chronic inflammatory disease of the arterial walls [31] and it is strongly associated with elevated plasma levels of electronegative LDL [32,33], an important factor in the initiation and progression of atherosclerotic lesions [13]. This particle typically represents less than 10% of the total circulating LDL in healthy subjects [9]; however, its plasma concentration may be increased in subjects with hypertriglyceridemia [9], familial hypercholesterolemia [34,35], diabetes mellitus [36,37], or coronary artery disease [38], and in patients undergoing hemodialysis [39]. Compared with native LDL, LDL(−) has some differences in its composition and physicochemical properties that may be associated with its pro-inflammatory and pro-atherogenic effects. The LDL(−) is an *in vivo* minimally modified LDL subfraction constituted by very mildly oxidized particles with higher susceptibility to aggregation and propensity to form amyloid-like structures in comparison with native LDL [40–44]. The differences in the lipid composition of LDL(−) are correlated with the promotion of conformational changes in the apoB-100 molecule, which is unfolded and seems to be sinking into the particle surface lipids [42]. These modifications of the apoB-100 molecule in LDL(−) can contribute to its low binding affinity for the B/E receptor [43]. Another property of LDL(−) that can contribute to progression of atherosclerosis is its increased binding affinity to arterial proteoglycans (PGs), through interactions between the negatively charged carboxyl and sulfate groups of proteoglycans and the positively charged residues of apoB-100; these interactions favor the retention of LDL(−) on the proteoglycans of the extracellular matrix of the arterial intima [44].

The approach of preventing and treating atherosclerosis through the modulation of the immune responses is very promising [45,46]. Antibodies against modified forms of LDL are able to bind these particles and to neutralize their pro-inflammatory and pro-atherogenic effects [47]. Previous reports from our group demonstrated that the treatment of C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice with an anti-LDL(−) monoclonal antibody decreased the atherosclerotic lesions at the aortic sinus [28]. To avoid possible deleterious effects due to the uptake of the immune complexes formed between the anti-LDL(−) monoclonal IgG and the LDL(−) particles via Fc gamma receptors [48], the scFv fragment of this antibody was obtained [18]. The antibody binding site remains intact within the antibody fragment and there is no significant loss of specificity to the epitopes [49]; thus, the 2C7 scFv anti-LDL(−) obtained from this mAb is specific to electronegative LDL and does not recognize the native or non-modified LDL [18]. The administration of 5 mg/kg 2C7 scFv anti-LDL(−) to *Ldlr*$^{-/-}$ mice promoted an anti-atherogenic effect [18], indicating its potential role in the modulation of atherosclerosis. Although the accelerated clearance of scFv from blood reduces its cytotoxicity [50], the faster removal from the circulation may limit its potential effects on target tissues [51]. In this context, nanomedicine has been very helpful, because the design and synthesis of nanoparticles can be precisely controlled, allowing variations in their size, shape, stability, surface charge and several other characteristics to improve their behavior in different systems [52]. The high surface-to-volume ratio allows the modification of the surface coating with drugs and bioactive molecules that can improve the drug pharmacokinetics allowing the use of drugs that are rapidly metabolized [53].

Although nanomedicine was initially focused on oncology, during the last decade a substantial number of applications in cardiovascular disease were developed, particularly for atherosclerosis [54]. As in cancer, several strategies can be used to target the atherosclerotic plaque, and these strategies include nonspecific targeting, through enhanced permeability of the luminal endothelium, or specific targeting, through the use of functionalized nanoparticles [55]. In the last years, different antibody fragments (e.g., scFv) that lack the crystallizable fragment (Fc) portion have been used in the construction of nanodevices for therapeutic purposes [56]. Due to the small size of scFvs compared with the whole antibody, the conjugation between scFvs and nanoparticles promotes less variation in the particle diameter and greater homogeneity of the nanoparticulate systems [57].

The present study shows a new and unique biotechnological approach for the prevention and treatment of atherosclerosis with a nanodevice specific to the pro-inflammatory and pro-atherogenic LDL(−) particles, the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation. A previous report demonstrated that the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation and the 2C7 scFv anti-LDL(−) in solution had similar reactivity and specificity to LDL(−), showing that these properties are preserved after the binding of the recombinant protein to the nanocapsule surface [25]. Our results showed that scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn was not cytotoxic to RAW 264.7 macrophages or to HUVEC cells in the 6.25 μg/mL to 25 μg/mL scFv concentration range, as previously reported for the fragment itself [18]. The apoptosis and necrosis percentage was not changed in the same cell lines treated with different concentrations of the Phe-MCMN-Zn nanocapsules [a formulation that lacks 2C7 scFv anti-LDL(−)]; thus, it is clear that the scFv fragment, but not the nanocapsules, limits the choice of concentrations and doses that

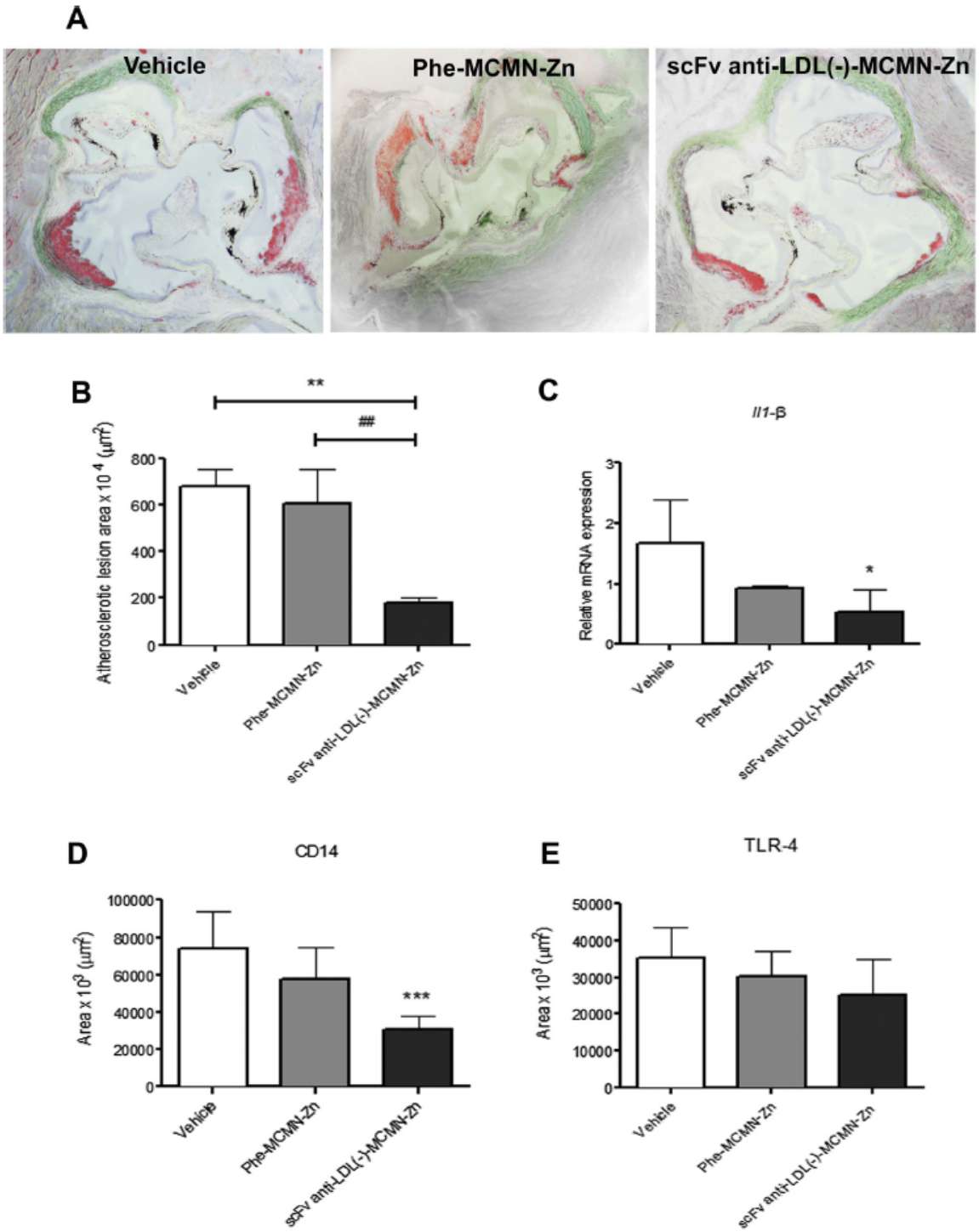


Fig. 3. Effect of treating C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice with Phe-MCMN-Zn nanocapsules and the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation on the atherosclerotic lesion development at the aortic sinus. (A) Representative sections of the aortic sinus from the vehicle, the Phe-MCMN-Zn and scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn groups. Red color indicates lipid accumulation, green color indicates collagen fibrils and blue color indicates the nuclei. 10× magnification images. (B) Atherosclerotic lesion area expressed as the means ± SD, $^{**}p < 0.01$ compared with vehicle and $^{\#\#}p < 0.01$ compared with Phe-MCMN-Zn. (C) Relative gene expression of *Il1b*. Data expressed as the means ± SD, $^{*}p < 0.05$ compared with vehicle. (D) Expression levels of CD14 detected by immunohistochemistry and expressed as the means ± SD, $^{***}p < 0.001$ compared with vehicle and (E) expression levels of TLR-4. ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were used in this study. Although all doses that were evaluated in the acute toxicity assay led to minor hepatic impairment, the 5 mg/kg dose was chosen for the treatment of *Ldlr*$^{-/-}$ mice. In fact, the C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mouse strain shows high levels of total cholesterol, triglycerides and LDL cholesterol and has a predisposition to developing hepatic steatosis, depending on the composition of the diet provided [58]. In this context, the findings from the histopathological analysis cannot be correlated with a deleterious effect of the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation on liver function. After four weekly doses, this nanoformulation was able to decrease the atherosclerotic lesion area of *Ldlr*$^{-/-}$ mice by more than 50%, relative to that in non-treated mice. This change is notable compared to the atheroprotective effect demonstrated by the fragment itself, which was able to decrease the atheroma area in the aortic sinus by approximately 40% [18]. In fact, the presence of several scFv fragments on the surface of the nanoformulation increased the atheroprotective effect of the 2C7 scFv anti-LDL(−) due to its conjugation to the nanocapsules.

In addition, the present study demonstrated that the scFv anti-LDL(−)-MCMN-Zn nanoformulation decreased the *Il1b* mRNA expression and CD14 protein levels in the atherosclerotic lesions at the aortic arch. This finding is relevant because of the pro-inflammatory action of LDL(−) on monocytes and macrophages leading to inflammasome activation is mediated by CD14 and TLR4 [59,60]. CD14 and TLR4 are expressed on the cell surface of monocytes and macrophages [61] and work as a complex during the cytokine release in these cells; they act as pattern recognition receptors that are able to activate multiple genes related to the pro-inflammatory cytokines that participate directly in atherosclerotic lesion development and plaque instability, such as IL-1β and IL-6 [62]. In fact, blocking CD14 in monocytes promoted a greater than 70% inhibition of IL-1β secretion [63]. Considering this result and the fact that IL-1β acts not only in the activation of immune cells, such as lymphocytes [64], but also in stimulating the production of other cytokines by macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells [65], the findings described here confirm the great importance of our nanoformulation in the context of atherosclerosis.

In conclusion, this study reports for the first time the beneficial effects of a nanoformulation composed of biodegradable multiwall polymeric nanocapsules functionalized with a scFv reactive to electronegative LDL, demonstrating its applicability for the prevention or treatment of atherosclerosis.

Acknowledgments

The authors acknowledge Elaine Moura Augusto, M.Sc. for the isolation of LDL(−), Renata Chaves Albuquerque, M.Sc. for assisting with flow cytometry, Mauricio Santos for assisting with serum lipid profile measurements and Jacqueline Cavalcante Silva, M.Sc. for adjustment of the images. This research was supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation: Grant 12/51315-5 to D. S.P.A. and scholarships to M.F.C. and S.M.K.) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development: grant to the National Institute of Science and Technology for Pharmaceutical Innovation, INCT_if, and Universal Project), Brazil.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.002.

References

[1] American Heart Association, Subcommittee on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics, D. Wong, D. Woo, M.B. Turner, Heart Disease and Stroke Statistics – 2014 Update: a report from the American Heart Association, Circulation 129 (2014) e28–e292.
[2] C.J. Murray, T. Vos, R. Lozano, M. Naghavi, A.D. Flaxman, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J.A. Salomon, S. Abdalla, et al., Disability adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, Lancet 380 (2012) 2197–2223, http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61689-4.
[3] P. Libby, A.H. Lichtman, G.K. Hansson, Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans, Immunity 38 (2013) 1092–1104, http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.009.
[4] P. Libby, Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy, N. Engl. J. Med. 368 (2013) 2004–2013, http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1216063.
[5] G.K. Hansson, Inflammatory mechanisms in atherosclerosis, J. Thromb. Haemost. 7 (Suppl. 1) (2009) 328–331, http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03416.x.
[6] K.J. Moore, I. Tabas, Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis, Cell 145 (2011) 341–355, http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005.
[7] P. Avogaro, G.B. Bon, G. Cazzolato, Presence of a modified low-density lipoprotein in humans, Arteriosclerosis 8 (1988) 79–87, http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.8.1.79.
[8] J.L. Sánchez-Quesada, S. Villegas, J. Ordóñez-Llanos, Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding, Curr. Opin. Lipidol. 23 (2012) 479–486, http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0b013e328357c933.
[9] J.L. Sánchez-Quesada, S. Benítez, C. Otal, M. Franco, F. Blanco-Vaca, J. Ordóñez-Llanos, Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects, J. Lipid Res. 43 (2002) 699–705.
[10] G.K. Hansson, Immune mechanisms in atherosclerosis, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21 (2001) 1876–1890, http://dx.doi.org/10.1161/hq1201.100220.
[11] A. Arman, O. Soyly, A. Yildirim, A. Furman, N. Ercelen, H. Aydogan, A. Coker, T. Tezel, Interleukin-1 receptor antagonist gene VNTR polymorphism is associated with coronary artery disease, Arq. Bras. de Cardiologia 91 (2008) 268–273, http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2008001700002.
[12] C. De Castellarnau, J.L. Sánchez-Quesada, S. Benítez, R. Rosa, L. Caveda, L. Vila, J. Ordóñez-Llanos, Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20 (2000) 2281–2287, http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.20.10.2281.
[13] J.L. Sánchez-Quesada, M. Camacho, R. Antón, S. Benítez, L. Vila, J. Ordóñez-Llanos, Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells, Atherosclerosis 166 (2003) 261–270, http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00374-X.
[14] R.I. Silverstein, Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36, Cleve. Clin. J. Med. 76 (2009) 27–30, http://dx.doi.org/10.3949/ccjm.76.s2.06.
[15] K.Y. Chyu, J. Nilsson, P.K. Shah, Immunization for atherosclerosis, Curr. Atheroscl. Rep. 9 (2007) 104–109.
[16] A. Schiopu, J. Bengtsson, I. Söderberg, S. Janciauskiene, S. Lindgren, M.P.S. Ares, P.K. Shah, R. Carlsson, J. Nilsson, G.N. Fredrikson, Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis, Circulation 10 (2004) 2047–2052, http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000143162.56057.B5.
[17] S. Tsimikas, A. Miyanohara, K. Hartvigsen, E. Merki, P.X. Shaw, J. Pattison, M. Torzewski, J. Sollors, T. Friedman, N.C. Lai, H.K. Hammond, G.S. Getz, C.A. Reardon, A.C. Li, C.L. Banka, J.L. Witztum, Human oxidation-specific antibodies reduce foam cell formation and atherosclerosis progression, J. Am. Coll. Cardiol. 58 (2011) 1715–1727, http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2011.07.017.
[18] S.M. Kazuma, M.F. Cavalcante, A.E.R. Telles, A.Q. Maranhão, D.S.P. Abdalla, Cloning and expression of an anti-LDL(−) single-chain variable fragment and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis, MAbs 5 (2013) 763–775, http://dx.doi.org/10.4161/mabs.25859.
[19] T. Nagle, C. Berg, R. Nassr, K. Pang, The further evolution of biotech, Nat. Rev. Drug Discov. 2 (2003) 75–79, http://dx.doi.org/10.1038/nrd989.
[20] R. Duncan, The dawning era of polymer therapeutics, Nat. Rev. Drug Discov. 2 (2003) 347–360, http://dx.doi.org/10.1038/nrd1088.
[21] C. Pssaros, R. Lee, M. Margaritis, C. Antoniades, Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis, Nanomedicine 8 (2012) S59–S68, http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.006.
[22] R.K. Jain, Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function, J. Control. Release 74 (2001) 7–25, http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00306-6.
[23] V.J. Mohanraj, Y. Chen, Nanoparticles – a review, Tropical J. Pharm. Res. 5 (2006) 561–573, http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634.
[24] M.E. Lobatto, V. Fuster, Z.A. Fayad, W.J.M. Mulder, Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis, Nat. Rev. Drug Discovery 10 (2011) 835–852, http://dx.doi.org/10.1038/nrd3578.
[25] E.A. Bender, M.F. Cavalcante, M.D. Adorne, L.M. Colomé, S.S. Guterres, D.S.P. Abdalla, A.R. Pohlmann, New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules, Pharm. Res. 31 (2014) 2975–2987, http://dx.doi.org/10.1007/s11095-014-1392-5.
[26] P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutritio ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, J. Nutr. 123 (1993) 1939–1951.

ANEXO 9 - ARTIGO SUBMETIDO EM PERIÓDICO

From: **Nanomedicine NBM** <nnbm.journaloffice@gmail.com>
Date: Sat, Sep 24, 2016 at 11:11 PM
Subject: A manuscript number has been assigned: JN2016737
To: dspa@usp.br, dspabdalla@gmail.como

Ms. Ref. No.: JN2016737
Title: scFv-anti-LDL(-)-metal-complex multi-wall functionalized-nanocapsules as a promising tool for the prevention of atherosclerosis: effects on macrophages
Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine

Dear Dr. Abdalla,

Your submission entitled "scFv-anti-LDL(-)-metal-complex multi-wall functionalized-nanocapsules as a promising tool for the prevention of atherosclerosis: effects on macrophages" has been assigned the following manuscript number: JN2016737. Please refer to this number in all correspondence with the editorial office.

You may check on the progress of your paper by logging in to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is http://ees.elsevier.com/nano/.

Your username is: dspa@usp.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/NANO/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to the journal Nanomedicine.

Sincerely,

Editorial Staff
Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine

scFv-anti-LDL(-)-metal-complex multi-wall functionalized-nanocapsules as a promising tool for the prevention of atherosclerosis: effects on macrophages

Marcela Frota Cavalcante[1+], Márcia Duarte Adorne[2+], Marina Kemmerer[3], Mayara Klimuk Uchiyama[4], Ana Carolina Cavazzin Asbahr[2], Aline de Cristo Soares Alves[5], Soraya Megumi Kazuma[1], Marcel Boss[3], Silvia Stanisçuaski Guterres[5], Koiti Araki[4], Bernhard Brüne[3], Dmitry Namgaladze[3], Adriana Raffin Pohlmann[2], Dulcineia Saes Parra Abdalla[1*]

[1]Department of Clinical and Toxicological Analysis; Faculty of Pharmaceutical Sciences; University of Sao Paulo; Sao Paulo, SP, Brazil; [2]Department of Organic Chemistry; Chemistry Institute; Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil; [3]Institute of Biochemistry I, Faculty of Medicine, Goethe-University Frankfurt; Frankfurt, Germany; [4]Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of Sao Paulo; Sao Paulo, SP, Brazil; [5]Department of Production and Control of Medicines; Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil.

[+]These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author

Abstract:

Atherosclerosis can be originated from the accumulation of modified cholesterol-rich lipoproteins in the arterial wall. The electronegative LDL, LDL(-), plays an important role in atherosclerosis once is internalized by macrophages, contributing to the formation of foam cells inducing an immune-inflammatory response. We aimed to obtain a nanoformulation containing highly pure surface-functionalized nanocapsules using as ligand a single chain fragment variable (scFv), reactive to LDL(-), to demonstrate its beneficial effects on decreasing LDL(-) uptake by human and murine primary macrophages. Flow cytometry, confocal and CytoViva® microscopy analysis showed that the nanoformulation is internalized by human and murine macrophages by different endocytosis mechanisms. Moreover, the nanoformulation promoted a significant decrease of LDL(-) uptake by both human and murine primary macrophages besides the inhibition of *IL1B* and *MCP1* mRNA and protein expression induced by LDL(-). The results showed a promising application of the nanoformulation in future preventive and therapeutic strategies for atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, nanocapsules, nanoformulation, electronegative LDL, macrophage, single chain fragment variable.

Background

In the last years, nanoparticles have been widely used for medical applications [1] either for diagnosis, therapy or molecular imaging [2]. This great acceptance is related to properties presented by nanoparticles such as their versatility of formulation, colloidal size, biocompatibility and sustained-release properties [3]. This set of characteristics has also encouraged the use of nanoparticles as drug carriers, allowing the delivery of drugs, peptides, antibodies and recombinant proteins at a specific rate and at a specific site [4]. The use of synthetic polymer nanoparticles and nanoparticle-protein conjugates, or functionalized nanoparticles, as nanocarriers improves the effectiveness of potential biodrugs, providing promising advantages, such as improved stability, a precise control of their pharmacokinetics and bioavailability and increased residence time in the body [5]. Moreover, these nanoparticles have greater interaction with cells due to their larger contact surface [6] besides to promote targeting to specific sites of action [2]

allowing crossing organ barriers such as the blood-brain barrier and the cell membrane [7]. Furthermore, the use of nanocarriers enables the safe delivery of toxic therapeutic compounds, protecting non-target tissues and cells from possible damaging side effects [5].

Although nanomedicine's applications were initially focused on oncology, a substantial number of studies in cardiovascular diseases were conducted during the last decade, particularly for atherosclerosis [8] – a complex chronic inflammatory disease that can be originated by b the accumulation of modified cholesterol-rich lipoproteins in the arterial wall of large- and medium-sized arteries, mediating an immune-inflammatory response [9]. Briefly, the accumulation of modified low-density lipoprotein (LDL) particles, such as the electronegative LDL [LDL(-)], leads to endothelium activation and recruitment of monocytes and T cells into the arterial intima, as a result of increased expression of leukocyte adhesion molecules. These modified LDL particles are taken up by macrophages through scavenger receptors, leading to the formation of foam cells and production of pro-inflammatory cytokines [10]. LDL(-) has pro-inflammatory and pro-angiogenic properties that may contribute to the progression of atherosclerosis [11], making this lipoprotein subfraction an excellent candidate for specific targeting therapy.

In this study, we aimed to synthesize lecithin-chitosan-coated lipid-core nanocapsules having at the surface, as ligand, a scFv (single chain fragment variable) reactive to LDL(-), to demonstrate the beneficial effects of the nanoformulation on decreasing of LDL(-) uptake by human and murine primary macrophages. Additionally, we demonstrated that the nanoformulation is internalized by human and murine macrophages by different endocytosis mechanisms, suggesting its promising use in drug delivery and drug targeting approaches for prevention and treatment of atherosclerosis.

Methods

Human and animal rights

The study was approved by the Human Research Ethics Committee for the use of human blood (n. 114/2010), and by the Animal Research Ethics Committee, for the use of C57BL/6J homozygous low-density lipoprotein receptor-deficient mice (*Ldlr*$^{-/-}$) (n. 392/2013), both of the Faculty of Pharmaceutical Sciences from the University of

Sao Paulo, in agreement with the Brazilian College for Animal Experimentation guidelines.

Materials

Poly(e-caprolactone) (PCL) (#440752; M_n 10,000 g/mol, M_w 14,000 g/mol), sorbitan monostearate (Span 60®, #S7010), chitosan (#48869; M_w 50,000-190,000 g/mol, 75-85% deacetylated) and zinc acetate (#383317) were acquired from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, FR). Capric-caprylic triglyceride (CAS#73398-61-5) and polysorbate 80 (Tween 80®, #P1754) were delivered by Delaware (Porto Alegre, BR). Soybean lecithin (Lipoid S75®, #776132-15/301) was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, DE). Acetone and ethanol (analytical grade) were used as received. For flow cytometry assays, all samples were analyzed with a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, NJ, USA) and the data analysis of 10,000 events, for each experimental condition, was performed using Flow Jo software (version 9.5.1, Tree Star Inc, OR, USA). For confocal microscopy analysis, images were obtained with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope with a HAL 100 illuminator (Carl Zeiss Microscopy, Cambridge, UK).

Synthesis of chitosan-lecithin-coated lipid-core nanocapsules

Synthesis of lecithin-lipid-core nanocapsules

A pre-formulation study to determine the optimized concentration of lecithin in the lipid-core nanocapsules was conducted. Formulations were named considering the lecithin concentration (Supplementary material).

Chitosan coating of lecithin-lipid-core nanocapsules

A pre-formulation study to determine the optimized concentration of chitosan to coat the lecithin-lipid-core nanocapsules was conducted. Nine different formulations were prepared (Supplementary material) by varying the chitosan concentration (0.5 to 1.4 mg/mL). After the selection of the best chitosan coating and considering the final concentration of acetic acid in the formulation (and pH) for the biological evaluations, the selected formulation was prepared using 1% acetic acid.

Production of scFv anti-LDL(-)

The scFv-anti-LDL(-) was expressed in the yeast *Pichia pastoris* (SMD1168 strain – #C17500, ThermoFisher Scientific, MA, USA), as previously reported [12] (Supplementary material).

Surface functionalization to produce the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation

A pre-formulation study was conducted to determine the optimal concentration of scFv anti-LDL(-) in the nanocapsule formulation. The selected formulation ($LNC^{+}_{0.7}$) was added of zinc acetate solution and immediately (after 1 min) of scFv anti-LDL(-) aqueous solution (Supplementary material) .

Isolation of LDL(-)

The isolation of LDL(-) was performed by sequential flotation ultracentrifugation according to Faulin and co-workers, 2012 [13] (Supplementary material).

Cell isolation and culture conditions

Human monocytes were isolated from peripheral blood [14] using Ficoll gradient (#17-829E, Lonza, MO, USA), Leucosep™ tubes (#227290, Greiner Bio-One, NC, USA) and CD14 microbeads selection system (#130-050-201, Miltenyi Biotec, CA, USA) and differentiated (Supplementary material) into macrophages with human recombinant macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, #78057, StemCell Technologies, WA, USA). To obtain murine primary macrophages (Supplementary material), bone marrow cells were isolated from femur and tibia of C57BL/6J *Ldlr*$^{-/-}$ mice and differentiated (Supplementary material) in the presence of growth factors as previously described [15]. For treatments, both macrophages were cultured in RPMI 1640 medium containing 2 mM L-glutamine, 2 g/L sodium bicarbonate (#S5761, Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil), and a mix of 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin (#15070-063, Gibco®, MA, USA) and 10% fetal bovine serum. The concentration of FBS was reduced to 1% 16 hours before the treatments. For flow cytometry assays, 2.5 x 10^5 murine or human primary macrophages were seeded in 12-well plates, exposed to the treatments, detached with sequential pipetting and resuspended in PBS for analysis. For confocal microscopy, 4-well CELLview™ glass bottom dishes (#627975, Greiner Bio-One,

Frickenhausen, DE) were used for culture of 2.5 x 10^5 murine or human primary macrophages. These cells were treated and, after 3 hours, fixed with 10% neutral buffered formaldehyde for 15 minutes. The fluorophore DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride, #D1306, Gibco®, NY, USA) was added to stain the cells nuclei. All experiments included a control group that did not receive any treatment.

Cellular uptake of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation

Flow cytometry and confocal microscopy

The internalization of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation by murine and human macrophages was evaluated by flow cytometry and confocal microscopy. For these, the fluorophore Rhodamine B was chemically bound to PCL and, then, this PCL-RhoB conjugate was incorporated to the nanocapsule structure during the first step of its synthesis using a blend PCL-RhoB/PCL (1:10, w/w). The cells were incubated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation for 3 hours at 37 ºC and then evaluated.

Fluorescence and hyperspectral microscopy by CytoViva®

The fluorescence and enhanced dark field hyperspectral microscopy (CytoViva Inc, AL, USA) was also performed to evaluate the internalization of the nanoformulation by the macrophages of both species. Therefore, 2.0 x 10^5 cells/well were seeded in extra clean dust-free Nexterion® Glass D coverslips (#D263T, Schott, NY, USA) present in 6-well plates. Cells were incubated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation, containing the fluorophore Rhodamine B, for 3 hours at 37 ºC. After the treatment, coverslips were carefully placed on slides containing 10 µL of PBS and imaged using a CytoViva® Ultra Resolution Imaging System (CytoViva, Inc., AL, USA), mounted on an Olympus BX51 microscope (x1,500 magnification; Olympus, Tokyo, JP). The fluorescence images were taken with a Dage XL CCD digital camera with Image Processing Software (DAGE®, Japan). Data were collected from multiple areas using the Specim V10E CCD spectral camera, and the respective average spectrum for each sample determined using the CytoViva customized ENVI Hyperspectral Image Analysis software.

Endocytosis study

To determine the mechanisms involved in the internalization of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation by murine and human macrophages, flow cytometry assays were also performed. The cells were treated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation for 3 hours at 37 ºC, after a previously 1 hour treatment with the following endocytosis inhibitors: 50 µM Chloroquine, 40 µM Cytochalasin D, 50 µM EIPA [5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride], 80 µM Dynasore and 1 µM Brefeldin A for inhibition of endocytosis, phagocytosis, macropinocytosis, dynamin-dependent endocytosis and intracellular protein transport, respectively.

Cellular uptake of LDL(-)

The effect of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation on the uptake of LDL(-) by both species of macrophages was evaluated by flow cytometry. Cells were treated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation and 37.5 µg/mL of LDL(-) individually or combined for 3 hours at 37 ºC. The LDL(-) was labeled with the fluorophore DiI(C_{18}) (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate, #D282, Life Technologies, USA) [16].

Gene expression analysis by qRT-PCR

The expression levels of mRNA were determined by real-time quantitative in a PCR 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, MA, USA). Cells were treated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation and 37.5 µg/mL of LDL(-) individually or combined for 24 hours at 37 ºC. Primers for IL-1β and MCP-1 were used (Table S1). The mRNA expression was normalized with GAPDH for human and R*pl13a* and for murine macrophages and calculated by the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method [17].

Expression of IL-1β by Cytometric Beads Array (CBA)

To evaluate the expression of IL-1β, CBA assays were performed by flow cytometry, using the Human IL-1β Flex Set Kit (#558279, BD Biosciences, CA, USA) or the Mouse IL-1β Enhanced Sensitivity Flex Set Kit (#562278, BD Biosciences, CA, USA). The supernatant of 1 x 10^6 cells after 48 hours treatment at 37 ºC as described before was collected, and the samples were prepared as suggested by the instruction manual of the product.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA and the results are reported as mean values ± SD. Tukey's test was used for paired comparisons analysis. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Synthesis of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation

Pre-formulation study to determine the optimal concentration of lecithin in lipid-core nanocapsules

The lecithin-lipid-core nanocapsules showed white-turbid macroscopic aspect. All formulations presented pH values slightly acid from 4.4 to 6.1 (Table S2). Laser diffraction analysis showed unimodal size distribution profiles when lecithin was used up to 9 mg/mL (Fig. S1). The volume-weighted mean diameters ($D[4,3]_v$) were similar ($p > 0.05$) (close to 125 nm) when the lecithin solution was used at concentrations from 3 to 9 mg/mL, while the use of lecithin solutions above 10 mg/mL led to formulations presenting $D[4,3]_v$ higher than 1,400 nm, indicating the presence of microstructures in the formulations (LNC_{10}, LNC_{12} and LNC_{14}) (Fig. S2). The polydispersity (SPAN) showed clearly narrow size distributions for LNC_3 to LNC_9 and highly polydispersed systems for LNC_{10} to LNC_{14} (Table S2). Furthermore, the median diameters calculated by number of particles, $d(0.5)_n$, were lower than 90 nm for all formulations, and zeta potential decreased from -8.2 mV (LNC_3) to -20.0 mV (LNC_9) remaining constant for the other formulations. LNC_9 was the selected lecithin-lipid-core nanocapsule formulation, which dynamic light scattering analysis (Fig. S3) showed mean diameter (z-average) of 117±4 nm and polydispersity index (PDI) of 0.1, indicating narrow size distribution.

Pre-formulation study to determine the optimal concentration of chitosan to coat the lecithin-lipid-core nanocapsules

Chitosan was used to coat the surface of the lecithin-lipid-core nanocapsules (Fig. S4). The selected formulation, LNC_9, was reacted with chitosan aqueous solutions at concentrations from 5 mg/mL to 14 mg/mL. The pH values varied from 3.6 to 4.0, the volume-weighted mean diameters ($D[4,3]_v$) were close to 130 nm, except for the formulation prepared with the lowest concentration of chitosan, which had $D[4,3]_v$ of 161 nm (Table S3). Laser diffraction analysis showed unimodal nanometric particle

size distributions (Fig. S5). The polydispersity (SPAN) was 1 for all formulations excepting for $LNC^{+}_{0.5}$, which value was 2. All zeta potential values were positive increasing from 9.6 mV to 17.6 mV, when the chitosan solution varied from 5 to 8 mg/mL, from 16.0 mV to 19.2 mV when the chitosan solution varied from 9 to 12 mg/mL, and it was higher than 20 mV when the chitosan solution had a concentration above 13 mg/mL.

To determine the optimal concentration of chitosan new batches of formulations $LNC^{+}_{0.5}$, $LNC^{+}_{0.7}$ and $LNC^{+}_{1.4}$ were prepared (chitosan solutions at 5, 7 and 14 mg/mL) and analyzed by laser diffraction (Fig. S6). After storage at 5 ºC for 7 days, the formulations prepared with the lowest ($LNC^{+}_{0.5}$) and the highest ($LNC^{+}_{1.4}$) chitosan concentrations showed volume-weighted mean diameters higher than 600 nm compared to the $D[4,3]_v$ of $LNC^{+}_{0.7}$ (Table S4), which was the only showing constant mean diameter within 21 days of storage.

$LNC^{+}_{0.7}$ was the selected formulation. Then, we repeated the synthesis of $LNC^{+}_{0.7}$ using a 7 mg/mL chitosan solution in acetic acid at 1% decreasing the concentration of acid in the solution. The new $LNC^{+}_{0.7}$ formulation showed pH of 4.1±0.0, volume-weighted mean diameter of 130±3 nm and polydispersity (SPAN) of 1, indicating narrow size distribution (Fig. S7). Zeta potential was 15.0±1.8 mV, and the dynamic light scattering analysis showed mean diameter (z-average) of 127.0±3.1 nm and PDI of 0.2. The only physico-chemical parameter presenting significant ($p < 0.05$) difference from $LNC^{+}_{0.7}$ (prepared using 2% acetic acid) was the pH value, which was higher for the new formulation; all other parameters were similar ($p > 0.05$) comparing both formulations. Further characterization of $LNC^{+}_{0.7}$ (prepared using 1% acetic acid) by nanoparticle tracking analysis (NTA) (Fig. S8) showed hydrodynamic diameter, median diameter and particle number density, respectively, of 162±11 nm, 161±8 nm and (0.94±0.4) x 10^{13} particles/mL.

<u>Pre-formulation study to determine the optimal concentration of scFv anti-LDL(-) to functionalize the surface of the nanocapsules</u>

The surface functionalization of chitosan-lecithin-coated lipid-core nanocapsules with scFv anti-LDL(-) was carried out by an organometallic complex using Zn^{+2} (Fig. S9). To determine the minimal concentration of scFv to passivate the surface of the nanocapsules, a pre-formulation study was performed. Four different formulations of multi-wall nanocapsules (MCMN-Zn) containing scFv anti-LDL(-) at 50, 100, 200

and 300 µg/mL, and Zn^{+2} at 25 mg/mL were obtained. Dynamic light scattering analysis (Fig. S10) showed similar correlation decays for the formulations containing scFv anti-LDL(-) higher than 100 mg/mL but a slower decay for that containing it at 50 mg/mL. Despite a moderate polydispersity (PDI = 0.2) determined for all batches, the mean diameters (z-average) of the size distribution curves (Fig. S11) were respectively 347±122, 123±5, 124±9 and 121±8 nm for the scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulations containing the scFv at 50, 100, 200 and 300 mg/mL. The quantification of scFv in the ultrafiltrate (non-bound to the nanocapsule surface) using a calibration curve of it (5 mg/mL to 70 mg/mL) (Fig. S12) showed that the non-bound amount of scFv (soluble in the continuous phase of the nanoformulation) was lower than 15% for the nanoformulations containing it at 200 and 300 mg/mL (Table 1).

Evidence of intracellular uptake of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation *in vitro*

Human (Fig. 1A) and murine (Fig. 1B) primary macrophages significantly internalized scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation, after 3 hours treatment ($p < 0.001$). Confocal microscopy images demonstrated this internalization by both human (Fig. 1C) and murine (Fig. 1D) macrophages. These results were also confirmed by fluorescence, enhanced dark-field and hyperspectral CytoViva® microscopy (Fig. 2 and Videos S1 – control of human macrophages, S2 – control of murine macrophages, S3 – human macrophages treated with scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn and S4 – murine macrophages treated with scFv anti-LDL(-)-MCMN-Zn). The fluorescence microscopy images monitoring the typical red emission of Rhodamine B clearly showed the presence of nanocapsules inside macrophages, whereas the enhanced dark-field CytoViva microscopy images showed the presence of a large number of bright yellowish spots in the cell cytoplasm corresponding to the nanocapsules, as compared to the control, whose spectrum (Fig. S13) registered using the CytoViva microscope hyperspectral mode exhibiting a maximum at 600 nm also corroborated those results.

Identification of endocytosis mechanisms related to the internalization of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation by macrophages

Macropinocytosis inhibitor EIPA profoundly inhibited nanoformulation internalization both in human (79.4% inhibition, $p < 0.001$) and murine (79.5% inhibition, $p < 0.001$) macrophages (Fig. 3A and B). The uptake was also significantly inhibited by actin polymerization inhibitor Cytochalasin D in both cell types (25.2% and 44.7% inhibition for human and murine macrophages respectively, $p < 0.01$). Only human macrophages responded with reduced nanoformulation uptake to inhibitor of lysosomal acidification Chloroquine (67,4% inhibition, $p < 0.001$) and inhibitor of dynamin, Dynasore (25.5% inhibition, $p < 0.01$), while ER to Golgi traffic inhibitor Brefeldin A attenuated nanocapsule uptake in murine (28.1% inhibition, $p < 0.05$), but not human macrophages.

Effect of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation on LDL(-) uptake by macrophages

The treatment with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation for 3 hours significantly decreased LDL(-) uptake by both human ($p < 0.001$) and murine ($p < 0.001$) macrophages (Fig. 4A and Fig. 4B, respectively) compared to LDL(-) control.

Effect of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation on the pro-inflammatory effects of LDL(-) in macrophages

The treatment of human macrophages with 6.25 µg/mL of nanoformulation caused significant down regulation of *IL1B* (Fig. 5A) and *MCP1/CCL2* (Fig. 5B) mRNA expression, compared to LDL(-) control. The treatment also decreased IL-1β protein levels (Fig. 5C) after 48 hours of stimulation. In murine macrophages, the nanoformulation promoted a significant decrease of IL-1β mRNA expression and abolished IL-1β protein secretion (Fig. 5D and Fig. 5E) compared to LDL(-).

Discussion

One of the greatest advantages of the use of nanotechnology in medical applications is the ability to engineer materials that can interact with different cell features and specific substrates in order to deliver drugs or bioactive molecules. Moreover, the use of nanodevices conjugated with antibody fragments, such as the scFv [18], has been increased due to their small size, compared to whole

antibodies, which enables the reduction of the diameter variation of the nanoparticulate systems after conjugation [19].

Recently, we proposed a new strategy to functionalize the surface of polymeric nanocapsules using an organometallic complex to bind a ligand to the nanostructure with high yields without needing for further purification steps [20; 21]. In the present study, we pursued an optimized nanoformulation to evaluate its effects on macrophages. In this way, a highly pure nanoformulation in terms of supramolecular structure is required to have reliable biological evaluation results. Previously, the proportions of triglyceride, sorbitan monostearate and PCL have been studied for the polysorbate 80-coated lipid-core nanocapsules [22], but the optimized proportions of lecithin, chitosan, metal ion and ligand [scFv anti-LDL(-)] to produce surface-functionalized nanocapsules were evaluated here. Considering the volume-weighted mean diameters ($D[4,3]_v$), the polydispersity (SPAN) and zeta potential values for lecithin-lipid-core nanocapsules, its optimal concentration is 9 mg/mL. The results are in accordance to those previously observed [23] for lecithin adsorbed on poly(lactide)-nanostructures, which zeta potential values reached a plateau after surface site saturation. The negative zeta potential is a consequence of the oxygenated species at the particle-water interface, which value increased in modulus with the increase in the lecithin concentration due to the presence of phosphatidic acid as impurity. The selected formulation (LNC_9) was then reacted with chitosan at different concentrations. The highest volume-weighted mean diameter and the highest polydispersity (SPAN) determined for the formulation prepared with the lowest concentration of chitosan (5 mg/mL) suggested that the surface coating of the nanocapsules was not complete. Furthermore, a plateau is observed when the 7 mg/mL chitosan solution was used to coat the LNC_9 formulation suggesting that a surface site saturation is occurring and a monolayer is achieved. After storage at 5 ºC, only the formulation coated with chitosan solution at 7 mg/mL was kinetically stable. Considering the presence of polysorbate 80 in the formulation, the mechanism of stability of those colloidal particles is based on both steric hindrance (by the non-ionic surfactant) and electrostatic repulsion (by the polycationic polymer) at the particle-water interface. In order to decrease the concentration of acetic acid in the formulation, a new batch of $LNC^+_{0.7}$ was obtained by using a 7 mg/mL chitosan solution in 1% acetic acid. All physico-chemical characteristics were similar between the $LNC^+_{0.7}$ formulations, except for the pH,

which was higher for that prepared with lower amounts of acetic acid. Previously, scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulations have been proposed using 3 mg/mL of lecithin, 0.5 mg/mL of chitosan and 200 mg/mL of scFv [20]. Here, we proposed to optimize the composition to increase the kinetic stability of the nanocapsules. Indeed, the chitosan-lecithin-coated lipid-core nanocapsules prepared with 9 mg/mL lecithin and 0.7 mg/mL chitosan showed constant mean diameter for 21 days (stored at 5 ºC). Therefore, after varying the concentration of lecithin and chitosan at the surface of the nanocapsules, a new pre-formulation study to determine the optimal concentration of scFv to passivate the interface particle-water was necessary. The lack of reproducibility in producing the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation at 50 µg/mL of scFv showed a non-compliance of the product, which was discarded. Moreover, the quantification of non-bound scFv to the nanocapsule surface indicated that its optimal concentration in the nanoformulation is higher than 200 mg/mL since the nanoformulations prepared at 200 and 300 mg/mL showed percentages higher than 85% of scFv bound to the nanocapsule surface. In this way, we selected the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation at 300 mg/mL for the biological evaluations.

Here, it was shown that only the nanocapsules functionalized with the scFv anti-LDL(-) were efficiently internalized by murine and human macrophages compared to the control formulation. Previous studies [24; 25] have shown that conjugated nanoparticles present greater cellular uptake, sustained intracellular retention and, therefore, better efficacy in cells when compared to unconjugated nanoparticles. In order to deliver a drug or even molecules that might be unstable in physiological conditions and maintain its intracellular levels, the nanoparticles should be able to cross key barriers, such as the cell membranes [26], which typically prevent the entrance of large molecules despite the occurrence of endocytosis [27]. Nanoparticles interact differently with the cells compared to molecules in general [28] and the mechanisms involved in their internalization by cells, are deeply influenced by their physicochemical properties as well as by their surface ligands [29].

Generally, phagocytosis occurs in specialized cells like monocytes, macrophages, neutrophils and dendritic cells in order to protect the organism from infectious agents and exogenous inert particles, such as drug delivery nanoparticles [30]. The key steps in this process are the opsonization (made by proteins called opsonins,

such as immunoglobulins and complement proteins) [31] and the formation of the phagosome, which is able to transport the particle throughout the cytoplasm and later to fuse with lysosomes to form a phagolysosome. The phagolysosomes become acidified and acquire an enzymatic content, which is essential for polymer biodegradability of synthetic nanoparticles, for example, allowing drug release [32]. Usually, particles need a minimum size of 500 nm to undergo phagocytosis [33], however the size is not the only determinant characteristic in this process and surface properties must be also considered [34].

Unlike phagocytosis, endocytosis mechanisms are present in almost all cell types and include: macropinocytosis, clathrin- and caveolin-mediated endocytosis, both dependent on dynamin recruitment, as well as other clathrin- and caveolin-independent mechanisms [29]. Macropinocytosis occurs in many cells, including macrophages, and involves the formation of protrusions that merge with each other and fuse with the cell membrane [35]. Although macropinocytosis does not have any selectivity [36] and engulfs large particles, with no specific surface coating, generating macropinosomes bigger than 1 μm [37], it is considered one of the best routes for drug delivery [38]. Clathrin- and caveolin-mediated endocytosis generates membrane invaginations of approximately 150 nm and 50–80 nm, respectively. They are two different mechanisms of internalization of molecules that depend on a single and essential component of clathrin-coated vesicle formation and caveolae internalization, a GTPase known as dynamin [39]. The cargo uptake by clathrin-dependent endocytic mechanism is followed by the formation of degradative lysosomes with an acidic and enzyme-rich environment that promotes degradation of the carried drug [29]. The caveolae-mediated endocytosis starts with the particles binding to the cell surface and moving to caveolae invaginations, followed by the fission of the caveolae from the cell membrane, mediated by dynamin, and formation of a caveolar vesicle, which does not present a damaging environment [40; 34].

As shown here, the internalization of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanocapsules may occur via phagocytosis (demonstrated by the Cytochalasin D-mediated inhibition of the polymerization of actin filaments) and macropinocytosis (about 80% of inhibition of the nanoformulation internalization by EIPA). The wide range of nanoparticle internalization pathways described in the literature may be related to several factors as: i) nanoparticles made of the same material and originated from

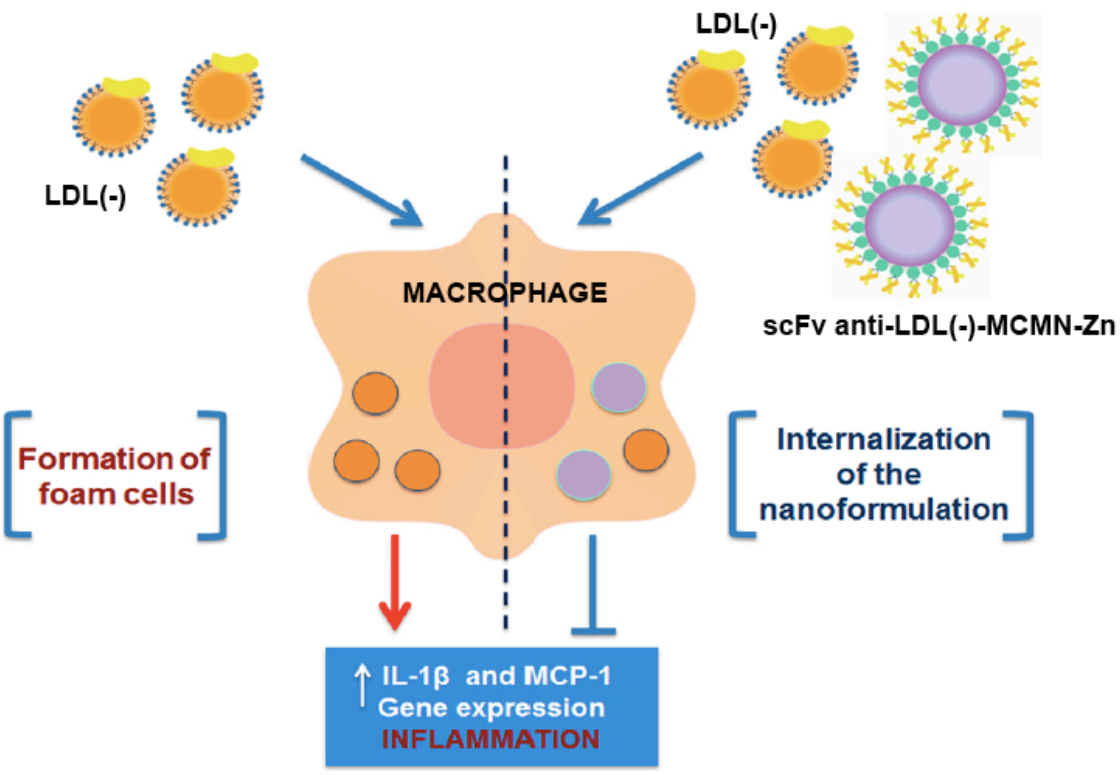
the same solution or suspension may differ about size, shape and porosity, interacting differently with cells and inducing particular endocytic mechanisms [41]; ii) the adsorption of proteins or peptides on the surface of nanoparticles may alter their unique properties, such as size and charge [42]; iii) different types of cells will present distinguished internalization strategies [43]; iv) the pharmacological inhibitors commonly used, generally, do not present high specificity for each mechanism and may influence alternative internalization routes [44]. In our case, the shape and surface are constant for the nanocapsule formulation, the size distribution being likely the most relevant parameter influencing the uptake mechanism. Considering that most of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanocapsules are taken up by macrophages through macropynocytosis, one of the best routes for drug delivery [38], this nanodevice may be used for new therapeutic approaches, including targeted drug delivery to the site of disease, combining the functionalization of nanoparticles and encapsulation of specific drugs at one system. Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world [45], which explains why nanotechnology has been increasingly applied to the understanding, diagnosis and treatment of these pathologies [46]. In the context of atherosclerosis, it is important to reduce cholesterol accumulation into the arterial wall to prevent foam cell formation [8]. In fact, our findings clearly show that the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation promoted a significant decrease of LDL(-) uptake by both human and murine macrophages. This is in agreement with previous reports demonstrating that the *in vitro* treatment of macrophages with a complex of polylatic acid nanoparticles conjugated to an anti-apoB-100 monoclonal antibody significantly decreased the LDL uptake by these cells [47].

Moreover, as the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation inhibits the uptake of LDL(-) by macrophages, this treatment decreased the MCP-1 and IL-1β mRNA and protein expression by these cells. It is very well known that the LDL(-) plays a key role in atherosclerosis, being involved not only in the formation of foam cells but also by its pro-inflammatory action on endothelial cells, stimulating the production of several cytokines, chemokines and growth factors related to many stages of atherosclerosis development, such as leukocyte recruitment and cell proliferation [48]. In macrophages, the LDL(-) promotes the secretion of biologically active IL-1β through two main mechanisms: the activation of CD14 and TLR4 receptors, known as priming, and the activation of NRLP3 inflammasome, with the formation of the

inflammasome complex NLRP3-ASC and the activation of caspase-1 [49; 50]. IL-1β acts as an important mediator of the inflammatory response in cell proliferation and differentiation processes [51] and has direct functions in the formation and stability of the atherosclerotic plaque by inducing the production of proteolytic enzymes by macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells, presenting great importance on spreading inflammation to other cell types [52]. It has been shown that IL-1β receptor-deficient mice have less atherosclerotic lesions (approximately 33%) compared to mice without the deletion of this allele, suggesting its importance in promoting atherosclerosis [53]. MCP-1, in turn, presents an important role in the regulation of migration and infiltration of monocytes from the circulation through the vascular endothelium during the inflammatory response not only at the beginning of the subendothelial migration but also in the amplification of this process [54]. Recent studies involving human monocytes from atherosclerotic plaque reported increased levels of MCP-1 compared to those isolated from peripheral blood monocytes [55]. Increased MCP-1 expression was also observed in the aortic arch of hypercholesterolemic rabbits [56], associated with the increase of TNFα (tumor necrosis factor-α), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) and IL-1β [57]. Therefore, MCP-1 has also been considered as a potential marker of the atherogenic process [58; 59].

In summary, this study showed the cellular uptake of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanocapsules to major extent through phagocytosis and macropinocytosis, and demonstrated the beneficial effects of this nanoformulation on the inhibition of LDL(-)-mediated production of pro-inflammatory factors related to the atherosclerotic process. Therefore, the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation is a promising strategy for early intervention in atherosclerosis in order to prevent the development and progression of this disease. In addition, the results pave the way to further investigations of the nanoformulation as a nanocarrier for drug delivery and targeting.

Graphical abstract



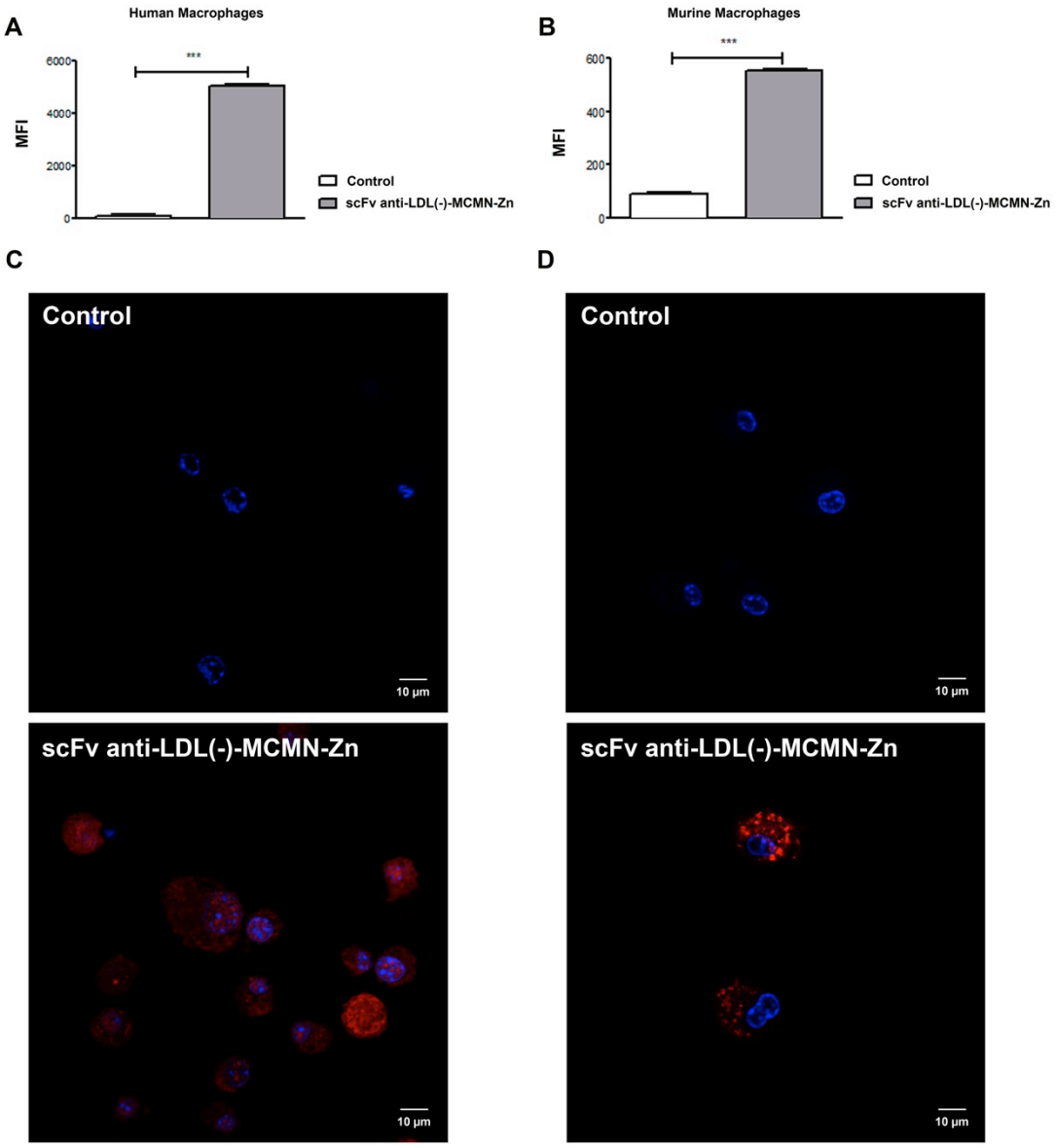


Figure 1: Internalization of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation by human and murine primary macrophages. Flow cytometry measurements data from (A) human and (B) murine primary macrophages treated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation for 3 hours. Confocal microscopy images of (C) human and (D) murine macrophages exposed to the same conditions. Nanocapsules were labeled with Rhodamin B (red fluorescence) and macrophages nuclei stained with DAPI (blue fluorescence). Images from immersion oil 63x objective. Data from three independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SD ***$p < 0.001$ compared with Control; ANOVA followed by the Tukey-Kramer's test.

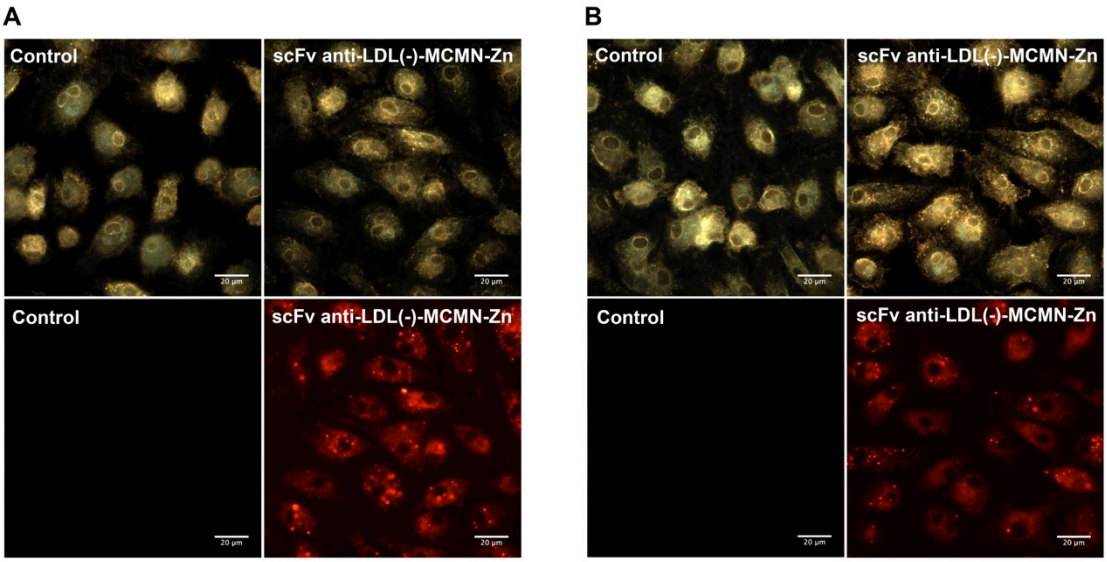


Figure 2: Internalization of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation, by human and murine primary macrophages, monitored by fluorescence (red emission) and enhanced dark-field microscopy (CytoViva®). Data from (A) human and (B) murine macrophages treated 3 hours with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation conjugated with Rhodamine B. Images from 100x objective.

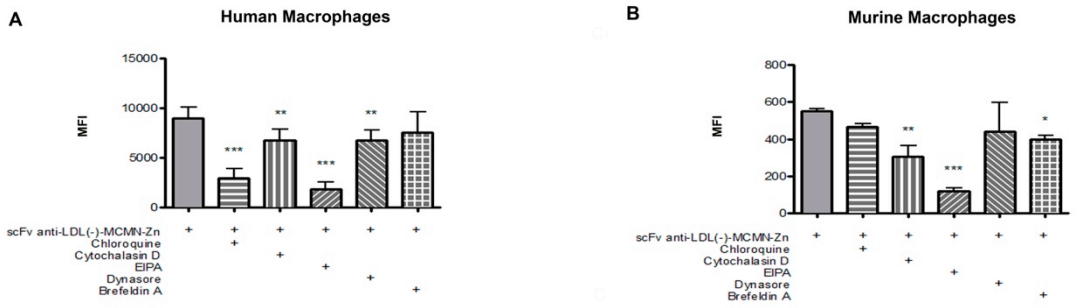


Figure 3: Endocytosis mechanisms involved in the internalization of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation by human and murine primary macrophages. Flow cytometry measurements data from (A) human and (B) murine macrophages treated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation for 3 hours, after one hour incubation with 50 µM Chloroquine, 40 µM Cytochalasin D, 50 µM EIPA [5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride], 80 µM Dynasore or 1 µM Brefeldin A. Data from three independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SD ***$p < 0.001$, **$p < 0.01$ and $p < 0.05$ compared with scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation without any inhibitor; ANOVA followed by the Tukey-Kramer's test.

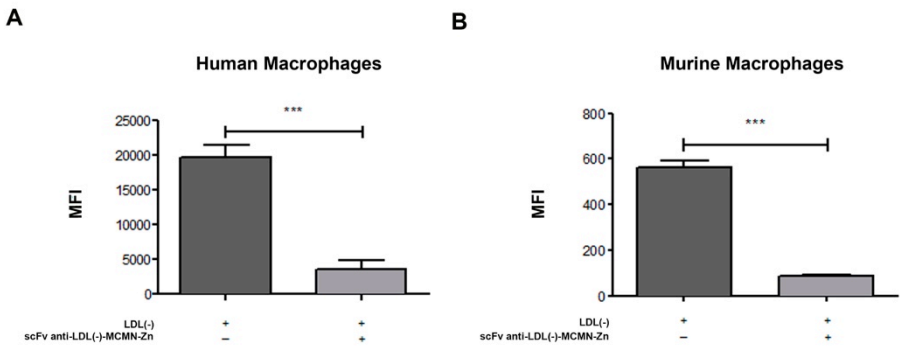


Figure 4: Effect of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation on LDL(-) uptake by human and murine primary macrophages. Flow cytometry measurements data from (A) human and (B) murine macrophages treated with 6.25 µg/mL of scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation and 37.5 µg/mL of LDL(-) individually or combined for 3 hours. LDL(-) was labeled with DiI(C_{18}). Data from three independent experiments, performed in triplicate, are expressed as the means ± SD ***p < 0.001 compared with LDL(-); ANOVA followed by the Tukey-Kramer's test.

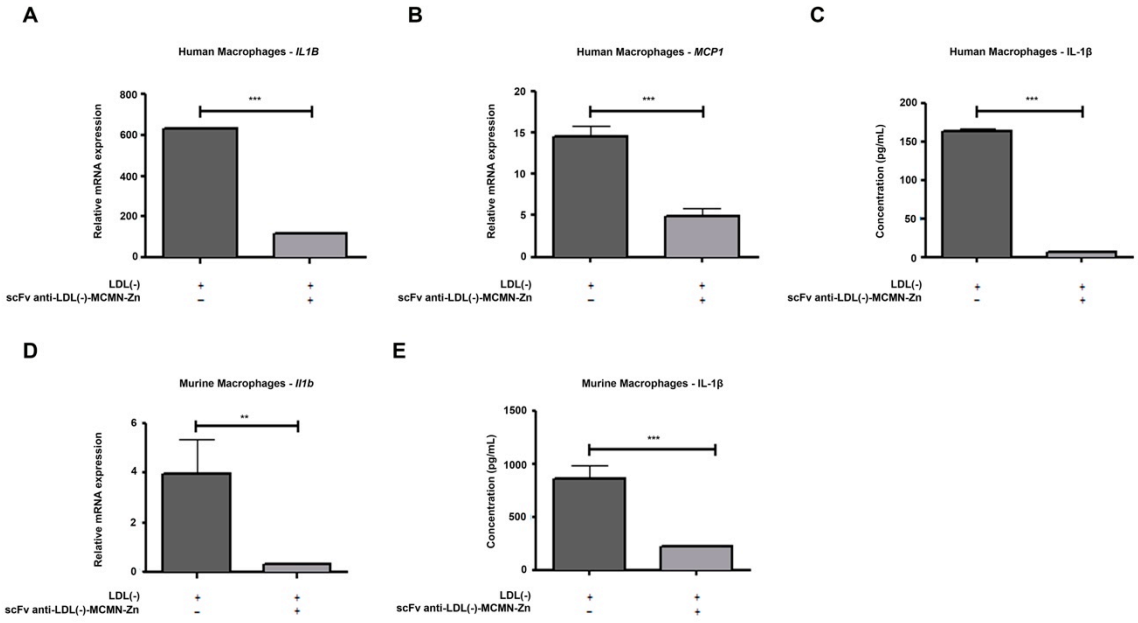


Figure 5: Effect of the scFv-anti-LDL(-)-MCMN-Zn nanoformulation on cytokines mRNA and protein expression by human and murine primary macrophages. Relative mRNA expression of *IL1B* (A) and *MCP1/CCL2* (B) and (C) expression levels of IL-1β on human macrophages. (D) Relative mRNA expression of *Il1b* and (E) expression levels of IL-1β on murine macrophages. Data expressed as the means ± SD, **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared with LDL(-). ANOVA followed by the Tukey-Kramer's test.

ANEXO 10 – ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO

Archives of Biochemistry and Biophysics
Volume 557, 1 September 2014, Pages 28–35
Antioxidants and Redox Processes in Health - Bilateral Meeting Brazil-Japan

Identification of microRNAs involved in the modulation of pro-angiogenic factors in atherosclerosis by a polyphenol-rich extract from propolis

Alejandro Cuevas[a, 1], Nicolás Saavedra[a, 1], Marcela F. Cavalcante[b], Luis A. Salazar[a], Dulcineia S.P. Abdalla[b]
[a] Center of Molecular Biology and Pharmacogenetics, Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN), Universidad de La Frontera, Av. Francisco Salazar, 01145 Temuco, Chile
[b] Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes 580, São Paulo, Brazil

Received 31 January 2014, Revised 17 April 2014, Available online 30 April 2014

Toxicon 101 (2015) 1–10
Contents lists available at ScienceDirect
Toxicon
journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Post-transcriptional control of Amblyomin-X on secretion of vascular endothelial growth factor and expression of adhesion molecules in endothelial cells

C.C. Drewes [a], R.Y. Dias [a], V.G. Branco [b], M.F. Cavalcante [c], J.G. Souza [b], D.S.P. Abdalla [c], A.M. Chudzinski-Tavassi [b], S.H.P. Farsky [a, *]
[a] Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ave. Prof. Lineu Prestes 580, SP, 05503-900, São Paulo, Brazil
[b] Biochemistry and Biophysics Laboratory, Butantan Institute, Ave. Vital Brasil 1500, SP, 05503-900, São Paulo, Brazil
[c] Laboratory of Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ave. Prof. Lineu Prestes 580, SP, 05503-900, São Paulo, Brazil

PLOS ONE
RESEARCH ARTICLE

AMP-Activated Protein Kinase Interacts with the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta to Induce Genes Affecting Fatty Acid Oxidation in Human Macrophages

Marina Kemmerer[1], Florian Finkernagel[2], Marcela Frota Cavalcante[3], Dulcineia Saes Parra Abdalla[3], Rolf Müller[2], Bernhard Brüne[1‡], Dmitry Namgaladze[1‡*]
1 Institute of Biochemistry I, Faculty of Medicine, Goethe-University Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590, Frankfurt, Germany, 2 Institute of Molecular Biology and Tumor Research (IMT), Philipps-University Marburg, Marburg, Germany, 3 Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
‡ These authors are joint senior authors on this work.
* namgaladze@biochem.uni-frankfurt.de

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2016, Article ID 6505383, 8 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2016/6505383

Research Article

Polyphenols from Chilean Propolis and Pinocembrin Reduce MMP-9 Gene Expression and Activity in Activated Macrophages

Nicolás Saavedra,[1] Alejandro Cuevas,[1] Marcela F. Cavalcante,[2] Felipe A. Dörr,[2] Kathleen Saavedra,[1] Tomás Zambrano,[1] Dulcineia S. P. Abdalla,[2] and Luis A. Salazar[1]
[1]Center of Molecular Biology and Pharmacogenetics, Department of Basic Sciences, Scientific and Technological Bioresource Nucleus, Universidad de La Frontera, Avenida Francisco Salazar 01145, 4811230 Temuco, Chile
[2]Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes 580, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

ANEXO 11 – FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9136 - 7080201/2 - Marcela Frota Cavalcante

Email:	marcela.frota@usp.br
Data de Nascimento:	04/04/1984
Cédula de Identidade:	RG - 98002158370 - CE
Local de Nascimento:	Estado do Ceará
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal do Ceará - Ceará - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	05/10/2012
Início da Contagem de Prazo:	05/10/2012
Data Limite para o Depósito:	05/10/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 05/10/2012 até o presente. Email: dspa@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Adriana Raffin Pohlmann - 07/05/2014 até o presente. Email:
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 05/10/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 11/12/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matricula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 27/09/2016 16:14:11

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9136 - 7080201/2 - Marcela Frota Cavalcante

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
TNA5772-3/1	Biomoléculas Radiomarcadas para Uso em Diagnóstico e Terapia de Tumores e Infecções (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	25/02/2013	19/05/2013	120	8	98	A	N	Concluída
FBA5728-3/7	Aprimoramento Didático	19/03/2013	15/04/2013	60	4	87	A	N	Concluída
BMA5887-2/3	Princípios de Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética Aplicados à Anatomia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	19/03/2013	27/05/2013	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5792-3/1	Tópicos em Análises Clínicas III	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
BTC5828-1/1	Biossegurança em Laboratórios (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	14/03/2014	22/05/2014	60	4	95	A	N	Concluída
MIP5737-2/2	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	02/06/2014	08/06/2014	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5771-7/2	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	02/06/2014	15/06/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5766-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
QBQ5747-8/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/11/2014	30/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016
Impresso em: 27/09/2016 16:14:11

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9136 - 7080201/2 - Marcela Frota Cavalcante

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
2083139	Dulcineia Saes Parra Abdalla	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016
Impresso em: 27/09/2016 16:14:11

ANEXO 12 – CURRÍCULO LATTES DO ALUNO

Marcela Frota Cavalcante

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/7763153876642803
Última atualização do currículo em 08/07/2016

Possui graduação em Farmácia - Análises Clínicas pela Universidade Federal do Ceará (2008). É mestre em Ciências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2012) e atualmente faz doutorado na mesma instituição. Realizou estágio (Doutorado Sanduiche - Capes/DAAD Probral) na Goethe Universität em Frankfurt am Main, Alemanha (2013), sob orientação do Prof. Dr. Bernhard Brüne e do Dr. Dmitry Namgaladze. Tem experiência na área de Bioquímica, Biologia Molecular e Microbiologia, atuando principalmente nos temas: aterosclerose, lipoproteínas modificadas e proteínas recombinantes. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Marcela Frota Cavalcante
Nome em citações bibliográficas	CAVALCANTE, M. F.;CAVALCANTE, MARCELA F;CAVALCANTE, MARCELA F.;CAVALCANTE, MARCELA FROTA;CAVALCANTE, M.F.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Butantã 05508-900 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (011) 30913637

Formação acadêmica/titulação

2012	Doutorado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com **período sanduíche** em Goethe Universität Frankfurt am Main (Orientador: Prof. Dr. Bernhard Brüne and Dr. Dmitry Namgaladze). Título: Estudos in vitro e in vivo com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa vetorizados em nanocápsulas na aterosclerose experimental., Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: scFv; Nanotecnologia; LDL eletronegativa; Aterosclerose; biofármaco. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.
2010 - 2012	Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental,Ano de Obtenção: 2012. Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: scFv; Aterosclerose; LDL eletronegativa. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.

2008 - 2014 Especialização em Citologia Clínica.
Faculdade Ateneu, FATE, Brasil.
Título: Câncer de mama no homem.
Orientador: Tania Maria Maia.

2003 - 2008 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil.
Título: Perfil de resistência de microrganismos isolados de líquidos biológicos de pacientes internados na unidade de terapia intensiva da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza..
Orientador: Nádia Accioly Pinto Nogueira.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação Complementar

2015 - 2015 International Summer School. (Carga horária: 80h).
Institute of Translational Pharmacology, ITP, Itália.

2015 - 2015 Módulo 1: Fundamentos da PCR Quantitativa (qPCR). (Carga horária: 20h).
Life Technologies Corporation, LIFE, Brasil.

2015 - 2015 Inflammation and Vascular Disease. (Carga horária: 1h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil.

2014 - 2014 Ultrassequenciamento: Técnicas, aplicações e análi. (Carga horária: 16h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil.

2014 - 2014 Perícia Criminal - XLIX SUPFAB. (Carga horária: 4h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil.

2014 - 2014 Biologia de sistemas de doenças infecciosas. (Carga horária: 1h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil.

2014 - 2014 Thomson Reuters Integrity. (Carga horária: 1h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil.

2014 - 2014 From apoptosis to zebrafish. (Carga horária: 1h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil.

2012 - 2012 Curso de Atualização em PET/CT. (Carga horária: 40h).
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, Brasil.

2010 - 2010 Nanotecnologia. (Carga horária: 4h).
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Brasil.

2009 - 2010 Programa de Atualização. (Carga horária: 400h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2007 - 2007 Atualização em Imunohematologia, Coagulação e Leuc. (Carga horária: 40h).
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - Regional Ceará, SBAC - CE, Brasil.

2006 - 2006 Atualização em Virologia. (Carga horária: 40h).
Centro de Treinamento e Desenvolvimento, CETREDE, Brasil.

2005 - 2005 Aplicação da Biologia Molecular em Microbiologia. (Carga horária: 4h).
Associação Farmacêutica de Pernambuco, AFP, Brasil.

2005 - 2005 Interpretação de Exames Laboratoriais. (Carga horária: 42h).
Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil.

2004 - 2004 Principios e Aplicações da Biologia Molecular. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil.

2004 - 2004 Atualização em Farmacologia. (Carga horária: 50h).
Axion, AXION, Brasil.

2004 - 2004 Prática de Atendimento em Urgências e Emergências. (Carga horária: 16h).
Conselho Regional de Farmacia do Estado do Ceará, CRF-CE, Brasil.

2004 - 2004 O Farmacêutico e a Comunidade. (Carga horária: 24h).
Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil.

Atuação Profissional

Goethe Universität Frankfurt am Main, UNI-FRANKFURT, Alemanha.

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutorado Sanduiche, Carga horária: 40

Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil.

Vínculo institucional

2002 - 2008 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

07/2007 - 01/2008 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Laboratório de Microbiologia - Projeto intitulado: "Atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais do Nordeste brasileiro". Bolsista FUNCAP.

07/2006 - 07/2007 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Laboratório de Microbiologia - Projeto intitulado: "Atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais do Nordeste brasileiro". Bolsista CNPq.

11/2006 - 11/2006 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Estágio no Centro de Atendimento Toxicológico - CEATOX - no Instituto Doutor José Frota..

10/2006 - 10/2006 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Estágio em farmácia hospitalar realizado na Maternidade Escola Assis Chateaubriand - Fortaleza-CE. 40h/semanais.

09/2006 - 09/2006 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Estágio em farmácia de manipulação. 40 h/semanais.

08/2006 - 08/2006 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Estágio em farmácia comercial. 40 h/semanais..

07/2006 - 07/2006 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Estágio Rural - CRUTAC - realizado em Maracanaú-CE. 40 h/semanais..

07/2005 - 07/2006 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Laboratório de Microbiologia - Projeto intitulado: "Atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais do Nordeste brasileiro". Bolsista CNPq.

07/2004 - 07/2005 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Laboratório de Microbiologia - Projeto intitulado: "Atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais do Nordeste brasileiro". Bolsista CNPq.

07/2003 - 07/2004 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Estágio realizado
Laboratório de Microbiologia - Projeto intitulado: "Atividade antimicrobiana de

extratos de plantas medicinais do Nordeste brasileiro". Bolsista CNPq.

09/2002 - 07/2003 Estágios , Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Estágio realizado
Laboratório de Microbiologia - Projeto intitulado:.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno pós-graduação, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Aluna de Doutorado no programa de pós-graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Bolsista CAPESP. Desenvolvimento do projeto: Estudos in vitro e in vivo com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa derivatizados em nanocápsulas na aterosclerose experimental.

Vínculo institucional

2010 - 2012 Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Aluna de Mestrado no programa de pós-graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Bolsista FAPESP. Desenvolvimento do projeto: Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental.

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Voluntário, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

04/2012 - 04/2012 Ensino, Farmácia (Análises Clínicas), Nível: Pós-Graduação

Disciplinas ministradas
Aula intitulada "Nanotecnologia aplica à biofármacos na Aterosclerose" ministrada na disciplina " Aterosclerose: Fisiopatologia, Diagnóstico e Terapêutica" do Programa de Pós-graduação em Farmácia - Análises Clínicas - USP - com carga horária de 3 horas.

04/2011 - 05/2011 Ensino, Farmácia, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas
Atividade realizada como monitora na disciplina de Bioquímica Clínica da Graduação em Farmácia - Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP durante as aulas teóricas e práticas, com carga horária de 36 horas.

04/2010 - 04/2010 Ensino, Farmácia, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas
Atividade realizada como monitora na disciplina de Bioquímica Clínica da Graduação em Farmácia - Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP durante a aula prática sobre "Novos biomarcadores de função hepática", com carga horária de 2 horas

08/2009 - 12/2009 Treinamentos ministrados , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Treinamentos ministrados
Treinamento ministrado durante o Programa de Atualização: Técnicas do estudo de lipoperoxidação e oxidação lipoproteínas, pelo setor de Bioquímica Clínica - FCF (USP)

Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, SCMF, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Farmacêutica-Bioquímica, Enquadramento Funcional: Funcionária, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estudante, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Edilson Gurgel nos

setores: Coleta, Hematologia, Bioquímica, Parasitologia, Imunologia e Microbiologia.

Atividades

07/2008 - 04/2009 Serviços técnicos especializados , Laboratório de Análises Clínicas Dr. Edilson Gurgel, .

Serviço realizado
Farmacêutica Bioquímica responsável pelo setor de Imunologia..

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: ANÁLISES CLÍNICAS/Especialidade: Bioquímica.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. SAAVEDRA, NICOLÁS ; CUEVAS, ALEJANDRO ; **CAVALCANTE, MARCELA F.** ; DÖRR, FELIPE A. ; SAAVEDRA, KATHLEEN ; ZAMBRANO, TOMÁS ; ABDALLA, DULCINEIA S. P. ; SALAZAR, LUIS A. . Polyphenols from Chilean Propolis and Pinocembrin Reduce MMP-9 Gene Expression and Activity in Activated Macrophages. BIOMED RES INT JCR, v. 2016, p. 1-8, 2016.

2. KEMMERER, MARINA ; FINKERNAGEL, FLORIAN ; **CAVALCANTE, MARCELA FROTA** ; ABDALLA, DULCINEIA SAES PARRA ; MÜLLER, ROLF ; BRÜNE, BERNHARD ; NAMGALADZE, DMITRY . AMP-Activated Protein Kinase Interacts with the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta to Induce Genes Affecting Fatty Acid Oxidation in Human Macrophages. Plos One JCR, v. 10, p. e0130893, 2015.

3. DREWES, C.C. ; DIAS, R.Y. ; BRANCO, V.G. ; **CAVALCANTE, M.F.** ; SOUZA, J.G. ; ABDALLA, D.S.P. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. ; FARSKY, S.H.P. . Post-transcriptional control of Amblyomin-X on secretion of vascular endothelial growth factor and expression of adhesion molecules in endothelial cells. Toxicon (Oxford) JCR, v. 101, p. 1-10, 2015.

   Citações: WEB OF SCIENCE℠ 1 | SCOPUS 2

4. BENDER, EDUARDO A. ; **CAVALCANTE, MARCELA F.** ; ADORNE, MÁRCIA D. ; COLOMÉ, LETÍCIA M. ; GUTERRES, SÍLVIA S. ; ABDALLA, DULCINÉIA S. P. ; POHLMANN, ADRIANA R. . New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(−)-functionalized nanocapsules. Pharmaceutical Research JCR, v. 31, p. 2975-2987, 2014.

   Citações: WEB OF SCIENCE℠ 5 | SCOPUS 5

5. CUEVAS, ALEJANDRO ; SAAVEDRA, NICOLÁS ; **CAVALCANTE, MARCELA F.** ; SALAZAR, LUIS A. ; ABDALLA, DULCINEIA S.P. . Identification of microRNAs involved in the modulation of pro-angiogenic factors in atherosclerosis by a polyphenol-rich extract from propolis. Archives of Biochemistry and Biophysics (Print) JCR, v. 557, p. 28-35, 2014.

   Citações: WEB OF SCIENCE℠ 6 | SCOPUS 6

6. KAZUMA, SORAYA M ; **CAVALCANTE, MARCELA F** ; TELLES, ANDRÉIA ER ; MARANHÃO, ANDREA QUEIROZ ; ABDALLA, DULCINEIA SP . Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. MABS-AUSTIN JCR, v. 5, p. 763-775, 2013.

7. FAULIN, T. E. S. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; ABDALLA, D. S. P. . Role of Electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. Clinical Lipidology (Print) JCR, v. 5, p. 719-729, 2011.

Citações: WEB OF SCIENCE 2 | SCOPUS 2

Resumos publicados em anais de congressos

1. **CAVALCANTE, M.F.**; KAZUMA, SORAYA M ; ADORNE, MÁRCIA D. ; BENDER, EDUARDO A. ; KREMMERER, M. ; BOSS, M. ; NAMGALADZE, DMITRY ; BRÜNE, BERNHARD ; GUTERRES, SÍLVIA S. ; POHLMANN, ADRIANA R. ; ABDALLA, D.S.P. . Potential therapeutic use of anti-electronegative LDL single chain fragment variable vectorized in nanocapsules on atherosclerosis. In: 17th International Symposium on Atherosclerosis, 2015, Amsterdam. International Symposium on Atherosclerosis. Amsterdam: International Symposium on Atherosclerosis, 2015. v. 1.

2. **CAVALCANTE, M. F.**; KAZUMA, S. M. ; BENDER, E. A. ; ADORNE, M. D. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. ; ABDALLA, D. S. P. . Inhibitory effect of an anti-LDL(-) scFv conjugated to nanoparticles in experimental atherosclerosis. In: 16th International Biotechnology Symposium, 2014, Fortaleza. 16th IBS, 2014. v. 1.

3. **CAVALCANTE, M. F.**; KAZUMA, S. M. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. ; BENDER, E. A. ; ADORNE, M. D. ; ABDALLA, D. S. P. . Atheroprotection of anti-LDL(-) scFv conjugated to nanoparticles in experimental atherosclerosis. In: 81st European Atherosclerosis Society Congress, 2013, Lyon. 81st EAS, 2013. p. 123-123.

4. KAZUMA, S. M. ; FAULIN, T. E. S. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; MICHALOSKI, J. ; GIORDANO, R. J. ; ABDALLA, D. S. P. . Effects of mimotope peptides of modified LDL in RAW macrophages.. In: 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2013, Osaka. APIPS, 2013. p. 166-166.

5. SAAVEDRA, N. ; CUEVAS, A. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; MARCUCCI, M. C. ; ABDALLA, D. S. P. ; SALAZAR, L. A. . Chilean Propolis reduces Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression in Activated Macrophages. In: 80th European Atherosclerosis Society Congress, 2012, Milão. Atherosclerosis European Journal, 2012.

6. SAAVEDRA, N. ; CUEVAS, A. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; ABDALLA, D. S. P. ; SALAZAR, L. A. . Polyphenols from Propolis Reduces Matrix Metalloporteinase-9 Gene Expression and Activity in Activated Macrophages. In: 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), 2012, São Paulo. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics. Basel: Karger, 2012. v. 5. p. 269-269.

7. KAZUMA, S. M. ; FAULIN, T. E. S. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; MARANHAO, A. Q. ; ABDALLA, D. S. P. . ScFv with functional activity against electronegative low-density lipoprotein. In: Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2011, Keystone, Denver. Antibody as Drugs, 2011. p. 69-69.

8. KAZUMA, S. M. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; DIAZ, C. A. ; MARQUES, D. V. ; CASTRO, F. G. S. ; RUDNICKI, M. ; FAULIN, T. E. S. ; CESAR, F. A. ; PESSOA JUNIOR, A. ; ABDALLA, D. S. P. . Inhibitory activity of single chain variable fragment anti-LDL(-) on the formation of foam cells. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. Anais XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.

9. **CAVALCANTE, M. F.**; KAZUMA, S. M. ; Arias, C. A. D. ; MARQUES, D. V. ; CASTRO, F. G. S. ; RUDNICKI, M. ; FAULIN, T. E. S. ; CESAR, F. A. ; PESSOA JUNIOR, A. ; ABDALLA, D. S. P. . Inhibitory activity of anti-LDL(-) single-chain variable fragment on the formation of foam cells.. In: XV Semana Farmcêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: FCF/USP, 2010. v. 46.

10. Arias, C. A. D. ; MARQUES, D. V. ; KAZUMA, S. M. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; ROSSO, B. ; SANTOS-EBINUMA, V. C. ; MOLINO, J. V. D. ; ABDALLA, D. S. P. ; PESSOA JUNIOR, A. . Comparison of antibody fragment scFv production by Pichia pastoris in bioreactor and shaker. In: XV Semana Farmcêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: FCF/USP, 2010. v. 46.

11. **CAVALCANTE, M. F.**; NOGUEIRA, N. A. P. ; MORAIS, T.M.F. ; SOUSA, D. F. ; FERREIRA, J. M. ; MARTINS, A. R. ; HOLANDA, S. H. N. ; ARRUDA FILHO, A. C. V. ; MELO, C. L. ; ROCHA, M. V. A. P. ; QUEIROZ, M. G. R. . SUMMARY OF URINE PROFILE OF PREGNANTS ATTENDING A PHILANTHROPIC HOSPITAL. In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and laboratory Medicine, 2008, Fortaleza. Clin Chem Lab Med. Berlin New York: Walter de Gruyter, 2008. v. 46. p. 52-52.

12. FIGUEIREDO, J. G. ; FIGUEIREDO, I. S. T. ; TEIXEIRA, C. M. ; PIERDONA, T. M. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; NOGUEIRA, N. A. P. ; PORTO, A. L. F. ; LIMA FILHO, J. L. ; CAVADA, B. S. ; CARNEIRO-LEAO, A. M. A. ; ALENCAR, N. M. N. . Efeito da Lectina de Cratylia floribunda no Tratamento Tópico de Feridas Cutâneas Experimentais em Camundongos.. In: 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto. Anais do 39º Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica Experimental, 2007.

13. ALMEIDA, A. S. ; CAVALCANTE, A. C. C. ; BASTOS, G. M. ; SALES, G. W. P. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; LINS, M. U. D. S. ; NOGUEIRA, N. A. P. ; CAVALCANTE, R. C. M. ; LEMOS, T. L. G. . Efeito do tempo de Exposição na Atividade Antimicrobiana de Óleo Essencial de Protium tenuifolium sobre Staphylococcus aureus.. In: 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005, Fortaleza. Livro de Resumos da 57º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o

Progresso da Ciência., 2005.

14. NOGUEIRA, N. A. P. ; BASTOS, G. M. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; ALMEIDA, A. S. ; SALES, G. W. P. ; CAVALCANTE, R. C. M. ; CAVALCANTE, B. G. B. ; CAVALCANTE, A. C. C. . Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de Staphylococcus aureus isoladas de queijo "colhao" comercializado em Fortaleza - CE. In: I Congresso Regional de Microbiologia Clínica, 2005, João Pessoa. Anais do I Congresso Regional de Microbiologia Clínica, 2005.

15. ALMEIDA, A. S. ; OLIVEIRA, F. S. A. ; SALES, G. W. P. ; ROCHA, L. Q. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; NOGUEIRA, N. A. P. ; FREIRE, R. M. . Presença de Coliformes de Origem Fecal e Staphylococcus aureus em Canres Comercializadas em Fortaleza - CE. In: 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005, Fortaleza. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005.

16. NOGUEIRA, N. A. P. ; BASTOS, G. M. ; SALES, G. W. P. ; CAVALCANTE, A. C. C. ; ALMEIDA, A. S. ; **CAVALCANTE, M. F.** . Contagem de Saphylococcus aureus coagulase-positiva em queijo do tipo coalho.. In: 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2004, Floorianópolis. Anais do 38º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial., 2004.

Apresentações de Trabalho

1. **CAVALCANTE, M. F.**. Efeitos de uma nanoformulação sobre a aterosclerose. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2. **CAVALCANTE, M. F.**; KAZUMA, S. M. ; ADORNE, M. D. ; BENDER, E. A. ; KREMMERER, M. ; BOSS, M. ; NAMGALADZE, D. ; BRUNE, B. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. ; ABDALLA, D. S. P. . Potential therapeutic use of anti-electronegative LDL single chain fragment variable vectorized in nanocapsules on atherosclerosis. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. **CAVALCANTE, M. F.**; KAZUMA, S. M. ; BENDER, E. A. ; ADORNE, M. D. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. ; ABDALLA, D. S. P. . Inhibitory effect of an anti-LDL(-) scFv conjugated to nanoparticles in experimental atherosclerosis. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

4. **CAVALCANTE, M. F.**; KAZUMA, S. M. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. ; BENDER, E. A. ; ADORNE, M. D. ; ABDALLA, D. S. P. . Atheroprotection of anti-LDL(-) scFv conjugated to nanoparticles in experimental atherosclerosis. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. **CAVALCANTE, M. F.**; ABDALLA, D. S. P. . Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

6. KAZUMA, S. M. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; DIAZ, C. A. ; MARQUES, D. V. ; CASTRO, F. G. S. ; RUDNICKI, M. ; FAULIN, T. E. S. ; CESAR, F. A. ; PESSOA JUNIOR, A. ; ABDALLA, D. S. P. . Inhibitory activity of anti-LDL(-) single chain variable fragment on the formation of foam cells. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

7. KAZUMA, S. M. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; DIAZ, C. A. ; MARQUES, D. V. ; CASTRO, F. G. S. ; RUDNICKI, M. ; FAULIN, T. E. S. ; CESAR, F. A. ; PESSOA JUNIOR, A. ; ABDALLA, D. S. P. . Inhbitory acitivty of single chain variable fragment anti-LDL(-) on the formation of foam cell. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

8. **CAVALCANTE, M. F.**; NOGUEIRA, N. A. P. . SUMMARY OF URINE PROFILE OF PREGNANTS ATTENDING A PHILANTHROPIC HOSPITAL. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9. **CAVALCANTE, M. F.**; MARTINS, M. R. ; VERAS, H. N. H. ; NOGUEIRA, N. A. P. ; SANTIAGO, G. M. P. . Potencial Antimicrobiano de Óleos Essenciais e Extratos de Plantas do Nordeste Brasileiro. 2007. (Apresentação de Trabalho/Outra).

10. **CAVALCANTE, M. F.**; OLIVEIRA, F. S. A. ; ROCHA, L. Q. ; SOARES, C. L. ; NOGUEIRA, N. A. P. ; BANDEIRA, M. A. M. . Potencial Antimicrobiano de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais de Plantas do Nordeste Brasileiro. 2006. (Apresentação de Trabalho/Outra).

11. NOGUEIRA, N. A. P. ; ALMEIDA, A. S. ; OLIVEIRA, F. S. A. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; FREIRE, R. M. ; ROCHA, L. Q. . Qualidade Microbiológica da Carne Comercializada em Fortaleza-CE.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

12. OLIVEIRA, F. S. A. ; ROCHA, L. Q. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; ALMEIDA, A. S. ; NOGUEIRA, N. A. P. . Avaliação Microbiológica da Água dos bebedouros dos Campi Porangabussu, Pici e Benfica da Universidade Federal do Ceará.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Outra).

13. **CAVALCANTE, M. F.**; SALES, G. W. P. ; BARROZO, M. B. ; BANDEIRA, M. A. M. ; NOGUEIRA, N. A. P. . Potencial Antimicrobiano de Óleos Essenciais e Extratos de Plantas do Nordeste Brasileiro. 2005. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Demais tipos de produção técnica

1. SAAVEDRA, NICOLÁS ; SAAVEDRA, K. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; KAZUMA, SORAYA M ; CUEVAS, ALEJANDRO ; SILVA, J. C. ; ABDALLA, D.S.P. ; SALAZAR, LUIS A. . Cultivos celulares: herramientas y aplicaciones básicas. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

2. **CAVALCANTE, M. F.**; ABDALLA, D. S. P. ; CUEVAS, A. ; SAAVEDRA, N. ; SALAZAR, LUIS A. . Cultivos celulares como herramienta para la evaluación de compuestos con potencial farmacológico. 2015. (Curso de curta

duração ministrado/Extensão).

Patentes e registros

Patente

A Confirmação do status de um pedido de patentes poderá ser solicitada à Diretoria de Patentes (DIRPA) por meio de uma Certidão de atos relativos aos processos

1. POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. ; ABDALLA, D. S. P. ; BENDER, E. A. . Processo sintético para a produção e uso de nanocápsulas multiparedes complexadas com íons metálicos.. 2011, Brasil.
Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11061936, título: "Processo sintético para a produção e uso de nanocápsulas multiparedes complexadas com íons metálicos." , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 11/10/2011; Depósito PCT: 11/10/2011; Concessão: 19/06/2012. Instituição(ões) financiadora(s): UFRGS, USP.
2. ABDALLA, D. S. P. ; MARANHAO, A. Q. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; BENDER, E. A. ; KAZUMA, S. M. ; ADORNE, M. D. . Composição Farmacêutica Nanométrica e Seus Usos. 2012, Brasil.
Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102012025132, título: "Composição Farmacêutica Nanométrica e Seus Usos" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 02/10/2012; Concessão: 04/06/2013. Instituição(ões) financiadora(s): FAPESP.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 14ª FEBRACE. 14ª FEBRACE. 2016. (Feira).
2. 13ª FEBRACE. 13ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. 2015. (Feira).
3. 17th International Symposium on Atherosclerosis 2015.Potential therapeutic use of anti-electronegative LDL single chain fragment variable vectorized in nanocapsules on atherosclerosis. 2015. (Simpósio).
4. 16th International Biotechnology Symposium.Inhibitory effect of an anti-LDL(-) scFv conjugated to nanoparticles in experimental atherosclerosis. 2014. (Simpósio).
5. Simpósio Internacional em Tecnologias de Imagem para Medicina Translacional. 2014. (Simpósio).
6. XLIX SUPFAB. 2014. (Outra).
7. 81st European Atherosclerosis Society. Atheroprotection of anti-LDL(-) scFv conjugated to nanoparticles in experimental atherosclerosis. 2013. (Congresso).
8. Encontro Nacional de Quantificação em Tomografia por Emissão SPECT e PET. 2013. (Encontro).
9. V Simpósio da Pós-graduação em Análises Clínicas.Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia única anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental. 2013. (Simpósio).
10. 1st Brazil-Canada Workshop on Nanotechnology. 2012. (Outra).
11. IV Simpósio da Pós-graduação em Análises Clínicas. 2012. (Simpósio).
12. III Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas. 2011. (Simpósio).
13. USP Conference - Challenge for Integrating Molecular and System Biology. 2011. (Seminário).
14. II Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas. 2010. (Simpósio).
15. IX Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa. 2010. (Simpósio).
16. Seminário de Eletroforese Capilar. 2010. (Seminário).
17. Técnicas Inovadoras para Concentração de Amostras. 2010. (Seminário).
18. Workshop de Aterosclerose e Biologia Vascular. 2010. (Outra).
19. XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology.Inhibitory activity of single chain variable fragment anti-LDL(-) on the formation of foam cells. 2010. (Encontro).
20. XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - Simposio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas.Inhibitory activity of anti-LDL(-) single-chain variable fragment on the formation of foam cells. 2010. (Simpósio).
21. II Simpósio de Atualização em Cultura Celular e Fermentação Bacteriana. 2009. (Simpósio).

22. 20th International Congress of Clinical Chemistry and laboratory Medicine. SUMMARY OF URINE PROFILE OF PREGNANTS ATTENDING A PHILANTHROPIC HOSPITAL. 2008. (Congresso).
23. Simpósio de Atualização Cinetífica em Sorologia. 2007. (Simpósio).
24. VI Encontro Regional dos Estudantes de Farmácia do Nordeste. 2007. (Encontro).
25. I Simpósio Brasileiro de Farmácia Clínica. 2006. (Simpósio).
26. I Simpósio de Biossegurança do Nordeste. 2006. (Simpósio).
27. XIV Jornada Científica da Santa Casa. 2006. (Outra).
28. I Encontro Maranhense dos Estudantes de Farmácia (EMEFAR).Avaliação Microbiológica da Água dos bebedouros dos Campi Porangabussu, Pici e Benfica da Universidade Federal do Ceará.. 2005. (Encontro).
29. IV Congresso Regional de Análises Clínicas. 2005. (Congresso).
30. IV Copefarma. Qualidade Microbiológica da carne comercializada em Fortaleza-CE.. 2005. (Congresso).
31. II Congresso Regional de Análises Clínicas do Nordeste. 2003. (Congresso).
32. Projeto "Vivendo Medley" para Farmacêuticos. 2003. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. SALAZAR, LUIS A. ; SAAVEDRA, N. ; **CAVALCANTE, M.F.** ; CUEVAS, A. ; ABDALLA, D. S. P. . Cultivos celulares como herramienta para la evaluación de compuestos con potencial farmacológico. 2015. (Outro).
2. **CAVALCANTE, M. F.**. V Simpósio da Pós-graduação em Análises Clínicas. 2013. (Outro).
3. **CAVALCANTE, M. F.**. IV Simpósio da Pós-graduação em Análises Clínicas. 2012. (Outro).
4. **CAVALCANTE, M. F.**. III Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas. 2011. (Outro).
5. NOGUEIRA, N. A. P. ; **CAVALCANTE, M. F.** ; ALBUQUERQUE, A. C. ; FONSECA, F. N. ; LEITE, C. P. ; RODRIGUES FILHO, F. E. ; XAVIER, B. O. ; MENEZES, S. ; SILVA, K. C. . Curso de Atualização em Virologia. 2006. (Outro).