Dirce Sakauchi

Desenvolvimento de um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando anti-soro policlonal produzido em coelho contra a proteína SP-A suína para quantificar SP-A no lavado broncoalveolar humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

.

São Paulo
2008

Dirce Sakauchi

Desenvolvimento de um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando anti-soro policlonal produzido em coelho contra a proteína SP-A suína para quantificar SP-A no lavado broncoalveolar humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Sakauchi, Dirce.
Desenvolvimento de um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando anti-soro policlonal produzido em coelho contra a proteína SP-A suína para quantificar SP-A no lavado broncoalveolar humano / Dirce Sakauchi. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Flávia Saldanha Kubrusly.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produtos animais.

Versão do título para o inglês: Development of an indirect ELISA using porcine pulmonary SP-A polyclonal antibody to measure human pulmonary surfactant protein A concentration on bronchoalveolar lavage.

Descritores: 1. Colectinas pulmonares 2. Marcador de doenças pulmonares 3. SP-A suína 4. SP-A humana 5. Soro.anti SP-A suína 6. Lavado broncoalveolar I. Kubrusly, Flávia Saldanha II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB019/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Dirce Sakauchi.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando anti-soro policlonal produzido em coelho contra a proteína SP-A suína para quantificar SP-A no lavado broncoalveolar humano .

Orientador(a): Flávia Saldanha Kubrusly.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Aos meus pais

Shigeteru "*in memorium*" e Kinu pela dedicação, amor e incentivo.

À toda a minha família

Por todo apoio, estímulo e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly pela orientação, amizade, incentivo e colaboração.

A Dra. Hisako Gondo Higashi pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Isaías Raw pela dedicação à pesquisa.

À Dra. Denise S.P.Q. Horton pelo apoio, amizade, pela ajuda na análise estatística dos ensaios e sugestões.

A Dra. Sally M. A. Prado e Dra. Aryene Góes Trezena pelo apoio e compreensão, tornando possível o término deste trabalho.

Ao Dmitri Iourtov pelo fornecimento do extrato pulmonar suíno pobre em surfactante, proveniente da produção do surfactante pulmonar e pelas sugestões ao trabalho.

À Maria Aparecida Sakauchi pelo constante incentivo, apoio e colaboração.

À Sandra de Cássia Dias pela amizade, paciência e participação na realização deste trabalho.

À Carolina Y. Takano e Camila N. Takano pela valiosa ajuda na elaboração das figuras.

À Lucila R. Veiga pela amizade e apoio.

À Maria José da Silva Leme, Fábio Raiano, José Augusto Ferraz e Andréia Silvério pela participação nos experimentos com os animais.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dra. Roxane M. F. Piazza, Dr. Celso M. Rebello e Dr. Alexander R. Precioso pelas sugestões para a conclusão deste trabalho.

À todos do laboratório de Biotecnologia pela convivência e amizade durante a realização deste trabalho.

À SADIA pelo fornecimento da matéria prima, os pulmões de suínos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

SAKAUCHI, D. **Desenvolvimento de um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando anti-soro policlonal produzido em coelho contra a proteína SP-A suína para quantificar SP-A no lavado broncoalveolar humano**. 2008. 45 f. Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As colectinas pulmonares SP-A e SP-D são marcadores específicos de doenças pulmonares. A determinação destas proteínas por ensaios imunoenzimáticos permite aos clínicos correlacionarem seu papel funcional durante o desenvolvimento do processo patológico baseado nas anormalidades de suas concentrações. Como o lavado broncoalveolar (BAL) é uma amostra que permite estudar as proteínas secretadas pelo epitélio pulmonar em quaisquer circunstâncias, foi proposto o desenvolvimento de um ELISA indireto capaz de detectar SP-A no BAL humano usando um anti-soro policlonal contra SP-A suína produzido em coelho. SP-A suína foi purificada por protocolo que acopla precipitação ácida do extrato pulmonar suíno e cromatografia de afinidade. O anti-soro reagiu com as duas espécies de SP-A testadas: humana e suína. A curva padrão foi otimizada utilizando como calibrador a SP-A purificada de pacientes com artrite reumatóide. A faixa selecionada da curva de calibração foi de 0,312 a 5,0 μg/mL usando a diluição 1:1000 do anticorpo. O limite de detecção da curva foi de 0,625 μg/mL.

Palavras chaves: Colectinas pulmonares, Marcador de doenças pulmonares, SP-A suína, SP-A humana, soro anti-SP-A suína, lavado broncoalveolar humano, ELISA indireto.

ABSTRACT

SAKAUCHI, D. **Development of an indirect ELISA using porcine pulmonary SP-A polyclonal antibody to measure human pulmonary surfactant protein A concentration on bronchoalveolar lavage**. 2008. 45 f. Master thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The lung collectins SP-A and SP-D are specific markers for lung diseases. Determination of amounts of these proteins using polyclonal and monoclonal antibodies on ELISA assays enabled clinicians to predict their role in the course of the lung disease process based on abnormalities on their concentrations. As the bronchoalveolar lavage (BAL) is a sample that permits to study the proteins secreted by the lung epithelium at any conditions, we proposed to develop an indirect ELISA able to detect SP-A in the BAL using polyclonal rabbit antiserum, raised against porcine SP-A. Porcine SP-A was purified by a protocol that includes an acid precipitation of the porcine pulmonary extract before affinity chromatography. The antiserum reacted with the two tested species porcine and human. The calibration curve were optimized, using human SP-A purified from patients with rheumatoid arthritis as human antigen calibrator. The selected calibration curve range was 0.312 to 5.0 μg/mL using the antiboby dilution 1:1.000. The detection limit of the standard curve was 0.625 μg/mL.

Key words: Lung collectins, marker for lung diseases, porcine pulmonary SP-A**,** human pulmonary surfactant protein A, antiserum against porcine SP-A, bronchoalveolar lavage, indirect ELISA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 11
2 OBJETIVOS..... 16
2.1 Geral 16
2.2 Específicos..... 16
2.2.1 Produção dos reagentes para o desenvolvimento do ensaio..... 16
2.2.1.1 Purificação da SP-A suína a partir de metodologia que utilize como matéria prima o extrato pulmonar pobre em surfactante descartado da planta de produção do surfactante pulmonar suíno 16
2.2.1.2 Caracterização da proteína SP-A suína (pureza e identidade) 16
2.2.1.3 Protocolo de imunização dos coelhos para a produção do anti-soro policlonal contra SP-A suína com adjuvante de Freund 16
2.2.1.4 Titulação do anti-soro policlonal produzido em coelho contra SP-A suína 16
2.2.1.5 Caracterização do anti-soro policlonal produzido em coelho contra SP-A suína 16
2.2.2 Desenvolvimento do teste de ELISA indireto utilizando hSP- A para sensibilização das placas e diferentes diluições de pSP-Aab..... 16
2.2.2.1 Otimização da curva de calibração usando como calibrador hSP-A..... 16
2.2.2.2 Definição do limite de detecção da hSP- A frente diluição determinada de pSP-Aab..... 16
2.2.2.3 Determinação da concentração de SP-A em amostras humanas de BAL através do Ensaio de ELISA indireto desenvolvido 16
3 MATERIAL E MÉTODOS 17
3.1 Purificação da SP- A suína a partir do clarificado pulmonar suíno acidificado 17
3.1.1 Obtenção do clarificado pulmonar suíno acidificado 17
3.1.2 Cromatografia de afinidade 17
3.1.2.1 Preparo das colunas 17
3.1.2.2 Aplicação das amostras 18

3.1.2.3 Lavagem e eluição das colunas 18
3.2 Caracterização da SP-A suína purificada 20
3.2.1 Determinação do grau de pureza 20
3.2.2 Determinação da identidade da proteína SP-A suína 20
3.3 Produção de anti-soro policlonal anti- SP-A suína (pSP-Aab)..... 21
3.4 Caracterização do anti-soro policlonal anti- SP-A suína (pSP-Aab)..... 23
3.5 Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA para quantificação de SP-A 23
3.5.1 Titulação do anti-soro policlonal anti-SP-A suína (pSP-Aab)..... 23
3.5.2 Curvas de calibração 24
3.6 Análise estatística 24
3.7 Lavado broncoalveolar humano (BAL) 24
3.7.1 Preparo das amostras 24
3.7.2 “Western blotting” 25
3.8 Métodos analíticos 25
3.8.1 Dosagem de proteínas 25
3.8.1.1 Lowry 25
3.8.1.2 Absorção a 280 nm (A_{280}) 26
3.8.1.3 BCA 26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 27
4.1 Purificação e caracterização da SP-A suína a partir do clarificado pulmonar suíno acidificado 27
4.2 Produção e caracterização de pSP-Aab..... 32
4.3 Curva de calibração do ELISA indireto utilizando o sistema hSP-A/ pSP- Aab 35
4.4 Quantificação de SP-A em amostras humanas de BAL usando pSP-Aab. 39
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 41
REFERÊNCIAS..... 42

1 INTRODUÇÃO

O surfactante pulmonar, uma mistura complexa de lipídios e proteínas, tem sido bastante estudado tanto por seu papel fundamental na redução da tensão superficial na interface ar-líquido do pulmão, como também pela função crítica na defesa imune inata do pulmão do hospedeiro. Tal fato é creditado principalmente às suas proteínas A e D (SP-A e SP-D). Juntas e concomitantemente, podem frustrar resposta inflamatória, inicialmente protetora, mas que fora de controle pode lesar o pulmão e impedir as trocas gasosas. Estas proteínas são produzidas pelos pneumócitos tipo II e pelas células bronquiolares não ciliadas (células Claras). São grandes oligômeros, caracterizados pela presença de um domínio N-terminal semelhante ao colágeno e um domínio C-terminal, globular, de reconhecimento de carboidratos (CRD) do tipo-C (cálcio-dependente). As regiões N-terminais estariam associadas com a manutenção da forma, tamanho e estabilidade das moléculas, as regiões semelhantes ao colágeno com a trimerização das proteínas e as regiões CRDs globulares responderiam pelas ligações dependentes de cálcio. Suas superestruturas são semelhantes à superestrutura da proteína do complemento C1q pertencendo todas estas proteínas a grande família das colectinas. Nesta família, as superestruturas estão envolvidas nos seus diferentes aspectos funcionais (LU et al, 2002). A organização oligomérica de SP-D é do tipo cruciforme (4 trímeros = dodecâmero) enquanto que a de SP-A seria um “buquê” de flores (6 trímeros= octadecâmero) (CROUCH, 1998, MCCORMACK and WHITSETT, 2002, KUROKI et al, 1998, MASON et al, 1998, HOLMSKOV et al, 2003, KISHORE et al, 2006). A natureza oligomérica destas proteínas pode ser comprovada através da detecção das diferentes mobilidades nos géis utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) em condições redutoras e não redutoras. SP-A na sua forma monomérica é uma proteína de 28-36 kDa e SP-D, uma proteína de 43 kDa.

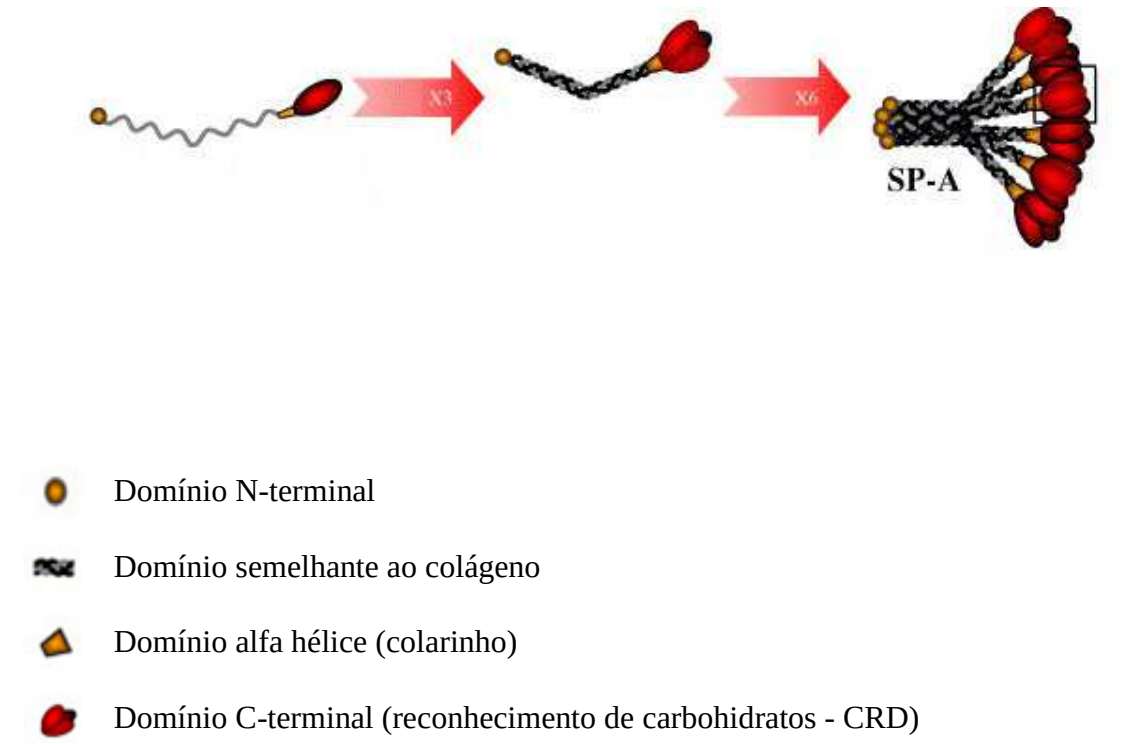

Figura 1 - Superestrutura da proteína SP-A. Apresentação das formas monomérica, trimérica e do "buquê de tulipas" (6X3=18).
FONTE: Figura parcial retirada do trabalho de KISHORE, U. et al, 2006.

As colectinas formam uma classe de proteínas freqüentemente secretadas nos fluidos corporais e cavidades extracelulares (LU et al, 2002, PALANIYAR et al, 2002), sendo as proteínas do sistema surfactante SP-A e SP-D, junto com a proteína do sangue que se liga ao açúcar manose, MBL, os seus membros mais estudados. Elas participam da resposta imune inata através da opsonização direta, neutralização e aglutinação dos microrganismos patogênicos via seus CRDs. Estas atividades limitam a infecção e modulam a resposta imune específica subseqüente (HOLMSKOV et al, 2003, KISHORE et al, 2006).

SP-A foi inicialmente identificada no surfactante pulmonar, como um componente relativamente hidrofílico que também aparecia no líquido amniótico, enquanto SP-D foi primeiramente identificada no meio de cultura do cultivo primário dos pneumócitos tipo II. Desde então já foi comprovada a expressão destas proteínas em outros tecidos não pulmonares tais como próstata, timo, mucosa intestinal, trompa de Eustáquio ou tuba auditiva, ouvido médio, seios paranasais, mesotélio e líquido sinovial. A evidente expressão destas proteínas dentro e fora do âmbito pulmonar aumentou também a importância da pesquisa da função delas nestes sítios (KHUBCHANDANI and SNYDER, 2001, KISHORE et al, 2006).

O monitoramento das concentrações destas proteínas num número considerável de secreções e fluidos biológicos dentro e fora do âmbito pulmonar também tem despertado o interesse de inúmeros autores (KUROKI et al, 1998, MASON et al, 1998, GREEN et al, 2002, KISHORE et al, 2006). Estes estudos visam correlacionar anormalidades nas concentrações destas proteínas com diferentes estados patológicos. No âmbito pulmonar, as colectinas SP-A e SP-D estão sendo consideradas e descritas como prováveis marcadores para diferentes doenças pulmonares após sua detecção nos lavados broncoalveolares (BAL), aspirados traqueais, escarro e efusões pleurais.

Para SP-A, alguns exemplos importantes: em gestações, nas quais, são detectadas baixas concentrações de SP-A no líquido amniótico, observa-se o aumento do risco da criança nascer prematura e desenvolver a síndrome do desconforto respiratório (SDR). Em concordância com este fato, baixas concentrações de SP-A são detectadas nos aspirados traqueais obtidos de crianças

com SDR. Um decréscimo significativo da concentração de SP-A foi observado nos BAL de pacientes adultos com a síndrome do desconforto respiratório agudo em adultos (SARA). As concentrações de SP-A nos BAL de pacientes com fibrose cística (CF) e com infecção nas vias respiratórias inferiores são maiores do que as encontradas em pacientes com CF e sem infecção, o aumento pode ocorrer em resposta à infecção. Entretanto em pacientes com pneumonia bacteriana ou viral foi observado decréscimo das concentrações de SP-A nos BAL destes indivíduos (KHUBCHANDANI and SNYDER, 2001).

Entre as amostras mais estudadas, o BAL tem sido amplamente empregado juntamente com o sangue (soro) para determinar as concentrações das proteínas do surfactante (DOYLE et al, 1997, KUROKI et al, 1998, MASON et al, 1998, GREENE et al, 1999, BERSTEN et al, 2001, KHUBCHANDANI & SNYDER, 2001, GREENE et al, 2002, HOLMSKOV et al, 2003, EISNER et al, 2003, BETSUYAKU et al, 2004, AL-SAMI et al, 2005, KISHORE et al, 2006, ERPENBECK et al, 2006).

Em BAL de pacientes portadores da doença pulmonar conhecida como proteinose alveolar (PAP), caracterizada pelo acúmulo de grandes quantidades de surfactante dentro dos alvéolos (ROSEN et al, 1958), quando os sobrenadantes destes lavados foram analisados após centrifugação de baixa velocidade, tanto as concentrações de SP-A quanto às de SP-D estavam significantemente elevadas bem como os fosfolipídios do surfactante. As concentrações de SP-A estavam dez vezes mais altas se comparadas com os voluntários saudáveis e os valores obtidos foram 39,3 $\pm$12,5 μg/mL versus 3,5 $\pm$1,1 μg/mL (KUROKI et al, 1998).

McCormack e colaboradores (1995) concluíram num estudo controlado com duração de 5 anos em 44 pacientes com fibrose idiopática cística (IPF) e em 33 voluntários normais que a determinação de SP-A no BAL não seria somente um marcador para diagnóstico, mas também seria um marcador bioquímico que poderia predizer até sobrevida. Neste estudo, os pacientes que sobreviveram ao diagnóstico e continuaram no estudo, apresentaram valores da relação SP-A /fosfolipídios acima da média de todos os pacientes com IPF (68 versus 30%).

Os métodos imunoquímicos que medem as proteínas do surfactante no lavado e em outros fluidos são principalmente variações de ensaios

imunoenzimáticos do tipo ELISA, em sua maioria empregando dois diferentes anticorpos monoclonais (variante sanduíche). Poucos ensaios foram descritos utilizando anticorpos policlonais em quaisquer das variantes (sanduíche ou indireto) (BERSTEN et al, 2001, STRONG et al, 2002, AWASTHI et al, 2004, PHELPS et al, 2004).

As concentrações de SP-A e SP-D determinadas nestes fluidos (soro e BAL) de indivíduos saudáveis variam de acordo com o ensaio empregado, e até o momento não existe um consenso com relação aos valores normais das duas colectinas tanto no soro quanto no lavado (HOLMSKOV et al, 2003, EISNER et al, 2003, ERPENBECK et al, 2006). Especificamente para a determinação de SP-A, os ensaios de ELISA têm empregado anticorpos monoclonais, isto pode levar a determinação de concentrações subestimadas pela remoção ou destruição de epítopos específicos por proteólise (PHELPS et al, 2004).

Neste trabalho, descreveremos a produção de reagentes para o desenvolvimento de um teste de ELISA indireto, capaz de determinar a concentração da proteína SP-A humana no BAL. Estes reagentes são a proteína SP-A purificada de pulmão de suínos (**pSP-A**) obtida por modificação de protocolo anteriormente descrito (KUBRUSLY et al, 2004) e um anti-soro policlonal produzido em coelho contra esta proteína (**pSP-Aab**) e capaz de reação cruzada com a proteína SP-A humana purificada e obtida de pacientes portadores de artrite reumatóide (hSP-A).

O intuito do nosso trabalho é futuramente garantir acesso aos reagentes que poderão compor um possível kit ELISA que poderá ser usado em testes pré-clínicos e clínicos com a proposta de entender e correlacionar as concentrações de SP-A encontradas no BAL de algumas condições patológicas específicas do pulmão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Desenvolver um ensaio de ELISA capaz de determinar as concentrações da proteína SP-A humana (hSP-A) no lavado broncoalveolar (BAL) de indivíduos saudáveis ou portadores de alguma patologia pulmonar utilizando um anti-soro policlonal (pSP-Aab) produzido em coelho a partir da proteína SP-A suína purificada.

2.2 Específicos:

2.2.1 Produção dos reagentes para o desenvolvimento do ensaio

2.2.1.1 Purificação da SP-A suína a partir de metodologia que utilize como matéria prima o extrato pulmonar pobre em surfactante descartado da planta de produção do surfactante pulmonar suíno,

2.2.1.2 Caracterização da proteína SP-A suína (pureza e identidade),

2.2.1.3 Protocolo de imunização dos coelhos para a produção do anti-soro policlonal contra SP-A suína com adjuvante de Freund,

2.2.1.4 Titulação do anti-soro policlonal produzido em coelho contra SP-A suína,

2.2.1.5 Caracterização do anti-soro policlonal produzido em coelho contra SP-A suína.

2.2.2 Desenvolvimento do teste de ELISA indireto utilizando hSP-A para sensibilização das placas e diferentes diluições de pSP-Aab

2.2.2.1 Otimização da curva de calibração usando como calibrador hSP-A,

2.2.2.2 Definição do limite de detecção da hSP-A frente diluição determinada de pSP-Aab,

2.2.2.3 Determinação da concentração de SP-A em amostras humanas de BAL através do Ensaio de ELISA indireto desenvolvido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Purificação da SP-A suína a partir do clarificado pulmonar suíno acidificado

3.1.1 Obtenção do clarificado pulmonar suíno acidificado

O extrato pulmonar suíno pobre em surfactante obtido a partir de uma etapa de produção do surfactante pulmonar suíno (KUBRUSLY et al, 2004) foi utilizado como matéria prima para a obtenção do clarificado pulmonar suíno acidificado. Para tanto, o extrato pulmonar suíno foi precipitado com ácido (pH 4,0-5,0), homogeneizado e mantido a 4º C overnight. Após esse período, o material foi centrifugado a 1000 g a 4º C por 20 minutos e o pellet foi descartado. O sobrenadante obtido (pH 5,0) teve seu pH ajustado para 7,0 com NaOH 1,0 M e o material foi novamente centrifugado a 1000 g a 4º C durante 20 minutos. Após esta última centrifugação, o sobrenadante obtido foi denominado clarificado pulmonar suíno acidificado e utilizado na etapa seguinte do processo de purificação da SP-A suína.

3.1.2 Cromatografia de afinidade

Foram utilizadas colunas pré-empacotadas HiTrap Blue HP (5 ml) (Amersham Biosciences) e colunas manualmente empacotadas no laboratório com 3 ml de resina Blue Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia) em seringas de 5 ml. As colunas pré-empacotadas foram utilizadas acopladas ao sistema RediFrac System conectado a uma bomba PUMP P-50 (Amersham Biosciences).

3.1.2.1 Preparo das colunas

Ambas as colunas pré-empacotadas e empacotadas foram lavadas com água destilada para retirada de solução preservativa, e equilibradas com 4 volumes da coluna (4VC) com solução contendo 10 mM NaCl e 5 mM $CaCl_2$.

3.1.2.2 Aplicação das amostras

O volume de 50 mL de clarificado pulmonar suíno acidificado foi aplicado na coluna pré-empacotada HiTrap Blue HP (5mL) acoplada ao sistema RediFrac System conectado a uma bomba PUMP P-50 (Amersham Biosciences), com fluxo de 2mL/minuto e o material não adsorvido foi denominado “flow through”. O volume de 10 mL de clarificado pulmonar suíno acidificado foi aplicado na coluna de Blue Sepharose 6 Fast Flow manualmente empacotada (3 ml) utilizando uma bomba Pharmacia LKB-Pump P-1.

3.1.2.3 Lavagem e eluição das colunas

As colunas pré-empacotadas e empacotadas foram lavadas com 4 VC com solução contendo 10 mM NaCl e 5 mM $CaCl_2$.

As colunas empacotadas foram eluídas com solução de cloreto de sódio em três diferentes concentrações: 0,2; 0,5 e 1,0 M. Para cada concentração de cloreto de sódio foi coletada uma fração de 3 mL. As frações coletadas foram mantidas congeladas a -20º C até o momento de uso para sua caracterização.

As colunas pré-empacotadas foram eluídas com solução de cloreto de sódio em duas diferentes concentrações: 0,2 e 1,0 M NaCl. O fluxo da eluição foi de 2mL/minuto e os picos foram registrados a 280 nm. As frações foram coletadas conforme o aparecimento dos picos no cromatograma (neste caso registrado graficamente). As frações coletadas foram mantidas congeladas a -20º C até o momento de uso para sua caracterização. Após a realização e análise dos resultados de alguns ensaios foram utilizadas apenas as concentrações de 0,2 e 1,0 M NaCl para a eluição. Após o término dos processos as colunas pré-empacotadas e empacotadas foram lavadas com água destilada e mantidas em solução de etanol 20% a 4º C.

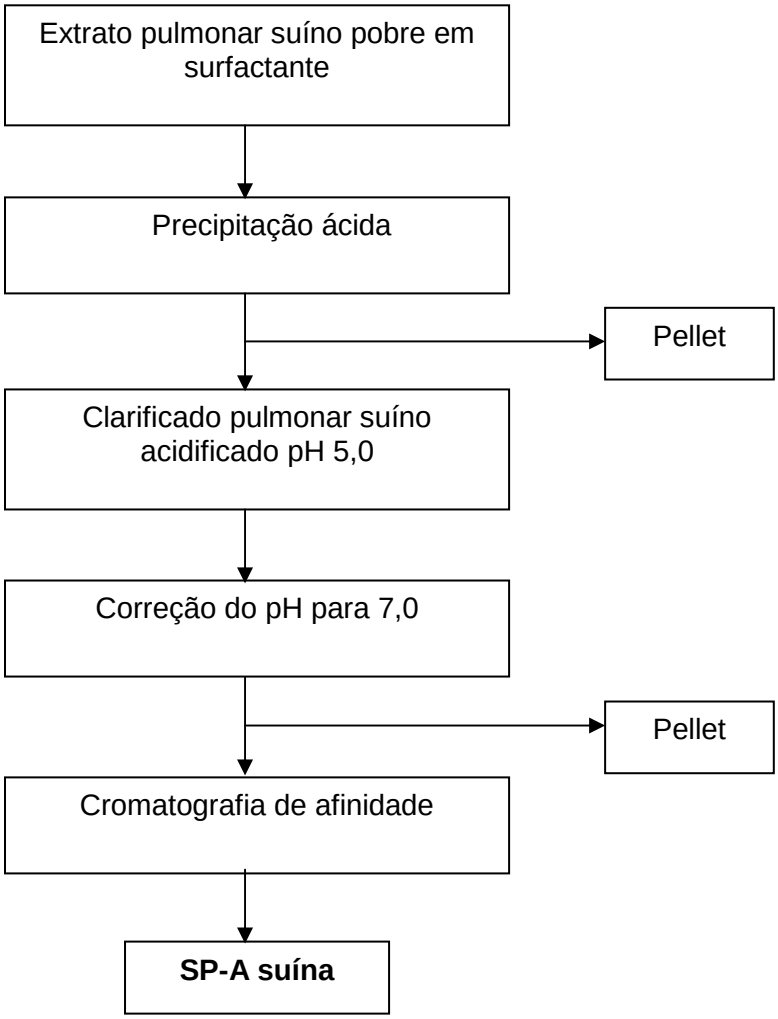

Figura 2 - Processo de purificação de SP-A suína, a partir do extrato pulmonar suíno pobre em surfactante.

3.2 Caracterização da SP-A suína purificada

3.2.1 Determinação do grau de pureza

A SP-A suína obtida da cromatografia de afinidade foi analisada em relação ao grau de pureza pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), descrita por Laemmli (1970). A concentração do gel de separação utilizada foi de 12,5%. As amostras foram diluídas em tampão de amostra contendo 0.0625 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% SDS, 0,02% azul de bromofenol, 20% glicerol e 2% β-mercaptoetanol, sob condição redutora, e foram aquecidas em banho-maria a 100 ºC durante 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada na presença de tampão de corrida contendo 25 mM Tris/HCl, 0,1% SDS, 192 mM glicina pH 8,3 a 120V por 100 minutos. Após a corrida, o gel foi corado pelos métodos de coloração de prata (BLUM et al., 1987) ou com Coomassie Blue. O padrão molecular utilizado apresenta as massas de 97/ 66/ 45/ 30/ 20,1 e 14,4 kDa (Low marker “LM” Amersham Biosciences).

3.2.2 Determinação da identidade da proteína SP-A suína

A identidade da proteína SP-A suína purificada foi analisada pela técnica de Western blotting com a utilização de anti-soros policlonais obtidos para esta finalidade. Para a realização deste ensaio, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5% em condições redutoras como já mencionado no item 3.2.1. Posteriormente as proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) Hybond-P Pharmacia, previamente tratadas por 10 segundos em metanol, 5 minutos em água e 10 minutos em tampão de transferência. Os géis foram colocados individualmente sobre as membranas de PVDF envoltas por folhas de papel de filtro, embebidas em tampão de transferência contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 15% metanol, pH 8,3. As transferências foram realizadas a 290 mA por 100 minutos em um sistema de transferência (Amersham Biosciences). A seguir, as membranas foram cortadas e coradas com solução de Ponceau, para verificação da eficiência da transferência e identificação das bandas do padrão de massas moleculares correspondentes

a 97/ 66/ 45/ 30/ 20,1 e 14,4 kDa e então bloqueadas em solução PBS pH 7,4 contendo 10% soro fetal bovino, durante 12-16 horas a 4º C. Após 3 lavagens seqüenciais, de 10 minutos cada, com PBS pH 7,4 e 0,05% Tween 20 (PBST), as membranas foram incubadas com anti-soros policlonais: anti-SP-A suína (**pSP-Aab)**, anti-SP-A humana e anti-albumina bovina diluídos em PBS pH 7,4 com 0,5% BSA por 4 horas, sob agitação à temperatura ambiente. O anti-soro policlonal anti-SP-A suína (**pSP-Aab)** utilizado neste ensaio está descrito no item 3.2.2.1. O anti-soro policlonal anti-SP-A humana produzido em coelhos foi gentilmente cedido pela Dra. Roxane M. F. Piazza do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. O anti-soro policlonal anti-albumina bovina foi comercialmente adquirido (B-1520, Sigma). Após 3 ciclos de lavagem de 10 minutos em PBST, as membranas foram incubadas com conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma) diluído na proporção 1/10.000 com PBS pH 7,4 contendo 0,5% BSA por 2 horas, sob agitação e a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram lavadas três vezes durante 10 minutos e reveladas com substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) (1mg/mL); PBS pH 7,4 e 0,11% H_2O_2 30% até o aparecimento de bandas.

3.3 Produção de anti-soro policlonal anti-SP-A suína (pSP-Aab)

Para esta produção, coelhos albinos da raça Nova Zelândia, fêmeas, pesando aproximadamente 2 Kg foram injetados com 100 μg de SP-A suína purificada (1mg/mL), misturados com 200 μL de adjuvante de Freund completo (Sigma), por via intramuscular no membro posterior do animal e em dois diferentes pontos de inoculação. Após oito dias da primeira inoculação foi realizada uma nova injeção com 150 μg de SP-A suína (1mg/mL), misturados com 200 μL de adjuvante de Freund incompleto (Sigma) seguindo o mesmo procedimento. As sangrias foram realizadas através da veia marginal da orelha no dia zero e por punção cardíaca do animal após 30 dias da primeira inoculação. O sangue coletado e processado em tubos com ativador de coágulo e gel separador (Greiner Bio-one) foram centrifugados a 500 g por 20 minutos e os soros obtidos foram estocados a -20º C até o momento da sua utilização.

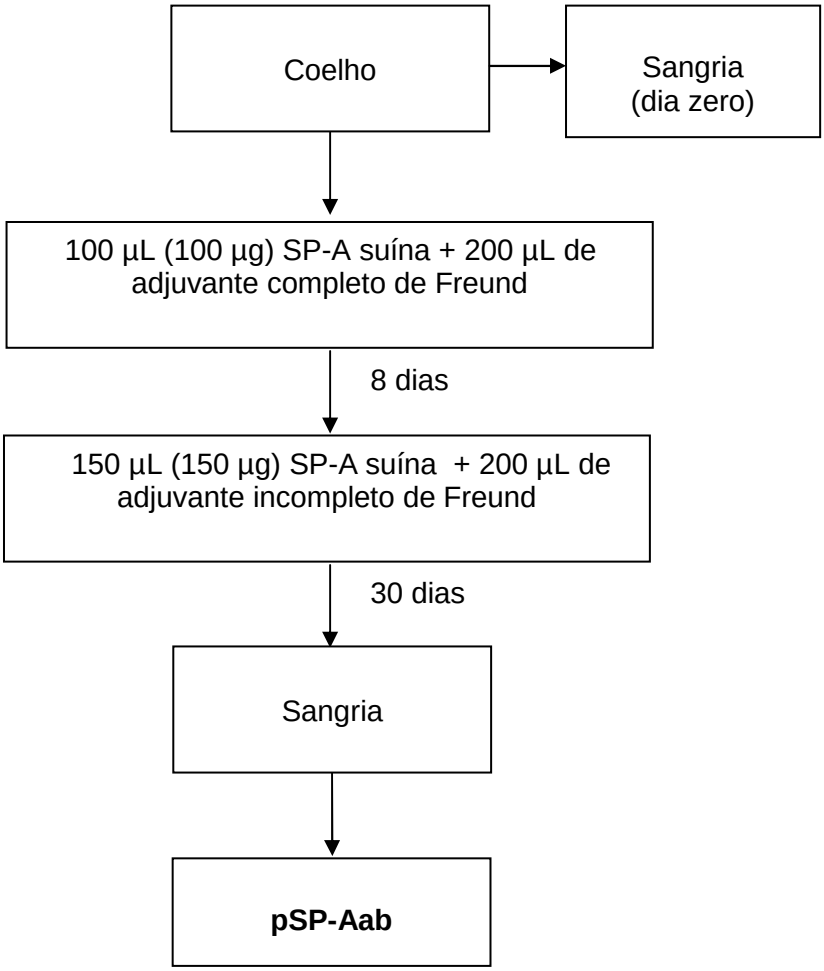

Figura 3 - Esquema do protocolo de imunização de coelhos com a proteína SP-A suína para produção de anti-soro policlonal. Produção de pSP-Aab.

3.4 Caracterização do anti-soro policlonal anti-SP-A suína (pSP-Aab)

A especificidade de **pSP-Aab** foi testada por Western blotting frente diferentes proteínas. As proteínas SP-A suína (8μg) (3.1), SP-A humana obtida de pacientes portadores de artrite reumatóide, (8μg), gentilmente cedida pela Dra. Roxane M. F. Piazza do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, antígeno de superfície do vírus da hepatite B recombinante, (rHbsAg), (8μg), gentilmente cedido pela Dra. Cosue Miyaki do Laboratório de Produção da Vacina contra Hepatite B do Instituto Butantan e albumina bovina sérica (BSA) (8μg) de origem comercial foram separadas por eletroforese e transferidas segundo metodologia descrita nos ítens 3.2.1 e 3.2.2, e então incubadas com **pSP-Aab** nas diluições de 1:250 e 1:500 antes da segunda incubação com conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase e revelação com DAB.

3.5 Ensaio imunoenzimático do tipo ELISA para quantificação de SP-A

3.5.1 Titulação do anti-soro policlonal anti-SP-A suína (pSP-Aab)

O título de **pSP-Aab** foi determinado por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA indireto. Microplacas de 96 cavidades de fundo plano (Corning ®) foram sensibilizadas com diferentes concentrações das proteínas SP-A suína (3.1) e SP-A humana (3.4) (50 μL /cavidade) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 por 12-16 horas a 4º C. Após sensibilização, as placas foram lavadas três vezes, com PBS pH 7,4 contendo 0,05% Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 100 μL de PBS pH 7,4 com 10% de soro fetal bovino durante 5 horas à temperatura ambiente. Após bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com PBST e 50 μL das diferentes diluições de **pSP-Aab** em PBST foram adicionadas aos orifícios da placas e estas foram incubadas por 12-16 horas a 4º C. Após três novas lavagens das placas, foram adicionados 50 μL/cavidade do conjugado anti IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma Chemical CO®) diluído em PBST na proporção 1/20.000 e as placas incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de 50 μL de tampão substrato, O-phenylenediamine

(OPD Sigma Chemical CO®) e peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico a 4,5 M e as leituras das densidades ópticas foram feitas em leitor de ELISA (Labsystems, Multiskan EX) a 492 nm.

3.5.2 Curvas de calibração

A faixa de detecção de proteína de 0 a 5µg/mL foi selecionada para a validação da curva de calibração usando SP-A humana como calibrador e pSP-Aab nas diluições de 1:1000 e 1:3000. Para avaliação da reprodutibilidade do teste, cada concentração foi repetida quatro vezes e as densidades ópticas (OD) submetidas à análise estatística (reprodutibilidade intrateste) e três experimentos em momentos diferentes foram realizados e as densidades ópticas (OD) obtidas foram comparadas com as anteriores e analisadas estatisticamente (reprodutibilidade interteste).

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram feitas usando o programa Prisma (Graphpad, San Diego, Califórnia). O valor $p<0,05$ foi considerado significativo. Foram realizadas análises de comparação de médias, análise de variância e regressão.

3.7 Lavado broncoalveolar humano (BAL)

3.7.1 Preparo das amostras

Três amostras de lavados broncoalveolares humanos (BAL) com volumes aproximados de 1,0 - 1,5 mL por amostra, gentilmente cedidas pelo Dr. Alexander Roberto Precioso foram processadas. As amostras de lavados broncoalveolares, imediatamente após a coleta, foram trazidas para o laboratório e processadas. As amostras foram centrifugadas a 200 g a 5º C por 20 minutos para retirada de debris celulares e os sobrenadantes coletados foram então centrifugados a 14.000 g a

5º C por 30 minutos para retirada do muco. Após esta centrifugação, os novos sobrenadantes foram separados e estocados a -20º C até o momento de uso. A concentração total de proteínas de cada amostra e do “pool” das 3 amostras (100 µL de cada amostra) foram determinadas pelo método de BCA.

3.7.2 “Western blotting”

As amostras dos lavados broncoalveolares foram submetidas ao ensaio imunoenzimático de Western blotting, para detectar a presença de SP-A na amostra referente ao “pool” dos 3 lavados (20 µg) após incubação com anti-soros anti-SP-A suína (pSP-Aab), anti-SP-A humana e anti-albumina. Todos os anti-soros foram utilizados na diluição 1:500. O procedimento de ensaio está descrito no item 3.2.2

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Dosagem de proteínas

Para a determinação das concentrações protéicas durante os ensaios de purificação e caracterização foram utilizados os métodos de:

3.8.1.1 Lowry

As concentrações protéicas das amostras foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (LOWRY et al,1951). No ensaio o volume de 200 µL de amostra foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente com 2,0 mL de reativo de Folin. A seguir foi acrescentado 200 µL de reagente Folin-Ciocalteau no tubo de reação. Após agitação o tubo foi mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Albumina bovina (BSA-Sigma) foi utilizada para construção da curva padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 750 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 100 Amersham Pharmacia Biotech).

3.8.1.2 Absorção a 280 nm (A_{280})

Leitura direta em espectrofotômetro da concentração total de proteína. Aonde 1 unidade de absorbância = 1mg/mL (DEUTSCHER, 1990).

3.8.1.3 BCA

Também para dosagem de proteína total foi utilizado o Kit “BCA - Protein assay kit” (PIERCE) segundo as instruções do fabricante para microensaio que detecta de 5 a 250 µg/ml de proteína total. Foram pipetados 25 µL da amostra em teste ou do padrão (solução de BSA) nos respectivos poços, a seguir foi adicionado 200 µL da mistura do reagente A e B, sendo 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B. A leitura foi feita a 570 nm utilizando um leitor de placas Multiskan EX (Labsystens Uniscience). As concentrações das amostras foram obtidas com base na curva padrão de BSA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação e caracterização da SP-A suína a partir do clarificado pulmonar suíno acidificado

A **Figura 2** já apresentada no item 3.1 do Material e Métodos desta dissertação descreve o esquema para purificação da proteína SP-A suína. A metodologia atual foi modificada de outro esquema para purificação desta proteína também utilizando o extrato pulmonar pobre em surfactante descartado da planta de produção do surfactante pulmonar suíno produzido no Instituto Butantan. O novo protocolo é baseado na precipitação ácida do extrato pulmonar pobre em surfactante antes da separação por cromatografia de afinidade usando a coluna Blue Sepharose, que apresenta o corante Cibacron Blue F-3-GA conjugado com Sepharose. O carregamento da coluna com plasma humano total resulta na remoção de aproximadamente 98% de albumina (TRAVIS et al, 1976). No esquema atual o rendimento da proteína purificada foi de 810 mg por kilograma de pulmão suíno, sendo superior ao anteriormente descrito (KUBRUSLY et al, 2004). A SP-A suína obtida por esta metodologia simplificada apresenta também apenas bandas ao redor de 30 e ao redor de 60 kDa (**figura 4, canaleta 4**) correspondente aos monômeros e dímeros da proteína já anteriormente descritos e referenciados (VAN IWAARDEN et al, 1995, SUWABE et al, 1996, MCCORMARCK, 1998, STRONG et al, 1998, FLOROS, 2001, KUBRUSLY et al, 2004). A fração 2 (**figura 4, canaleta 5**) já apresenta o principal contaminante albumina. Se necessário esta fração pode ser novamente carregada na coluna para recuperação de SP-A após diálise da fração. O anti-soro policlonal anti-SP-A humana (1:250, 1:500) reconheceu a proteína SP-A suína (**figura 5 A, canaleta 5** e **figura 5 B, canaleta 1**) e não reconheceu as proteínas rHbsAg (**figura 5 A, canaleta 3**) e albumina (**figura 5 B, canaleta 3**). A SP-A humana (**figura 6, canaleta 3**) e a SP-A suína (**figura 6, canaleta 4**) foram pobremente reconhecidas pelo soro policlonal anti-albumina. A SP-A suína pura e identificada (fração 1) foi então utilizada para a imunização dos coelhos.

A reatividade cruzada entre as espécies humana e suína com relação à proteína SP-A já tinha sido anteriormente observada pelo grupo (KUBRUSLY et al, 2004). Um anti-soro policlonal comercial produzido em cabra contra um peptídeo sintético correspondente aos aminoácidos da região terminal da proteína SP-A de origem humana reconheceu a SP-A suína purificada pelo outro protocolo. No descritivo deste anti-soro fornecido pelo produtor estava descrito que ele também reconheceria a SP-A de rato e a de camundongo. A reatividade cruzada entre as proteínas SP-A de diferentes espécies vem sendo observada desde trabalhos pioneiros de determinação da composição protéica do surfactante (WRIGHT et al, 1984).

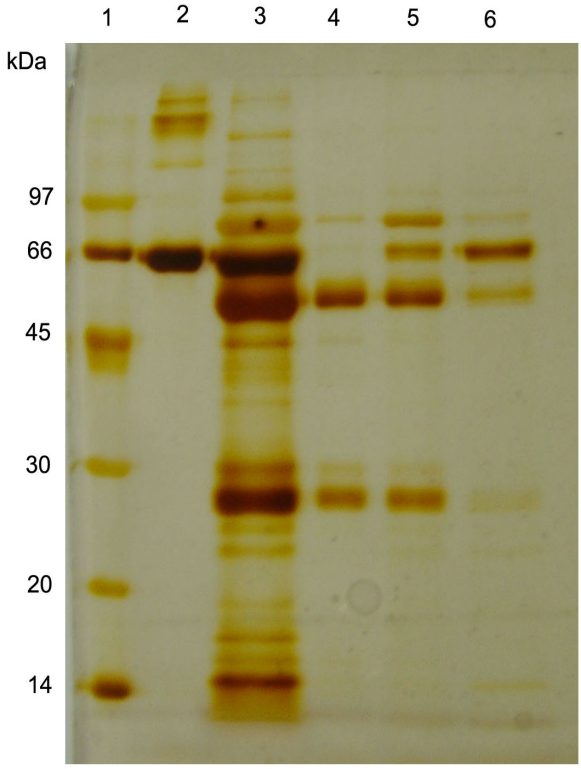

Figura 4 - Caracterização da SP-A suína. Perfis eletroforéticos da etapa de cromatografia de afinidade da purificação de SP- A suína (SDS - PAGE 12,5%) Canaletas **1**- Padrão de massas moleculares (97 a 14 kDa) (5µL), **2**- BSA (6µL), **3-** Clarificado pulmonar suíno acidificado (90µg), **4**- **SP-A suína pura** (fração 1) (10µg), **5**- Fração 2 (16,6µg), **6**-Fração 3 (8,33µg).

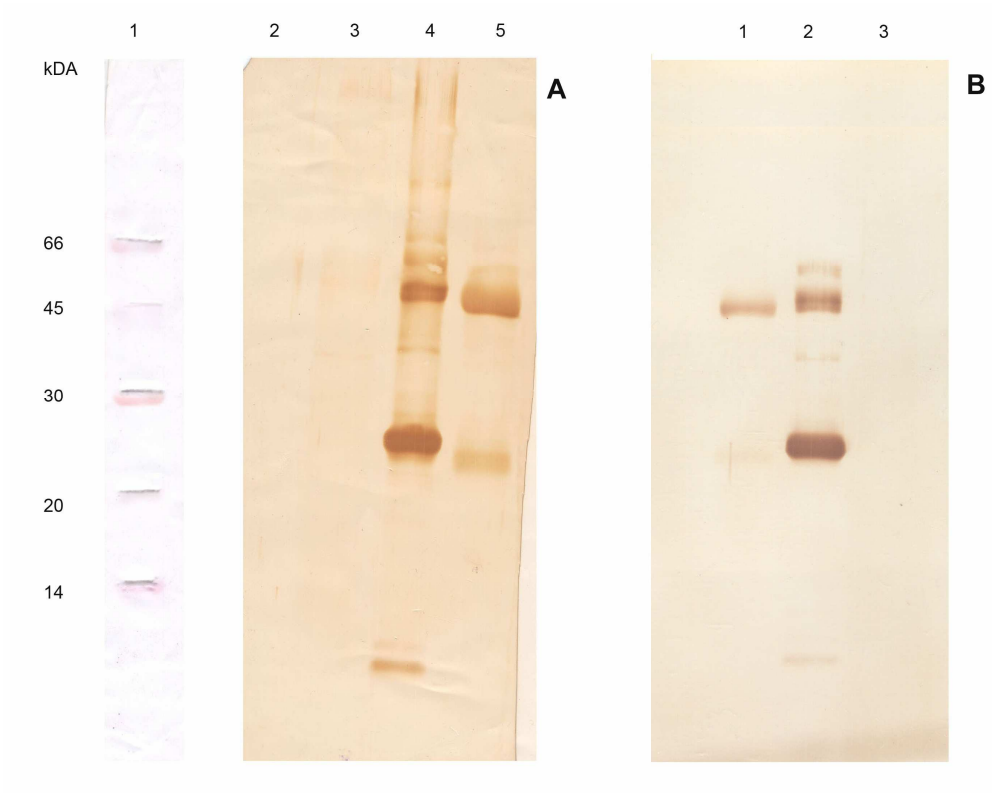

Figura 5- Caracterização da SP-A suína por Western blotting - Após a separação por eletroforese as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com anti-soro policlonal anti-SP-A humana nas diluições **1:250 (A)** e **1:500 (B)** e seguido de incubação com anticorpo de coelho conjugado com peroxidase e revelação com DAB.**(A)** Canaletas:**1**-Padrão de massas moleculares moleculares (97 a 14 kDa), **2** - Ø, **3** - Antígeno de superfície do vírus contra Hepatite B (rHbsAg) (8µg), **4** - SP-A humana (8µg), **5**- SP-A suína (8µg). **(B) 1-** SP-A suína (8µg), **2**- SP-A humana (8µg), **3**- Albumina bovina (8µg).

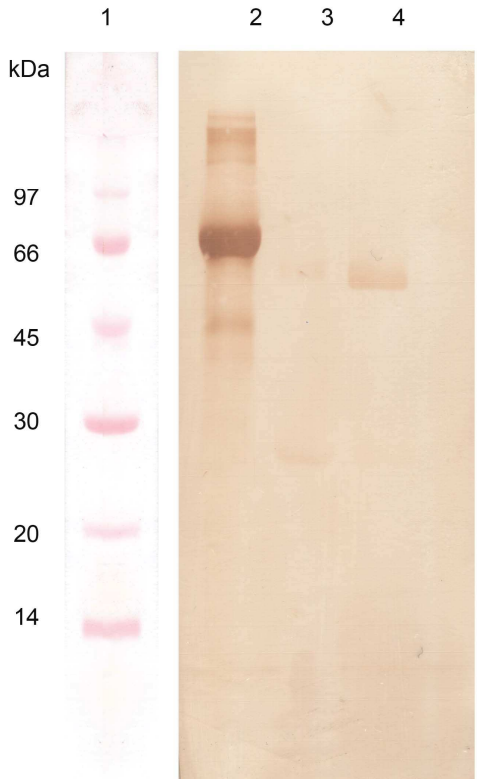

Figura 6- Caracterização da SP-A suína por Western blotting – Após a separação por eletroforese as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com anti-soro policlonal anti-albumina bovina na diluição **1:500,** seguido de incubação com anticorpo de coelho conjugado com peroxidase e revelação com DAB. Canaletas: **1**- Padrão de massas moleculares (97 a 14 kDa), **2**- Albumina bovina (8µg), **3** - SP-A humana (8µg), **4** -SP-A suína(8µg).

4.2 Produção e caracterização de pSP-Aab

A **figura 3** do item 3.3 do Material e Métodos desta dissertação representa o esquema do protocolo de imunização dos coelhos usado para a produção do anti-soro policlonal contra SP-A suína (pSP-Aab) com adjuvante de Freund. Os resultados das análises imunoenzimáticas ELISA (**figura 7**) e Western blotting (**figura 8**) mostraram que o esquema de imunização proposto foi adequado para a produção de anticorpo contra a proteína SP-A suína. A titulação e a especificidade do anti-soro foram determinadas por elas. Foram observados valores de densidades ópticas acima de 1,5 inclusive para a diluição 1: 20.000, que estariam relacionados com altos níveis de anticorpos específicos, quando o soro foi testado contra a concentração de 20 µg/mL de SP-A suína que tinha sido utilizada para a sensibilização das placas (**figura 7**). Posteriormente outros experimentos foram feitos e a diluição 1: 30.000 de pSP-Aab foi capaz de detectar até 8 ng/ml de SP-A suína numa curva de calibração na faixa de 4 - 250 ng/ml, ainda com valores de densidades ópticas ao redor de 1,0. O anti-soro pSP-Aab reconheceu a hSP-A (**figura 8 A, canaleta 3**, **figura 8 B, canaleta 1**) e não reconheceu a albumina bovina (**figura 8 B, canaleta 3**) ou o antígeno rHbsAg (**figura 8 A, canaleta 2**). Portanto, pSp-Aab poderia ser utilizado na fase seguinte de desenvolvimento do ensaio para detectar SP-A no BAL humano.

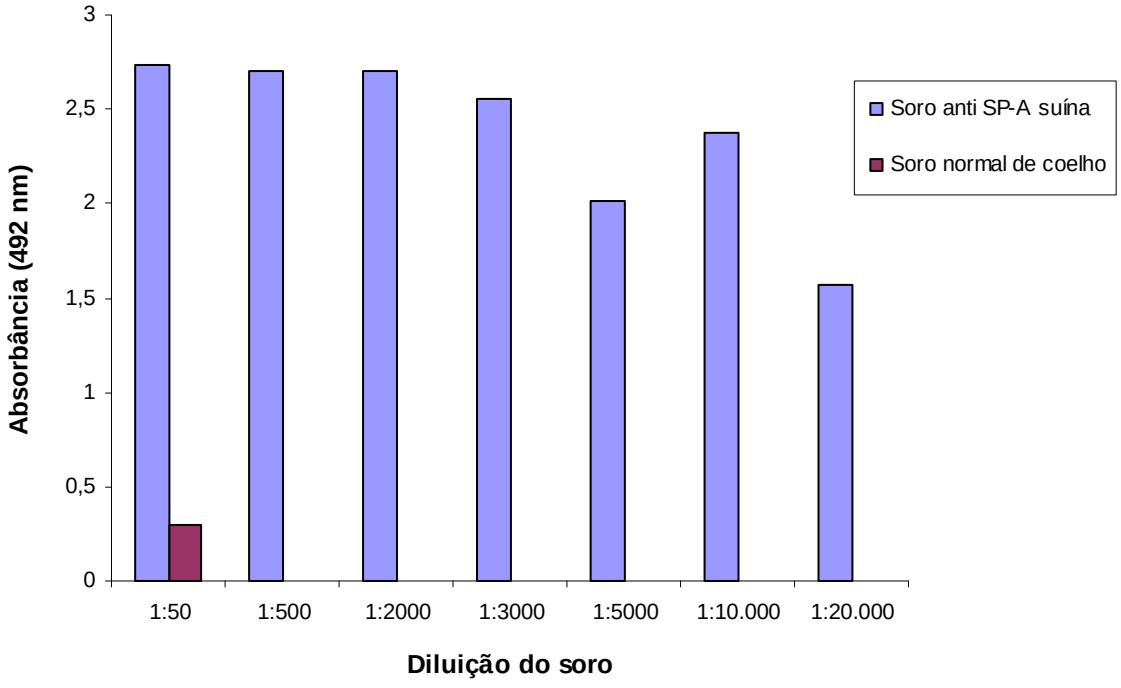

Figura 7 - Titulação do anti- soro policlonal produzido em coelho contra SP-A suína (pSP-Aab) por ELISA utilizando microplacas sensibilizadas com SP-A suína na concentração de 20 µg/mL. A diluição 1:50 de soro normal de coelho foi usada como controle.

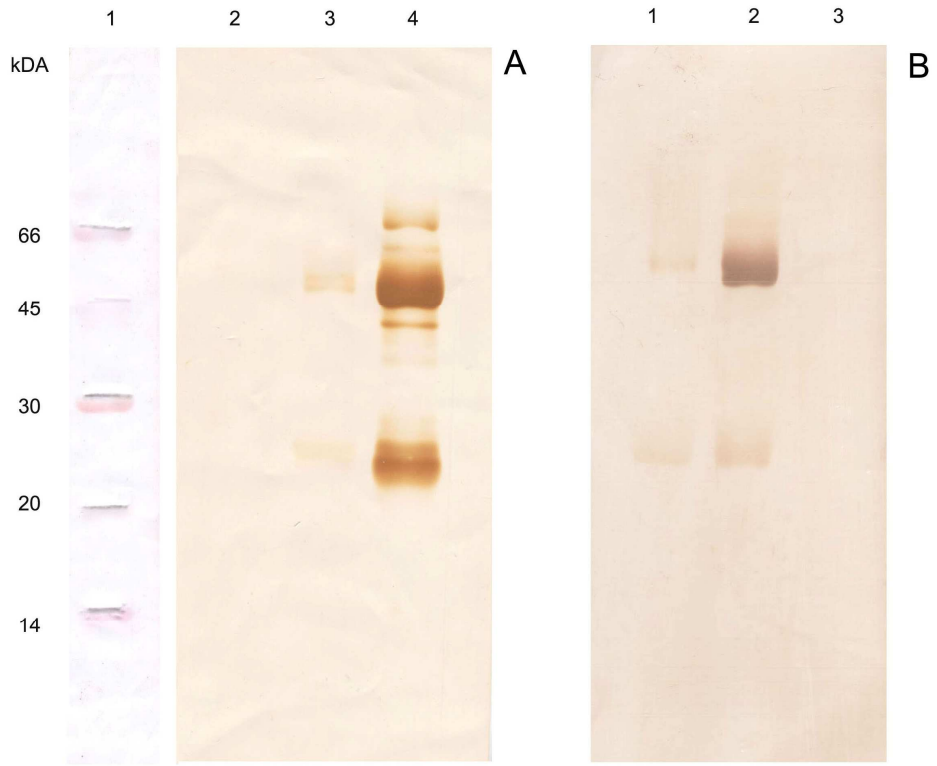

Figura 8 -Caracterização de pSP- Aab por Western blotting. Após a separação por eletroforese as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com anti-soro policlonal anti-SP-A suína (pSP-Aab) nas diluições **1:250 (A)** e **1:500 (B)** seguido de incubação com anticorpo de coelho conjugado com peroxidase e revelação com DAB. **(A)** Canaletas: **1** -Padrão de massas moleculares (97 a 14 kDa), **2** - Antígeno de superfície do vírus contra Hepatite B (rHbsAg) (8µg), **3**-SP-A humana (8µg), **4**- SP-A suína (8µg).**(B) 1-** SP-A humana (8µg), **2-** SP- A suína (8µg), **3-** Albumina bovina (8µg).

4.3 Curva de calibração do ELISA indireto utilizando o sistema hSP-A/ pSP-Aab

A Tabela 1 e a **figura 9** apresentam os resultados médios dos 3 testes independentes realizados com amostras de cada concentração repetidas quatro vezes para a determinação da curva de calibração do ELISA indireto utilizando SP-A humana obtida de pacientes portadores de artrite reumatóide (hSP-A) como calibrador para uma faixa padronizada de 0,312 - 5,0 µg/mL e pSP-Aab na diluição constante de 1:1000. O limite de detecção do ensaio obtido foi 0,625 µg/mL. A linearidade da precisão da curva foi verificada através dos coeficientes de determinação R^2, próximos de 1, que representam a estimativa otimista da qualidade da regressão linear. Os coeficientes obtidos foram 0,9825, 0,9783 e 0,9742, respectivamente para os experimentos 1, 2 e 3. Na técnica de ELISA, a precisão determinada por estes coeficientes é dependente de fatores como erros no procedimento analítico, preparo de reagentes, natureza e qualidade do material suporte do ensaio, controle de parâmetros (temperatura e tempo de incubação), volumes aplicados, homogeneização e cobertura irregular com anticorpos. A comparação das retas de regressão linear para $p<0,05$ mostrou que não existe diferença significativa entre elas. Entre as curvas 1 e 2: $p = 0, 1148$, entre 1 e 3: $p =0,1429$ e entre 2 e 3: $p = 0,1328$. A simples observação visual das curvas já mostra que elas não são diferentes já que para a maioria dos resultados, as barras de erros foram menores que os símbolos (**Figura 9**). Isto também foi verificado quando calculamos o desvio padrão em porcentagem da média. Os coeficientes de variação obtidos foram sempre baixos (inferiores a 5%), com exceção dos resultados para a concentração de 5,0 µg/mL, que estiveram acima de 5% nos testes 2 e 3. Portanto, com esta curva de calibração (**figura 9**), concentrações de h-SP-A, a partir de 1 µg/ mL, podem ser medidas usando pSP-Aab na diluição de 1:1000. Isto é bastante conveniente quando é descrito que nenhum paciente com valores de SP-A acima de 1,2 µg /mL medidos no BAL desenvolvem ARDS (GREENE et al, 1999). Segundo estes mesmos autores este valor tem 57% de especificidade para predizer o desenvolvimento da síndrome. Também o aumento significativo da concentração de SP-A no BAL de pacientes com PAP é o diagnóstico da doença, os valores de $39,3 \pm 12,5$ µg/ mL versus $3,5 \pm 1,1$ µg/ mL para indivíduos saudáveis, já tinham sido

descritos (KUROKI et al, 1998). Por outro lado, os valores encontrados nos ELISAs realizados para medir SP-A em BAL de pacientes com IPF (fibrose pulmonar idiopática) e de pacientes com HP (pneumonite por hipersensibilidade) não foram estatisticamente diferentes dos obtidos dos voluntários saudáveis, embora o aumento da concentração de SP-A fosse esperado para os portadores das patologias. Para IPF foram encontrados os valores de 7,99 ± 0,81 μg/mL versus 4,77 ± 0,73 μg/mL, e para HP os valores de 13,11 ± 1,01 μg/mL versus 4,77 ± 0,73 μg/mL (PHELPS et at, 2004). Os autores discutem que as concentrações de SP-A podem ter sido subestimadas pelo uso dos anticorpos monoclonais. Por outro lado, a concentração de SP-A nos BAL de pacientes asmáticos desafiados (1,5 μg/ mL) com substâncias alergênicas foi considerada significantemente diminuída quando comparada com as concentrações de não asmáticos desafiados (2,5 μg/ mL) (ERPENBECK et al, 2006). Em suma, a curva de calibração proposta sinalizou a possibilidade da utilização do sistema hSP-A/ pSP-Aab. Obviamente a validação desta e de outras possíveis curvas selecionadas para a otimização da performance farão parte de um programa de desenvolvimento e de controle de qualidade do futuro teste.

Tabela 1 – Valores médios das densidades ópticas e respectivos erros padrões para cada concentração de hSp-A ensaiada com pSP-Aab na diluição de 1:1000 em três testes, para validação da curva padrão.

Concentração (µg/mL)	Curva de calibração sistema hSP-A/ pSP-Aab (1:1000)					
	Teste 1		Teste 2		Teste 3	
	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão
5,000	1,1200	0,0196	0,9300	0,0642	1,565	0,0710
2,500	0,4300	0,0258	0,3475	0,0193	0,5575	0,0417
1,250	0,1825	0,0048	0,1450	0,0029	0,2475	0,0075
0,625	0,1025	0,0025	0,0850	0,0029	0,1425	0,0075
0,312	0,0675	0,0025	0,0600	0,0000	0,0975	0,0048

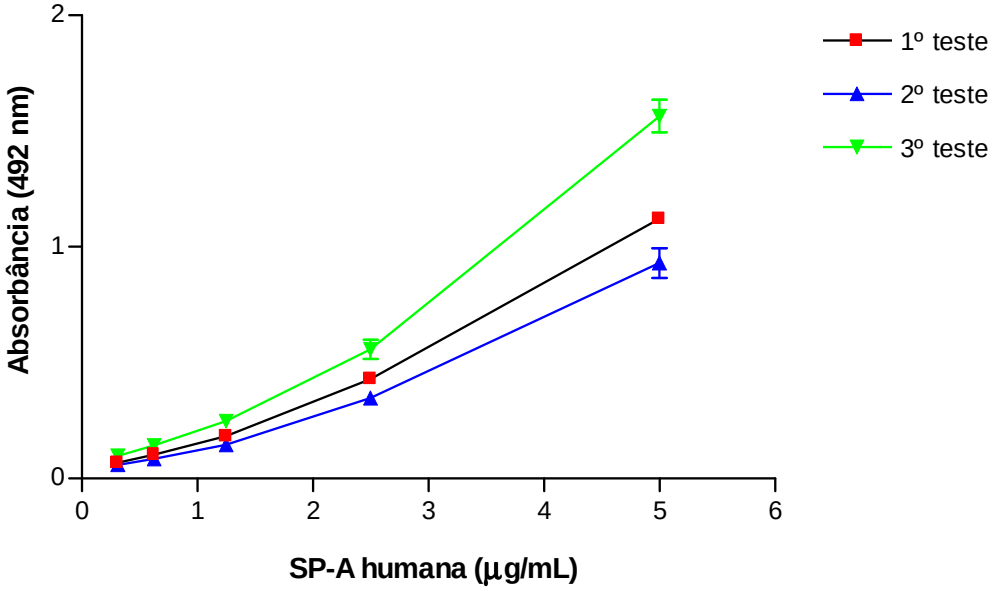

Figura 9 - ELISA indireto para medir hSP-A usando pSP-Aab na diluição 1:1.000, seguido pela incubação com conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (1/20.000) e revelação com OPD. A curva de calibração na faixa de 0,31 a 5,0 µg/mL da proteína foi determinada após 3 ensaios independentes e com quatro repetições de cada uma das amostras. Não foi observada diferença estatística significante entre as curvas para $p<0,05$. Entre curva 1 e 2: $p= 0,1148$, entre 1 e 3: $p =0,1429$ e entre 2 e 3: $p = 0,1328$. Os coeficientes de variação foram inferiores a 10% sendo considerados baixos, mesmo para a concentração de 5 µg/mL.

4.4 Quantificação de SP-A em amostras humanas de BAL usando pSP-Aab

Amostras de BAL preparadas como descrito no item 3.7 foram utilizadas para medir SP-A utilizando pSP-Aab na diluição 1:500 (Western blotting) e 1:1000 (ELISA). O conteúdo total de proteína das amostras dos lavados, dosadas pelo método de BCA, foi para BAL 1 = 2,17 mg/mL, para BAL 2 = 0,30 mg/mL, para BAL 3 = 2,22 mg/mL e 1,6 mg/mL para o "pool" das 3 amostras feito com 100 μL de cada amostra. Para o ELISA, os lavados e o "pool" foram usados na diluição 1:100. Os valores médios das densidades ópticas obtidas foram para BAL 1 = 0,46, BAL 2 = 0,30, BAL 3 = 0,62 e pool = 0,26 que confrontados com a curva padrão (**figura 9**) e corrigidos pelo fator de diluição corresponderiam a 250 μg/mL, 100 -125 μg/mL , 250 - 300 μg/mL, 62,5 -100 μg/mL, respectivamente.

A **figura 10** mostra os resultados do Western blotting que identifica a proteína SP-A no pool dos 3 lavados usando diferentes anti-soros policlonais produzidos em coelho e diluídos 1:500: pSP-Aab (**figura 10, canaleta 2**), anti-SP-A humana (**figura 10**, **canaleta 3**), anti-albumina (**figura 10, canaleta 4**). pSP-Aab reconheceu no pool do BAL o dímero e fracamente o monômero de SP-A do lavado, ressaltando sua especificidade, o anti-SP-A humana reconheceu fortemente SP-A (monômero, dímero e até trímero) e também albumina, e o anti-albumina bovina reconheceu a albumina humana e levemente o dímero e o monômero de SP-A. De qualquer modo está comprovado que a proteína que está sendo medida por ELISA ou identificada por Western blotting no BAL humano por pSP-Aab é a SP-A e quantificar SP-A no lavado humano utilizando um anticorpo policlonal produzido em coelho contra a proteína SP-A suína é viável. Portanto o sistema pode ser uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de estudos clínicos que relacionem anormalidades nos níveis de SP-A em diferentes doenças e estágios da doença.

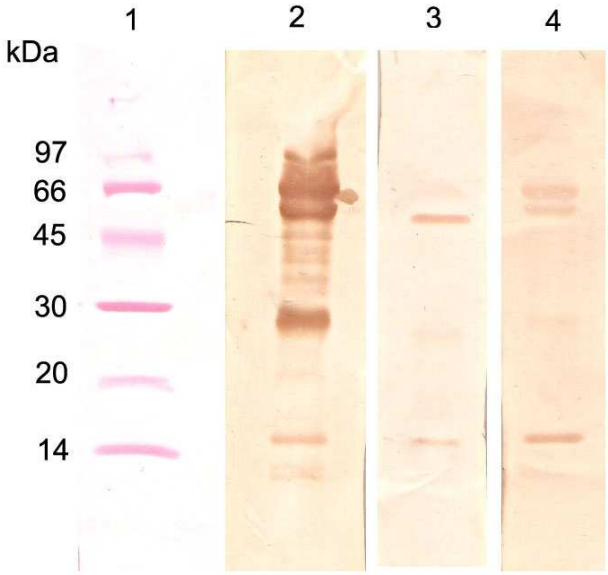

Figura 10 - Identificação de hSP-A em "pool" de 3 amostras humanas de BAL (20 µg) usando pSpA-ab (diluição 1:500) por Western blotting.**1**- Padrão de massas moleculares **2**-"Pool" de BAL humano + anti-soro policlonal anti-SP-A humana, **3**- "Pool" de BAL humano + pSP-Aab, **4** – "Pool" de BAL humano + anti-soro policlonal anti-albumina bovina.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Os reagentes SP-A suína e anti-soro policlonal contra SP-A suína foram purificados e caracterizados,

5.2 O grau de pureza de SP-A suína usada para produção de pSP-Aab foi fundamental para a boa especificidade do soro,

5.3 Foi desenvolvido um teste de ELISA indireto utilizando hSP-A para sensibilização das placas e utilizada como calibrador frente diferentes diluições de pSP-Aab, para definição de uma curva de calibração capaz de detectar no BAL valores ao redor de 1 µg/ mL,

5.4 A curva de calibração proposta (0,312 - 5 µg/mL) usou pSP-Aab na diluição 1:1000 e seu limite de detecção foi 0,625 -1,0 µg/mL.

5.5 O ensaio de ELISA indireto usando anticorpo policlonal produzido em coelho capaz de quantificar SP-A no lavado humano pode ser ferramenta útil para utilização em futuros ensaios clínicos que testem as proteínas do surfactante como marcadores específicos de doenças.

REFERÊNCIAS

AL-SALMI, Q. A.; WALTER, J. N.; COLASURDO, G. N.; SOCKRIDER, M. M.; SMITH, E. O.; TAKAHASHI, H.; FAN, L. L. Serum KL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease. **Chest**, v. 127, p. 403-407, 2005.

AWASTHI, S.; MAGEE, D. M.; COALSON, J. J. Coccidioides posadasii infection alters the expression of pulmonary surfactant proteins (SP)-A and SP-D. **Respir. Res.,** v. 5, 2004.

BERSTEN, A. D.; HUNT, T.; NICHOLAS, T. E.; DOYLE, I. R. Elevated plasma surfactant protein-B predicts development of acute respiratory distress syndrome in patients with acute respiratory failure. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.,** v**.** 164, p. 648-652, 2001.

BETSUYAKU, T.; KUROKI, Y.; NAGAI, K.; NASUHARA, Y.; NISHIMURA, M. Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. **Eur. Respir. J.,** v. 24, p. 964-970, 2004.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

CROUCH, E. C. Collectins and pulmonary host defense. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 19, p.177-201, 1998.

DEUTSCHER, M. P. Protein Purification. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 889-894, 1990.

DOYLE, I. R.; BERSTEN, A. D.; NICHOLAS, T. E. Surfactant proteins-A and B are elevated in plasma of patients with acute respiratory failure. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**., v. 156, p. 1217-1229, 1997.

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**
Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/;
http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html.

EISNER, M. D.; PARSONS, P.; MATTHAY, M. A.; WARE, L.; GREENE, K. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. **Thorax,** v. 58, p. 983-988, 2003.

ERPENBECK, V. J.; SCHMIDT, R.; GÜNTHER, A.; KRUG, N.; HOHLFELD, J. M. Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma. **Allergy,** v. 61, p. 598-604, 2006.

FLOROS, J. Human surfactant protein A (SP-A) variants: why so many, why such a complexity ?. **Swiss Med. Wkly**., v. 131, p. 87-90, 2001.

GREEN, F. H. Overview of pulmonary fibrosis. **Chest**., v. 122, p. 334S-339S, 2002.

GREENE, K. E.; WRIGHT, J. R.; STEINBERG, K. P.; RUZINSKI, J. T.; CALDWELL, E.; WONG, W. B.; HULL, W.; WHITSETT, J. A.; AKINO, T.; KUROKI, Y.; NAGAE, H.; HUDSON, L. D.; MARTIN, T. R. Serial changes in surfactant associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**., v. 160, p. 1843-1850, 1999.

GREENE, K. E.; JR, KING, T. E.; KUROKI, Y.; BUCHER-BARTELSON, B.; HUNNINGHAKE, G. W.; NEWMAN, L. S.; NAGAE, H.; MASON, R. J. Serum surfactant proteins-A and D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. **Eur. Respir. J.**, v. 19, p. 439-446, 2002.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annu. Rev. Immunol**., v. 21, p. 547-578, 2003.

KHUBCHANDANI, K. R.; SNYDER, J. M. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. **FASEB Journal**, v. 15, p. 59-69, 2001.

KISHORE, U.; GREENHOUGH, T. J.; WATERS, P.; SHRIVE, A. K.; GHAI, R.; KAMRAN, M. F.; BERNAL, A. L.; REID, K. B. M.; MADAN, T.; CHAKRABORTY, T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. **Mol. Immunol.**, v. 43, p. 1293-1315, 2006.

KUBRUSLY, F. S.; IOURTOV, D.; LEME, E.; RAW, I. Pulmonary surfactant protein A isolation as a by- product of porcine pulmonary surfactant production. **Biotechnol. Appl**. **Biochem**., v. 40, p. 173-179, 2004.

KUROKI, Y.; TAKAHASHI, H.; CHIBA, H.; AKINO,T. Surfactant proteins A and D: disease markers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1408, p. 334-345, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOWRY, H. O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**., v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, J.; THE, C.; KISHORE, U.; REID, K. B. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system Review. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1572, p. 387-400, 2002.

MASON, R. J.; GREENE, K.; VOELKER, D. R. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. L1-13, 1998.

MCCORMACK, F. X.; KING, T. E.; BUCHER, B. L.; NIELSEN, L.; MASON, R. J. Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**., v. 152, p. 751-759, 1995.

MCCORMACK, F. X. Structure, processing and properties of surfactant protein A. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 1408, p. 109-131, 1998.

MCCORMACK, F. X.; WHITSETT, J. A. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. **J. Clin. Invest.**, v. 109, p. 707-712, 2002.

PALANIYAR, N.; ZHAN, G. L.; KUZMENKO, A.; IKEGAMI, M.; WAN, S.; WU, H.; KORFHAGEN, T. R.; WHITSETT, J. A.; MCCORMACK, F. X. The role of pulmonary collectin N-terminal domains in surfactant structure, function and homeostasis in vivo. **J. Biol. Chem**., v. 30, p. 26971-26979, 2002.

PHELPS, D. S.; UMSTEAD, T. M.; MEJIA, M.; CARRILLO, G.; PARDO, A.; SELMAN, M. Increased surfactant protein A levels in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis. **Chest.,** v. 125, p. 617-625, 2004.

ROSEN, S. H.; CASTLEMAN, B.; LIEBOW, A. A. Pulmonary alveolar proteinosis. **New Engl. J. Med**., v. 258, p. 1123-1142, 1958.

STRONG, P.; KISHORE, U.; MORGAN, C.; LOPEZ, BERNAL, A.; SINGH, M., REID, K. B. A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid. **J. Immunol. Methods,** v. 220, p. 139-149, 1998.

STRONG, P.; REID, K. B.; CLARK, H. Intranasal delivery of a truncated recombinant human SP-D is effective at down-regulating allergic hypersensitivity in mice sensitized to allergens of Aspergillus fumigatus. **Clin. Exp. Immunol.,** v. 130, p. 19-24, 2002.

SUWABE, A.; MASON, R. J.; VOELKER, D. R. Calcium dependent association of surfactant protein A with pulmonary surfactant: application to simple surfactant protein A purification. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 327, p. 285-291, 1996.

TRAVIS, J.; BOWEN, J.; TEWKSBURY, D.; JOHNSON, D.; PANNELL, R. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. **Biochem. J.,** v. 157, p. 301-306, 1976.

VAN IWAARDEN, J. F.; TEDING VAN BERKHOUT, F.; WHITSETT, J. A.; OOSTING, R. S.; VAN GOLDE, L. M. A novel procedure for the rapid isolation of surfactant protein A with retention of its alveolar-macrophage-stimulating properties. **Biochem. J**., v. 309, p. 551-555, 1995.

WRIGHT, J. R.; BENSON, B. J.; WILLIAMS, M. C.; GOERKE, J.; CLEMENTS, J. A. Protein composition of rabbit alveolar surfactant subfractions. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 791, p. 320-332, 1984.