BIBLIOTÉCA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

**Modificação induzida por β_2 -glicoproteína I na resposta oxidativa
de polimorfonucleares humanos durante a fagocitose**

Elisângela Monteiro Pereira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2005

18-227

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011030

Ficha Catalográfica

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

Pereira, Elisângela Monteiro
P436m Modificação induzida por β_2 -glicoproteína I na resposta
oxidativa de polimorfonucleares humanos durante a fagocitose
/ Elisângela Monteiro Pereira. -- São Paulo, 2005.
56p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Gomes, Lígia Ferreira

1. Bioquímica clínica 2. Biologia celular 3. Radical livre :
Patologia fisiológica I. T. II. Gomes, Lígia Ferreira, orientador.

616.0756 CDD

Elisângela Monteiro Pereira

**Modificação induzida por β_2 -glicoproteína I na resposta oxidativa de
polimorfonucleares humanos durante a fagocitose**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Orientador/presidente**

**Profa. Dra. Sônia Jancar Negro
Titular**

**Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
Titular**

São Paulo, 19 de agosto de 2005.

À minha orientadora Lígia Ferreira Gomes,

“A ciência é a mais bela e difícil empresa do homem. Em sua busca colhemos alegrias, amigos e flores da natureza e, um de seus mais belos frutos, a união eterna das gerações. Neste momento as gerações se unem e agradeço essa união.”

Aos meus queridos Pais,

“Ao proporcionar-me o estudo e a compreensão do ser humano, vocês me cederam a oportunidade de conhecer o medo, o trabalho, a solidão, a amizade... Enfim, com seu amor, pude aprender o que é viver através de lutas, sacrifícios, sonhos...

Vocês foram companheiros, presentes ou não, confortando e participando de todos os meus momentos e incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Por tudo isto e muito mais lhes sou grata, e quero compartilhar-lhes esta conquista, pois ninguém merece tanto!!” Amo vocês

À Deus,

“... que, incomparável e inconfundível na sua infinita bondade, compreendeu os meus anseios e me deu a necessária coragem para atingir meus objetivos. Ofereço o meu porvir e peço forças para sempre agir com eficiência no meu trabalho e acerto nas minhas decisões.”

Agradecimentos

A todos da minha família, meus pais, minhas irmãs, sobrinhos, tios, primos, avó, pela força, pelas orações, pela compreensão e, principalmente, pelo amor.

Aos meus amigos pela torcida, pela ajuda, pelos momentos indispensáveis de descontração.

Ao Jorlan, pelo apoio e companheirismo na etapa final desse trabalho.

À minha orientadora Lígia Ferreira Gomes, pela amizade, pela confiança, pelos ensinamentos da vida e da ciência.

A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) – USP, especialmente do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e ao pessoal das secretarias do departamento e da pós-graduação, por toda contribuição.

Às equipes das professoras Silvia Berlaga de Moraes Barros e Silvy Stuchi Maria Engler, do laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, por dividirem o laboratório, os materiais, as preocupações, as conquistas...

Às equipes dos professores Sandro Rogério de Almeida, Irene da Silva Soares, Adelaide José Vaz, Ana Campa, do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, pela ajuda e contribuição durante esses anos.

À equipe do Dr. Reinaldo Salomão (Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias - UNIFESP) pela atenção, pelo auxílio, pelo carinho.

À Dr. Virgínia Berlanga Campos Junqueira e Karin Argenti Simon-Giavarotti (Disciplina de Geriatria – UNIFESP) por toda atenção e ajuda.

À bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos, que se colocou inteiramente à disposição auxiliando-me na montagem e organização das referências bibliográficas.

“... Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora um dia.
A gente chega,
E o outro vai embora
Cada um de nós
Compõe a sua história.
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz.”

(Almir Sater / Renato Teixeira)

Índice

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Abreviaturas	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1. Estrutura e função da β_2 -glicoproteína I	1
1.2. β_2 -glicoproteína I e inflamação.....	4
1.3. β_2 -glicoproteína I e fagocitose	6
2. Objetivos	8
3. Materiais e métodos	9
3.1. Amostras de sangue	9
3.1.1. Separação dos polimorfonucleares	9
3.2. Purificação da β_2 -glicoproteína I	10
3.2.1. Precipitação em ácido perclórico	10
3.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna sepharose-heparina.....	11
3.2.2.1. Montagem da coluna de cromatografia.....	11
3.2.2.2. Separação da β_2 -glicoproteína I por cromatografia de afinidade.....	11
3.3. Eletroforese SDS-PAGE e densitometria.....	12
3.4. Immunoblot	13
3.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 -glicoproteína I	15
3.5.1. Curvas padrão de β_2 -glicoproteína I e determinação da concentração de β_2 -glicoproteína I pelo ensaio ELISA por competição.....	15
3.6. Medidas da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	16
3.6.1. Quimioluminescência	16
3.6.1.1. Preparo do luminol.....	16

3.6.1.2. Preparo da lucigenina	17
3.6.1.3. Preparo do zymosan opsonizado	17
3.6.1.4. Preparo do PMA	17
3.6.1.5. Ensaio de quimioluminescência	18
3.6.2. Citometria de fluxo	18
3.6.2.1. Preparo do DCFH	18
3.6.2.2. Ensaio de citometria de fluxo	19
3.6.3. Medida da produção de óxido nítrico (NO [•])	20
3.7. Análise estatística dos resultados	20
4. Resultados	21
4.1. Purificação da β_2 -glicoproteína I	21
4.2. Eletroforese SDS-PAGE e densitometria	22
4.3. Immunoblot	23
4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 -glicoproteína I	24
4.5. Medidas da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	26
5. Discussão.....	34
5.1. Obtenção das formas nativa e modificada da β_2 -glicoproteína I.....	34
5.2. Concentrações plasmáticas de β_2 -glicoproteína I	36
5.3. Efeito da β_2 -glicoproteína I sobre a produção de ERON associada à fagocitose de zymosan por PMN.....	36
6. Conclusões	42
7. Referências Bibliográficas	43
ANEXO 1	54
ANEXO 2	55

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura da β_2 -glicoproteína I	1
Figura 2	Habilidade de ligação da β_2 GPI a superfícies carregadas negativamente. Principal sítio de ligação da β_2 GPI localizado no quinto domínio	2
Figura 3	Ligação da heparina à β_2 GPI, favorecendo a ação proteolítica da plasmina	5
Figura 4	SDS-PAGE 12,5%, corado pela prata, de β_2 GPI purificada a partir de precipitação de soro humano em ácido perclórico e cromatografia de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B.....	22
Figura 5	Imunoblot em membrana de nitrocelulose de β_2 GPI purificada a partir de precipitação de soro em ácido perclórico e cromatografia de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B.....	23
Figura 6	Ensaio Imunoenzimático para β_2 GPI. Curvas de competição geradas pelas alíquotas purificadas da proteína nas formas nativa e modificada.....	25
Figura 7	Curva de emissão de luz produzida no ensaio de quimiluminescência amplificada por luminol durante 30 minutos de incubação de PMN isolados de sangue humano.....	26
Figura 8	Área integrada da curva de emissão de luz de PMN isolados de sangue humano, estimulados com zymosan opsonizado na presença ou não de 20 μ g de β_2 GPI nativa.....	27
Figura 9	Efeito da β_2 GPI sobre a velocidade máxima de emissão de luz, durante a quimiluminescência de PMN associada à fagocitose de zymosan opsonizado.....	28
Figura 10	Estudo de especificidade do efeito de β_2 GPI sobre a quimiluminescência amplificada por luminol de PMN associada à fagocitose de zymosan opsonizado.....	31

Figura 11	Efeito da forma nativa de β_2 GPI sobre a quimioluminescência amplificada por luminol de PMN associada à ativação por PMA.....	31
Figura 12	Efeito da β_2 GPI nativa na oxidação do DCFH pelas espécies reativas produzidas nos PMN de sangue total colhido com citatro, estimulados ou não com zymosan opsonizado.....	32
Figura 13	Concentração de NO no sobrenadante de PMN não estimulados (basal) e estimulados com zymosan opsonizado, na ausência e na presença de β_2 GPI nativa	33

Lista de Tabelas

Tabela 1	Concentração de β_2 GPI ($\mu\text{g/mL}$) no plasma de cada um dos doadores de sangue do grupo amostral. Cada medida corresponde à média de três determinações independentes. A média e o desvio padrão das concentrações plasmáticas de β_2 GPI do grupo amostral são mostradas na última linha da tabela.....	24
Tabela 2	Estudo do efeito da forma nativa de β_2 GPI sobre a velocidade de emissão de luz no ensaio de QL-lum, medido como a variação unitária do efeito de concentração da proteína à partir do ponto inicial.....	29
Tabela 3	Estudo do efeito da forma modificada (dimérica ou clivada) de β_2 GPI sobre a velocidade de emissão de luz no ensaio de QL-lum, medido como a variação unitária do efeito de concentração da proteína à partir do ponto inicial.....	30

Abreviaturas

Ac - Anticorpo

APS - Persulfato de amônia

β_2 GPI - β_2 -Glicoproteína I

BSA – Albumina Sérica Bovina

CL - Cardiolipina

CR3 - Receptor de Complemento do tipo 3

DCF - 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH - diclorofluoresceína

DCFH-DA - 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

DIC - Coagulação intravascular disseminada

DMSO - Dimetilsulfóxido

ELISA - Ensaio imunoenzimático

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERON – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

iC3b - Componente do Complemento 3b inativado

MFR - Receptor Fucosil-Manosil

MPO - Mieloperoxidase

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

PBS -Tampão salina fosfato

PMN - Polimorfonucleares

PS - Fosfatidilserina

PMA - Acetato de forbolmiristato

QL-lum - Quimiluminescência amplificada por luminol

QL-luc - Quimiluminescência amplificada por lucigenina

RLU/s - Unidades relativas de luz por segundo

SDS-PAGE - Dodecil sulfato de sódio / Gel de poliacrilamida

SOD - Superóxido dismutase

TEMED - N,N,N,N-tetrametilenodiamina

TMB - Tetrametilbenzidina

Resumo

β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é encontrada (200 μ g/mL) no plasma, 60% livre e 40% em lipoproteínas. Esta proteína de fase aguda, com afinidade por superfícies negativas pode ser clivada pela plasmina. Fragmentos são purificados como dímeros ou multímeros de β_2 GPI. Formas monomérica e dimérica de β_2 GPI foram purificadas de soro humano e identificadas por SDS-PAGE, imunoblot e ELISA. Somente a forma monomérica foi detectada no teste ELISA. Os efeitos de ambas as formas sobre o burst respiratório de polimorfonucleares humanos (PMN), estimulados *in vitro* com zymosan opsonizado, foram estudados por quimioluminescência amplificada por luminol ou lucigenina e citometria de fluxo, pela oxidação do DCFH. A forma monomérica inibiu a quimioluminescência amplificada por luminol (-43.6 x -7.33 AEU/s), mas não por lucigenina, e aumentou a oxidação de DCFH e a produção de Óxido Nítrico ($\cdot$ NO). É provável que o $\cdot$ NO, via peroxinitrito, medeie os efeitos de β_2 GPI sobre o burst respiratório de PMN.

Abstract

Circulating blood contains approximately 200 μ g/mL of β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI), either free (60%) or lipoprotein bound (40%). This acute phase protein, with affinity for negative surfaces, can be cleaved by plasmin. Fragments purify as dimeric or multimeric β_2 GPI. Both β_2 GPI forms were purified from human sera and identified by SDS-PAGE, immunoblotting and ELISA. ELISA reactivity was dependent on the monomeric status of β_2 GPI. The effects of dimeric and monomeric β_2 GPI upon respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils (PMN) stimulated *in vitro* with opsonized zymosan were studied. Respiratory burst was evaluated by luminol- or lucigenin-amplified chemiluminescence, or by DCFH oxidation (flow-cytometry assay). The monomeric, but not the dimeric form, inhibited the luminol chemiluminescence of zymosan-stimulated PMNs (-43.6×-7.33 AEU/s). Lucigenin chemiluminescence was insensitive to β_2 -GPI. Monomeric β_2 GPI increases both DCFH oxidation and nitric oxide production. Nitric oxide, probably through peroxynitrite reactions, mediates β_2 GPI effects upon PMNs respiratory burst.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Estrutura e função da β_2 -Glicoproteína I

A β_2 -Glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína altamente glicosilada, que possui cadeia polipeptídica de 326 resíduos de aminoácidos e cinco domínios repetidos (I - V) típicos da família "short consensus repeats" (LOSIER et al., 1984; SHULTZ et al., 1961)(Figura 1). É encontrada no plasma, na linfa, no líquido cefaloraquideano e no humor aquoso. No plasma, cerca de 60% da proteína total circula na forma livre e 40%, ligada a diversas frações de lipoproteínas, principalmente VLDL e quilomicrons (POLZ et al., 1980). Sua concentração plasmática varia em torno de 200 $\mu\text{g/mL}$ nos indivíduos sadios (ARVIEUX et al., 1996; BRIGHTON et al., 1996; HORBACH et al., 1998; BALASUBRAMANIAN et al., 1998; BIASIOLO et al., 1999). Há relatos de que esta ampla variação interindividual é exercida por controle genético, mas suas bases moleculares ainda não são conhecidas (SANGUERA et al., 1997b; MEHDI et al., 1999). Não são conhecidas patologias associadas à variação das concentrações plasmáticas de β_2 -GPI.

Figura 1 – Estrutura da β_2 -Glicoproteína I (DE GROOT et al., 2000)

O principal sítio de síntese da β_2 GPI é o fígado, porém, sua expressão (mRNA e proteína) tem sido demonstrada em outros tecidos e em diversos tipos celulares como intestino, placenta, astrócitos fetais, células endoteliais, linfócitos, monócitos, astrócitos e neurônios (CONTI et al., 2003; AVERNA et al., 2004).

A β_2 GPI liga-se a superfícies contendo lipídios carregados negativamente, como fosfatidilserina (PS) e cardiolipina (CL); a heparina; a dextran sulfato e a DNA (BRIGHTON et al., 1994; GOLDSMITH et al., 1994; AVERNA et al., 2004). A associação entre β_2 GPI e membranas contendo lipídios negativos dá-se especificamente através do seu quinto domínio (SANGUERA et al., 1997a) (Figura 2). Após ancorar-se a membranas, a proteína sofre mudanças conformacionais e oligomerização, o que pode contribuir para sua antigenicidade e a indução de autoimunidade *in vivo* (HAMMEL et al., 2001). A heparina previne a ligação da β_2 GPI aos fosfolipídeos carregados negativamente, pois o sítio primário de ligação da proteína a heparina é o mesmo sítio de interação com esses fosfolipídios (GUERIN et al., 2002). A capacidade de ligação da β_2 GPI a heparina é rotineiramente explorada para sua purificação a partir do plasma humano (POLZ et al., 1980).

Figura 2 – Habilidade de ligação da β_2 GPI a superfícies carregadas negativamente. Principal sítio de ligação da β_2 GPI localizado no quinto domínio. (GUERIN et al., 2002, modificado)

A β_2 GPI é conhecida como um anticoagulante natural. Além de ligar-se a plaquetas ativadas, que expõem resíduos de PS e CL em suas membranas, β_2 GPI inibe a agregação plaquetária e a fase de contato da cascata de coagulação (BRIGHTON et al., 1994; GOLDSMITH et al., 1994).

Em parte por sua atividade anticoagulante, a β_2 GPI tem sido proposta como uma proteína antiaterogênica. Outros efeitos potencialmente antiaterogênicos são descritos. Por exemplo, a β_2 GPI é capaz de aumentar a depuração de triglicerídeos por estimular a lipase lipoprotéica (NAKAYA et al., 1980) e também de ligar-se a lipídios modificados na superfície de LDL oxidada *in vitro* (KOBAYASHI et al., 2001). Em portadores de doenças cardiovasculares, as concentrações plasmáticas de β_2 GPI correlacionam-se negativamente com a susceptibilidade da LDL à oxidação e a proteína inibe o influxo de colesterol em macrófagos *in vitro* (LIN et al., 2001). Entretanto, não há consenso sobre seu papel no desenvolvimento da aterosclerose (GEORGE et al., 1999b). A deficiência completa de β_2 GPI não mostra associação com sintomas clínicos de dislipidemia (YASUDA et al., 2000). Em indivíduos idosos sem história clínica de doença vascular, a concentração plasmática de β_2 GPI é maior em indivíduos hipercolesterolêmicos do que em normocolesterolêmicos (GOMES et al., 2004b).

A β_2 GPI também foi descrita como um sinalizador de apoptose para macrófagos (CHONN et al., 1995). É possível que participe da regulação da resposta a apoptose. Em particular, sua expressão gênica no fígado, foi diretamente relacionada ao estado proliferativo das células hepáticas e parece estar envolvida na manutenção da vitalidade dessas células quando expostas a estresse. Por exemplo, na regeneração após hepatectomia parcial ou após a depleção de fatores de crescimento, quando lhe foi atribuído um papel de fator de sobrevivência para hepatócitos (CHONN et al., 1995; AVERNA et al., 2004).

1.2. β_2 -Glicoproteína I e inflamação

Embora seu papel fisiológico preciso não esteja bem determinado, o conjunto de suas propriedades a situa entre as proteínas de fase aguda. A estimulação da expressão de mRNA de β_2 GPI por citocinas pró-inflamatórias, IL-1b e IL-6, foi mostrada em linhagem de células de tumor hepático humano e durante a inflamação experimentalmente induzida em cães (MEHDI et al., 1991; SELLAR et al., 1993).

A presença de autoanticorpos com especificidade para β_2 GPI é descrita para uma parcela da população assintomática, com maior frequência em indivíduos idosos (CELLI, 1997).

Autoanticorpos reativos para β_2 GPI podem ser induzidos em modelos animais infectados com *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* entre outros patógenos. Estes autoanticorpos, produzidos após administração de toxoide tetânico ou infecção por estas bactérias, são capazes de induzir a síndrome do anticorpo antifosfolípido em animais sadios (BLANK et al., 2002).

A associação entre β_2 GPI e hemostasia é importante nas doenças inflamatórias com componente autoimune. Está descrita a associação entre inflamação e trombose em pacientes com títulos altos de anticorpos reativos contra β_2 GPI ou seus complexos *in vivo* (CELLI, 1997; GHARAVI, et al., 2000). Autoanticorpos com especificidade para β_2 GPI ou para complexos entre β_2 GPI e lipídios de membrana celular associam-se à fisiopatologia de Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido Primário, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Doença de Chagas congênita, Sífilis congênita (GEORGE et al., 1999a). Nessas patologias, está descrito um aumento na concentração plasmática de β_2 GPI, embora existam dados discordantes na literatura (ARVIEUX et al., 1996; BALASUBRAMANIAN & SCHROIT, 1998; BIASIOLO et al., 1999).

Formas clivadas de β_2 GPI foram detectadas no plasma de pacientes sofrendo de Coagulação Intravascular Disseminada (DIC), pacientes tratados com estreptoquinase, pacientes com leucemia e com atividade do anticoagulante lúpico (HORBACH et al., 1999; ITOH et al., 2000). Esse

processamento proteolítico da β_2 GPI ocorre durante a ativação da fibrinólise e é mediado pela plasmina. A heparina é capaz de potencializar a geração da forma clivada da β_2 GPI pela plasmina (GUERIN et al., 2002) (Figura 3). A afinidade de ligação da forma clivada da β_2 GPI a fosfolipídeos negativamente carregados e a heparina é menor do que a da proteína íntegra (HORBACH et al., 1999; GUERIN et al., 2002). A clivagem *in vitro* da β_2 GPI é causada por plasmina, tripsina e elastase e é prevenida pelo pré-tratamento do plasma com precipitação em ácido perclórico (HORBACH et al., 1999).

Figura 3 – Ligação da heparina à β_2 GPI, favorecendo a ação proteolítica da plasmina. (GUERIN et al., 2002, modificado)

A ocorrência simultânea do aumento dos níveis plasmáticos de β_2 GPI clivada com a diminuição de β_2 GPI íntegra, sugere que a clivagem da β_2 GPI induz ao aumento na velocidade de depuração da proteína da circulação. Porém, em pacientes com DIC, esse processamento proteolítico da β_2 GPI não é necessário para a depuração da proteína, sugerindo que sua remoção da circulação ocorre através da ligação a fosfolipídeos carregados negativamente, expostos nas partículas derivadas de células apoptóticas (HORBACH et al., 1999).

CHONN et al. (1995) demonstraram, em modelo animal, que a capacidade de interação de lipossomos com proteínas sanguíneas, *in vivo*, está altamente relacionada com a velocidade de depuração de lipossomos da circulação e que existe uma predominância da β_2 GPI nas membranas que são rapidamente removidas da circulação.

No rim, a megalina tem sido proposta como um eficiente receptor fisiológico para a β_2 GPI, mediando sua depuração. A β_2 GPI tem sido utilizada como marcador diagnóstico para falência tubular renal nas doenças renais crônicas como a Síndrome de Fanconi e nas intoxicações de túbulo renal, porque a atividade insuficiente da megalina nestas condições causa a excreção urinária da β_2 GPI. A proteína não é detectada na urina de controles sadios. (MOESTRUP et al., 1998).

1.3. β_2 -Glicoproteína I e fagocitose

Em ensaios *in vitro*, β_2 GPI aumenta a eficiência da atividade fungicida de um "pool" de células não parenquimatosas de fígado de rato contra *Candida albicans* (GOMES et al., 2002). A proteína inibe tanto a ingestão de antígenos particulados (zymosan, *Candida albicans*) quanto o "burst" respiratório de células de Kupffer. Os efeitos observados são mais evidentes em células de Kupffer mantidas *in situ*, em um sistema de perfusão de fígado de camundongo, do que em uma suspensão de células não parenquimatosas obtidas após perfusão com collagenase (GOMES et al., 2004a).

Entretanto, quando as células de Kupffer são desafiadas com uma suspensão de lipossomos contendo PS, tanto a ingestão quanto o processamento das partículas fagocitadas é estimulado (GOMES et al., 2002). Este efeito parece ser independente da glicosilação da proteína e não requer os receptores usuais de lipídio em fagócitos (CD36, CD68 e CD14) (BALASUBRAMANIAN & SCHROIT, 1998).

β_2 GPI determina também uma resposta de aumento de produção de Interferon- γ e NO * , associada à diminuição de burst respiratório e ingestão de partículas, em macrófagos peritoneais inflamatórios desafiados com formas amastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*. Esse efeito é amplificado na

presença de superfícies contendo PS no meio de reação (KNOX DE SOUSA et al., 2001).

Resultados preliminares, obtidos com suspensões de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos isolados de voluntários humanos, mostraram um discreto aumento na emissão total de quimioluminescência e modificação no perfil de fosforilação em tirosinas após estimulação por partículas de zymosan opsonizado na presença de β_2 GPI, em relação a seus respectivos controles (CARVALHO et al., 1999).

Embora os sistemas efetores do “burst” respiratório de PMN e de macrófagos sejam semelhantes, não é estabelecido se o efeito da β_2 GPI é geral sobre todos os fagócitos. Considerando que a β_2 GPI é uma proteína circulante, este trabalho foi desenvolvido para ampliar a pesquisa de como a β_2 GPI interage com seus alvos biológicos, no caso PMN neutrófilos de sangue periférico humano.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Purificar a β_2 GPI e seus produtos de clivagem de ocorrência natural (forma clivada contendo dímeros) a partir de soro humano.

Verificar se a forma modificada da β_2 GPI (forma clivada contendo dímero) compete pelo anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI com a forma nativa da proteína adsorvida em fase sólida.

Verificar se a β_2 GPI atua como um modulador da resposta de PMN de sangue periférico humano, através da análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células, frente a estímulos solúveis e particulados.

Verificar se o efeito modulador da β_2 GPI na produção de espécies reativas de oxigênio pelos PMN é similar entre as formas nativa e modificada da proteína.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1. Amostras de sangue

Amostras de sangue foram colhidas de voluntários sadios com idades entre 22 e 55 anos. Cada doador assinou um Termo de Consentimento (Anexo 2) relatando ciência da utilidade do sangue doado. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com o protocolo nº 211 (Anexo 1).

Das amostras de sangue coletadas, foram utilizados o plasma, o soro e a fração celular, da qual foram separados os PMN. Para os ensaios de citometria de fluxo foi utilizado sangue total colhido com citrato.

Alíquotas dos plasmas de todos os doadores foram separadas e armazenadas a -20°C para determinação da concentração da $\beta_2\text{GPI}$ através do ensaio ELISA por competição.

3.1.1 Separação dos polimorfonucleares

Foram colhidos 10 a 15 mL de sangue periférico de voluntários sadios, em tubos Vacutainer heparinizados.

Os tubos foram colocados para centrifugar a 239 g, por 10 minutos (Centrifuge 5804 – Eppendorf) e o plasma obtido foi retirado e substituído por NaCl 0,9% estéril, seguindo-se uma suave homogeneização da suspensão resultante, por inversão do tubo.

A suspensão foi, então, transferida delicadamente para tubos cônicos de 15 mL estéreis, contendo 4 mL de Ficoll-paqueTMPLUS (Amershan Pharmacia Biotech) e uma nova centrifugação foi efetuada à 344g, por 30 minutos em temperatura ambiente.

O sobrenadante contendo o anel de mononucleares foi desprezado e o mesmo volume retirado foi substituído por PBS estéril.

Em seguida, as células foram diluídas em Dextran 2% (Sigma) em NaCl 0,9% (1:2 v Dextran/ v Células) e, após homogeneização, os tubos foram deixados em

repouso com tampas semi-abertas durante 40 minutos para a sedimentação dos eritrócitos.

Após a sedimentação, a camada superior contendo os PMN foi removida e o seu volume completado para 12 mL com PBS, para nova centrifugação a 344 g, por 10 minutos, a 4°C. A camada inferior foi desprezada.

Para lise dos eritrócitos contaminantes, 3 mL de água Milli-Q gelada foram adicionados sobre o “pellet” de PMN e, durante 1 minuto, o tubo foi homogeneizado com pipeta plástica. Em seguida, 3 mL de NaCl 2,7% estéril foram adicionados e 9 mL foram completados, com PBS isosmótico (0,9%), para centrifugação a 344 g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e os PMN, obtidos do centrifugado, foram ressuspensos em PBS. Amostras das células nessa suspensão foram diluídas em líquido de Turk (1:20), para contagem em Câmara de Neubauer e em azul de Tripán isosmótico, para medir a viabilidade, antes do uso.

3.2. Purificação da β_2 -glicoproteína I

A β_2 GPI foi purificada a partir de “pool” de soro humano através de precipitação em ácido perclórico, seguida de cromatografia em coluna de afinidade Sepharose heparina CL-6B:

3.2.1. Precipitação em ácido perclórico

Um pool de soro humano foi dialisado em tampão Tris 20mM (SIGMA)/ NaCl 30mM (MERCK), pH 7,0, por 24 horas a 4°C. Para cada 50 mL de soro dialisado foram acrescentados 1,25 mL de ácido perclórico (MERCK) gota a gota durante 15 minutos e sob agitação constante. A mistura formada foi centrifugada a 10621 g por 30 minutos, a 4°C (Refrigerate Centrifuge Himac CR20B2 – Hitachi). Após a centrifugação o sobrenadante foi colhido, neutralizado a pH 7,0 com carbonato de sódio saturado (MERCK) e novamente dialisado em tampão Tris 20mM pH 7,0, contendo 30mM de NaCl, por 24 horas, a 4°C.

3.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-heparina

3.2.2.1. Montagem da coluna de cromatografia

Após pesagem de 3,5 g da resina de Sepharose heparina CL-6B (Pharmacia Biotech), a mesma foi hidratada e lavada várias vezes em água destilada. O gel formado foi colocado, com excesso de água, em um erlenmeyer sem tampa. O erlenmeyer foi colocado dentro de um dessecador fechado e degaseado por cerca de 1 hora, com o auxílio de uma bomba de vácuo, para remoção de bolhas do gel.

Antes da transferência do gel para a coluna de vidro, uma fina camada de lã de vidro foi introduzida na base da coluna. O gel foi então transferido para a coluna de maneira homogênea, evitando a secagem e a formação de camadas no empacotamento.

Pronta, a coluna de cromatografia (7cm de diâmetro X 18 cm de altura) foi equilibrada com a passagem de água destilada, seguida de tampão 30 mM NaCl/20mM Tris pH 7,0 .

Todo o material de cromatografia foi mantido a 4°C, inclusive durante o processo de preparação do gel.

3.2.2.2. Separação da β_2 -glicoproteína I por cromatografia de afinidade

Após equilíbrio da coluna de cromatografia com o tampão 30 mM NaCl/20mM Tris pH 7,0, a amostra dialisada, resultante do processo de precipitação em ácido perclórico, foi passada pela coluna, num fluxo de 0,5 mL por minuto.

Após a passagem de toda a amostra, as frações apresentando ligações fracas ou inespecíficas foram eluídas lavando-se a coluna com tampão 150 mM NaCl /20 mM Tris, pH 7,0 , até que a absorbância do eluído fosse menor que 0,01.

Em seguida, um tampão de 175 mM NaCl / 20mM Tris, pH 8,5 foi aplicado para retirada das formas modificadas da proteína (clivada e dimerizada) e todo o volume eluído foi colhido em alíquotas seqüenciais, de 1,5 mL, para análise da eluição através da medida das absorbâncias de cada alíquota. Depois, um tampão de 350 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5 foi aplicado para a eluição da β_2 GPI nativa e alíquotas também foram colhidas e analisadas no espectrofotômetro.

O perfil de eluição foi determinado a partir do gráfico das absorbâncias das alíquotas coletadas em função do volume eluído, em cada etapa. As amostras ricas em proteína de cada uma das etapas de purificação foram recolhidas, reunidas num volume único por etapa considerada, dialisadas em água Milli-Q e estocadas a -20°C.

A coluna foi, então, lavada com tampão 500 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5 e reequilibrada com tampão 30 mM NaCl/20 mM Tris, pH 7,0.

Todo o procedimento de purificação foi realizado em geladeira (4°C) e as absorbâncias obtidas num Espectrofotômetro Hitachi – U-3210 em 280 nm, com auxílio de cubetas de quartzo.

Amostras das frações retiradas durante a passagem dos tampões de 175 e 350 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5 foram encaminhadas para ensaios de eletroforese SDS/PAGE corado pela prata, densitometria, imunoblot e ensaio imunoenzimático (ELISA) por competição utilizando Ac anti- β_2 -Glicoproteína I para análise da pureza da proteína obtida.

3.3. Eletroforese SDS-PAGE e densitometria

Foram utilizados os seguintes tampões:

- Tampão do compartimento inferior (Tris-HCl (Sigma) 1,5 M pH 8,8 / 0,4% Dodecil - Sulfato de Sódio (Sigma) - SDS)
- Tampão do compartimento superior (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 / 0,4% SDS)
- Tampão de Amostra – SDS (4 mL Tris-HCl 1M, pH 6,8; 5 mL SDS 20%; 5 mL glicerol (Sigma); 0,5 mL azul de bromofenol 0,1% (Difco Laboratories, Detroit, MI); 32,5 mL água bidestilada; β -mercaptoetanol 10%)
- Tampão de eletroforese (12 g Trizma base (Sigma); 57 g glicina (Ajinomoto); 4 g SDS; q.s.p. 1L água destilada; para concentração 4X)

Amostras da proteína purificada, das frações colhidas na cromatografia durante a passagem dos tampões de 175 e 350 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5, foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE.

A eletroforese foi realizada num sistema Protean 3 (BioRad), com gel de separação 12,5% (5,3 mL água destilada; 4,0 mL tampão do compartimento inferior; 6,7 mL 30% acrilamida (Sigma) / 0,8% bisacrilamida (Sigma) ; 40 µL Persulfato de Amônia a 10% (Sigma) - APS; 25 µL N,N,N,N-tetrametilenodiamina (Sigma) - TEMED) e gel de empacotamento 3,0% (2,95 mL água destilada; 1,25 mL tampão do compartimento superior; 0,8 mL 30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida; 25 µL APS; 15 µL TEMED).

O sistema montado foi colocado numa cuba contendo tampão de eletroforese e 0,5 µg de proteína purificada foi aplicado em cada poço. Um padrão de peso molecular (Protein Molecular Weight Marker – Fermentas) foi utilizado (5 µL) para comparação com a migração das bandas reveladas nas amostras de proteína.

A cuba foi ligada a uma fonte de 120 V e 2 A, procedendo-se à eletroforese por um tempo aproximado de 80 minutos.

Após a corrida, o gel foi submetido à coloração pela prata e o peso molecular das bandas foi analisado por densitometria, num Densitômetro de Calibração GS-700 BIO-RAD.

3.4. Immunoblot

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Tampão de Transferência: 3 g Tris (Sigma); 14,4 g Glicina (Ajinomoto); 200 mL metanol; água Milli-Q, q.s.p. 1000 mL
- Solução Ponceau: 1g Ponceau (Merck); 10 mL ácido acético (Merck); água Milli-Q q.s.p. 100 mL
- Solução de Bloqueio: PBS Tween leite 5% - 100mL PBS Tween 0,05%; 1g leite em pó (Molico Nestlé) desnatado
- PBS Tween leite 1%: 100mL PBS Tween 0,05%; 1g leite em pó desnatado
- Solução reveladora: 2,5 mg diaminobenzidina (Sigma); 15 mL PBS; 75 µL H₂O₂ 30% (Merck).

Em um gel SDS-PAGE, foram submetidos a eletroforese 2 µg por poço das amostras de proteína recolhidas na cromatografia e 5 µL do padrão de peso molecular. Após a corrida, o gel foi colocado em um recipiente contendo tampão de transferência.

Uma membrana de nitrocelulose (Amershan-Pharmacia Biotech) e papéis de filtro de 3 e 1 mm de espessura (Chromatography Paper – WHATMAN), foram cortados, nas dimensões do gel, para a montagem do sistema de transferência. Antes da montagem, a membrana de nitrocelulose foi colocada em água Milli-Q por 2 minutos e em seguida em tampão de transferência por 10 minutos.

A membrana de nitrocelulose e o gel foram fechados entre os papéis de filtro previamente molhados no tampão de transferência, num suporte disposto dentro da cuba de transferência (Bio Rad), com o gel voltado para o lado negativo e a membrana de nitrocelulose para o lado positivo da cuba. A cuba de transferência foi ligada numa fonte de corrente elétrica (50 V, 400 mA) por 18 horas dentro da geladeira (4°C).

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi colocada num recipiente contendo solução Ponceau, até o aparecimento das bandas. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada e colocada para secar.

Após secagem, as tiras foram cortadas e colocadas em solução de bloqueio, por 2 horas sob agitação, com exceção das tiras referentes ao padrão de peso molecular que foram guardadas na geladeira entre papéis absorventes para posterior comparação com o as bandas reveladas no imunoblot.

Após o bloqueio, as tiras foram lavadas com PBS Tween 0,05%, 3 vezes, por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com o Anticorpo (Ac) Monoclonal Anti-β₂-glicoproteína I (clone 5F-7 – ICN) diluído 1:1000 em PBS Tween leite 1%, por uma noite sob agitação, a 4°C.

Após nova lavagem, as tiras foram incubadas com Anticorpo IgG (Fc específico) de cabra, anti-camundongo, conjugado a Peroxidase (SIGMA) diluído 1:200 em PBS Tween leite 1%, por 1 hora sob agitação.

As tiras foram lavadas novamente e colocadas em solução reveladora para a visualização das bandas. O bloqueio da revelação foi feito com sucessivos banhos de água Milli-Q.

3.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 -Glicoproteína I

Um ensaio ELISA de competição foi empregado para medir a concentração de β_2 GPI plasmática dos doadores das amostras de sangue utilizadas durante a pesquisa (GOMES et al., 2004b).

Microplacas Nunc do tipo Maxisorp foram usadas como suporte. A diluição do Ac primário e as concentrações de β_2 GPI, tanto para a sensibilização da placa quanto para a competição, foram padronizadas previamente para cada novo lote de proteína purificada. O kit de TMB (DADE-BEHRING/Supplementary Reagents for Enzygnost-TMB) foi utilizado como sistema revelador.

A lavagem das placas foi feita em lavadora de ELISA LP35 (Diagnostics Pasteur) e a leitura feita em um leitor de ELISA - "microplate reader" modelo 3550 Bio Rad - no comprimento de onda de 450 nm.

3.5.1. Curvas padrão de β_2 -glicoproteína I e determinação da concentração plasmática de β_2 -glicoproteína I pelo ensaio ELISA por competição

A placa foi sensibilizada com um volume de 100 μ L de β_2 GPI nativa, preparada em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6, de forma a obter-se 0,2 μ g da proteína por poço. A sensibilização foi conduzida numa temperatura de 4°C, por uma noite.

Após a sensibilização, a placa foi lavada 5 vezes com PBS Tween 0,05% e cada poço foi bloqueado com 200 μ L de PBS Tween leite 5% por 90 minutos a 37°C, seguindo-se nova lavagem.

Na etapa de competição, concentrações crescentes de β_2 GPI nativa e modificada (dimérica ou clivada) – 0,125 μ g, 0,25 μ g, 0,5 μ g, 1,0 μ g e 2,0 μ g, e plasmas diluídos 1:200, foram incubados com Ac primário 1:1000 por 1 hora a 37°C e em seguida, acrescentados na placa (100 μ L) para mais uma incubação.

Em seguida, a placa foi lavada e cada poço recebeu 100 μ L de Ac secundário (Anticorpo IgG (Fc específico) de Cabra Anti-camundongo, conjugado a Peroxidase - SIGMA), diluído 1:5000 em PBS Tween leite 1%, para uma nova incubação a 37°C, durante 90 minutos.

A placa foi novamente lavada e a revelação, utilizando o kit TMB, foi realizada conforme as instruções do fabricante.

Os valores de concentração de proteína β_2 GPI da curva padrão, calculados a partir da β_2 GPI estoque, em $\mu\text{g/poço}$, foram utilizados como logaritmo da concentração (abscissa) e os valores de absorbância em cada ponto da curva foram divididos pela absorbância do controle 100% (C100%) obtendo-se assim a porcentagem de ligação de anticorpo na placa (ordenada) (GOMES et al, 2004b).

3.6. Medidas da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) pelos polimorfonucleares (PMN) foi analisada por quimioluminescência, citometria de fluxo e análise de óxido nítrico (NO^*).

3.6.1. Quimioluminescência

As técnicas utilizadas foram a de quimioluminescência amplificada por luminol (QL-lum) e quimioluminescência amplificada por lucigenina (QL-luc) (KITAGAWA & JOHNSTON, 1986), realizadas com PMN isolados de sangue periférico humano em resposta a zymosan opsonizado, e como controle da produção do “burst” respiratório, o 4-O-metil éter de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

Foram realizados 14 experimentos no ensaio de QL-lum e 13 experimentos no ensaio de QL-luc, em duplicatas.

3.6.1.1. Preparo do luminol

A solução estoque de luminol (10^{-3} M) foi preparada a partir da diluição de 5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinodiona (Sigma) em água destilada acrescentada de NaOH (q.s.p. dissolução completa do luminol). As alíquotas da solução estoque foram armazenadas numa temperatura de -20°C , e descongeladas imediatamente antes do uso.

3.6.1.2. Preparo da lucigenina

A lucigenina (10^{-3} M) foi preparada a partir da dissolução de nitrato de bis-(N-metilacridínio) (Sigma) em água destilada e armazenada a -20°C em alíquotas que sofreram descongelamento imediatamente antes do uso.

3.6.1.3. Preparo do zymosan opsonizado

Quinhentos miligramas (500 mg) de zymosan (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* – Sigma) foram fervidos com 50 mL de PBS por 1 hora, sob agitação constante e a mistura, colocada para esfriar em temperatura ambiente.

A suspensão foi então sonicada em 14 ciclos de sonicação de 15 segundos de duração, com intervalos de 15 segundos de descanso em gelo, no sonicador de ponta (Cole-Parmer 8853). Depois foi centrifugada por 5 minutos a 4°C em 27 g. O “pellet” formado foi lavado 3 vezes em PBS, novamente centrifugado e ressuspensionado em 50 mL de PBS, obtendo-se uma concentração final de 10 mg/mL.

Para opsonização, o zymosan foi misturado com “pool” de soro humano recém-colhido numa proporção de 1:3 mL, respectivamente. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora sob agitação constante. Em seguida, foi centrifugada a 425 g por 10 minutos a 4°C . O “pellet” formado foi lavado em PBS, centrifugado a 425 g a 4°C durante 10 minutos e, finalmente, ressuspensionado em PBS, mantendo-se a concentração de 10 mg/mL. A suspensão resultante foi alíquotada e armazenada em freezer a -80°C .

Imediatamente antes do uso, a alíquota descongelada sofreu três ciclos de sonicação de 1 minuto de duração, com intervalos de 1 minuto de descanso em gelo, e o número de partículas de zymosan foi contado em câmara de Neubauer.

3.6.1.4. Preparo do PMA

A solução estoque de acetato de forbolmiristato (PMA, Sigma) foi preparada através da diluição em dimetilsulfóxido - DMSO ($100\text{ }\mu\text{M/mL}$) e estocada a -20°C . As alíquotas foram descongeladas imediatamente antes do uso.

3.6.1.5. Ensaio de quimioluminescência

As medidas de quimioluminescência foram realizadas num luminômetro (Microplate Luminometer LB96V – EG&G BERTHOLD) equipado para leitura de emissão de luz em placas brancas (Nunc - Maxisorp Surface) de 96 poços, fundo chato. Para um volume final de 300 μ L, em cada poço, trabalhamos com 10^5 células, 10^{-1} M de luminol ou lucigenina, concentrações crescentes (1,0 μ g, 2,5 μ g, 5,0 μ g, 10 μ g e 20 μ g) de β_2 GPI ou Albumina Sérica Bovina (BSA – Sigma) e 10^6 partículas de zymosan opsonizado ou 10 ng de PMA.

Em todos os poços o volume final foi completado com PBS. Como branco da reação utilizamos a mistura de células e luminol ou lucigenina. Para controle do efeito da proteína, as misturas de reação continham células, β_2 GPI e luminol ou lucigenina.

A leitura da quimioluminescência foi registrada continuamente em Unidades Relativas de Luz por Segundo (RLU/s), como a média dos valores integrados pelo próprio aparelho, num intervalo de alguns segundos entre as medidas individuais. As curvas foram medidas durante um período de 30 minutos, na temperatura de 37°C, registrando-se uma medida por amostra a cada 2 minutos.

3.6.2. Citometria de fluxo

O metabolismo oxidativo observado pela citometria de fluxo seguiu o protocolo padronizado por MARTINS et al. (2003), utilizando sangue total.

Para quantificação do “burst” oxidativo, a medida da oxidação diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) pelas espécies reativas a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto altamente fluorescente, foi realizada num citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.6.2.1. Preparo do DCFH

O DCFH-DA (SIGMA) foi diluído em etanol numa concentração de 25 mM e armazenado a -20°C.

3.6.2.2. Ensaio de citometria de fluxo

Considerando a capacidade de interação da heparina com a β_2 GPI e conseqüente probabilidade de antagonismo, o protocolo foi inicialmente adaptado a essa condição e as amostras de sangue foram colhidas em tubos Vacutainer contendo citrato. O ensaio foi realizado com 100 μ L de sangue total, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 mM), 20 e 60 μ g de β_2 GPI nativa e como estímulo, 8×10^6 partículas de zymosan opsonizado.

O volume final de 1,1 mL foi completado com PBS. Como branco, utilizamos célula e PBS; como basal, célula, DCFH-DA e PBS; e como controle, célula, DCFH-DA, β_2 GPI e PBS. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos sob agitação constante. Em seguida, 2 mL de EDTA 3 mM foram adicionados a cada tubo, para terminar a reação. Os tubos foram então colocados para centrifugar a 344 g por 10 minutos a 4°C (Centrifuge 5804 – Eppendorf).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos contaminantes da porção contendo as células, foram lisados. Para isto, foram acrescentados, a cada tubo, 2 mL de NaCl 0,2% e, após 20 segundos, 2 mL de NaCl 1,6%, seguindo-se uma centrifugação a 344 g por 10 minutos a 4°C e descarte do sobrenadante. Esse procedimento de lise hipotônica foi efetuado 3 vezes.

Após a lise hipotônica, os monócitos foram marcados com Ac monoclonal CD14 PerCP (Proteína de Clorofila Peridina) (BDIS, San Jose – CA – USA), 4 μ L por tubo, com incubação em câmara escura durante 15 minutos em temperatura ambiente.

Uma centrifugação a 344 g, por 10 min a 4°C foi realizada, o sobrenadante descartado e cada tubo recebeu 300 μ L de EDTA 3 mM para leitura no citômetro de fluxo. Foram adquiridos um mínimo de 20.000 eventos na população de PMN, analisada a partir da distribuição das populações celulares do sangue total nos parâmetros “forward-scatter” e “side-scatter”. Em cada conjunto de medidas adquirimos 5.000 eventos baseados nas células marcadas com CD14-PerCP, como controle da distribuição de populações dos fagócitos. A média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) foi analisada usando FL-3 para histograma de células CD14 positivas e FL-1 para histograma de produção de ERON.

3.6.3. Medida da produção de óxido nítrico (NO)

Para a medida da produção de NO , PMN (10^5 células), $\beta_2\text{GPI}$ (20 μg) e zymosan opsonizado (10^6 partículas) foram colocados em placas de 96 poços, com tampa (Cell WellsTM – Corning), e levados para incubação em estufa de CO_2 a 37°C . Como branco, utilizamos células e PBS; e como controle, células, $\beta_2\text{GPI}$ e PBS. Depois de 30 minutos de incubação, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 210 g e a concentração de NO foi determinada no sobrenadante. Para isso, 10 μL do sobrenadante foram aplicados no sistema do Analisador de NO (Nitric Oxide Analyzer – Sievers 280), as curvas de NO foram calculadas pelo software (NOA Software – NOAnalysis version 3.21), e a concentração de NO em cada amostra calculada a partir das integrais das áreas das curvas de resposta do detector, medidas para cada amostra. Os ensaios foram feitos em duplicata. Cada ponto experimental foi tomado como a média de duas determinações.

3.7. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados dos ensaios de QL-lum, QL-luc, citometria de fluxo e análise de NO foi realizada através de oneway ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

A análise do efeito de concentração de $\beta_2\text{GPI}$ sobre o “burst” respiratório de PMN no ensaio QL-lum foi feita pelo teste t, de comparação de médias de amostras independentes.

Para todos os conjuntos de resultados, arbitramos como 95% o valor da significância aceitável nos testes de hipótese empregados.

Os cálculos foram realizados com o programa SPSS (SPSS Inc.).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Purificação da β_2 -glicoproteína I

A β_2 GPI foi purificada a partir de um pool de soro humano, com rendimento de 3,3 mg de proteína por 50 mL de soro (66 mg/L). A fração correspondente à proteína nativa foi obtida da cromatografia do sobrenadante da precipitação do soro em ácido perclórico em uma coluna de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B, conforme a literatura (POLSZ et al, 1980).

As frações eluídas durante a passagem do tampão de 175 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5, mostraram a presença de formas diméricas e multiméricas da proteína (figura 4, linha 2), que correspondem aos principais contaminantes de ocorrência natural. Estas formas, com peso molecular de cerca de 95kDa e com mais de 100 kDa, foram identificadas e distinguidas da forma nativa nos géis de eletroforese SDS/PAGE corado pela prata, densitometria e imunoblot. Nesta fração, identificamos bandas com peso molecular aproximado de 50kDa que reagiram no imunoblot, mas não no ensaio imunoenzimático por competição utilizando anticorpo monoclonal anti- β_2 -glicoproteína I e que provavelmente correspondem às formas clivadas que originam os dímeros e multímeros da β_2 GPI. O rendimento total das frações coletadas durante a separação foi estimado a partir das absorbâncias a 280 nm, assumindo-se que o valor do coeficiente de extinção molar da β_2 GPI ($\epsilon_{280\text{nm}} = 1,0 \text{ mL/mg.cm}$) não varia com a dimerização.

A fração eluída durante a passagem do tampão de 350 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5, mostrou o perfil de bandas típico da proteína pura no gel corado pela prata (figura 4, linha 3), sendo a identidade da proteína nativa confirmada pela densitometria, imunoblot e atividade no ensaio ELISA por competição.

FIGURA 4- SDS-PAGE 12,5%, corado pela prata, de β_2 GPI (0,5 μ g) purificada a partir de precipitação de soro humano em ácido perclórico e cromatografia de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B. **Linha 1:** Padrão de Peso Molecular; **Linha 2:** Amostra eluída com tampão de 175 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5; **Linha 3:** Amostra eluída com tampão de 350 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5.

4.2. Eletroforese SDS-PAGE e densitometria

O aspecto típico da β_2 GPI após eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado pela prata está mostrado na figura 4. Os pesos moleculares, confirmados pela densitometria, estão indicados na figura.

A figura 4 mostra a presença de uma banda múltipla na altura correspondente ao peso molecular de 55 kDa, que é o peso esperado para a proteína nativa, em todas as amostras submetidas ao ensaio. Esta é a banda principal nas amostras eluídas com o tampão de 350 mM. A amostra retirada do eluato do tampão de 175 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5 da

cromatografia mostrou, além da banda referente aos 55 kDa, duas outras bandas mais fracas de 106 kDa e 91 kDa, compatíveis com a forma dimérica da β_2 -Glicoproteína I. As bandas na região de peso molecular maior do que 116 kDa correspondem, provavelmente, a formas multiméricas da β_2 GPI .

4.3. Imunoblot

A presença da β_2 GPI nativa nas amostras colhidas durante o processo de purificação foi confirmada por imunoblot . A figura 5 mostra que apenas a banda de 55 kDa, presente em todas as amostras, apresentou reatividade com os anticorpos monoclonal e policlonal anti- β_2 GPI .

FIGURA 5 - Imunoblot em membrana de nitrocelulose de β_2 GPI (2,0 μ g) purificada a partir de precipitação de soro em ácido perclórico e cromatografia de afinidade de Sepharose Heparina CL-6B. **A:** Amostra eluída com tampão de 175 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5; **B:** Amostra eluída com tampão de 350 mM NaCl/20 mM Tris, pH 8,5. **Linha 1:** Padrão de Peso Molecular; **Linha 2:** Reação com Ac monoclonal anti- β_2 GPI; **Linha 3:** Reação com Ac policlonal anti- β_2 GPI de soro de coelho. **Revelação** com Ac IgG de Cabra Anti-camundongo (Fc específico) conjugado a Peroxidase.

4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para β_2 -glicoproteína I

A determinação das concentrações plasmáticas de β_2 GPI dos doadores das amostras utilizadas na pesquisa foi feita através de um ensaio ELISA por competição. A proteína purificada foi utilizada como padrão para este ensaio. As concentrações plasmáticas de β_2 GPI encontradas, bem como a variação interindividual do nosso grupo amostral são compatíveis com os relatos da literatura. (Tabela 1)

Tabela 1. Concentração de β_2 GPI ($\mu\text{g/mL}$) no plasma de cada um dos doadores de sangue do grupo amostral. Cada medida corresponde à média de três determinações independentes. A média e o desvio padrão das idades e das concentrações plasmáticas de β_2 GPI dos componentes do grupo amostral são mostradas na última linha da tabela.

Amostra	Doador	Sexo	Idade	β_2 GPI ($\mu\text{g/mL}$)
1	S.L.N.	F	48	301
2	L.A.P.	F	24	236
3	M.C.J.S.	F	25	331
4	C.K.	F	24	344
5	R.L.A.	F	24	136
6	T.F.P.	F	20	957
7	M.L.F.	F	28	333
8	A.J.B.	F	23	104
9	A.A.C	F	55	1273
10	S.S.	F	25	149
11	T.V.O	F	24	374
12	V.M.F.G.	F	31	201
13	S.V.C	F	26	332
14	D.F.L.N.	M	25	232
15	P.R.S.	M	42	338
16	D.P.R.	M	22	305
17	C.M.C.	M	23	287
18	A.H.I.	M	30	422
19	E.J.O.	M	42	253
20	A.A.	M	30	229
21	T.P.	M	36	474
22	E.E.B.G.	M	24	523
23	F.E.V.B.	M	26	253
Média $\pm$ DP			29 $\pm$ 9	365 $\pm$ 262

A figura 6 mostra uma análise comparativa da competição das formas nativa da β_2 GPI e modificada contendo dímero, realizada num ELISA por competição. A forma modificada não competiu pelo Ac primário (Ac monoclonal anti- β_2 GPI) em placas de ELISA revestidas pela proteína na forma nativa.

FIGURA 6 – Ensaio Imunoenzimático para β_2 GPI. Curvas de competição pelo Ac Monoclonal anti- β_2 GPI Clone 5F7-ICN (1:1000 em PBS Twenn 1%) obtidas com as formas nativa ($\blacksquare$) e clivada, contendo dímero ($\square$), da proteína purificada, presentes nas alíquotas dos elutatos de 350 mM e 175 mM de sal, respectivamente. Sensibilização da placa Nunc - Maxisorp com 0,2 μ g de β_2 GPI na forma nativa. Revelação com Anticorpo IgG (Fc específico) de Cabra Anti-camundongo, conjugado a Peroxidase, diluído 1:5000.

4.5. Medidas da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

O efeito da β_2 GPI sobre a ativação de PMN isolados de sangue periférico humano foi estudado pela análise da quimioluminescência amplificada por luminol (QL-lum) e por lucigenina (QL-luc). Nestes ensaios, os PMN foram estimulados com zymosan opsonizado, e a velocidade de emissão de luz ou a emissão total foram calculadas, a partir de curvas de emissão medidas durante 30 minutos, como as mostradas na figura 7.

FIGURA 7 – Curva de emissão de luz produzida no ensaio de quimioluminescência amplificada por luminol (10^{-1} M) durante 30 minutos de incubação de PMN (10^5 céls) isolados de sangue humano. Linha pontilhada: PMN estimulados com zymosan opsonizado (10^6 partículas) na ausência de β_2 GPI; Linhas contínuas finas: PMN estimulados na presença de 5 μ g, 10 μ g e 20 μ g de β_2 GPI (A, B e C, respectivamente); Linha contínua espessa: PMN sem estímulo (basal). Luminômetro Berthold equipado para leitura em placas brancas de fundo chato, com 96 poços. URL/s: Unidades relativas de luz por segundo.

A emissão total de luz associada ao burst respiratório dos PMN estimulados com zymosan opsonizado diminuiu na presença de β_2 GPI quando considerados os ensaios de QL-lum, mas não de QL-lucig (Figura 8).

FIGURA 8 – Área integrada da curva de emissão de luz de PMN isolados de sangue humano (1×10^5 céls), estimulados com zymosan opsonizado (1×10^6 partículas) na presença ou não de $20 \mu\text{g}$ de β_2 GPI nativa. A – Ensaio de quimiluminescência amplificada por 10^{-1}M de luminol ($n=14$); B – Ensaio de quimiluminescência amplificada por 10^{-1}M de lucigenina ($n=13$). Luminômetro Berthold equipado para leitura em placas brancas de fundo chato, com 96 poços.

Como mostrado na figura 9A, a velocidade de emissão de luz diminuiu de forma dependente de concentração de β_2 GPI nos ensaios de QL-lum. Esta diminuição da quimiluminescência, expressa em Unidades Relativas de Luz por Segundo (URL/s) ocorreu em todos os diferentes doadores de células.

FIGURA 9 – Efeito da β_2 GPI sobre a velocidade máxima de emissão de luz, durante a quimiluminescência de PMN associada à fagocitose de zymosan opsonizado. Os símbolos correspondem a diferentes doadores de células. Ensaio em luminômetro Berthold equipado para leitura em placas brancas de fundo chato, com 96 poços. Meio de reação contendo 10^5 PMN, 10^{-1} M de luminol, 10^6 zymosan opsonizado e concentrações crescentes (abscissa) de β_2 GPI nativa (A) ou β_2 GPI modificada (dimérica ou clivada) (B). As curvas médias estão desenhadas no gráfico.

A forma modificada da proteína, contendo o dímero, não mostrou os efeitos de inibição do “burst” de PMN como a forma nativa (Figura 9B). A diferença entre os dois grupos de resultados foi evidenciada pela comparação da variação unitária da velocidade de emissão com a concentração de β_2 GPI, a partir dos dados mostrados na figura 9. Para isto, obtivemos as tangentes das curvas aproximadas para cada um dos conjuntos de pontos mostrados na figura 9 (Tabelas 2 e 3). Os coeficientes angulares das regressões lineares dessas tangentes foram então comparados utilizando o teste t para comparação de médias de amostras independentes ($p=0,01$). Nesta comparação, os coeficientes lineares das curvas de regressão não mostraram diferença significativa, indicando que a emissão das amostras sem a adição de β_2 GPI não foi diferente entre os indivíduos.

Tabela 2 – Estudo do efeito da forma nativa de β_2 GPI sobre a velocidade de emissão de luz no ensaio de QL-lum, medido como a variação unitária do efeito de concentração da proteína à partir do ponto inicial.

Amostra	Equação da reta tangente
1	$Y = -73.283 x + 587.27$
2	$Y = -59.135 x + 610.90$
3	$Y = -30.273 x + 639.24$
4	$Y = -41.543 x + 666.17$
5	$Y = -22.987 x + 602.17$
6	$Y = -34.434 x + 806.29$

Tabela 3 – Estudo do efeito da forma modificada (dimérica ou clivada) de β_2 GPI sobre a velocidade de emissão de luz no ensaio de QL-lum, medido como a variação unitária do efeito de concentração da proteína a partir do ponto inicial.

Amostra	Equação da reta tangente
1	$Y = -32.171 x + 1314$
2	$Y = 22.700 x + 497.57$
3	$Y = 8.0377 x + 977.82$
4	$Y = 7.8214 x + 321.07$
5	$Y = -42.546 x + 743.16$
6	$Y = -9.7416 x + 623.57$
7	$Y = -24.909 x + 943.97$

O efeito inibitório do “burst” não foi observado na quimiluminescência utilizando BSA ao invés de β_2 GPI (Figura 10), nem quando as células foram estimuladas com PMA (Figura 11).

FIGURA 10 – Estudo de especificidade do efeito de β_2 GPI sobre a quimioluminescência amplificada por luminol de PMN associada à fagocitose de zymosan opsonizado. Barras hachuradas: BSA. Barras brancas: β_2 GPI nativa. Ensaio num luminômetro Berthold equipado para leitura em placas brancas de fundo chato, com 96 poços. Meio de reação contendo 10^5 PMN, 10^{-1} M luminol, 10^6 zymosan opsonizado e β_2 GPI ou BSA como indicado na abcissa.

FIGURA 11 - Efeito da forma nativa de β_2 GPI sobre a quimioluminescência amplificada por luminol de PMN associada à ativação por PMA. Ensaio num luminômetro Berthold equipado para leitura em placas brancas de fundo chato, com 96 poços. Meio de reação contendo 10^5 PMN, 10^{-1} M luminol, 3ng/mL PMA e β_2 GPI como indicado na abcissa.

Nos ensaios de citometria a β_2 GPI aumentou a oxidação do DCFH nos PMN durante a fagocitose de zymosan opsonizado. A figura 12 mostra o efeito da β_2 GPI no metabolismo oxidativo, pelo delta do número de eventos adquiridos no citômetro de fluxo.

FIGURA 12 – Efeito da β_2 GPI nativa (20 μ g – □ e 60 μ g – □) na oxidação do DCFH pelas espécies reativas produzidas nos PMN de sangue total (100 μ L) colhido com citatro, estimulados ou não com zymosan opsonizado. Média geométrica da intensidade de fluorescência, subtraída dos valores medidos na ausência de β_2 GPI, medida em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

A figura 13 mostra os resultados da análise da concentração de NO no sobrenadante dos PMN estimulados com zymosan opsonizado na presença ou não da proteína. O zymosan por si, não estimulou a produção de NO nos PMN, mas a concentração de NO aumentou no sobrenadante das células estimuladas na presença de $\beta_2\text{GPI}$.

FIGURA 13 – Concentração de NO no sobrenadante de PMN (10^5 células) não estimulados (basal) e estimulados com zymosan opsonizado (10^6 partículas), na ausência e na presença de $\beta_2\text{GPI}$ nativa ($20\mu\text{g}$); medida em Analisador de Óxido Nítrico (Sievers 280). ApoH: $\beta_2\text{GPI}$.

DISCUSSÃO

5. Discussão

5.1. Obtenção das formas nativa e modificada da β_2 -glicoproteína I

A purificação da β_2 GPI na forma nativa é um procedimento que encontra discussão atual na literatura. O procedimento clássico para separação a partir de soro ou plasma é feito após precipitação com ácido perclórico, mas outras técnicas foram publicadas, sugerindo-se que este tratamento possa modificar a proteína (CAI et al., 1996; GALAZKA et al., 1998). Principalmente, não há um método de referência para aferir a pureza de preparações de β_2 GPI.

Está descrita a presença de contaminantes, em preparações comerciais ou produzidas em laboratórios de pesquisa, em amostras consideradas “puras”, discutindo-se a existência de formas quaternárias e multiméricas e de subunidades menores desta proteína (CAI et al., 1996; GALASKA et al., 1998).

A massa molecular da β_2 GPI, baseada na sua sequência de aminoácidos é de 40 kDa. Porém, devido a sua ampla glicosilação, preparações em SDS-PAGE mostram massas maiores que 50 kDa (WALSH et al., 1990). A β_2 GPI não se apresenta como uma banda única, mesmo quando pura. Está descrita a formação de um conjunto de bandas na região de 55 kDa, correspondente à proteína pura, devido à presença de variações na glicosilação e isoformas, na população humana (SCHOUSBOE, 1983; GRIES et al., 1989). Bandas com cerca de 97 kDa foram associadas com a forma dimérica e formas multiméricas da β_2 GPI foram evidenciadas por bandas maiores do que 116 kDa (BALASUBRAMANIAN et al., 1997).

Neste trabalho, as preparações da forma nativa da β_2 GPI foram consideradas adequadas quando continham bandas múltiplas na região entre 50 e 66 kDa, sem a presença de bandas de peso molecular menor ou de quantidades significativas de bandas na região de 100 kDa (Figura 4).

A β_2 GPI é uma molécula que possui até 5 isoformas principais e 5 menores, demonstráveis por focalização isoeletrica (SCHOUSBOE, 1983; GRIES et al., 1989). As diferentes isoformas de β_2 GPI parecem ser devidas às alterações na cadeia polipeptídica, até agora não muito bem caracterizadas. Quatro alelos tem sido

propostos (ApoH*1-4) para explicar a variação interindividual (KAMBOH et al., 1988). Porém, a variação na glicosilação, especificamente sialilação, tem sido proposta para justificar a diferença estrutural entre espécies isoelétricas. A variação no conteúdo de carboidrato pode ocorrer durante as preparações de β_2 GPI e influenciar nas propriedades funcionais da molécula.

Formas modificadas da β_2 GPI podem ser produzidas *in vivo* ou *in vitro*. Segundo HORBACH (1999), durante o processo de purificação da β_2 GPI de plasma humano usando cromatografia de afinidade a colunas de Sepharose Heparina, pode ocorrer clivagem proteolítica, gerando duas formas clivadas da proteína. Uma dessas formas é imunologicamente diferente da forma clivada de β_2 GPI gerada *in vivo* pela plasmina. A sequência N-terminal e o peso molecular de ambas as formas são idênticas. A diferença entre elas pode ocorrer por uma modificação na glicosilação e as diferenças imunológicas podem ser resultantes de diferenças na estrutura terciária. BRIGHTON et al. (1999) mostraram que 50% de uma de suas alíquotas, retirada da preparação da β_2 GPI a partir da precipitação do plasma em ácido perclórico, não mostrava afinidade pelos fosfolipídicos aniônicos em fase sólida por ELISA, mas manteve a afinidade pelo fosfolipídico aniônico vesicular, ainda que com menor afinidade quando comparada às preparações menos clivadas.

Neste trabalho, formas dimérica e clivada da proteína não foram caracterizadas estruturalmente. Entretanto, considerando a discussão presente na literatura sobre a presença de multímeros e o aspecto dos géis de SDS-PAGE das formas clivadas da proteína, consideramos como modificadas as alíquotas da proteína cuja eletroforese apresentasse bandas na região de 100kDa ou maiores (Figura 4). Embora somente as bandas entre 50 e 66 kDa da proteína dessas mesmas alíquotas apresentem reação similar à da proteína nativa no imunoblot com o Ac monoclonal anti- β_2 GPI, a sua mudança estrutural é evidenciada no ensaio ELISA por competição. Neste ensaio, a forma modificada de β_2 GPI, dimérica ou clivada, não compete com a forma nativa, adsorvida na placa, pelo Ac monoclonal anti- β_2 GPI (Figuras 5 e 6). As preparações da proteína contendo frações de peso molecular correspondente ao do dímero e bandas na região de 50kDa, simultaneamente, também foram diferentes das preparações da forma nativa quanto à inibição da quimiluminescência dos PMN estimulados com zymosan opsonizado

(Figura 9). Nossos resultados não permitiram avançar na discussão deste efeito, uma vez que ainda não é conhecida a composição da proteína nas suas frações modificadas e nem está descrito o mecanismo de inibição da quimioluminescência. Entretanto, foi possível demonstrar que a integridade estrutural é necessária para que ocorra o efeito de inibição sobre a quimioluminescência dependente de luminol.

5.2. Concentrações plasmáticas de β_2 -glicoproteína I

Não são descritos valores de referência para concentrações plasmáticas de β_2 GPI em humanos. Contudo, os valores das concentrações plasmáticas da proteína nos doadores de sangue do nosso grupo amostral (Tabela 1) correspondem aos referidos na literatura para indivíduos aparentemente saudáveis (BRIGHTON et al., 1996; ARVIEUX et al., 1996; BALASUBRAMANIAN & SCHROIT, 1998; BIASIOLO et al., 1999; YASUDA et al., 2000; GOMES et al., 2004b). Vale ressaltar que, de acordo com os resultados do ensaio ELISA por competição, obtidos com as formas nativa e modificada da proteína, somente a forma nativa foi quantificada no plasma dos nossos doadores.

5.3. Efeito da β_2 -glicoproteína I sobre a produção de ERON associada à fagocitose de zymosan por PMN

A β_2 GPI foi anteriormente proposta como um inibidor da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por macrófagos durante a fagocitose de zymosan (GOMES et al., 2002 e 2004a). Nestes trabalhos foi usado o ensaio de QL-lum. Embora não sendo uma reação específica, a quimioluminescência é uma técnica bastante utilizada para estudos do “burst” respiratório especialmente em estudos experimentais e em ensaios clínicos em que os controles são facilmente produzidos. O zymosan, opsonizado ou não, é um estímulo usual nestes ensaios.

O zymosan opsonizado ativa o “burst” respiratório dos fagócitos por ser capaz de ligar aos receptores do complemento e de imunoglobulinas, induzindo uma cascata de sinalização celular que leva à ativação da Proteína Kinase C (PKC) e uma conseqüente ativação da NADPH oxidase (LILIUS & MARNILA, 1992; THELEN

& DEWALD, 1993). A estimulação dos neutrófilos pelo zymosan opsonizado ocorre através do receptor de superfície CR3 (Receptor de Complemento do tipo 3) (LINDENA & BURKHARDT, 1990). O ligante para CR3 do zymosan não opsonizado é um polissacarídeo glicano presente na superfície da partícula (LINDENA et al., 1987). Em macrófagos, a ativação por zymosan é diminuída com o uso de anticorpo monoclonal específico para CR3 e também com um inibidor de Receptor Fucosil-Manosil (MFR), a manana (EZEKOWITZ et al., 1985). O reconhecimento de partículas não-ativadoras versus partículas ativadoras da via alternativa do complemento é modulado por constituintes de superfície. O zymosan, por exemplo, é transformado de uma partícula ativadora para uma partícula não-ativadora quando heparina-glicosaminoglicana é associada à sua superfície (KAZATCHKINE et al., 1979). Por analogia com a inibição induzida por lecitinas específicas, Smith e colaboradores propuseram que um fator sérico, contendo um sítio receptor para resíduos de glicosil e manosil poderia ligar-se ao zymosan, prevenindo a ativação da via alternativa do complemento (SMITH et al., 1982). Trabalhos anteriores do grupo demonstraram que β_2 GPI pode inibir esta ativação (Knox de Souza et al., 2001; Gomes et al., 2002; Gomes et al., 2004a).

A β_2 GPI também inibiu a QL-lum durante a fagocitose de zymosan opsonizado por PMN (Figuras 7 e 8A). Este efeito da β_2 GPI sobre o "burst" respiratório de PMN, como descrito em macrófagos, depende da ativação da célula por um estímulo particulado, além da integridade estrutural da proteína (Figura 11).

A ativação dos neutrófilos por PMA, um análogo sintético do diacilglicerol, ocorre de forma distinta da iniciada por zymosan. PMA ativa diretamente a PKC intracelular e produz a polimerização da NADPH oxidase, gerando o burst respiratório sem a intervenção de mecanismos dependentes de receptores de membrana (LINDENA & BURKHARDT, 1990). A ausência do efeito de β_2 GPI em fagócitos ativados por PMA, sugere que receptores de membrana são importantes para este efeito da proteína, como já havia sido sugerido por CARVALHO et al. (1999) e GOMES et al. (2002).

Entretanto, o efeito inibitório verificado com o luminol não ocorreu no ensaio de QL-luc (Figura 8B). Além disso, a medida de oxidação do DCFH mostrou um aumento do metabolismo oxidativo durante a fagocitose do zymosan opsonizado, na

presença de β_2 GPI (Figura 12). Este conjunto de resultados não pode ser explicado por uma inibição da produção de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, um outro mecanismo, que não a simples inibição do “burst” respiratório deve ser responsável por estes efeitos.

Uma hipótese inicial para explicar a diferença de efeito observada com o luminol e a lucigenina foi traçada, considerando-se a diferença de reatividade das sondas utilizadas com as diferentes espécies reativas produzidas (MYHRE et al., 2003). Durante o “burst” respiratório, ocorrem o aumento do consumo de oxigênio molecular e a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, que produz ânion superóxido (O_2^-). Como produtos secundários desta ativação, são formados peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras ERO, que respondem pela atividade microbicida dependente de oxigênio dos PMN (BABIOR et al., 1973). A luminescência é um produto natural desse metabolismo oxidativo e pode ser usada para monitorar a ativação dos fagócitos. A emissão de luz ocorre pela produção de fótons quando moléculas excitadas eletronicamente após oxidação por ERO voltam ao seu estado de repouso (ALLEN, 1982). Para aumentar a sensibilidade das medidas de emissão de luz, é usual utilizarem-se moléculas amplificadoras, como o luminol e a lucigenina.

O luminol está descrito como permeante nas células. Reage com diferentes ERO, tanto no compartimento intracelular como extracelular. A lucigenina reage especificamente com O_2^- extracelular e não é permeante nas células (CALDEFIE-CHÉZET et al., 2002). Esta diferença na sensibilidade das duas sondas de QL levou-nos à hipótese de que a β_2 GPI pudesse estar atuando no processo de degranulação dessas células, envolvendo a compartimentalização da mieloperoxidase (MPO). A MPO produz o ácido hipocloroso (HClO) a partir de O_2^-/H_2O_2 e Cl^- , nos granulócitos. E é liberada no vacúolo fagocítico e no meio extracelular durante a fagocitose. O HClO é o principal produto de catálise do sistema MPO (CLARK, 1990; HAMPTON et al., 1998). Desta forma, uma vez que a quimiluminescência do luminol tem maior sensibilidade para demonstrar a presença de HClO e de H_2O_2 /MPO do que a lucigenina, o efeito diferencial entre as duas sondas é compatível com uma menor degranulação. Porém, este efeito não explica os resultados obtidos na citometria de fluxo.

O DCFH-DA é um composto apolar, não fluorescente e estável, que se difunde através da membrana celular. No interior da célula, seus grupos acetil são clivados por esterases produzindo diclorofluoresceína (DCFH) não fluorescente, que é rapidamente oxidada a um composto altamente fluorescente na presença de espécies oxidantes, a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (VOWELLS et al., 1995). Embora tenha sido proposto como uma sonda fluorescente específica para a produção intracelular de H_2O_2 , foi demonstrado que a oxidação de DCFH a DCF por H_2O_2 depende da presença simultânea de peroxidases no compartimento testado (HERABAYASHI et al., 1985; LIEBERMAN et al., 1996; MYHRE et al., 2003; WALRAND et al., 2003). Desta forma, no caso de inibição de degranulação dos PMN, poderia haver um aumento na oxidação do DCFH, pela preservação do sistema enzimático intracelular ao longo do ensaio, até a medida por citometria.

Entretanto, outra hipótese pode ser formulada a partir dos dados da literatura, a de que β_2 GPI produz um efeito sobre a oxidação das diversas sondas utilizadas a partir de um aumento na produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN). DIKSHIT & SHARMA (2002) mostraram que o DCFH-DA também reage com ERN. Em neutrófilos humanos e sistemas livres de células o DCFH mostrou-se sensível à oxidação por $ONOO^-$, H_2O_2 em combinação com peroxidases celulares, peroxidases, e $\cdot OH$. MYHRE et al. (2003) referem baixa sensibilidade do DCFH para a medida de $\cdot NO$, $HClO$ e O_2^- em sistemas biológicos.

Enquanto o O_2^- é produzido pela NADPH oxidase, o $\cdot NO$ é produzido por uma enzima óxido nítrico sintase independente de cálcio (iNOS), pela deaminação oxidativa de L-arginina a L-citrulina, na presença de cofatores NADPH, 6(R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, dinucleotídeo adenina flavina e protoporfirina férrica IX (WANG et al., 1993; RUBBO et al., 1996). Então, $\cdot NO$ e O_2^- reagem para formar $ONOO^-$ numa velocidade limitada por difusão ($K = 6,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) que é aproximadamente 3,5 vezes mais rápida que a reação de catálise do O_2^- pela superóxido dismutase (SOD) em pH neutro ($K_{SOD} = 2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Na célula ou em meio extracelular, $ONOO^-$ pode se decompor para gerar outras espécies reativas como radical hidroxila e dióxido de nitrogênio que são potentes oxidantes capazes de oxidar desoxirribose, dimetilsulfoxida, ou sulfidrilas e induzir a peroxidação de lipídeos de membrana (WANG et al., 1993). Segundo Mihre

et al. (2003), ONOO^- e $\cdot\text{OH}$ podem ser os únicos oxidantes que oxidam DCFH em segundos ou poucos minutos, enquanto os outros oxidantes podem precisar de altas concentrações e maior tempo (MIHRE et al., 2003).

Na QL-lum, embora ONOO^- tenha um efeito indutor, $\cdot\text{NO}$ pode limitar os processos oxidativos por reagir com radicais orgânicos. A formação de adutos termina a reação de propagação de cadeia, e a reação com intermediários do processo de quimioexcitação do luminol, leva a uma via de rota oculta (CASTRO et al., 1996). Uma modulação da QL-lum pode ocorrer ainda por inibição da NADPH oxidase ou por efeito “scavenger”, mas estes efeitos não correspondem ao encontrado nos nossos ensaios com a lucigenina (CLANCY et al., 1992; RUBANYI et al., 1991; SETH et al., 1994).

O papel do $\cdot\text{NO}$ nos PMN não está bem definido; ele tem sido apresentado como um agente microbicida nos citoplastos dessas células (MALAWISTA et al., 1992), envolvido na quimiotaxia (KAPLAN et al., 1989; BELENKY et al., 1993), adesão endotelial (KUBES et al., 1991), agregação (MCCALL et al., 1988) e lesão tecidual mediada por PMN (MULLIGAN et al., 1991). Por outro lado, a $\beta_2\text{GPI}$ já foi sugerida como indutora de aumento da produção de $\cdot\text{NO}$ durante a resposta de macrófagos peritoniais inflamatórios diante de formas amastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* na presença de $\beta_2\text{GPI}$ (KNOX DE SOUSA et al., 2001).

O zymosan opsonizado por si, não aumenta a produção de $\cdot\text{NO}$ nos PMN (Figura 10). Esse resultado é consistente com os resultados de Wang et al. (1993) e suas citações, Schmidt et al. (1989) e Keller et al. (1990), que não detectaram produção de $\cdot\text{NO}$ ao estimularem granulócitos humanos e neutrófilos peritoneais de rato com esse estímulo, além de outros. Porém, como mostrado na figura 13, no sobrenadante das células estimuladas por zymosan opsonizado na presença de $\beta_2\text{GPI}$, a concentração de $\cdot\text{NO}$ é maior do que a encontrada nos controles da reação. Com o aumento na produção de $\cdot\text{NO}$, pode ocorrer mudança na produção das ERO derivadas do O_2^- , que passa a reagir preferencialmente com o $\cdot\text{NO}$. O ONOO^- resultante implica aumento na oxidação do DCFH e, dependendo da condição oxidante e do grau de degranulação dos PMN, inibição na QL-lum induzida por $\beta_2\text{GPI}$ durante a fagocitose de zymosan. Este achado indica que a modificação na proporção das ERO produzidas durante a fagocitose pode responder

simultaneamente pelo conjunto dos efeitos observados. Portanto, os efeitos de β_2 GPI sobre o metabolismo oxidativo de PMN são provavelmente mediados pelo aumento na formação de ONOO^- , derivado da reação de $\cdot\text{NO}$ com o O_2^- produzido durante o “burst respiratório”, associado ou não a efeitos sobre a compartimentalização da MPO.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

As formas nativa e modificada (dimérica ou clivada) da proteína são distintas quanto à sua capacidade de competir com a forma nativa, adsorvida em fase sólida, pelo Ac monoclonal anti- β_2 GPI. Esta propriedade da β_2 GPI pode ser utilizada para determinar a concentração da forma nativa em plasma humano.

Durante a fagocitose de zymosan por PMN isolados, a quimioluminescência dependente de luminol, mas não de lucigenina, diminui na presença da forma nativa de β_2 GPI. A forma modificada, contendo o dímero da β_2 GPI, não é capaz de inibir a quimioluminescência amplificada por luminol. O efeito inibitório da β_2 GPI nativa não é verificado na ativação das células por PMA.

A oxidação de DCFH associada à fagocitose de zymosan opsonizado por PMN de sangue periférico aumenta na presença de β_2 GPI.

A produção de $^{\bullet}\text{NO}$ aumenta durante a fagocitose de zymosan opsonizado por PMN isolados na presença de β_2 GPI.

A presença de β_2 GPI resulta em mudança no perfil de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas durante o burst respiratório de PMN, associada ou não a efeitos sobre a compartimentalização da MPO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas*

- ALLEN, R.C. Biochemiexcitation: chemiluminescence and the study of biological oxygenation reations. In: ADAM, W., CILENTO, G., eds. **Chemical and biological generation of excited states**. New York: Academic Press, 1982. p. 309-344.
- ARVIEUX, J., DARNIGE, L., HACHULLA, E., ROUSSEL, B., BENZA, J.C., COLOMB, M.G. Species specificity of anti- β_2 -Glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitation. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.75, p.725-730, 1996.
- AVERNA, M., PARAVIZZINI, G., MARINO, G., EMMANUELE, G., CEFALU, A.B., MAGRO, G., BARTOLONI, G., RAGUSA, M., NOTO, D.E., BARBAGALLO, C. M., CALLARI, D., MAZZARINO, J.C., NOTARBARTOLO, A., TRAVALI, S. β_2 -glycoprotein I is growth regulated and plays a role as survival factor for hepatocytes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Oxford, v.36, p.1297-1305, 2004.
- BABIOR, B.M., KIPNES, R.S., CURNUTTE, J.T. The production by leukocytes of superoxide: a potential bacteridal agent. **J. Clin. Invest.**, New York, v.52, p.741-744, 1973.
- BALASUBRAMANIAN, K., CHANDRA, J., SSCHROIT, A. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes: the role of β_2 -glycoprotein I in macrophage recognition. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.272, p.31113-31117, 1997.

* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- BALASUBRAMANIAN, K., SCHROIT, A.J. Characterization of phosphatidylserine-dependent β_2 -glycoprotein I macrophage interactions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.29272-29277, 1998.
- BALASUBRAMANIAN, K., KILLION, J.J., SCHROIT, A.J. Estimation of plasma β_2 -glycoprotein I levels by competitive ELISA. **Thromb. Res.**, Oxford, v.92, p.91-97, 1998.
- BELENKY, S.N., ROBBINS, R.A., RUBINSTEIN, I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro. **J. Leukocyte Biol.**, Bethesda, v.53, p.498-503, 1993.
- BIASIOLO, A., RAMPAZZO, P., BROCCO, T., BARBERO, F., ROSATO, A., PENGO, V. [Anti- β_2 -glycoprotein I - β_2 -glycoprotein I] immune complexes in patients with antiphospholipid syndrome and other autoimmune diseases. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.121-126, 1999.
- BLANK, M., KRAUSE, I., FRIDKIN, M., KELLER, N., KOPOLOVIC, J., GOLDBERG, I., TOBAR, A., SHOENFELD, Y. Bacterial induction of autoantibodies to β_2 -glycoprotein I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. **J. Clin. Invest.**, New York, v.109, p.797-804, 2002.
- BRIGHTON, T.A., CHESTERMAN, C.N. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. **Baillieres Clin. Haematol.**, Philadelphia, v.7, p.541-547, 1994.
- BRIGHTON, T.A., HOGG, P.J., DAY, Y.-P., MURRAY, B., CHONG, B.H., CHESTERMAN, C.N. β_2 -Glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.93, p.185-194, 1996.
- BRIGHTON, T.A., DAÍ, Y., HOGG, P.J., CHESTERMAN, C.N. Microheterogeneity of β_2 -glycoprotein I: Implications for binding to anionic phospholipids. **Biochem. J.**, London, v.340, p.59-67, 1999.
- CAI, G., GUO, Y., SHI, J. Purification of apolipoprotein H by polyethylene glycol precipitation. **Protein Expression Purif.**, San Diego, v.8, p.341-346, 1996.

- CALDEFIE-CHÉZET, F., WALRAND, S., MOINARD, C., TRIDON, A., CHASSAGNE, J., VASSON, M-P. Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.319, p.9-17, 2002.
- CARVALHO, A.M., MONTEIRO, H.P., CHAN, S.S., CHAIMOVICH GURALNIK, H., JUNQUEIRA, V.B.C., GOMES, S.L. β_2 -glycoprotein I stimulates chemiluminescence of neutrophils. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 28., Caxambú, 1999. **Programa e Resumos**. São Paulo, SBBq, 1999. p.151, res.O23.
- CASTRO, L., ALVAREZ, M.N., RADI, R. Modulatory role of nitric oxide on superoxid-dependent chemiluminescence. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.333, p.179-188, 1996.
- CELLI, C.M. **Interação de anticorpos antifosfolipídios com seus epitopos e o papel da β_2 -glycoprotein I**. São Paulo, 1997. 135p. [Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo].
- CHONN, A., SEMPLET, S.C., CULLIS, P.R. β_2 -glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of non-self particles. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.270, p.25845-25849, 1995.
- CLANCY, R.M., LESZCZYNSKA-PIZIAK, J., ABRAMSON, S.B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J. Clin. Invest.**, New York, v.90, p.1116-1121, 1992.
- CLARK, R.A. The human neutrophil respiratory burst oxidase. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.161, p.1140-1147, 1990.
- CONTI, F., SORICE, M., CIRCELLA, A., ALESSANDRI, C., PITTONI, V., CARONTI, B., ALDERARO, C., GRIGG, T. β_2 -Glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with tissue factor expression. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.132, p.509-516, 2003.

- DE GROOT, P.G., BOUMA, B., LUTTERS, B.C.H., SIMMELINK, M.J.A., DERKSEN, R.H.W.M., GROS, P. Structure-function studies on β_2 -Glycoprotein I. **J. Autoimmun.**, London, v.15, p.87-89, 2000.
- DIKSHIT, M., SHARMA, P., Nitric oxide mediated modulation of free radical generation response in the rat polymorphonuclear leukocytes: a flow cytometer study. **Methods Cell Sci.**, India, v.24, p.69-76, 2002.
- EZEKOWITZ, R.A.B., SIM, R.B., MACPHERSON, G.G., GORDON, S. Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro. **J. Clin. Invest.**, New York, v.76, p.2368-2376, 1985.
- GALAZKA, M., KEIL, L.B., KOHLES, J.D., LI, J., KELTY, S.P., PETERSHEIM, M., DEBARI, V.A. A stable, multi-subunit complex of β_2 -glycoprotein I, **Thromb. Res.**, Oxford, v.90, p.131-137, 1998.
- GEORGE, J., GILBURD, B., LANGEVITZ, P., LEVY, Y., NEZLIN, R., HARATS, D., SHOENFELD, Y. β_2 -glycoprotein I containing immune-complexes in lupus patients: association with thrombocytopenia and lipoprotein (a) levels. **Lupus**, Basingstoke, v.8, p.16-122, 1999a.
- GEORGE, J., HARATS, D., GILBURD, B., ARNON, A., LEVY, Y., SCHNEIDERMAN, J., SCHOENFELD, Y. Immunolocalization of β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques. **Circulation**, Dallas, v.99, p. 2227-2237, 1999b.
- GHARAVI, A.E., PIERANGELI, S.S., HARRIS, E.N. New developments in viral peptides and APL induction. **J. Autoimmun.**, London, v.15, p.227-230, 2000.
- GOLDSMITH, G.H. PIERANGELLI, L.S., BRANCH, D.W., GHARAVI, A.E., HARES, E.N., Inibition of protrombin activation by antiphospholipids antibodies and β_2 -glycoprotein I. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.87, p.548-554, 1994.
- GOMES, L.F., GONÇALVES, L.M., FONSECA, F.L.A., CELLI, C.M., VIDELA, L.A., JUNQUEIRA, V.B.C. β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) modulates uptake and endocytosis associated chemiluminescence in rat Küpffer cells. **Free Radical Res.**, Amsterdam, v.36, p.741-747, 2002.

- GOMES, L.F., KNOX DE SOUZA, P.R., GIAVAROTTI, K.A.S., JUNQUEIRA, V.B.C., SANS, J., VIDELA, L.S. β_2 -glycoprotein I inhibition of mouse Kupffer cells respiratory burst is dependent on liver architecture. **Comp. Hepatol.**, London, v.3, suppl I, p.S43, 2004a.
- GOMES, L.F.; ALVES, A.L.F.L.; SEVANIAN, A.; PERES, C.A.; CENDOROGLO, M.S.; MELLO-ALMADA FILHO, C.; QUIRINO, L.M.; RAMOS, L.R.; JUNQUEIRA, V.B.C. Role of β_2 -Glycoprotein I, LDL-, and Antioxidant Levels in Hypercholesterolemic Elderly Subjects. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v.6, p.237-244, 2004b.
- GRIES, A., NIMPF, J., WURM, H., KOSTNER, G.M., KENNER, T. Characterization of isoelectric subspecies of asialo-beta2-glycoprotein I. **Biochem. J.**, London, v.260, p.531-534, 1989.
- GUERIN, J., SHENG, U., REDDEL, S., IVERSON, M., CHAPMAN, M.G., KRILIS, S.A. Heparin inhibits the binding of β_2 -Glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.277, p.2644-2649, 2002.
- HAMMEL, M., SCHWARZENBACHER, R., GRIES, A., KOSTNER, G.M., LAGNER, P., PRASSL, R. Mechanism of the interaction of β_2 -glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes. **Biochemistry**, Washington, v.40, p.14173-14181, 2001.
- HAMPTON, M.B., KETTLE A.J., WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, mieloperoxidase and bacterial killing. Review article. **Blood**, Philadelphia, v.92, p.3007-3017, 1998.
- HERABAYASHI, Y., TANIUCHI, S., KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrofiles in whole blood using flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.82, p.253-259, 1985.
- HORBACH, D.A., OORT, E., TEMPELMAN, J.M., DERKSEN, R.H.W.M., GROOT, P.G. The prevalence of a non-phospholipid-binding form of β_2 -glycoprotein I in human plasma. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.80, p.791-797, 1998.

- HORBACH, D.A., OORT, E., LISMAN, T., MEIJERS, J.C.M., DERKSEN, R.H.W.M., GROOT, P.G. β_2 -glycoprotein I is proteolytically cleaved *in vivo* upon activation of fibrinolysis. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v.81, p.87-95, 1999.
- ITOH, Y., INUZUKA, K., KOHNO, I., WADA, H., SHIKU, H., OHKURA, N., KATO, H. Highly increased plasma concentrations of the nicked form of beta(2) glycoprotein I in patients with leukemia and with lupus anticoagulant: measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain V. **J. Biochem.**, Tokyo, v.128, p.1017-1024, 2000.
- KAMBOH, M.I., FERRELL, R.E., SEPEHRNIA, B. Genetic studies of human apolipoproteins. IV. Structural heterogeneity of apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.42, p.452-457, 1988.
- KAPLAN, S.S., BILLIAR, T., CURRAN, D., ZDZIARSKI, U.E., SIMMONS, R.L., BASFORD, R.E. Inhibition of chemotaxis with N^G -monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. **Blood**, Philadelphia, v.74, p.1885-1887, 1989.
- KAZATCHKINE, M.D., FEARON, D.T., SILBER, J.E., AUSTEN, K.F.
Surface-associated heparin inhibits zymosan-induced activation of the human alternative complement pathway by augmenting the regulatory action of the control proteins on particle-blood C3b. **J. Exp. Med.**, New York, v.150, p.1202-1215, 1979.
- KELLER, R., KEIST, R., ERB, P., AEBISCHER, T., DE LIBERO, G., BALZER, M., GROSCURTH, P., KELLER, H.U. Expression of cellular effector functions and production of reactive nitrogen intermediates: a comparative study including T lymphocytes, T-like cells, neutrophil granulocytes, and mononuclear phagocytes. **Cell Immunol.**, v.131, p. 398-403, 1990. *apud* WANG, J-F., KOMAROV, P., GROOT, H. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: The role of NO, O_2^-/H_2O_2 e HClO. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.304, p.189-196, 1993.
- KITAGAWA, S., JOHNSTON, R.B. Deactivation of the respiratory burst in activated macrophages: evidence for alteration of signal transduction. **J. Immunol.**, Philadelphia, v.136, p.2605-2612, 1986.

- KNOX DE SOUSA, P., BARCINSKI, M.A., JUNQUEIRA, V.B.C., GOMES, L.F. Modulation of macrophage functional activity by β_2 -glycoprotein I during phagocytosis of leishmania (L) amazonensis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., Caxambú, 2001. **Programa e Resumos**. São Paulo, SBBq, 2001. p.207, res.T02.
- KOBAYASHI, K., MATSUURA, E., LIU, Q., FURUKAWA, J., KAIHARA, K., INAGAKI, J., ATSUMI, T., SAKAIRI, N., YASUDA, T., VOELKER, D.R., KOIKE, T. A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.42, p.697-709, 2001.
- KUBES, P., SUZUKI, M., GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.88, p.4651-4655, 1991.
- LIEBERMAN, M.M., SACHANANDANI, D.M., PINNEY, C.A. Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. **Clin. Diagn. Lab. Immun.**, Washington, v.3, p.654-662, 1996.
- LILIUS, E.M., MARNILA, P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. **Experientia**, Basel, v.48, p.1082-1091, 1992.
- LIN, K.Y., PAN, J.P., YANG, D.L., HUANG, K.T., CHANG, M.S., DING, P.Y.A., CHIANG, A.N. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Life Sci.**, Oxford, v.69, p.707-719, 2001.
- LINDENA, J., BURKHARDT, H., DWENGER, A. Mechanisms of non-opsonized zymosan-induced and luminol-enhanced chemiluminescence in whole blood and isolated phagocytes. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, Berlin, v.25, p.765-778, 1987.
- LINDENA, J., BURKHARDT, H. Chemiluminescence properties of human, canine, and rat polymorphonuclear cells. **J. Biolumin. Chemilumin.**, Chichester, v.5, p.165-170, 1990.

- LOSIER, J.A., TAKAHASHI, N., PUTNAM, F.W. Complete amino acid sequence of human plasma β_2 -glycoprotein I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.81, p.3640-3644, 1984.
- McCALL, T., WHITTLE, B.J.R., BOUGHTON-SMITH, N.K., MONCADA, S. Inhibition of FMLP-induced aggregation of rabbit neutrophils by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.93, p.517, 1998. [resumo]
- MALAWISTA, S.E., MONTGOMERY, R.R., BLARICOM, G.V. Evidence for reactive nitrogen intermediate in killing of Staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorfonuclear leucocytes. **J. Clin. Invest.**, New York, v.90, p.631-636, 1992.
- MARTINS, P.S., KALLAS, E.G., CENDORO GLO NETO, M., DALBONI, M.A., BLECHER, S., SALOMÃO, R. Upregulation of reactiv oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **Shock**, Augusta, v.20, p.208-212, 2003.
- MEHDI, H., NUNN, M., STEEL, D.M., WHITEHEAD, A.S., PEREZ, M., WALKER, M., PEEPLES, M.E. Nucleotide sequence and expression of the human gene encodg apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Gene**, Amsterdan, v.108, p.293-298,1991.
- MEHDI, H., ASTON, C.E., SANGUERA, D.K., HAMMAN, R.F., KAMBOH, M.I. Genetic variation in the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. **Hum. Genet.**, Berlin, v.105, p.63-71, 1999.
- MYHRE, O., ANDERSEN, J.M., AARNES, H., FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicator of reactive species formation. **Biochem. Pharmacol.**, London, v.65, p.1575-1582, 2003.
- MOESTRUP, S.K., SCHOUSBOE, I., JACOBSEN, C., LEHEST, J., CHRISTENSEN, E.I., WILLNOW, T.E. β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) and β_2 -glycoprotein I – phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. **J. Clin. Invest.**, New York, v.102, p.902-909, 1998.

- MULLIGAN, M.S., HEVEL, J.M., MARLETTA, M.A., WARD, P.A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.88, p.6338-6342, 1991.
- NAKAYA, Y., SCHAEFER, J., BREWER, H.B. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.95, p.1168-1174, 1980.
- POLZ, E., WURM, H., KOSTNER, G.M. Investigations on β_2 -glycoprotein I in the rat: isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.11, p.265-570, 1980.
- RUBANYI, G.M., HO, E.H., CANTOR, E.H., LUMMA, W.C., BOTELHO L.H.P. Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.181, p.1392-1397, 1991.
- RUBBO, H., DARLEY-USMAR, V., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. **Chem. Res. Toxicol.**, Washington, v.9, p.809-820, 1996.
- SANGUERA, D.K., KRISTENSEN, T., HAMMAN, R.F., KAMBOH, M.I. Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) protein polymorphism. **Hum. Genet.**, Berlin, v.100, p.57-62, 1997a.
- SANGUERA, D.K., WAGENKENECHT, D.R., MCINTYRE, J.A., KAMBOH, M.I. Identification of structural mutations in fifth domain of apolipoprotein H which affect phospholipid binding. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.6, p.311-316, 1997b.
- SETH, P., KUMARI, R., DIKSHIT, M., SRIMAL, R.C. Modulation of rat peripheral polymorphonuclear leukocyte response by nitric oxide and arginine. **Blood**, Philadelphia, v.84, p.2741-2748, 1994.
- SELLAR, G.C., KEANE, J., MEHDI, H., PEEPLES, M.E., BROWNE, N., WHITEHEAD, A.S. Characterization and acute phase modulation of canine apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.191, p.1288-1293, 1993.

- SCHMIDT, H.H.H.W., SEIFERT, R., BÖHME, E. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B₄. **FEBBS Lett.**, v.244, p.357-360, 1989. *apud* WANG, J-F., KOMAROV, P., GROOT, H. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: The role of NO, O₂⁻/H₂O₂ e HclO. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.304, p.189-196, 1993.
- SCHOUSBOE, I. Characterization of subfrations of beta2-glycoprotein I: evidence for sialic acid microheterogeneity. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v. 15, p.35-44, 1983.
- SCHULTZ, H.E., HEIDE, K., HAUPT, H. Über ein bisher unbekanntes neidermolekul es beta2-globulindes humanseruns. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.48, p.719-726, 1961.
- SMITH, M.C., PENSKY, J., NAFF, G.B. Inhibition of zymosan-induced alternative complement pathway activation by concanavalin A. **Infect. Immun.**, Washington, v.38, p.1279-1284, 1982.
- THELEN, M., DEWALD, B., BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction an activation of the respiratory burst. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.73, p.797-821, 1993.
- VOWELLS, S.J., SEKHSARIA, S., MALECH, H.L., SHALIT, M., FLEISHER, T.A. Flow cytometric analysis of the granulocyte espiratory burst: a compaision study of fluorescent probes. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.178, p.89-97, 1995.
- WALRAND, S., VALEIX, S., RODRIGUEZ, C., LIGOT, P., CHASSAGME, J., VASSON, M.P. Flow cytometer study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.331, p.103-110, 2003.
- WALSH, M.T., WATZLAWICK, H., PUTNAM, R.W., SCHMID, K., BROSSMER, R. Effect of the carbohydrate moiety on the secondary structure of beta 2-glycoprotein I. Implications for the biosynthesis and folding of glycoproteins. **Biochemistry**, Washington, v.29, p.6250-6257, 1990.

- WANG, J-F., KOMAROV, P., GROOT, H. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: The role of NO, O_2^-/H_2O_2 e HClO. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.304, p.189-196, 1993.
- YASUDA, S. TSUTSUMI, A., CHIBA, H., YANAI, H., MIYOSHI, Y., TAKEUCHI, R., HORITA, T., ATSUMI, T., ICHIKAWA, K., MATSUURA, E., KOIKE, T. β_2 -glycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.152, p.337-346, 2000.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 113

São Paulo, 01 de outubro de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Elisângela Monteiro Pereira

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 29 de setembro passado, **APROVOU** o projeto "Modulação diferencial da ativação de fagócitos de sangue periférico por β 2-Glicoproteína I" (Protocolo nº 211) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas:

- 1) Ser incluído no corpo do projeto o número de indivíduos que serão recrutados para a pesquisa.
- 2) Ser anexado declaração de anuência da Chefia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, onde será desenvolvida a pesquisa.

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

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Lígia Ferreira Gomes
FBC

ANEXO II

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
- Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
- Data de Nascimento:...../...../.....
- Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
- Bairro:..... Cidade:.....
- CEP:..... Telefone:.....
2. Responsável Legal:.....
- Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
- Documento de Identidade Nº:..... Sexo: () M () F
- Data de Nascimento:...../...../.....
- Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
- Bairro:..... Cidade:..... CEP:..... Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:.....Modulação Diferencial da Ativação de Fagócitos de Sangue Periférico por β_2 -Glicoproteína I
2. Pesquisador:.....Elisângela Monteiro Pereira

Cargo/Função: Farmacêutica-Bioquímica Inscrição Conselho Regional Nº:12.252/MG
Departamento da FCF/USP:..Análises Clínicas e Toxicológicas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo (X) Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

O risco associado à coleta de amostras de sangue venoso periférico é a possibilidade de sangramento de curta duração (minutos) e eventual formação de hematoma no local da punção venosa. Não há risco tardio. O procedimento de coleta é desenhado para minimizar o risco de sangramento. Após a coleta, o paciente deve manter o braço estendido e o local da punção pressionado por alguns minutos, para evitar pequenas hemorragias no local de introdução da agulha. É recomendável que o braço não seja submetido a esforços por algumas horas, pelo mesmo motivo. Alguns indivíduos podem sofrer hipotensão e sudorese, de origem psicológica, no momento da coleta, por medo do procedimento. Estes indivíduos não serão convidados a participar do estudo ou serão dispensados de participar, mesmo que se tenham apresentado voluntariamente.

Duração da Pesquisa:..24 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Os participantes do estudo serão informados de que trata-se de um estudo sobre a função de leucócitos, para identificar mecanismos que controlam sua resposta diante de estímulos inflamatórios. Para isto serão obtidas amostras de sangue, com anticoagulante para que mantenham-se fluidas e preservem as células íntegras. Estas amostras serão utilizadas uma parte diretamente e outra parte, depois de separadas as células e a porção líquida, dependendo do tipo de medida. Todos os componentes coletados serão utilizados em ensaios *in vitro*. Os testes propostos já foram utilizados anteriormente e existe literatura sobre seu uso. As medidas de resposta celular a estímulos inflamatórios em condições controladas e de concentração de alguns componentes do sangue permitirão entender melhor como funciona a resposta natural de defesa do organismo a infecções. Não são esperados desconfortos e não há risco para o doador da amostra. Os resultados são uma contribuição ao conhecimento científico na área e deverão ser disponibilizados para a comunidade através dos meios usuais de divulgação científica: comunicações em congressos, publicação de trabalhos.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Os participantes têm o direito a:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Elisângela Monteiro Pereira – R. Francisco Gonçalves de Andrade Machado, 120 Apto. 21 Bairro Bela Vista – São Paulo
Telefone: 287-6288 Telef. celular: 035-9974-2871

Lígia Ferreira Gomes – R. Dr. Mello Alves, 585 Apto. 14 Bairro Jardins São Paulo-SP
Telefone: 3086-3557

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....
.....
.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)