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

Produção, caracterização e aplicação analítica de anticorpos
monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I

Carolina Nigro Stella

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2009

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

Produção, caracterização e aplicação analítica de anticorpos
monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I

Carolina Nigro Stella

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

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

Stella, Carolina Nigro
S824p Produção, caracterização e aplicação analítica de anticorpos
monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I / Carolina Nigro Stella. --
São Paulo, 2009.
96p.

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

Orientador: Gomes, Lígia Ferreira

1. Imunoensaio 2. Anticorpo monoclonal : Imunologia 3. Reação
de imunohistoquímica : Medicina I. T. II. Gomes, Lígia Ferreira,
orientador.

615.37 CDD

Carolina Nigro Stella

Produção, caracterização e aplicação analítica de anticorpos
monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Aos meus pais, Maria da Gloria e Alberto,
pelo amor incondicional que me oferece suporte
para transpor qualquer fronteira.*

*Ao meu querido Luis Felipe,
por caminhar ao meu lado*

AGRADECIMENTOS

À professora Lígia Ferreira Gomes, por me ensinar que a boa ciência, feita com critério e ética, é aquela que sempre traz os melhores resultados (nos experimentos e na vida).

À professora Lucila Heloisa Simardi Santiago, de quem “herdei” a paixão pela citopatologia.

Aos colegas de grupo: Elisângela Monteiro Pereira, Fernanda Martins Pozzi, José Emílio Fehr Pereira Lopes, Júlia Havandjian Begalli, Lucas Vicente da Silva, Cássia Prado, William Alves dos Santos, Andréia Silva Ramos, Flávia Cristina de Oliveira e Marcela Graciano Bronzeri. Todos muito queridos. Sou muito grata a vocês por este período que passamos juntos.

Às professoras Adelaide José Vaz e Kioko Takei, pelas inúmeras demonstrações de verdadeiro espírito acadêmico.

Às colegas do laboratório de Imunologia Clínica: Andréia Bartachini Gomes e Cristiane Rocha de Farias, por dividirem comigo seu espaço e amizade.

Ao Alberto Hiroshi Iha, pelas várias vezes em que me ajudou com os experimentos.

À Maria Cristina Cabral Garcia.

À Noeli Maria Espindola e à Fabyana Maria dos Anjos, pela dedicação e paciência com que me ensinaram a lidar com o mundo dos hibridomas.

À professora Rosario Dominguez Crespo Hirata e seus alunos, pela colaboração no desenvolvimento da β_2 GPI recombinante.

À professora Primavera Borelli e seus alunos.

À todos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Ao professor Ivan Hong Jun Koh (Departamento de Cirurgia – UNIFESP/EPM), por permitir a utilização de seu modelo experimental e generosamente emprestar sua habilidade nos procedimentos com os animais.

Ao professor Aldo Tonso (Departamento de Engenharia Química – Escola Politécnica USP), por me acolher em seu laboratório para a expansão dos hibridomas em cultura.

Ao professor Marco Antonio Stephano (Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – FCF USP), pela ajuda sempre rápida e precisa.

À pesquisadora Kátia Cirlene Botelho (Laboratório de Espectroscopia Molecular – Instituto de Química USP), pela ajuda com os Espectros de Infravermelho.

Ao pesquisador Luiz Carlos Donizetti Gonçalves (Laboratório de Sistemas Integráveis – Escola Politécnica USP), pelos ensinamentos e valiosas sugestões.

Aos amigos Dr. Plínio Santos e Marilda, Dr. Celso di Loreto, Adhemar Longatto Filho, e todos os pesquisadores da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pela torcida.

RESUMO

Anticorpos monoclonais (AcMo) anti- β_2 GPI foram obtidos de hibridomas produzidos pela fusão de linfócitos de camundongos com células SP2-O, de mieloma murino. A imunização foi realizada com proteína purificada de plasma humano, por cromatografia de afinidade em resina Sepharose-Heparina 6 Fast Flow (GE Healthcare). Os AcMo produzidos pelos hibridomas K₂57, K₂11-3, K₂33, K₂2, K₂37 e K₂124 foram estudados quanto à sua capacidade de reconhecer o antígeno adsorvido em suporte sólido (dot-blot, imunoblot, ELISA direto) e em solução (ELISA indireto). Todos os clones foram cultivados e expandidos *in vivo* (ascite) e *in vitro* (cultura convencional). Pretende-se a substituição da expansão *in vivo* pela produção em biorreator. Os AcMo produzidos reconheceram a β_2 GPI em imunoblot com sensibilidade e especificidade variáveis. O desempenho dos AcMo K₂2 e K₂124 no reconhecimento da proteína adsorvida em placas de ELISA (Maxisorp, NUNC), mostrou-se promissor para o desenvolvimento de um teste ELISA direto (sanduíche), em substituição ao ELISA indireto (competição) atualmente utilizado. O AcMo K₂2 mostrou reatividade semelhante à do anticorpo comercial 5F7 (ICN) em todos os testes realizados. Tanto o anticorpo produzido pelo clone K₂2 quanto seus fragmentos Fab, obtidos através de digestão enzimática, foram utilizados para identificação e quantificação da proteína em plasma e tecidos de ratos submetidos a um modelo de sepse e translocação bacteriana. Os resultados obtidos demonstram que a modulação das concentrações plasmáticas de β_2 GPI e sua distribuição hepática dependem da intensidade e da via de infecção, e sugerem a presença de imunocomplexos da proteína *in vivo*.

Palavras-chave: β_2 -glicoproteína I. Anticorpo monoclonal. ELISA. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI) detection is important for the accurate diagnostic of autoimmune and chronic inflammatory disease. This project was designed in order to obtain specific monoclonal antibodies (MoAb) that could replace or add to the commercially available 5F7. It is intended to achieve a convenient *in vitro* production, in the near future. The β_2 GPI antigen was purified from human plasma through Heparin-Sepharose 6 FF (GE Healthcare) affinity chromatography. Six different hybridomas were generated after the fusion of immunized mouse lymphocytes with SP2-O murine myeloma cells. The anti- β_2 GPI MoAb K₂57, K₂II-3, K₂33, K₂2, K₂37, and K₂124 were purified after clone expansion from ascites (*in vivo*) and conventional cellular culture (*in vitro*). MoAb reactivity was evaluated towards the β_2 GPI antigen either adsorbed to solid phase support (Dot-Blot, immunoblot, direct ELISA), or in solution (indirect ELISA). All clones were positive in immunoblot. MoAb K₂37, K₂57 e K₂124 recognized cleaved forms of the protein. The K₂2, K₂124 and K₂57 MoAb were promising for the development of direct ELISA. Best sensibility was obtained with K₂2 AcMo in comparison to commercial reference 5F7 (ICN) in all tests. Both AcMo K₂2 and its digestion product K₂2_{Fab}, could be applied in assays for β_2 GPI on plasma and tissues of rats with good performance.

Key-words: β_2 -glycoprotein I. Monoclonal antibody. ELISA. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo estrutural da β_2 GPI e potencial eletrostático de superfície.....	17
Figura 2 -	Potencial eletrostático de superfície do domínio V e diagrama do modelo proposto indicando interação com a membrana fosfolipídica estabilizada pela exposição do “loop flexível”.....	18
Figura 3 -	Representação visual do deslocamento das cadeias laterais de açúcar sofrido pela β_2 GPI após ligação à superfícies negativas através do domínio V, favorecendo a ligação de anticorpos ao domínio I.....	19
Figura 4 -	Representação estrutural do domínio V intacto e após clivagem por plasmina.....	19
Figura 5 -	Esquematização participação da β_2 GPI no sistema fibrinolítico.....	20
Figura 6 -	Fluxograma do diagnóstico da APS segundo atualização do critério Sapporo de classificação laboratorial em consenso internacional.....	22
Figura 7 -	Representação gráfica do procedimento de purificação da β_2 GPI.....	24
Figura 8 -	Características do produto final e dos intermediários da purificação da β_2 GPI lote 70.....	25
Figura 9 -	Cinética da produção de IgG anti- β_2 GPI pelos camundongos imunizados.....	26
Figura 10 -	Isotipagem dos anticorpos produzidos por alguns dos hibridomas estáveis clonados.....	29
Figura 11 -	Representação gráfica do procedimento de purificação de IgG anti- β_2 GPI clone K ₂ 124 por cromatografia de afinidade.....	32
Figura 12 -	SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot para caracterização do procedimento de digestão do AcMo K ₂ 2.....	34

Figura 13 - Representação gráfica do procedimento de separação cromatográfica das frações Fab e Fc do AcMo K ₂ 124 por cromatografia de afinidade.....	35
Figura 14 - Perfil eletroforético de diferentes lotes de β_2 GPI purificada.....	45
Figura 15 - Perfil eletroforético de lotes sequenciais de β_2 GPI purificada com a nova resina, em comparação à resina antiga.....	46
Figura 16 - Representação gráfica do procedimento de purificação da β_2 GPI (lotes 78 e 79) por cromatografia de afinidade.....	47
Figura 17 - Representação gráfica do procedimento de purificação da β_2 GPI (lotes 80) por cromatografia de afinidade e SDS-PAGE 12,5% corado pela prata das frações eluídas.....	47
Figura 18 - Perfil eletroforético da β_2 GPI após alteração de concentração da solução.....	48
Figura 19 - SDS-PAGE 12,5% corado pela prata de diferentes lotes de β_2 GPI e as mesmas amostras coradas por Alcian Blue 0,5%.....	49
Figura 20 - SDS-PAGE 12,5%, procedimento tradicional (120v/90min) e SDS-PAGE 12,5%, procedimento incluindo etapa de alta voltagem (120v/5min – 240v/30seg – 120v/90min).....	49
Figura 21 - ELISA direto para caracterização de novos lotes de β_2 GPI purificada.....	50
Figura 22 - Aspecto macroscópico das soluções contendo β_2 GPI purificada após diálise em água pura.....	50
Figura 23 - ELISA direto realizado com placas sensibilizadas com diferentes amostras de β_2 GPI. O reconhecimento das amostras pelo AcMo 5F7 no ELISA direto é diretamente proporcional à densidade de banda de 45 kDa em SDS-PAGE 12,5%.....	51
Figura 24 - Alteração do perfil eletroforético durante armazenamento a 4°C de β_2 GPI purificada e imunoblot com anticorpo monoclonal comercial 5F7.....	52
Figura 25 - SDS-PAGE 12,5% corado pela prata de diferentes lotes de β_2 GPI armazenada, e imunoblot das respectivas amostras, em reação com anticorpo monoclonal comercial 5F7.....	53

Figura 26 -	SDS-PAGE 12,5% corado pela prata de amostras de β_2 GPI lote 71 preparadas em diferentes condições de pH (tampão Britton-Robinson) e imunoblot das respectivas amostras, em reação com AcMo 5F7.....	53
Figura 27 -	Reação de Dot Blot avaliando a influência de variações de pH e massa de β_2 GPI no reconhecimento pelo clone 5F7 e histograma de intensidade linear de cor.....	54
Figura 28 -	ELISA direto com curva de diluição dos anticorpos monoclonais produzidos no primeiro ciclo de expansão.....	55
Figura 29 -	ELISA direto com curva de diluição dos anticorpos monoclonais produzidos (2º ciclo de expansão).....	56
Figura 30 -	ELISA direto comparando os anticorpos monoclonais produzidos com o AcMo 5F7.....	57
Figura 31 -	Caracterização do AcMo K ₂ 2 purificado a partir do sobrenadante de cultura celular convencional (ELISA direto).....	58
Figura 32 -	Reconhecimento dos AcMo produzidos em Dot-Blot utilizando β_2 GPI aplicada em diferentes massas por posição.....	58
Figura 33 -	Diferentes frações de um mesmo lote de β_2 GPI em SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e Dot-Blot das respectivas amostras, aplicadas em diferentes massas por posição contra os AcMos K ₂ 2, K ₂ 124 e 5F7.....	60
Figura 34 -	Dot-Blot de diferentes frações de um mesmo lote de β_2 GPI diluídas em tampão Britton-Robinson (pHs 3 a 10) com 1,0 μ g de proteína por posição contra os AcMos K ₂ 2, K ₂ 124 e 5F7.....	61
Figura 35 -	Imunoblot revelando o reconhecimento de diferentes lotes de β_2 GPI pelos AcMo produzidos no laboratório em comparação com o padrão ouro comercial (5F7).....	62
Figura 36 -	SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot da β_2 GPI lote 71 em diferentes condições de pH comparando a sensibilidade dos AcMos 5F7 e K ₂ 2.....	63
Figura 37 -	Curva de competição da β_2 GPI purificada com AcMo 5F7 (comercial) e AcMo K ₂ 2. ELISA indireto.....	64

Figura 38 -	Imunoblot revelando o reconhecimento da β_2 GPI pelos AcMo anti- β_2 GPI purificados após expansão <i>in vivo</i> em comparação com os sobrenadantes de culturas celulares convencionais.....	65
Figura 39 -	Imunoblot e ELISA direto revelando o reconhecimento de β_2 GPI pelos AcMo 5F7 e K ₂ 2 purificado a partir do sobrenadante de cultura convencional.....	65
Figura 40 -	Imuno-histoquímica para β_2 GPI em tecidos de fígado e intestino delgado (íleo) de ratos submetidos ao modelo de sepse e translocação bacteriana.....	67
Figura 41 -	Imuno-histoquímica em tecidos de fígado ratos do grupo sepse revelando reação inespecífica nas reações de controle negativo....	68
Figura 42 -	Teste do sistema EnVision em placa adsorvida com diferentes quantidades de β_2 GPI e fixadas com Formalina ou Metacarn.....	68
Figura 43 -	SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot do Anticorpo Monoclonal clone K ₂ 2 e suas frações Fc e Fab.....	69
Figura 44 -	SDS-PAGE 12,5% e Imunoblot para β_2 GPI, utilizando como anticorpo primário o clone K ₂ 2 ou apenas a fração Fab.....	69
Figura 45 -	Teste do sistema EnVision em placa adsorvida com diferentes quantidades de β_2 GPI e fixadas com Metacarn mostrando que o Polímero do sistema EnVision®, utilizado na revelação, não reconhece a fração Fab do AcMo K ₂ 2.....	70
Figura 46 -	Imuno-histoquímica em tecidos de fígado ratos do grupo sepse. Reação com AcMo anti- β_2 GPI clone K ₂ 2, K ₂ 2 _{Fab} e anti-IgG de rato conjugado à peroxidase.....	71
Figura 47 -	Reconhecimento da β_2 GPI em imunoblot por anticorpos presentes nos soros de ratos submetidos ao modelo de sepse e translocação bacteriana.....	72
Figura 48 -	ELISA direto (sanduíche) realizado em placa adsorvida com diferentes quantidades de AcMo anti- β_2 GPI K ₂ 124 _{Fab}	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios de classificação para diagnóstico da APS	21
Tabela 2 -	Seleção dos hibridomas produtores de anticorpos anti- β_2 GPI após a fusão celular.....	28
Tabela 3 -	Rendimento em mg obtido nos procedimentos de expansão para os diferentes clones.....	32
Tabela 4 -	Perfil de eluição das moléculas de IgG durante purificação de amostra de sobrenadante de cultura celular convencional.....	33
Tabela 5 -	Preparo do tampão Britton Robinson para os diferentes pHs.....	39
Tabela 6 -	Concentração plasmática da β_2 GPI de ratos nos grupos experimentais e seus controles, determinada por ELISA indireto (competição).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo Monoclonal
APS	Persulfato de amônio
BSA	Albumina de soro bovino
β_2 GPI	β_2 -glicoproteína I / Apolipoproteína H
DAB	3,3-Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	densidade optica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático em placa
HAT	Meio de cultura RPMI 1640 suplementado com Hipoxantina e Timidina
HEPES	Ácido N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanossulfônico
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LDL	Liporproteína de baixa densidade ("low density liporproteín")
MES	Ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico
mg	miligramas
mM	milimolar
N	normal
nm	nanometros
OPD	Orto-fenilenodiamina
PEG	Polietilenoglicol
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBST	Solução salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20
RPMI ⁺	Meio para cultura de células RPMI 1640 adicionado de soro fetal bovino
RPMI ⁻	Meio para cultura de células RPMI 1640 livre de soro fetal bovino
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida / doceilsulfato de sódio
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBST	Solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa ("very low density lipoprotein")

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Obtenção de insumos para determinação de β_2GPI	23
2.1.1. Purificação da β_2 GPI	23
2.1.2. Produção de anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI	25
2.1.2.1. Obtenção e clonagem de hibridomas específicos	25
2.1.2.2. Expansão dos hibridomas clonados.	30
2.1.2.3. Purificação dos anticorpos monoclonais (ascite).....	31
2.1.2.4. Purificação dos anticorpos monoclonais (sobrenadante de cultura)	33
2.1.2.5. Obtenção de fragmentos Fab	33
2.2. Caracterização dos insumos produzidos.....	35
2.2.1. Eletroforese (SDS-PAGE)	35
2.2.2. Immunoblot.....	36
2.2.3. Dot Blot.....	37
2.2.4. ELISA direto	38
2.2.5. Preparo de tampões para estudo de influência do pH.....	38
2.3. Aplicação analítica dos insumos produzidos	39
2.3.1. Modelo experimental de sepse (S) e translocação bacteriana (TB)	39
2.3.2. Imuno-histoquímica para β_2 GPI	41
2.3.3. Testes de especificidade do sistema EnVision®	42
2.3.4. ELISA indireto (competição)	43
2.3.5. ELISA direto (sanduíche).....	44
3. RESULTADOS	45
3.1. Caracterização da β_2 GPI purificada	45
3.2. Caracterização dos anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI produzidos	55
3.3. Aplicação analítica dos insumos produzidos	66
4. DISCUSSÃO	75
5. CONCLUSÕES	83
Referências Bibliográficas	84
Anexos	89

1. INTRODUÇÃO

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína da família "short consensus repeats" (SCR), da qual fazem parte várias proteínas de controle do complemento. A β_2 GPI é produzida principalmente no fígado e em enterócitos e reabsorvida nos rins, ligada à megalina no túbulo proximal (MOESTRUP et al., 1998).

A β_2 GPI pode ser encontrada no líquido, linfa e plasma, onde circula cerca de 40% ligada a diversas frações de lipoproteínas, principalmente lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomicrons (BALASUBRAMANIAN; KILLION; SCHROIT, 1998; KOCH et al., 2001). É observada uma ampla variação inter-individual de suas concentrações plasmáticas em humanos, que pode ser exercida por controle genético (SANGUERA et al., 1997a; MEHDI et al., 1999).

Seu papel fisiológico preciso ainda não é conhecido, mas já foram estudadas propriedades que sinalizam uma ampla atuação sistêmica de controle da resposta inflamatória e seu envolvimento com mecanismos de sobrevivência e proliferação celular de algumas linhagens. Em 1995, a β_2 GPI foi proposta como um sinalizador de apoptose para macrófagos (CHONN et al., 1995) e existem evidências de que este papel possa ter relevância clínica. Mais recentemente, esta função da proteína foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo* (BALASUBRAMANIAN; MAITI; SCHROIT, 2005). Especula-se também sobre a participação de β_2 GPI na regulação do processamento de antígenos com reduzida produção de mediadores químicos, diminuindo o burst respiratório de macrófagos, em contraposição à indução de resposta inflamatória (GOMES et al., 2002). Esta competência da imunidade inata é fundamental para o equilíbrio geral do sistema imune e para o controle adequado da resposta a infecções e da autoimunidade. Recentemente, foi demonstrada a identidade estrutural entre a β_2 GPI e o inibidor de interleucina 3 (NIL-3) (ADACHI et al., 2002), o que a situa como um modulador da imunidade inata.

Na vigência de infecções, em especial na sepse, a regulação negativa das funções de IL-3 pode ser relevante. O impacto dessa inibição sobre a resposta imune, entretanto, deve ser considerado em múltiplos aspectos.

A β_2 GPI apresenta uma produção basal realizada por diversos tipos celulares parenquimatosos, além de, provavelmente, por células da medula óssea na presença de grandes quantidades de IL-3. A IL-3 modifica a diferenciação de monócitos e células dendríticas, diminui a produção de IL-12 e aumenta a produção

de IL-10 em culturas de células mononucleares. Além disso, implica potencialmente no favorecimento de um padrão Th2 da resposta das células T em culturas mistas de células dendríticas e células T CD_4^+ naïve (EBNER et al., 2002). A indução de mecanismo de resposta Th-1 pela β_2 GPI foi recentemente demonstrada (BUTTARI et al., 2005). A inibição de IL-3 por β_2 GPI associada ao seu papel no processamento de antígenos particulados e de lipídios modificados, não pode, portanto, ser entendida como um simples efeito antiinflamatório. Ao contrário, o conjunto dos efeitos remete a um papel regulador de fenômenos relacionados à imunidade inata e específica, talvez dependentes da extensão e intensidade do dano tecidual, ativação de plaquetas e células endoteliais.

Estruturalmente, a β_2 GPI apresenta-se como uma cadeia polipeptídica única, com 326 resíduos de aminoácidos, 11 pontes dissulfeto e 5 sítios de glicosilação (LOSIER et al., 1984; KATO; ENJYOJI, 1991). Possui cinco domínios estruturais numerados a partir da extremidade N-terminal. Os domínios I a IV são típicos da família SCR e compõem-se de quatro fitas antiparalelas duas a duas de folha beta pregueada num arranjo estabilizado por pontes dissulfeto. A representação espacial mostrada na figura 1 explicita a orientação relativa das folhas beta, e motivou a denominação “domínios sushi”. No quinto domínio SCR, peculiar da β_2 GPI, há a única região de meia volta de alfa hélice da proteína, além das quatro fitas antiparalelas de folha beta. A dimensão calculada para a molécula a partir de estudos de cristalografia e de difração de raios X é de 13,2 x 7,2 x 2,0 nm (Figura 1A).

Sua massa molecular, baseada na sequência de aminoácidos é de 40 kDa, mas em SDS-PAGE, são observadas múltiplas bandas entre 43 e 66 kDa, relatadas na literatura como representações da forma monomérica da proteína em diferentes graus de glicosilação da molécula.

A sequência primária dos resíduos de aminoácidos da β_2 GPI é bastante conservada entre diversas espécies (>80%), incluindo humanos, camundongos e bovinos.

A estrutura primária do domínio V difere dos domínios sushi típicos pela adição de uma ponte dissulfeto e 24 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal. Outra característica particular do domínio V é sua superfície carregada positivamente, o que contribui para a interação da β_2 GPI com superfícies negativas (Figura 1B).

Figura 1 – (A) Modelo estrutural da β_2 GPI, mostrando seus cinco domínios (representação estrutural em fita) e os sítios de glicosilação (modelo de estrutura atômica). As folhas beta aparecem representadas em azul, alfa hélice em vermelho e pontes dissulfeto em amarelo. (B) Potencial eletrostático de superfície. Carga positiva representada em azul, negativa em vermelho (SCHWARZENBACHER et al., 1999). (C) Conformação molecular da β_2 GPI bovina. Representação da sequência de aminoácidos em fitas antiparalelas, formando os típicos “domínios sushi” nos domínios I a IV. (-CHO) N-glicosilação (Kato; Enjoji, 1991)

Através dessa região carregada positivamente, a β_2 GPI liga-se a superfícies contendo lipídios negativamente carregados, como fosfatidilserina e cardiolipina e a

vários lipídios oxidados em membranas biológicas (SANGUERA et al., 1997b). Os resíduos de aminoácidos positivos presentes no domínio V (Lisinas, Arginina e Histidina), contribuem para o posicionamento de uma região hidrofóbica chamada “loop” flexível, composto pelos aminoácidos Ser³¹¹-Ser-Leu-Ala-Phe-Trp-Lys³¹⁷, que se insere na membrana fosfolipídica estabilizando a interação desta com a molécula de β_2 GPI (Figura 2).

É também capaz de ligar-se a DNA, heparina e a lipídios modificados na superfície de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada *in vitro* (SANGUERA et al., 1997b; KOBAYASHI et al., 2001). Entre seus efeitos biológicos está o aumento da depuração de triglicerídeos pelo estímulo da lipase lipoprotéica (NAKAYA et al., 1980).

Figura 2 – (A) potencial eletrostático de superfície do domínio V, carregado positivamente, e a distribuição dos resíduos de aminoácidos. Em destaque, os 14 resíduos que contribuem para o posicionamento da proteína nas membranas fosfolipídicas, denominado “loop flexível”, (B) Diagrama do modelo proposto indicando a interação entre as cargas positivas do domínio V e a membrana fosfolipídica, estabilizada pela exposição do “loop flexível” (BOUMA et al., 1999).

Estudos mostram que ao interagir com superfícies negativas a β_2 GPI sofre mudanças conformacionais que deslocam as cadeias de glicosilação. A ligação da proteína a seus anticorpos mostra-se suscetível à mudança conformacional induzida pela ligação da proteína à superfícies negativas e pode ser estabilizada por dimerização (Figura 3). Mudanças conformacionais e oligomerização contribuem para o aumento da antigenicidade da β_2 GPI e podem induzir autoimunidade *in vivo* (HAMMEL et al., 2001).

Figura 3 – Representação visual do deslocamento das cadeias laterais de açúcar sofrido pela β_2 GPI após ligação à superfícies negativas através do domínio V, favorecendo a ligação de anticorpos ao domínio I. A estabilização da ligação pode ser alcançada através da dimerização (de LAAT et al., 2006).

A clivagem do domínio V por plasmina *in vivo* prejudica a ligação da β_2 GPI às superfícies negativas. A clivagem por plasmina ocorre entre os aminoácidos das posições 317 e 318 da cadeia polipeptídica (Figura 4). O fragmento permanece ancorado à molécula através de uma ponte dissulfeto, mas a mudança conformacional induzida na clivagem já não permite mais uma interação eficiente entre o domínio V da molécula e superfícies negativas (MATSUURA et al., 2000). Além disso, esta ligação pode ser dissociada por substâncias oxidantes de pontes dissulfeto. Com esta ligação prejudicada, a molécula tende a não mudar sua conformação, deixando os epitopos do domínio I pouco disponíveis para ligação com auto-anticorpos (de LAAT et al., 2006)

Figura 4 – Representação estrutural do domínio V intacto e após clivagem por plasmina. As folhas beta aparecem representadas em azul, K^{317} em verde, T^{318} em amarelo e a ponte dissulfeto entre C^{288} e C^{326} em roxo (MATSUURA et al., 2000).

Existem divergências quanto aos epítomos reconhecidos pelos anticorpos anti- β_2 GPI. Os domínios I e V são, segundo grande parte dos autores, as regiões que contêm os sítios de ligação aos anticorpos específicos. Alguns autores, no entanto, defendem a presença de epítomos críticos no domínio IV (GEORGE et al., 1998).

A β_2 GPI apresenta efeitos sobre os mecanismos de controle da coagulação e agregação plaquetária. Tanto a atividade anticoagulante como procoagulante podem ser reguladas pela β_2 GPI. A β_2 GPI é capaz de inibir a fase de contato da via intrínseca da cascata de coagulação *in vitro* (SCHOUSBOE, 1985) e existem relatos de que a β_2 GPI promove fibrinólise através de sua ligação com o fator de ativação tecidual do plasminogênio (tPA) (BU et al., 2009). Com a conversão do plasminogênio em plasmina, a clivagem da β_2 GPI no domínio V é favorecida, tornando a proteína incapaz de ligar-se a fosfolipídios. Alguns autores afirmam que a β_2 GPI clivada é capaz de ligar-se ao plasminogênio, ainda que fracamente, o que suprimiria a geração de plasmina na presença de fibrina, funcionando como feedback negativo para a fibrinólise extrínseca (Figura 5).

Figura 5 – Esquematização da participação da β_2 GPI no sistema fibrinolítico. A plasmina gerada cliva a β_2 GPI, que se liga ao plasminogênio, inibindo sua ligação à fibrina (YASUDA et al., 2004).

Dentre os efeitos que contribuem para uma ação pro-coagulante da β_2 GPI, podemos citar a inibição da Proteína C ativada, impedindo a degradação dos fatores Va e VIIIa da cascata de coagulação. (IEKO et al., 1999).

Não são relatadas patologias causadas por concentrações plasmáticas elevadas de β_2 GPI ou à sua completa deficiência, embora estudos com camundongos knock-out para β_2 GPI apresentem uma diminuição na geração de trombina *in vitro* e comprometimento na implantação da placenta durante a gestação.

Apesar da característica anti-trombótica da β_2 GPI ser a mais discutida, suas outras propriedades sinalizam uma atuação sistêmica mais ampla de controle da resposta inflamatória e controle de proliferação e morte celular de linhagens envolvidas no processo inflamatório. A detecção desta proteína em amostras de tecidos e fluidos biológicos pode agregar valor no entendimento de alguns processos fisiopatológicos importantes.

A β_2 GPI tem sido evidenciada como peça importante em algumas autoimunidades, tais como a Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (APS). Esta síndrome é descrita como uma trombofilia adquirida caracterizada pela ocorrência de eventos arteriais e venosos, onde altos títulos de anticorpos anti- β_2 GPI (IgG e IgM) podem ser encontrados o soro ou plasma, o que situou a proteína como um importante marcador diagnóstico para a APS, sendo em 2006 incluída na atualização do critério Sapporo de classificação laboratorial em consenso internacional (Tabela 1 e Figura 6). A utilização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a β_2 GPI, quando usados em conjunto com ELISAs para cardiolipina e lupus anticoagulante, pode situar pacientes em relação a fatores de risco para APS (GIANNAKOPOULOS et al., 2009).

Tabela 1 – Critérios de classificação para diagnóstico da APS (MIYAKIS et al., 2006). De acordo com a nova classificação, a APS está presente se pelo menos um critério clínico e um critério laboratorial dentre os descritos abaixo estiverem presentes.

Critérios clínicos				Critérios laboratoriais		
Ocorrências durante a gravidez				Presença de lupus anticoagulante no plasma, detectado em mais de uma ocasião, com pelo menos 12 semanas de intervalo (de acordo com os protocolos adotados pela Sociedade Internacional de Trombose e Homeostasia) *	Médios ou altos títulos de anticorpos anti- cardiolipina IgG e/ou IgM no soro ou plasma (ELISA) *	Altos títulos de anticorpos anti- β_2 GPI IgG e/ou IgM no soro ou plasma (ELISA) *
Trombose vascular	Uma ou mais mortes inexplicadas de fetos morfológicamente normais com mais de 10 semanas de gestação	Um ou mais nascimentos prematurados de neonatos morfológicamente normais após a 34ª. semana, devida a eclampsia ou insuficiência placentária	Três ou mais abortos espontâneos, não explicados e consecutivos após a 10ª. semana de gestação, excluídas causas anatômicas, hormonais e cromossômicas.			

* presente em duas ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas de intervalo entre elas.

Figura 6 – Fluxograma do diagnóstico da APS segundo atualização do critério Sapporo de classificação laboratorial em consenso internacional (GIANNAKOPOULOS et al., 2009).

Com o intuito de minimizar a variação interlaboratorial dos testes para β_2 GPI, novas diretrizes vêm sendo estabelecidas no que diz respeito ao anticorpo anti- β_2 GPI pesquisado (IgG ou IgM), ao tipo de amostra (soro ou plasma), aos controles, à precisão do ensaio, aos calibradores e aos valores de “cutoff” (WONG et al., 2008).

Os ensaios imunoenzimáticos, ferramentas fundamentais para a determinação dos critérios laboratoriais envolvendo a β_2 GPI, têm apresentado desafios para o estabelecimento dos testes na rotina dos laboratórios clínicos. Muitas vezes, apesar do esforço empregado na padronização dos kits ELISA comerciais, ainda há casos em que não se consegue estabelecer um resultado seguro, uma vez que a variação interindividual da β_2 GPI e de seus auto-anticorpos é ampla. Alguns autores defendem a necessidade de um estudo extenso, incluindo ampla amostragem de soro humano normal, além das amostras de pacientes acometidos pela APS, por doenças infecciosas e outras doenças auto-imunes como a artrite reumatóide, para que sejam estabelecidos valores de referência mais precisos e para que se possa entender melhor como os testes se comportam (ANDREOLI et al., 2007).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção de insumos para determinação de β_2 GPI

2.1.1 Purificação da β_2 GPI

A β_2 GPI foi purificada a partir de *pool* de plasma humano através de precipitação com Ácido Perclórico (1,25 mL de Ácido Perclórico para cada 50 mL de plasma), adicionado gota a gota, durante 15 minutos, sob agitação constante, para precipitação da maioria das proteínas plasmáticas. O produto desta etapa foi centrifugado a 1100 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado a pH 7,0 com solução saturada de carbonato de sódio e dialisado contra dez volumes de tampão Tris 20 mM / NaCl 30 mM pH 7,0 (tampão de equilíbrio), por 24 horas a 4°C. Durante o desenvolvimento do trabalho experimental, a purificação da β_2 GPI teve de ser modificada porque a resina para cromatografia de afinidade Heparin Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech) teve sua comercialização interrompida. O procedimento anterior (POLZ; WURM; KOSTNER, 1980; GOMES et al., 2002) foi adaptado e o novo protocolo encontra-se descrito abaixo.

A amostra dialisada foi diluída com um volume equivalente de tampão de equilíbrio e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Heparina (Heparin Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare). A amostra foi passada por uma coluna de 10mL de volume total (V_t), previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio, até o volume teórico de saturação dos sítios de ligação da resina com a proteína contida no pré-purificado. Na escala utilizada, o volume de carga da coluna correspondeu a cerca de 625 mL de soro humano normal ou 500mL de pré-purificado dialisado. Ligações inespecíficas foram eliminadas por lavagem em tampão Tris 20 mM / NaCl 50 mM pH 7,0. A β_2 GPI retida na coluna foi então eluída com tampão Tris 20mM / NaCl 200 mM pH 8.0 e recolhida em microtubos em frações sequenciais de 2 mL cada. O perfil de eluição foi determinado pela densidade ótica do eluato lida em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Uniscience) em comprimento de onda de 280 nm. Todo o procedimento cromatográfico foi realizado a 4°C. Terminada a eluição, a coluna foi lavada com tampão Tris 20 mM / NaCl 500 mM pH 8,0 para a eliminação de eventuais resíduos que possam comprometer a purificação seguinte.

A purificação da β_2 GPI por cromatografia de afinidade foi acompanhada através da variação da densidade ótica em comprimento de onda de 280 nm. A figura 7 mostra o gráfico com os valores de densidade ótica das frações eluídas, nas etapas de lavagem das ligações inespecíficas e eluição da proteína de acordo com o pH e a força iônica do tampão utilizado.

Figura 7 – Representação gráfica do procedimento de purificação da β_2 GPI, ilustrando as etapas de lavagem das ligações inespecíficas (NaCl 50 mM pH 7,0), eluição da proteína (NaCl 200 mM pH 8,0) e lavagem final para remoção de resíduos da resina (NaCl 500 mM pH 8,0). Em destaque, frações selecionadas para o pool que compõem o lote (pico de eluição da proteína). (DO) densidade ótica λ 280 nm.

O SDS-PAGE 12,5% e o Immunoblot revelaram a presença de β_2 GPI no pré-purificado (amostra recolhida antes do início da purificação) e no produto eluído em tampão Tris 20 mM / NaCl 200 mM pH 8,0 (pool das frações que compunham o pico de eluição). Apenas traços de β_2 GPI foram detectados pelos anticorpos monoclonais nas etapas de lavagem com Tris 20 mM / NaCl 50 mM pH 7,0 e Tris 20 mM / NaCl 500 mM pH 8,0 (ensaio realizado com a fração de maior densidade ótica em cada etapa), o que indica eluição eficiente da proteína com o tampão Tris 20 mM / NaCl 200 mM pH 8,0 (Figura 8).

A média de rendimento das 10 últimas purificações foi de $38,7 \pm 15$ mg de β_2 GPI para cada litro de plasma humano utilizado.

As alíquotas de proteína eluída foram reunidas, mantidas em geladeira a 4°C e utilizadas sem processamento adicional.

A pureza e estabilidade dos lotes produzidos foram estudadas por SDS-PAGE a 12,5%, imunoblot e ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.

Figura 8 – Características do produto e dos intermediários da purificação da β_2 GPI lote 70. (1) Pré-purificado; (2) ligantes inespecíficos eluídos da coluna com NaCl 50 mM pH 7,0; (3) β_2 GPI purificada; (4) resíduos removidos da coluna com NaCl 500 mM pH 8,0; (PM) marcador de peso molecular 14,4 a 116 KDa. SDS-PAGE 12,5% corado por Prata. Imunoblot realizado com AcMo anti- β_2 GPI 5F7 e Ac secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase revelado com DAB 0,05% e H_2O_2 .

2.1.2 Produção de anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI

2.1.2.1 Obtenção e clonagem de hibridomas específicos

Camundongos BALB/c foram divididos em dois grupos e imunizados pela via subplantar com 20 μ g do antígeno β_2 GPI em 25 μ L de solução salina (NaCl a 0,15 M) previamente emulsificados em adjuvante completo de Freund. Após 15 dias, os animais receberam uma dose reforço pela mesma via e com mesma quantidade de antígeno, com o adjuvante incompleto. Foram colhidas amostras de sangue nos dias zero, 15º e 30º dia. As amostras permaneceram em repouso por 2 h, centrifugados a 1100 g por 5 minutos a temperatura ambiente e os soros separados foram estocados a -20°C até o momento do uso.

Para a determinação da cinética de produção dos anticorpos nos animais imunizados pela via subplantar com β_2 GPI, foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com os soros dos animais, em placas sensibilizadas com

o mesmo antígeno utilizado no processo de imunização. Os resultados demonstraram presença crescente de anticorpos do tipo IgG (Figura 9).

Figura 9 – Cinética da produção de IgG anti- β_2 GPI pelos camundongos imunizados. ELISA em placas sensibilizadas com 0,5 μ g de β_2 GPI lote 2 (A) ou lote 4 (B). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H_2O_2 , bloqueada com H_2SO_4 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

Todos os animais apresentaram resposta para produção de IgG anti- β_2 GPI após a primeira dose, intensificando a resposta após a segunda dose. No 30º dia, todos os animais estavam preparados para a extração dos linfonodos poplíteos.

Dois dias depois da última colheita de sangue, foi dado um reforço do antígeno β_2 GPI contendo a mesma dose das imunizações anteriores (20 μ g).

Os animais que apresentaram resultados no ELISA para presença de IgG anti- β_2 GPI acima de 2 unidades de densidade ótica foram considerados prontos para o procedimento de fusão celular.

Cinco dias antes da fusão celular, as células de mieloma (SP2-O) foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e rapidamente descongeladas a 37°C, sendo transferidas em seguida para um tubo cônico contendo 15 mL de meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais, gentamicina 10 μ g/mL, HEPES 15 mM e soro fetal bovino a 10% (RPMI⁺). As células foram centrifugadas a 800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, transferidas para uma garrafa de 25 cm² e expandidas para garrafas de 75 cm² contendo meio RPMI⁺. As garrafas foram incubadas a 37°C em ambiente de CO₂ a 5%, e cultivadas até que aproximadamente 75% da superfície de crescimento da garrafa estivesse coberta pelas células. Esta condição corresponde a cerca de 5 x 10⁴ células/mL de meio.

Atingida esta condição, obteve-se a cultura primária de macrófagos peritoneais de camundongo, necessários para a manutenção inicial dos hibridomas. Os macrófagos peritoneais foram coletados de um camundongo Balb/c *naive* de 2 meses de idade (“feeder layer”) através da injeção intra-peritoneal de 5 mL de meio RPMI⁺, assepticamente, seguida de massagem abdominal e recuperação do volume injetado por aspiração com seringa estéril. O lavado peritoneal foi então diluído em 45 mL do mesmo meio, e distribuído em placas de cultura de 96 cavidades (aproximadamente 100 µL por cavidade). As placas foram incubadas a 37°C em estufa com CO₂ a 5%, por 24h.

Os linfonodos poplíteos dos camundongos imunizados foram, retirados assepticamente e macerados com bastão de vidro, sobre uma peneira metálica de malha fina, em meio de cultura RPMI1640 suplementado com L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais, gentamicina 10 µg/mL e HEPES 15 mM (RPMI⁻).

Os linfócitos e as células SP2-O foram lavados separadamente em RPMI⁻ (3 ciclos de centrifugação a 800 g por 5 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em 15 mL de meio). O sobrenadante foi descartado e 10 mL de RPMI⁻ foram adicionados, tanto nos linfócitos, como nas células de mieloma. As células foram então misturadas na proporção de 2 linfócitos para 1 SP2-O e centrifugadas para a fusão celular, realizada através da adição de solução estéril de 0,5 g de polietilenoglicol (PEG 4000), diluído em 0,7 mL de tampão fosfato (PBS) contendo 50 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). A adição da solução às células foi feita gota a gota durante 1 minuto. As células foram então mantidas em repouso por 90 segundos, e em seguida adicionou-se 1 mL de RPMI⁻, também gota a gota, durante 1 minuto, e mais 20 mL de RPMI⁻, da mesma maneira, durante 4 minutos. Terminada a adição das soluções, as células permaneceram em repouso por 4 minutos.

Todo o procedimento foi realizado a 37°C. Concluído o procedimento de fusão, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI⁺ suplementado com hipoxantina e timidina (HAT) a 3% de maneira a obter a concentração de 1×10^6 células por mL de meio. O tubo contendo as células foi incubado a 37°C em estufa com CO₂ a 5% por 2 horas e em seguida, o volume foi distribuído nas placas de 96 cavidades contendo “feeder layer” (preparadas no dia anterior) em volume aproximado de 100 µL por cavidade e mantidas a 37°C com CO₂ a 5%.

A primeira troca do meio foi realizada 3 dias após a fusão celular e as trocas subsequentes, a cada 2 dias. Após a primeira semana de incubação, substituiu-se o meio HAT a 3% por meio HAT a 2%, e manteve-se este meio por mais 2 semanas, quando passou-se a utilizar RPMI⁺ livre de hipoxantina e timidina.

A seleção dos clones foi iniciada dez dias após a fusão celular ou quando os hibridomas já ocupavam 1/3 da superfície do poço. O critério de seleção dos hibridomas foi a resposta no teste ELISA utilizando placa sensibilizada com β_2 GPI (lotes 2 e 4) e revelada com conjugado anti-IgG de camundongo.

Foram obtidos 6 populações produtoras de Anticorpos IgG anti- β_2 GPI (Tabela 2): K57, K3, K33 (obtidos a partir dos linfócitos extraídos dos animais imunizados com β_2 GPI lote 2), K2, K37 e K124 (obtidos a partir dos animais imunizados com β_2 GPI lote 4).

Tabela 2 – Seleção dos hibridomas produtores de anticorpos anti- β_2 GPI após a fusão celular. ELISA em placa sensibilizada com β_2 GPI (lotes 2 e 4), revelado anti-IgG de camundongo conjugado a Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H₂O₂, bloqueada com H₂SO₄ 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

Hibridomas	DO (492 nm)	
	β_2 GPI lote 2	β_2 GPI lote 4
K2	1,791	1,236
K33	1,406	
K37	Neg	1,315
K57	0,976	
K124	1,272	Neg
K3	0,637	
C pos*	2,4095	2,286
C neg**	0,114	0,07

* soro de animal imunizado com β_2 GPI 1/500

**ausência de anticorpo primário.

Estas seis populações foram selecionadas para o procedimento de clonagem por diluição limitante, de maneira que ficassem distribuídas na proporção de 1 célula por cavidade, em placas de 96 cavidades. Apenas as cavidades que apresentavam 1 única célula foram selecionadas. Uma camada de “feeder layer” (aproximadamente 100 μ L por cavidade) foi adicionada para auxiliar o crescimento celular. ELISAs foram realizados quando as células clonadas atingiram um bom crescimento (8º dia aproximadamente) para confirmação do padrão secretor dos anticorpos de interesse.

De cada hibridoma clonado, a cavidade da placa de cultura que apresentava melhor reconhecimento para o antígeno (valores de densidade ótica no ELISA direto) foi selecionada para a re-clonagem e obtenção dos hibridomas estáveis.

Esta segunda clonagem foi calculada de modo que, durante a distribuição da suspensão celular, as células ficassem distribuídas na proporção 0,5 célula por cavidade nas placas de 96 cavidades. As células selecionadas na re-clonagem foram isotipadas e expandidas *in vitro*. Neste momento, os clones positivos no ELISA foram batizados com a letra K, seguida do número 2 subscrito e o número do poço em que se encontravam na placa de cultura. Por exemplo: K₂37. Para o clone K₂3, o procedimento de clonagem foi repetido uma terceira vez e o clone passou a ser identificado como K₂II-3.

Os isótipos foram determinados por ELISA com placas sensibilizadas com β_2 GPI e revelados com anticorpos monoclonais anti-IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ e IgM de camundongo biotinilados.

Os resultados mostraram que todos os clones obtidos produziam anticorpos anti- β_2 GPI do tipo IgG₁. (Figura 10).

Figura 10– Isotipagem dos anticorpos produzidos por alguns dos hibridomas estáveis clonados. ELISA realizado com placa sensibilizada com β_2 GPI lote 4. Reação revelada com conjugados anti-IgG₁, anti-IgG_{2a}, anti-IgG_{2b}, anti-IgG₃ e anti-IgM de camundongo, respectivamente, marcados com biotina (1/1000) seguido de avidina-peroxidase (1/2000). (DO) densidade ótica. A linha vermelha representa a média da DO obtida nos controles negativos (0,037).

2.1.2.2 Expansão dos hibridomas clonados

Os hibridomas foram expandidos até confluência, seqüencialmente em placas de 24 cavidades, garrafas de 25 cm² e garrafas de 75 cm². As células, que crescem aderidas, foram desprendidas mecanicamente da superfície da garrafa, transferidas para tubos cônicos de 50 mL e centrifugadas a 800 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 2,5 mL de solução salina a 0,9% estéril. Um volume de 300 a 500 µL da suspensão celular obtida foi injetado em cada camundongo, para expansão. Foram utilizados 14 camundongos Balb/c *naïve* por clone. Os animais receberam, através de injeção intraperitoneal, 300 µL de Pristane sintético (Sigma) e, cinco dias depois, a suspensão celular. A expansão da população celular resultou em ascite, com aumento visível da circunferência abdominal do animal, no período de 10 ± 3 dias após a inoculação dos hibridomas. Os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e o líquido ascítico foi colhido e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado a -20°C para posterior purificação. O procedimento de expansão dos hibridomas clonados, para produção dos anticorpos monoclonais através de derrame peritoneal (ascite), foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolos CEEA n^{os} 178 e 215).

Alguns dos hibridomas congelados em nitrogênio líquido após o primeiro ciclo de expansão (K₂2, K₂II-3 e K₂33) não apresentaram proliferação satisfatória após o descongelamento dos vials armazenados. Na 4^a tentativa de expansão do clone K₂2, foi observado crescimento satisfatório. Este foi expandido em cultura celular convencional e o produto purificado a partir de seu sobrenadante apresentou rendimento satisfatório e reatividade idêntica à do produto purificado a partir de ascite, no primeiro ciclo de expansão.

Foram realizadas, até o momento, duas tentativas de expansão dos hibridomas em cultura sob agitação (dois ensaios piloto para a expansão dos clones em biorreator), como método alternativo à ascite para produção dos anticorpos monoclonais. Nestes ensaios, $0,3 \times 10^6$ células dos clones K₂124 e K₂37 foram distribuídas em dois frascos, com volume final de 250 mL cada. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C CO₂ 5% sob agitação magnética. Em um dos frascos, foi instalado um sensor de O₂ ligado a um computador, de onde se acompanhou em

tempo real a concentração do gás no meio (inversamente proporcional ao número de células vivas). Amostras da suspensão celular foram retiradas dos frascos a cada 12 horas e contadas com azul de Tripán em câmara de Neubauer. Em paralelo às amostras para contagem das células, uma segunda amostra foi retirada, centrifugada a 3000 rpm e seu sobrenadante armazenado a 4°C para teste da presença e concentração de anticorpos, por ELISA. A partir do momento em que a população de células vivas entrou em declínio (aproximadamente 96 horas após o início), foi acompanhada por mais 48 horas e o experimento foi encerrado.

2.1.2.3 Purificação dos anticorpos monoclonais (ascite)

A expansão dos hibridomas em ascite foi realizada logo após a obtenção dos clones e repetida após o descongelamento dos clones em nitrogênio líquido, para verificação da manutenção do padrão produtor de anticorpos dos hibridomas congelados, o que determinou sua estabilidade.

O líquido ascítico foi tratado para remoção de lipoproteínas. Foram adicionados à cada mL de amostra 40 µL de sulfato de dextran a 10% e 1 mL de CaCl_2 1 M. A mistura foi mantida sob agitação por 20 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 10000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra tampão Borato / salina pH 8,5 por 24 horas para remoção dos resíduos remanescentes. O tampão de diálise foi então trocado para fosfato de sódio (Na_2PO_4) 0,02 M pH 7,0 por outras 24 horas. Após esta segunda diálise, a amostra foi considerada pronta para a purificação.

A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Proteína G (GE Healthcare) equilibrada com tampão de ligação, Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0. A coluna recebeu 30 mL da amostra tratada, correspondentes ao volume de ascite obtido dos 14 animais inoculados, e em seguida foi lavada com um mínimo de 30 mL do mesmo tampão, até que a densidade ótica do eluído, contra branco de tampão de ligação, atingisse valores próximos de zero, $\lambda=280$ nm. Os anticorpos foram eluídos com tampão Glicina-HCl 0,1 M pH 2,7 e colhidos em tubos de 2 mL sobre 100 µL de Tris-HCl 1M pH 9,0. Após a eluição dos anticorpos, a coluna foi novamente equilibrada com tampão Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0. A eluição foi acompanhada através da densidade ótica das frações, $\lambda=280$ nm (Figura 11). As frações eluídas que apresentaram maior

concentração do anticorpo foram dialisadas contra tampão Na_2HPO_4 0,02 M pH 7,0 e estocadas a -20°C para posterior caracterização.

Figura 11 - Representação gráfica do procedimento de purificação de IgG anti- β_2 GPI clone K₂124 por cromatografia de afinidade. Valores expressos em unidades de densidade ótica (DO) das frações eluídas, colhidas em tubos numerados de 2 mL cada, revelam a eluição do anticorpo com tampão Glicina 0,1 M pH 2,7. Em destaque, frações selecionadas para o pool que compõe o produto purificado (AcMo K₂124).

A concentração de IgG presente nas amostras foi determinada pela fórmula padrão recomendada para IgG, que considera os valores médios do coeficiente de extinção molar de globulinas deste grupo, concentração de IgG (mg/mL) = DO 280 nm x 0,725.

O rendimento de cada purificação e a concentração final do produto obtido, calculado a partir dos valores de densidade ótica das amostras, são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento em mg obtido nos procedimentos de expansão para os diferentes clones.

Clone	1º ciclo de expansão			2º ciclo de expansão		
	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Rendimento (mg)	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Rendimento (mg)
K ₂ 2	1,12	8,5	9,52	0,68*	4,5*	3,0*
K ₂ II-3	1,32	10	13,2	NR	NR	NR
K ₂ 33	1,71	12	20,52	NR	NR	NR
K ₂ 37	0,19	6	1,14	1,09	8	8,72
K ₂ 57	1,3	13,5	17,55	5,39	6	32,34
K ₂ 124	1,85	7	12,95	5,06	6	30,36

* produto purificado a partir de sobrenadante de cultura celular convencional (NR) procedimento de expansão não realizado.

2.1.2.4 Purificação dos anticorpos monoclonais (sobrenadante de cultura)

O sobrenadante da cultura celular convencional do hibridoma K₂2 foi recolhido e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos para separar eventual conteúdo celular. O sobrenadante foi então precipitado em solução de sulfato de amônio a 32% sob agitação em temperatura ambiente por 30 minutos. A amostra foi então centrifugada a 5000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em tampão Na₂HPO₄ 20mM pH 7,0 em volume suficiente para que a amostra tivesse um volume final 10 vezes menor do que o volume original de sobrenadante. A amostra foi dialisada em tampão Na₂HPO₄ 20mM pH 7,0 por 18 horas e em seguida foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Proteína G, de acordo com o mesmo protocolo aplicado para amostras de ascite (Tabela 4)

Tabela 4 – Perfil de eluição das moléculas de IgG durante purificação de amostra de sobrenadante de cultura celular convencional do hibridoma produtor de anticorpos anti-β₂GPI clone K₂2. As frações 3 e 4 (em destaque) foram reunidas e dialisadas contra tampão Na₂HPO₄ 20mM pH 7,0 por 24 horas. O rendimento obtido nesta purificação foi de aproximadamente 3,0 mg de IgG a uma concentração de 0,86 mg/mL.

Fração	volume (mL)	DO	concentração (mg/mL)
1	2	0,027	0,02
2	4	0,063	0,05
3	6	1,034	0,75
4	8	1,109	0,81
5	10	0,135	0,1
6	12	0,038	0,03
7	14	0,042	0,03
8	16	0,037	0,03
9	18	0,016	0,01
10	20	0,047	0,03

2.1.2.5 Obtenção de fragmentos F_{ab}

O Anticorpo Monoclonal clone K₂2 foi submetido a digestão enzimática com papaína para obtenção das frações F_c (fração constante) e F_{ab} (fração variável). Para cada miligrama de anticorpo foram adicionados 20 µL de cisteína hidrocloreada (Cisteína HCl) 16 mg/mL, 20 µL de EDTA a 8 mg/mL e 100 µL de papaína a 1 mg/mL. A reação foi incubada a 37°C sob agitação constante por 4 horas e em

seguida centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra tampão borato/salina pH 8,5 e purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Proteína A. Um volume de 1 mL de amostra passou por uma coluna de 3 mL de resina cromatográfica, a amostra foi eluída e a resina lavada com 9 mL de tampão borato/salina, para remoção quantitativa dos fragmentos Fab remanescentes na coluna. O produto eluído foi colhido em frações de 1 mL. Os fragmentos Fc retidos na resina foram eluídos com 3 mL de tampão Glicina-HCl 0,1M pH 2,8 e o eluato foi colhido em frações de 1,5mL cada. Os tubos que receberam o eluato foram previamente preparados com 100 μ L de tampão de neutralização (Tris-HCl 1M pH 9,0). Os fragmentos Fc eluídos e neutralizados foram então dialisados contra tampão borato/salina.

A pureza e a identidade das frações Fab do AcMo K₂2 digerido com papaína e purificadas em coluna de Sepharose-Proteína A foram confirmadas em imunoblot revelado com anticorpos específicos anti-Fab e anti-Fc (Figura 12)

Figura 12 – SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot para caracterização do procedimento de digestão do AcMo K₂2. (A) AcMo K₂2, (B) K₂2_{Fc}, (C) K₂2_{Fab}, (1) SDS-PAGE do Padrão de peso molecular, (2) SDS-PAGE da amostra, (3) imunoblot da amostra contra anticorpo secundário anti-IgGFc de camundongo marcado com Peroxidase 1/2000, (4) imunoblot da amostra contra anticorpo secundário anti-IgGFab marcado com Peroxidase 1/2000. Revelação com DAB 0,05% e H₂O₂.

O anticorpo monoclonal clone K₂124 também foi submetido a digestão enzimática com papaína, de acordo com o mesmo protocolo aplicado na digestão do clone K₂2. A purificação de suas frações, no entanto, foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Proteína G. Um volume de 7 mL amostra foi passado por uma coluna de 1,5mL de resina cromatográfica. A amostra foi eluída e a

resina lavada com 10 mL de tampão Na_2HPO_4 20 mM pH7,0 para remoção quantitativa dos fragmentos Fab remanescentes na coluna. O produto eluído foi colhido em frações de 0,6 mL. Os fragmentos Fc retidos na resina foram eluídos com 10 mL de tampão Glicina-HCl 0,1M pH 2,7 e o eluato foi colhido em frações de 0,6 mL cada (Figura 13). Os tubos que receberam o eluato foram previamente preparados com 30 μL de tampão Tris-HCl 1M pH 9,0. Os fragmentos Fc eluídos e neutralizados foram então dialisados contra tampão Na_2HPO_4 20 mM pH7,0.

Figura 13 – Representação gráfica do procedimento de separação cromatográfica das frações Fab e Fc do AcMo K₂124 por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Proteína G. (DO) densidade óptica. Frações colhidas em tubos sequenciais de 0,6 mL cada. Eluição dos fragmentos Fab do anticorpo na lavagem da coluna com tampão Na_2HPO_4 20 mM pH7,0. Fragmentos Fc eluídos com tampão Glicina 0,1 M pH 2,7.

2.2 Caracterização dos insumos produzidos

2.2.1 Eletroforese (SDS-PAGE)

Para caracterização dos lotes de proteína purificados, foi realizada eletroforese em sistema Protean 3 (BioRad), com gel de SDS-PAGE 12,5% e espessura 0,75 mm por aproximadamente 80 minutos a 120 V e 2 A. Aplicaram-se em cada posição do gel 0,5 μg de proteína diluída em água pura, acrescido de tampão de amostra (composto por Glicerol, SDS, Tris HCl, Azul de Bromofenol e água destilada). Em cada ensaio foi reservada pelo menos uma posição para aplicação de 5 μL de padrão de peso molecular, com variação de 14 a 116 kDa (Fermentas).

Os géis submetidos a eletroforese que foram corados pela prata, passaram por sucessivas etapas de imersão sob agitação e lavagem, nas seguintes soluções:

- Metanol 50% / Ácido Acético 12% / Formol 0,05% por, no mínimo, 10 minutos
- três lavagens rápidas em água destilada,
- Etanol 50%, 10 minutos (três vezes)
- três lavagens rápidas em água destilada
- Tiosulfato de Sódio 0,02%, 10 minutos
- três lavagens rápidas em água destilada
- Nitrato de prata 0,2% / Formol 0,07% por 10 minutos
- três lavagens rápidas em água destilada
- Carbonato de Sódio 0,06% / Formol 0,05% até a visualização das bandas

A revelação foi bloqueada com Metanol 50% / Ácido Acético 12% por 5 minutos e a coloração foi fixada em Metanol 50% por 10 minutos. O gel foi mantido em água destilada até sua completa reidratação.

Para coloração por Alcian Blue, os géis foram submersos em Alcian Blue 0,5% (solubilizado em ácido acético 2%) por 2 horas e em seguida descorados em ácido acético a 2% por 1 hora.

A técnica de SDS-PAGE foi empregada tanto para caracterização da β_2 GPI como para análise do fracionamento dos anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI clones K₂2 e K₂124.

2.2.2 Imunoblot

Amostras de β_2 GPI purificada submetidas a SDS-PAGE 12,5% (2 μ g por poço) foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) em um sistema de transferência montado com duas camadas de papel cromatográfico 3 mm e duas camadas de papel cromatográfico 1 mm de cada lado do conjunto gel-membrana, por 18 horas a 4°C (50 V, 400 mA). A membrana foi corada com Ponceau para observação da transferência das proteínas e marcação das bandas do marcador de peso molecular a lápis, para referência ao final do experimento. A membrana foi bloqueada em PBS Tween 0,05%, leite 5% por 2 h sob agitação, lavada e incubada com anticorpos monoclonais (AcMo) anti- β_2 GPI humana clone 5F7 (ICN Pharmaceuticals) e clones produzidos no laboratório (K₂2, K₂37, K₂124, K₂57, K₂33, K₂II-3) diluídos em PBS Tween 0,05% leite 1%, sob agitação por 18 horas a 4°C ou 2 horas a 37°C. Após nova lavagem, foi incubada com Anticorpo

anti-IgG_{Fc} de cabra anti-camundongo, conjugado a Peroxidase (SIGMA) diluído 1/2000 em PBS Tween 0,05% leite 1%, 1 h sob agitação, lavada e revelada com Diaminobenzidina (DAB 0,05%, Tris 50 mM, 3,3 μ L H₂O₂ 30%).

O imunoblot foi utilizado para verificar o sucesso do fracionamento do anti- β_2 GPI clone K₂2. O reconhecimento das frações Fc e Fab e do anticorpo não digerido foi realizado com anticorpos anti-IgG_{Fc} e anti-IgG_{Fab} de cabra anti-camundongo, conjugados a Peroxidase (1/2000 em PBS Tween 0,05% leite 1%).

2.2.3 Dot-Blot

A reação de Dot-Blot foi realizada utilizando o sistema Bio-Dot SF (Bio-Rad) e membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences). O sistema foi umidificado em cuba contendo água Milli-Q e ligado a uma bomba de vácuo para melhor adesão das camadas.

A β_2 GPI foi aplicada sobre a membrana em diluições seriadas em água que variaram entre 0,01 μ g e 2,0 μ g de proteína por posição, para estudo da sensibilidade dos AcMos anti- β_2 GPI. Também foi estudada a influência do pH no reconhecimento da proteína pelos AcMos.

Nos primeiros ensaios, com o AcMo 5F7, 1,0 μ g de β_2 GPI por posição foi aplicado sobre a membrana em soluções-tampão pH 5,5 (MES), pH 8,0 (Tris), pH 7,0 (Tris) e pH 10,25 (Carbonato-bicarbonato). O volume final de amostra por posição foi de 50 μ L.

Nos testes de caracterização dos AcMos produzidos, foram utilizadas amostras de 1,0 μ g de β_2 GPI por posição em tampão Britton-Robinson, com pHs teóricos que variaram de 3,0 a 10,0. O volume final de amostra foi de 100 μ L por posição.

Os controles negativos foram realizados com albumina bovina fração V (1,0 μ g por posição) ou através da realização da reação na ausência de AcMo primário anti- β_2 GPI.

Após a aplicação das amostras, aguardou-se até que todo o volume fosse absorvido pelo sistema. O sistema foi desmontado para a retirada da membrana, que recebeu, logo em seguida, marcações a lápis indicando as posições de aplicação das amostras e numeração das mesmas. A membrana foi então cortada em tiras para a reação com os diferentes anticorpos.

As tiras de membrana foram colocadas em solução de bloqueio (PBST leite 5%) por 2 horas sob agitação. Após 3 lavagem de 10 minutos cada em PBST, as membranas foram incubadas com a solução contendo os anticorpos monoclonais (1/1000 em PBST leite 1%) por 18 horas a 4 ° C, sob agitação. Após nova série de lavagens em PBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com Peroxidase, por 1 hora sob agitação e submetidas a 3 lavagens de 10 minutos cada, em PBST. A revelação foi feita com solução de Diaminobenzidina (DAB 0,05%, Tris 50 mM, 3,3 μ L H₂O₂ 30%).

2.2.4 ELISA direto

Para titulação dos anticorpos monoclonais produzidos e para a caracterização de novos lotes de β_2 GPI purificada, foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), sobre placas sensibilizadas com zero a 1,0 μ g de β_2 GPI em 100 μ L de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 por posição, incubadas por uma noite em câmara úmida a 4°C. Após a sensibilização, a placa foi lavada 4 vezes com tampão PBS Tween 0,05% (PBST) e em seguida foi realizado bloqueio de reações inespecíficas com 200 μ L de solução PBST leite 5% por 1 hora a 37°C seguido de nova série de 4 lavagem com PBST.

Uma curva de diluição seriada do anticorpo foi distribuída sobre a placa, que foi incubada a 37°C por 1 hora, lavada e incubada com 100 μ L de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a Peroxidase (SIGMA) 1/2000 em PBST leite 1%, por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem, a reação foi revelada com substrato Orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma) 1 mg/mL e H₂O₂ 30% 1 μ L/mL. A revelação foi bloqueada após 5 minutos com H₂SO₄ 4N. A leitura das amostras, foi feita em comprimento de onda de 492 nm em leitor de placas (SLT, Spectra).

2.2.5 Preparo de tampões para estudo de influência do pH

Tampão Ácido 2-(*N*-morpholino)ethanesulfônico (MES)

C₆H₁₃NO₄S 0,01M

NaCl 0,00817 M

pH 5,5 a 6,5

Tampão Tris(hidroximetil)aminometano

$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ 0,01M

NaCl 0,0051 M

pH 7,0 a 9,0

Tampão Carbonato de sódio / Bicarbonato de sódio

Na_2CO_3 0,01M

NaHCO_3 0,01M

NaCl 0,005 M

pH10,25

Tampão Britton-Robinson

Solução-mãe:

H_3PO_4 0,04 M

H_3BO_3 0,04 M

CH_3COOH 0,04 M

Após diluição dos reagentes em água pura, a solução-mãe recebeu quantidades calculadas de NaOH 1,0 M para a obtenção das diferentes faixas de pH (Tabela 5)

Tabela 5 – Preparo do tampão Britton Robinson para os diferentes pHs

pH teórico	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10
Solução-mãe (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10
NaOH 1,0 M (mL)	0,4	0,5	0,75	0,9	1,125	1,3	1,425	1,625
pH real	3,18	4,09	5,13	5,96	6,96	7,95	9,14	10,25

2.3 Aplicação analítica dos insumos produzidos

2.3.1 Modelo experimental de sepse (S) e translocação bacteriana (TB)

Ratos Wistar machos com 3 meses e peso entre 175 e 225 g, procedentes do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia-CEDEME, da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), mantidos em jejum por 24 h foram

distribuídos aleatoriamente entre os grupos segundo o modelo experimental (KOH e SILVA, 1996; SILVA *et al.*, 1998):

- grupo controle sem manipulação: CRO (2 animais);
- grupo de controle de manipulação para translocação bacteriana (CTB): injeção de 10 mL de solução fisiológica no íleo terminal. (3 animais);
- grupo de translocação bacteriana (TB): inoculação de 10 mL de bactérias gram negativas resistentes à Tetraciclina *Escherichia coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) no íleo terminal (5 animais);
- grupo de controle de manipulação para sepse (CS): injeção de solução fisiológica (1 mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (3 animais);
- grupo de sepse ($S 10^7$): inoculação de bactérias gram negativas resistentes à Tetraciclina *Escherichia coli* R-6 (10^7 UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (6 animais);
- grupo de sepse ($S 10^9$): inoculação de bactérias gram negativas resistentes à Tetraciclina *Escherichia coli* R-6 (10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (8 animais);
- grupo controle manipulação para translocação bacteriana e sepse: injeção de 10 mL de solução fisiológica no intestino delgado e injeção de solução fisiológica (1 mL/100 g de peso corporal) na veia cava inferior (3 animais)
- dois grupos de sepse associada a translocação bacteriana (TB+S 10^7 e TB+S 10^9): inoculação de bactérias gram negativas resistentes à Tetraciclina *Escherichia coli* R-6 (10^7 e 10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal, respectivamente) na veia cava inferior e inoculação de 10 mL de bactérias gram negativas resistentes à Tetraciclina *Escherichia coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) no íleo terminal (6 e 5 animais, respectivamente).

A *Escherichia coli* utilizada neste modelo foi previamente padronizada pelo grupo de pesquisa

Para estudo da translocação bacteriana (TB), Os animais foram anestesiados com Ketamina (Agribands do Brasil Ltda, Brasil) + Xilasina (Agribands) 2:8, dose de 0,1 mL/100 g de peso corporal, intraperitoneal. Em seguida, foi realizada antissepsia do abdome com álcool a 70%; laparotomia mediana por planos anatômicos; ligadura do íleo terminal, a aproximadamente 1 cm do ceco; introdução de uma sonda oroduodenal na primeira porção do duodeno; e inoculação de 10 mL de bactérias *Escherichia coli* R-6 (10^{10} UFC/mL) ou solução fisiológica para controle de

TB e TB+S. Após a inoculação, efetuou-se a ligadura obstrutiva do duodeno e remoção da sonda com subsequente fechamento da parede abdominal em dois planos com sutura contínua. Para indução de sepse, após a laparotomia, inoculou-se 10^7 ou 10^9 UFC/mL/100 g de peso corporal de bactérias *Escherichia coli* R-6 na veia cava inferior. Realizou-se hemostasia do local da punção com subsequente fechamento da parede abdominal em dois planos com sutura contínua. Para os grupos controles de S e TB+S, a suspensão foi substituída por solução fisiológica (1 mL/100 g de peso). Após 3 h da inoculação bacteriana, tempo suficiente para que o fenômeno da TB aconteça, todos os animais sofreram nova laparotomia abdominal sob anestesia. A coleta de material foi realizada de maneira sequencial: primeiro a linfa (1 mL) do ducto linfático mesenterial, canulado e exteriorizado; depois o sangue da veia porta (5 mL) em seringa com 0,1 mL de EDTA e finalmente fragmentos de fígado e intestino delgado (íleo). O intestino foi cortado transversalmente com bisturi, lavado em solução fisiológica e imediatamente fixado sobre papel filtro em Metacarn (metanol, 60%; clorofórmio, 30% e Ácido Acético glacial, 10%) a 4°C por 3 a 4 h. Os tecidos foram então transferidos para etanol absoluto a 4°C por 12 a 24 h para posterior inclusão em parafina. Os animais foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia. A linfa e o soro separado por centrifugação a 2000 g por 15 minutos, foram congelados a -20°C até o momento do uso.

2.3.2 Imuno-histoquímica para β_2 GPI

Foram obtidos cortes histológicos de 3 μ m em micrótomo manual a partir dos fragmentos de fígado e íleo incluídos em parafina e previamente congelados a -20 °C. Os cortes foram distendidos por flutuação em água destilada a temperatura ambiente, transferidos para lâminas de vidro previamente silanizadas e aderidos à superfície em banho de água destilada a 40 °C. As lâminas contendo cortes histológicos de fígado e intestino foram então desparafinizadas em estufa a 55 °C por no mínimo 24 horas, seguido de imersão em Xilol a 40 °C por 30 minutos, Xilol a temperatura ambiente por 20 minutos e dois banhos de Etanol absoluto por 3 minutos cada. O material foi progressivamente hidratado com Etanol a 95%, 80% e água destilada corrente, 3 minutos em cada etapa.

Para bloquear ligações inespecíficas, as lâminas passaram por um banho de 20 minutos em Tampão Tris HCl 50mM Tween 0,1% (TBST) acrescido de leite

desnatado a 5%, seguido de três banhos de 5 minutos cada em tampão de lavagem (TBST). Ainda como recurso de bloqueio para ligações inespecíficas, o material foi submetido à incubação em tampão TBS acrescido de pool de soro de cabra normal a 5% por 30 minutos a 37 °C. O material foi então incubado com AcMo anti- β_2 GPI clone K₂2 (1/1000 em TBS/BSA) a 37 °C por 2 horas e lavado em TBST (três banhos de 5 minutos cada).

A reação foi revelada com o sistema EnVision[®] Fosfatase Alcalina (Dako), um polímero conjugado a Fosfatase Alcalina associado a anticorpos secundários anti-IgG de camundongo e coelho. Este polímero é mais sensível do que a maioria dos sistemas utilizados em imuno-histoquímica para amplificação do sinal de ligação do anticorpo primário e é livre de biotina, sendo conveniente para amostras de fígado. As lâminas foram incubadas com o polímero a 37 °C por 30 minutos e lavadas em TBST (três banhos de 5 minutos cada). O cromógeno Fast Red[®] (Dako), acrescido de Levamisol, preparado no momento do uso, foi aplicado sobre os cortes à temperatura ambiente até que fosse observada reação cromógena satisfatória (5 ± 1 minutos). A revelação foi bloqueada por imersão dos cortes em água destilada por 5 minutos. Os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, seguido de banho em água destilada corrente, 10 mergulhos em cuba contendo água amoniacal (Hidróxido de Amônio 0,5%) e lavagem em água destilada corrente. As lâminas receberam então uma camada de meio de montagem aquoso Ultramount[®] (Dako) sobre os cortes e permaneceram em estufa a 55° C por 30 a 40 minutos ou até que o meio estivesse completamente seco.

2.3.3 Testes de especificidade do sistema EnVision[®]

Placas Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com zero a 1,0 μ g de β_2 GPI em 100 μ L de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 por posição, incubadas por uma noite em câmara úmida a 4°C. As cavidades foram então lavadas 3 vezes com 200 μ L de tampão Tris HCl 50mM Tween 0,1% (TBST) e passaram em seguida por uma etapa de fixação semelhante à dos fragmentos de tecido utilizados nos ensaios de imuno-histoquímica: 200 μ L de Metacarn (metanol, 60%; clorofórmio, 30% e Ácido Acético glacial, 10%) a 4°C por 3 horas seguido de 200 μ L de etanol absoluto a 4°C por 18 horas. Um segundo método de fixação, utilizando 200 μ L de Formalina em temperatura ambiente por 24 horas também foi utilizado nestes ensaios,

paralelamente. Após fixação, as cavidades foram lavadas 3 vezes com 200 μ L de água destilada e 3 vezes com 300 μ L de TBST para a completa remoção dos resíduos das soluções fixadoras.

As cavidades foram então incubadas com 200 μ L de TBST acrescido de leite desnatado a 5% por 20 minutos à temperatura ambiente, seguido de três lavagens com 200 μ L de TBST. O material foi submetido à um segundo bloqueio com 200 μ L de tampão TBS acrescido de pool de soro de cabra normal a 5% por 30 minutos a 37 °C. O excesso da solução de TBST com soro de cabra foi removido e a placa foi então incubada com AcMo anti- β_2 GPI clone K₂2 (1/1000 em TBS/BSA) a 37 °C por 3 horas e lavado em TBST. A reação foi revelada com o sistema EnVision[®]: incubação com o polímero a 37 °C por 30 minutos, lavagem em TBST, cromógeno Fast Red[®] (Dako), sem Levamisol, preparado no momento do uso, por 5 $\pm$ 1 minutos. A revelação foi bloqueada com água destilada e os poços receberam 20 μ L do meio de montagem aquoso Ultramount.

2.3.4 ELISA indireto (competição)

Placas Maxisorp (Nunc) de 96 cavidades foram sensibilizadas com 0,2 μ g de β_2 GPI por cavidade em 100 μ L de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. A placa foi lavada cinco vezes com PBST. Foram aplicados 200 μ L de PBST leite 5% em cada cavidade e a placa foi incubada por 90 min a 37°C para bloqueio de reações inespecíficas. Após nova lavagem, as cavidades receberam 100 μ L de amostra previamente submetida à competição com concentrações crescentes de β_2 GPI pré-incubadas com o AcMo 5F7 (1/1000 em PBST leite 1%, por 1 h a 37°C). A placa foi lavada em seguida e incubada com 100 μ L de anticorpo de cabra Anti-IgG_{FC} de camundongo, conjugado a Peroxidase (Sigma) 1/5000 em PBST leite 1%, a 37°C, 90 min, novamente lavada e revelada com OPD 1 mg/mL e H₂O₂ 30% 1 μ L/mL. A leitura das amostras, em duplicatas, foi feita em 492 nm no leitor de placas. A curva padrão foi determinada e representada no formato linear (% de ligação x log da concentração).

Uma vez padronizada, esta metodologia passou a ser empregada não apenas para a determinação de β_2 GPI em solução, mas também para a caracterização dos anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI produzidos no laboratório.

2.3.5 ELISA direto (sanduíche)

Na tentativa de padronizar um método alternativo ao ELISA indireto de competição para a determinação de β_2 GPI em solução, foram realizados ensaios sobre placas sensibilizadas com AcMo K₂124_{Fab} em concentrações de 0,05 a 5 μ g/mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. A placa foi lavada quatro vezes com PBST. Foram aplicados 200 μ L de PBST leite 5% em cada cavidade e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C para bloqueio de reações inespecíficas. Após novo ciclo de quatro lavagens, as cavidades receberam 100 μ L de β_2 GPI em concentrações que variaram de 0,05 a 150 μ g/mL de PBS e novamente incubadas por 1 hora a 37°C. A placa foi novamente lavada com PBST e então recebeu 100 μ L por cavidade de AcMo K₂2 1/2000 em PBST leite 1% e incubada por mais 1 hora a 37°C. Terminada a incubação com o anticorpo de detecção, a placa foi lavada seis vezes com PBST e incubada com 100 μ L por cavidade de anticorpo de cabra Anti-IgG_{Fc} de camundongo, conjugado a Peroxidase (SIGMA) 1/4000 em PBST leite 1%, a 37°C, 1 hora, novamente lavada e revelada com OPD 1 mg/mL e H₂O₂ 30% 1 μ L/mL por 5 minutos, quando foi bloqueada com H₂SO₄ 4N. A leitura dos resultados, obtido em unidades de densidade ótica, foi realizada em espectrofotômetro, em λ 492nm, sem filtro.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da β_2 GPI purificada

A cada produto obtido após uma sequência completa de purificação foi atribuído um número de lote sequencial. Os diversos lotes de proteína purificada apresentaram migração eletroforética de acordo com as descrições de literatura. A β_2 GPI mostrou alguma variação na proporção entre as diversas bandas reveladas pela prata. Foram observadas as bandas principais, descritas como correspondentes aos monômeros da proteína glicosilada em sua forma nativa, com peso molecular de 66 kDa e às formas da proteína nativa com diferentes graus de glicosilação, com pesos moleculares entre 45 e 66 kDa.

Os lotes de proteína purificada apresentaram mais frequentemente as bandas correspondentes aos pesos moleculares de 45 kDa e de 90kDa, descritas como dímeros da proteína nativa. Formas clivadas foram atribuídas às bandas com 35 a 40 kDa de peso molecular. Em soluções concentradas, as moléculas de β_2 GPI tendem a formar macroagregados que apresentaram-se no gel SDS-PAGE como bandas múltiplas de peso molecular acima de 116 kDa.

Em geral, o perfil eletroforético dos lotes de proteína purificada observados em SDS-PAGE 12,5% corados pela prata apresentou proporções variáveis das bandas de peso molecular acima de 116 kDa, múltiplas bandas com peso molecular entre 45 kDa e 66 kDa e algumas bandas com peso molecular entre 35 e 45 kDa (Figura 14).

Figura 14 – Perfil eletroforético de diferentes lotes de β_2 GPI purificada. SDS-PAGE 12,5% corado pela prata. (PM) marcador de peso molecular.

Durante a padronização da técnica com a nova resina cromatográfica, utilizada a partir da purificação do lote 67, notou-se uma significativa diminuição na variação do perfil eletroforético da proteína obtida (Figura 15).

Figura 15 - Perfil eletroforético de lotes sequenciais de β_2 GPI purificada com a nova resina, em comparação à resina antiga. SDS-PAGE 12,5% corado pela prata. (PM) marcador de peso molecular.

Durante a etapa de eluição da β_2 GPI da resina cromatográfica, no processo de purificação, as frações que compõem a frente de eluição, normalmente mais concentradas, apresentaram em SDS-PAGE 12,5% bandas densas na região de alto peso molecular, seguidas por frações ricas em material com peso molecular aparente de 90 kDa (correspondente às formas diméricas). Frações com banda única na região de 45 kDa só predominaram na cauda do pico de eluição (Figuras 16 e 17).

Este fenômeno de aparente agregação das moléculas em formas oligoméricas e diméricas nas frações mais concentradas não foi reversível com a diluição das amostras, no período de duas semanas. Tampouco ocorreu agregação com a concentração das amostras inicialmente mais diluídas, embora tenha sido observado um efeito de discreto aumento na migração da banda única presente nestas amostras (Figura 18). Entre as mudanças observadas, a dupla banda na região de 90 kDa mostrou uma tendência a aparecer como uma banda única, com o tempo. Este fenômeno foi interpretado como decorrente da fragmentação da molécula ou perda de componentes não covalentemente ligados à β_2 GPI e posteriormente investigado em relação à presença de contaminantes não proteicos.

Figura 16 - Representação gráfica do procedimento de purificação da β_2 GPI (lotes 78 e 79) por cromatografia de afinidade. Valores expressos em unidades de densidade ótica (DO) das frações eluídas, colhidas em tubos numerados de 2 mL cada. Ao lado, SDS-PAGE 12,5% corado pela prata das frações 5 e 14 (purificação do lote 78) e 6, 10 e 13 (purificação do lote 79).

Figura 17 - (A) Representação gráfica do procedimento de purificação da β_2 GPI (lote 80) por cromatografia de afinidade. Valores expressos em unidades de densidade ótica (DO) das frações eluídas, colhidas em tubos numerados de 0,6 mL cada. (B) SDS-PAGE 12,5% corado pela prata das frações eluídas. (C) SDS-PAGE 12,5% corado pela prata do pool das frações 11 a 23 e das frações 24 a 52. (PM) padrão de peso molecular.

Figura 18 - Perfil eletroforético da β_2 GPI após alteração de concentração da solução. (A) efeito observado 24 horas após alterações de concentração, (B) as mesmas amostras observadas 2 semanas após alterações de concentração. SDS-PAGE 12,5% corado pela prata. (PM) padrão de peso molecular.

As frações contendo banda única de 45 kDa e as frações contendo bandas múltiplas (45 e 90 kDa) foram armazenadas separadamente e submetidas a SDS-PAGE 12,5%. Os géis corados pela prata foram comparados com géis corados por Alcian Blue, e demonstrou-se a presença de cadeias de glicosilação da proteína tanto nas bandas de 45 kDa como as bandas na região de 90 kDa (Figura 19).

Adicionando-se ao procedimento de eletroforese tradicional (120v durante aproximadamente 90 minutos), uma etapa de 30 segundos com alta voltagem (240v), observou-se diminuição das bandas de pesos moleculares intermediários entre 45 e 90 kDa, no gel corado por prata. Esta diminuição associou-se ao aparecimento de bandas de peso molecular aparente inferior a 35kDa o que sugere que as bandas de peso molecular na região de 60 a 66 kDa correspondam a β_2 GPI associada, através de ligações fracas, a contaminantes de peso molecular baixo, (Figura 20). Este procedimento também resultou na perda de definição da dupla banda na região de 90kDa.

Figura 19 – (A) SDS-PAGE 12,5% corado pela prata de diferentes lotes de β_2 GPI, (B) as mesmas amostras, em concentração 4 vezes maior, coradas por Alcian Blue 0,5%. (PM) marcador de peso molecular 10 a 170 kDa (Fermentas).

Figura 20 – (A) SDS-PAGE 12,5%, procedimento tradicional (120v/90min), (B) SDS-PAGE 12,5%, procedimento incluindo etapa de alta voltagem (120v/5min – 240v/30seg – 120v/90min). Amostras não-filtradas e filtradas em membranas com poro de 0,22 μ m (estéril). Lavagem do filtro com água após a passagem da amostra contendo bandas de 45 e 90 kDa, resultou em recuperação de amostra com leitura de concentração por absorbância (λ 280nm). (PM) padrão de peso molecular.

Cada lote de β_2 GPI foi caracterizado quanto à resposta em ensaios ELISA direto e imunoblot, utilizando o anticorpo monoclonal comercial 5F7 (ICN) como padrão ouro para a identificação do produto purificado como β_2 GPI.

No ELISA direto, foi determinada a correlação entre o título da resposta e o limite de detecção da β_2 GPI purificada pelo AcMo anti- β_2 GPI 5F7 (Figura 21).

Figura 21 – ELISA direto para caracterização de novos lotes de β_2 GPI purificada. Placa adsorvida com diferentes quantidades de proteína (0,0 a 0,5 μ g). Anticorpo primário monoclonal anti- β_2 GPI clone 5F7 (1/250 a 1/16000). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H_2O_2 , bloqueada com H_2SO_4 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

O aspecto macroscópico das frações ricas em bandas de 45 e 90 kDa foi diferente após a etapa de diálise em água pura. O pool de frações reunidas segundo estes perfis foi límpido e transparente para a banda de 45 kDa e turvo para a banda de 90 kDa (Figura 22), evidenciando a presença de agregados da proteína em suspensão. Nossos resultados até o momento não permitem identificar a composição dos agregados, apenas verificar evidências de sua presença no material purificado.

Figura 22 – Aspecto macroscópico das soluções contendo β_2 GPI purificada após diálise em água pura. À esquerda, pool de frações de um mesmo lote que apresentavam banda única de 45 kDa em SDS-PAGE 12,5%. À direita, pool de frações de um mesmo lote que apresentavam predomínio da banda de 90 kDa em SDS-PAGE 12,5%.

Observaram-se diferenças no padrão de reconhecimento das amostras pelo AcMo 5F7 em ELISA direto de acordo com a densidade das bandas de 45 e 90 kDa, o fenômeno foi verificado tanto em lotes independentes, quanto em frações diferentes de um mesmo lote. Em todos os ensaios, o AcMo reconheceu o antígeno com sensibilidade diretamente proporcional à presença de β_2 GPI com peso molecular aparente de 45 kDa em cada amostra (Figura 23). A presença das formas de β_2 GPI associadas a contaminantes de baixo peso molecular (66 kDa) e da forma dimérica (90 kDa) não modificaram o reconhecimento da proteína no ELISA pelo AcMo 5F7. Estes resultados foram confirmados por reações de imunoblot, que mostraram um reconhecimento predominante pelo AcMo 5F7 das bandas de 45 kDa.

Figura 23 – ELISA direto realizado com placas sensibilizadas com diferentes amostras de β_2 GPI. O reconhecimento das amostras pelo AcMo 5F7 no ELISA direto é diretamente proporcional à densidade de banda de 45 kDa em SDS-PAGE 12,5%. Em destaque, ELISA direto realizado nos mesmos moldes, com proteína purificada a mais de 2 semanas. Anticorpo primário monoclonal anti- β_2 GPI clone 5F7 (1/250 a 1/16000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H_2O_2 , bloqueada com H_2SO_4 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

Estudos de estabilidade de β_2 GPI purificada e armazenada em geladeira por vários meses (SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e Imunoblot) demonstraram alteração no peso molecular aparente da proteína, em alguns lotes. Nas reações de imunoblot, a banda predominantemente reconhecida pelo AcMo 5F7 acompanhou a alteração de peso molecular aparente apresentado na eletroforese, indicando que o desvio no peso molecular das bandas que correspondem à forma monomérica da proteína, em lotes armazenados, não impediu o reconhecimento pelo AcMo específico (Figura 24), mesmo que tenha sido frequente a perda de sensibilidade durante o armazenamento. Este fenômeno, apesar de frequente, não mostrou reprodutibilidade para os desvios de migração e nem para a perda de sensibilidade entre os lotes estudados (Figura 25).

Figura 24 – Alteração do perfil eletroforético durante armazenamento a 4°C de β_2 GPI purificada (1) imediatamente após a purificação, (2) armazenado por 1 mês, (3) armazenado por 8 meses. SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot com anticorpo monoclonal comercial 5F7 (1/1000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H_2O_2 . (PM) marcador de peso molecular 10 a 170 kDa (Fermentas).

Figura 25 – (A) SDS-PAGE 12,5% corado pela prata de diferentes lotes de β_2 GPI armazenada, (B) imunoblot das respectivas amostras, em reação com anticorpo monoclonal comercial 5F7 (1/1000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H_2O_2 . (PM) marcador de peso molecular 10 a 170 kDa (Fermentas).

A proporção entre as diversas bandas do perfil eletroforético de um mesmo lote de proteína armazenada foi susceptível a variações de pH. Em pH ácido, a banda que migra com peso molecular aparente entre 55 e 66 kDa aparece fortemente corada pela prata. Em pH acima de 5,0 ela aparece mais fracamente corada. A revelação pelo AcMo 5F7 foi mais sensível em pH ácido (Figura 26).

O efeito de pH sobre o reconhecimento do antígeno pelo AcMo 5F7 também foi investigado através de Dot Blot, com a proteína adsorvida em membranas de nitrocelulose, sem a utilização de SDS. Nesta condição, o pH alcalino favoreceu o reconhecimento da proteína pelo anticorpo (Figura 27). O Dot Blot mostrou sensibilidade para detecção do antígeno de 1,0 μ g por posição, na técnica utilizada.

Figura 26 – (A) SDS-PAGE 12,5% corado pela prata de amostras de β_2 GPI lote 71 preparadas em diferentes condições de pH (tampão Briton-Robinson), (B) imunoblot das respectivas amostras, em reação com anticorpo monoclonal comercial 5F7 (1/1000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H_2O_2 . (PM) marcador de peso molecular 10 a 170 kDa (Fermentas).

Figura 27 – (A) Reação de Dot Blot avaliando a influência de variações de pH e massa de β_2 GPI no reconhecimento pelo clone 5F7 (1/1000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H_2O_2 . (C neg.) BSA 1,0 µg/cavidade. (B) Histograma de intensidade linear de cor produzido através da análise da imagem por software (Image J).

3.2 Caracterização dos anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI produzidos

A caracterização dos Anticorpos Monoclonais produzidos no laboratório foi realizada através de ensaios ELISA direto, Dot Blot e Imunoblot.

Os testes ELISA foram realizados, em um primeiro momento, em placas sensibilizadas com o mesmo antígeno utilizado na imunização dos camundongos. Nos testes com os anticorpos K₂57, K₂II-3 e K₂33, as placas foram sensibilizadas com β_2 GPI lote 2. Para os testes com os anticorpos K₂2, K₂37 e K₂124, as placas foram sensibilizadas com β_2 GPI lote 4 (Figura 28).

Figura 28 – ELISA direto com curva de diluição dos anticorpos monoclonais produzidos no primeiro ciclo de expansão. Placa sensibilizada com 0,5 μ g de β_2 GPI lote 2 (A), e lote 4 (B). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H₂O₂, bloqueada com H₂SO₄ 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

Os resultados indicaram maior sensibilidade dos AcMo K₂33, K₂57, K₂ II3 e K₂2 para o reconhecimento da β_2 GPI em testes ELISA do que dos AcMo K₂37 e K₂124.

A resposta dos AcMo produzidos pelos clones K₂37, K₂57 e K₂124 foi novamente avaliada, após descongelamento e expansão dos clones. Neste ensaio, foi utilizado um pool de lotes de proteína purificada, que não continha a proteína dos lotes 2 e 4, para sensibilizar a placa. O AcMo K₂37 não reconheceu o antígeno. O AcMo K₂124 mostrou uma sensibilidade mais alta do que o AcMo K₂57. A concentração do antígeno utilizada na etapa de sensibilização revelou-se uma variável importante (Figura 29).

Figura 29 – ELISA direto com curva de diluição dos anticorpos monoclonais produzidos (2º ciclo de expansão). (A) cavidades sensibilizadas com 0,5 µg de β_2 GPI, (B) cavidades sensibilizadas com 1,0 µg de β_2 GPI. Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H_2O_2 , bloqueada com H_2SO_4 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

O mapa das correlações entre o título da resposta no ELISA direto e o limite de detecção da β_2 GPI purificada para cada AcMo estável foi plotado em gráficos que mostraram que, dos três hibridomas expandidos em ascite após teste de descongelamento, os AcMo K₂124 e K₂57 apresentaram sensibilidade para reconhecimento do antígeno adsorvido em fase sólida (Figura 30). O AcMo K₂37 foi pouco sensível em todas as condições testadas em ELISA direto.

Dentre os AcMo produzidos, o clone K₂2 foi o que apresentou maior sensibilidade de reconhecimento para β_2 GPI adsorvida em placa, independentemente do lote de antígeno utilizado no ensaio. Sua resposta foi semelhante à do anticorpo comercial para todas as amostras de β_2 GPI testadas (Figura 31).

Figura 30 – ELISA direto comparando os anticorpos monoclonais produzidos com o AcMo 5F7. Placa adsorvida com diferentes quantidades de proteína (0,0 a 0,5 μ g). Anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI (1/250 a 1/8000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H_2O_2 , bloqueada com H_2SO_4 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm. Em destaque, adaptação na escala do eixo y para melhor visualização das diferenças de resposta entre os anticorpos K₂₁₂₄ e K₂₅₇.

Figura 31– Caracterização do AcMo K₂2 purificado a partir do sobrenadante de cultura celular convencional (ELISA direto). Placa adsorvida com diferentes quantidades de proteína (0,0 a 0,5 µg). Anticorpo primário monoclonal anti-β₂GPI (1/250 a 1/16000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H₂O₂, bloqueada com H₂SO₄ 4N. (DO) densidade ótica λ=492 nm.

O estudo dos efeitos de pH e concentração das soluções-mãe de β₂GPI sobre o reconhecimento da proteína adsorvida em membranas de nitrocelulose foi repetido com todos os AcMo produzidos no laboratório. A curva de concentração da proteína aplicada à membrana foi adaptada, considerando a sensibilidade do método observada no ensaio anterior. Todos os clones reconheceram a proteína no Dot-Blot (Figura 32).

Figura 32 – Reconhecimento dos AcMo produzidos em Dot-Blot utilizando β₂GPI aplicada em diferentes massas por posição. Os AcMo 5F7 e K₂2 foram utilizados na diluição 1/1000 e os demais, na diluição 1/200. Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H₂O₂. Albumina bovina fração V (1,0 µg/cavidade) utilizada como controle negativo.

Uma análise mais detalhada, conduzida por comparação da reatividade dos anticorpos K₂2, K₂124 e 5F7 no Dot-Blot mostrou diferenças importantes de reconhecimento entre os AcMos. O anticorpo comercial (5F7) reconheceu a amostra com banda única de 45 kDa com sensibilidade menor do que a do K₂2 em todos os pHs testados, sendo maior a sensibilidade quanto mais alcalino o meio de reação,

para ambos os anticorpos. Em Tris (tampão Tris 20 mM / NaCl 200 mM pH 8,0), condição na qual a amostra se encontrava após a purificação, o limite de sensibilidade foi menor do que 0,25 µg/posição para os AcMos K₂2 e 5F7.

O AcMo K₂124 reconheceu esta mesma amostra com baixa sensibilidade. Houve reação positiva foi observada na série em tampão de Britton-Robinson apenas com pH acima de 7,0 e, em Tris, quando a massa aplicada de β₂GPI foi maior ou igual a 1,0 µg/posição.

A adição de SDS na amostra diminuiu a sensibilidade para todos os AcMos testados.

Em Tris-NaCl pH 8,0, a fração rica na banda de 90 kDa foi reconhecida somente pelos AcMos K₂2 e K₂124, na ausência de SDS, com sensibilidades equivalentes a 0,25 µg/ posição e 0,75 µg/ posição, respectivamente. Na série em tampão de Britton-Robinson a reação foi positiva apenas em pH alcalino (Figuras 33 e 34).

Figura 33 – (A) Diferentes frações de um mesmo lote de β_2 GPI em SDS-PAGE 12,5% corado pela prata. (B) Dot-Blot das respectivas amostras, aplicadas em diferentes massas por posição. O gráfico representa numericamente a intensidade de cor produzida pela reação. Os dados foram gerados a partir da imagem digitalizada das membranas (abaixo de cada gráfico) através de histograma de intensidade linear de cor produzido pelo software Image J. A plotagem dos dados foi realizada no Microsoft Excel. Os AcMo 5F7 e K₂2 foram utilizados na diluição 1/1000 e o AcMo K₂124 na diluição 1/100. Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H₂O₂. Controle negativo corresponde à reação realizada na ausência de anticorpo primário.

Figura 34 – Dot-Blot de diferentes frações de um mesmo lote de β_2 GPI diluídas em tampão Britton-Robinson (pHs 3 a 10) com 1,0 μ g de proteína por posição. O gráfico representa numericamente a intensidade de cor produzida pela reação. Os dados foram gerados a partir da imagem digitalizada das membranas (abaixo de cada gráfico) através de histograma de intensidade linear de cor produzido pelo software Image J. A plotagem dos dados foi realizada no Microsoft Excel. Os AcMo 5F7 e K₂2 foram utilizados na diluição 1/1000 e o AcMo K₂124 na diluição 1/100.

Para caracterização do padrão de reconhecimento da β_2 GPI pelos AcMo, foram realizadas reações de imunoblot com diferentes lotes da proteína β_2 GPI purificada. Os AcMo produzidos apresentaram diferenças no padrão de reconhecimento das bandas atribuídas aos monômeros da proteína nativa, seus agregados e formas clivadas da proteína.

O AcMo K₂2 assemelhou-se com a referência comercial 5F7, apresentando boa especificidade para a banda de 45 kDa. O AcMo K₂124 demonstrou alta capacidade de reconhecimento para as formas clivadas da β_2 GPI, com reação positiva para as bandas entre 35 e 45 kDa de peso molecular. Os AcMo K₂37 e K₂57 não mostraram reprodutibilidade de resposta entre os diferentes lotes de antígeno. O AcMo K₂57 mostrou sensibilidade maior do que todos os demais para a detecção de macroagregados ou n-meros da β_2 GPI com peso molecular superior a 116 kDa, observados em alguns dos lotes (Figura 35).

Figura 35 – Imunoblot revelando o reconhecimento de diferentes lotes de β_2 GPI pelos AcMo produzidos no laboratório em comparação com o padrão ouro comercial (5F7, 1/1000). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Revelação com DAB e H₂O₂. Os AcMo 5F7 e K₂2 foram utilizados na diluição 1/1000 e os demais, na diluição 1/200.

O AcMo K₂2, além de apresentar especificidade semelhante à do AcMo 5F7, mostrou-se ainda mais sensível em relação ao anticorpo comercial. Em condições alcalinas, o AcMo K₂2 foi capaz de reconhecer bandas não reveladas pelo AcMo 5F7 (Figura 36).

Figura 36 – SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot da β_2 GPI lote 71 em diferentes condições de pH (tampão Britton-Robinson). Imunoblot realizado com AcMo comercial 5F7 (1/1000) e com AcMo produzido no laboratório K₂2 (1/1000). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/2000). Reação revelada com DAB e H₂O₂. (PM) marcador de peso molecular 10 a 170 kDa (Fermentas).

Por apresentar maior sensibilidade nos testes anteriores, o clone K₂2 foi considerado o melhor candidato à substituição do anticorpo comercial (clone 5F7) para caracterização da β_2 GPI purificada. Este anticorpo mostrou sensibilidade adequada para determinação da concentração de β_2 GPI em solução no teste ELISA indireto (de competição), e seu desempenho foi comparado ao do clone 5F7 (Figura 37). Os resultados fazem parte do trabalho de doutorado da estudante Elisângela Monteiro Pereira.

Figura 37 – Curva de competição da β_2 GPI purificada com AcMo 5F7 (comercial) e AcMo K₂2. ELISA indireto realizado com 0,2 ug de β_2 GPI adsorvida na placa e competição do AcMo com a proteína em solução de concentrações crescentes.

Devido à semelhança do perfil de reconhecimento e da sensibilidade obtida com o AcMo K₂2 e com ao anticorpo comercial 5F7, nos diversos testes, o AcMo K₂2 foi escolhido para padronização inicial do método imuno-histoquímico.

O sobrenadante das culturas celulares convencionais dos clones K₂2, K₂37, K₂57 e K₂124 reconheceram β_2 GPI em reações de imunoblot (Figura 38). Esta reatividade foi mantida pelos anticorpos purificados a partir do líquido ascítico após expansão *in vivo*. O sobrenadante de cultura celular convencional do clone K₂2, que apresentou alta sensibilidade e especificidade em imunoblot, foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-Proteína G e testado em ELISA direto, com resultados semelhantes aos do AcMo 5F7 (Figura 39). Desta maneira, descartou-se a necessidade de expansão do clone K₂2 *in vivo*. Apesar dos resultados promissores apresentados pela expansão em cultura celular convencional, as duas tentativas de expansão dos hibridomas K₂37 e K₂124 em cultura sob agitação ("spinner"), como alternativa de produção em maior escala sem o uso de animais, não mostraram resultados conclusivos em testes ELISA.

Figura 38 – Imunoblot revelando o reconhecimento da β_2 GPI pelos AcMo anti- β_2 GPI purificados após expansão *in vivo* em comparação com os sobrenadantes de culturas celulares convencionais. Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com Peroxidase. Revelação com DAB 0,05% e H_2O_2 .

Figura 39 – Imunoblot e ELISA direto revelando o reconhecimento de β_2 GPI pelos AcMo 5F7 (1/1000) e K22 purificado a partir do sobrenadante de cultura convencional (1/1000). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com Peroxidase (1/2000). Revelação do imunoblot com DAB e H_2O_2 e revelação do ELISA com OPD e H_2O_2 .

3.3 Aplicação analítica dos insumos produzidos

O AcMo K₂2, revelou a presença da β_2 GPI nos tecidos de fígado e intestino de ratos submetidos ao modelo de sepse e translocação bacteriana, em reações imuno-histoquímicas. O padrão de marcação hepática para a β_2 GPI dependeu da condição clínica do animal.

Nos cortes histológicos de fígado, o grupo *naïve* apresentou reação positiva para β_2 GPI heterogeneamente distribuída, com marcação mais intensa nos leitos sinusoidais. Nos dois grupos controle, a marcação para β_2 GPI revelou-se em padrão difuso que não se restringiu aos leitos sinusoidais, aparecendo também nos citoplasmas dos hepatócitos. Os animais do grupo Sepse apresentaram forte reação positiva para β_2 GPI, em localização restrita aos espaços-porta e regiões periféricas dos lóbulos hepáticos (Figura 40).

O padrão focal e granuloso da marcação intracitoplasmática observada no fígado dos animais sépticos foi morfológicamente sugestivo de domínios de secreção para a bile. As regiões periportais dos tecidos hepáticos destes animais apresentaram também uma certa refringência, e a coloração por Vermelho Congo sugeriu a presença de substância amilóide.

Os animais do grupo Translocação Bacteriana (TB) apresentaram reação positiva com padrão fraco e difuso, distribuído principalmente em regiões centrolobulares.

Nos cortes de intestino delgado, a região do íleo terminal dos animais dos grupos Sepse e TB apresentou marcação positiva nas células endoteliais e no estroma da porção apical das vilosidades. Os animais dos grupos *naïve*, controle de Sepse e controle de TB, no entanto, também apresentaram reação positiva nestas regiões, com variações de intensidade inconclusivas.

Figura 40 – Imuno-histoquímica para β_2 GPI em tecidos de fígado e intestino delgado (íleo) de ratos submetidos ao modelo de sepsis e translocação bacteriana. AcMo anti- β_2 GPI clone K₂2 (1/1000). Reação revelada com sistema EnVision®. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Aumento 100x.

Em todos os experimentos realizados, os tecidos utilizados como controle negativo apresentaram alguma reação inespecífica. As reações inespecíficas, geralmente de baixa intensidade, ocorreram em regiões coincidentes com as regiões de marcação observadas nos tecidos testados com AcMo K₂2 (Figura 41).

Figura 41– Imuno-histoquímica em tecidos de fígado ratos do grupo sepse revelando reação inespecífica nas reações de controle negativo (ausência de anticorpo primário anti- β_2 GPI). Revelação com sistema EnVision[®]. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Aumento 400x.

Placas ELISA sensibilizadas com β_2 GPI foram empregadas para detectar ligação inespecífica entre a proteína e o polímero conjugado do sistema de revelação. As condições de simulação dos controles negativos da imuno-histoquímica não produziram reação positiva. A intensidade de cor na revelação da reação na presença do AcMo K₂2 não foi dependente da quantidade de β_2 GPI adsorvida na placa e também não variou com a exposição da proteína aos fixadores histológicos formalina e metacarn (Figura 42)

Figura 42 – Teste do sistema EnVision em placa adsorvida com diferentes quantidades de β_2 GPI e fixadas com Formalina ou Metacarn. (+) reação realizada com anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI clone K₂2 (1/1000), (-) Controle negativo (ausência de anticorpo primário). Reação revelada com o sistema EnVision[®].

Foi possível observar a presença de moléculas não digeridas ou parcialmente digeridas na amostra que deveria conter apenas fragmentos Fc. O anticorpo anti-IgG_{FC} não identificou nenhuma banda na fração contendo os fragmentos Fab purificados (Figura 43).

Figura 43 – SDS-PAGE 12,5% corado pela prata e imunoblot do Anticorpo Monoclonal clone K₂2 e suas frações Fc e Fab (linha 1: Padrão de peso molecular, linha 2: Amostra). Reconhecimento por Imunoblot através dos anticorpos secundários anti-camundongo IgG_{FC} (linha 3) e anti-camundongo IgG_{Fab} (linha 4) ambos conjugados à Peroxidase. (A) Anticorpo Monoclonal clone K₂2 não-digerido, (B) Anticorpo Monoclonal clone K₂2_{FC}, (C) Anticorpo Monoclonal clone K₂2_{Fab}.

A fração Fab, mostrou-se eficaz na detecção de monômeros da proteína, com perfil de reconhecimento semelhante ao do anticorpo K₂2 não digerido (Figura 44).

Figura 44 – SDS-PAGE 12,5% e Imunoblot para β_2 GPI, utilizando como anticorpo primário o clone K₂2 ou apenas a fração Fab. (PM) Marcador de peso molecular. Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com Peroxidase (anti-IgG_{FC} para revelação da reação com anticorpo não-digerido e anti-IgG_{Fab} para revelação da reação com fração Fab, ambos em diluição 1/2000). Revelação com DAB 0,05% e H₂O₂.

Os fragmentos Fab obtidos no processo de digestão do clone K₂2 também foram testados quanto ao reconhecimento pelo polímero do kit EnVision®. Não foi observada marcação nas cavidades expostas ao AcMo K₂2_{Fab}, indicando que o polímero não reconhece os fragmentos Fab anti- β_2 GPI (Figura 45).

Figura 45 – Teste do sistema EnVision em placa adsorvida com diferentes quantidades de β_2 GPI e fixadas com Metacarn mostrando que o Polímero do sistema EnVision, utilizado na revelação, não reconhece a fração Fab do AcMo K₂2.

A natureza da reação inespecífica foi adicionalmente investigada, utilizando-se os fragmentos de tecido hepático e intestinal de animais de todos os grupos experimentais, em quatro procedimentos distintos de imuno-histoquímica:

- incubação com K₂2, revelado com o sistema EnVision®,
- incubação com K₂2_{Fab}, revelado com o sistema EnVision®,
- incubação com anti-IgG de camundongo conjugado a Peroxidase, revelado com DAB, seguido de incubação com K₂2, revelado com o sistema EnVision®,
- incubação com anti-IgG de camundongo conjugado a Peroxidase, revelado com DAB, seguido de incubação com K₂2_{Fab}, revelado com o sistema EnVision®.

Os resultados mostraram uma co-localização das marcações direcionadas para β_2 GPI (coloração vermelha) e para IgG endógena do tecido dos ratos (coloração castanha) (Figura 46).

Figura 46 – Imuno-histoquímica em tecidos de fígado ratos submetidos ao modelo de sepse e translocação bacteriana (grupo sepse). Reação com AcMo anti- β_2 GPI clone K₂₂ (1/1000) e fração Fab do clone K₂₂ (1/500) revelada com sistema EnVision[®] (vermelho). Reação com anti-IgG de rato conjugado à peroxidase (1/2000) revelada com DAB 0,05% e H₂O₂ (castanho). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Aumento 400x.

A presença de anticorpos anti- β_2 GPI também foi documentada em imunoblot, onde a banda de 45 kDa foi reconhecida por imunoglobulinas presentes em amostras de soro dos animais, revelando a existência de anticorpos circulantes anti- β_2 GPI. A banda de 60 kDa foi reconhecida por algumas amostras de soro dos animais de grupos controle (Figura 47).

Figura 47 – Reconhecimento da β_2 GPI em imunoblot por anticorpos presentes nos soros de ratos submetidos ao modelo de sepse e translocação bacteriana (1/100). SDS-PAGE 12,5% de β_2 GPI e imunoblot realizado com 5 μ g de proteína por posição. Controle positivo realizado com clone K₂2 1/1000. Anticorpo secundário anti-rato conjugado à peroxidase (1/2000). Revelação com DAB 0,05%. À esquerda, plotagem de superfície produzida pelo software de análise de imagens Image J.

Os resultados do ELISA indireto para β_2 GPI mostraram que os animais com sepse grave ($S 10^9$) e os animais com translocação bacteriana, na ausência e na presença de sepse, têm concentrações plasmáticas mais baixas do que seus respectivos controles. A média aritmética e o desvio padrão dos valores obtidos estão mostrados na tabela 6.

Entre os animais com sepse, foi verificado que as concentrações plasmáticas de β_2 GPI correlacionam-se com a concentração do inóculo utilizado. Além do inóculo, a concentração plasmática de β_2 GPI depende da via de infecção. A translocação bacteriana na ausência de sepse foi associada a valores menores do que os observados na presença concomitante de sepse e translocação.

Tabela 6 - Concentração plasmática da β_2 GPI de ratos nos grupos experimentais e seus controles, determinada por ELISA indireto (competição) conforme a legenda: TB: translocação bacteriana; S: seps; TB+S: seps associada à translocação bacteriana; CTB; CS e CTB+S: controles da manipulação, por grupo; CR0: controle sem manipulação. Determinação pelo ensaio ELISA para β_2 GPI utilizando AcMo 5F7. Revelação com Ac anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

Grupos	n	Inóculo (UFC/mL/100 g peso corporal)	β_2 GPI (μ g/mL) ^a
CTB	3	0	347 $\pm$ 43
CTB+S	3	0	328 $\pm$ 13
CS	3	0	335 $\pm$ 17
CR0	2	0	420 $\pm$ 6
S10 ⁷	6	endovenoso: 10 ⁷	291 $\pm$ 48
S10 ⁹	8	endovenoso: 10 ⁹	223 $\pm$ 39
TB	5	intestinal: 10 ¹⁰	189 $\pm$ 27
TB+S10 ⁷	6	intestinal: 10 ¹⁰ endovenoso: 10 ⁷	270 $\pm$ 51
TB+S10 ⁹	5	intestinal: 10 ¹⁰ endovenoso: 10 ⁹	237 $\pm$ 45

^a média dos resultados individuais $\pm$ desvio padrão da média

Encontra-se em desenvolvimento um teste ELISA direto do tipo sanduíche destinado à fluidos biológicos, que servirá como substituto para o ELISA indireto de competição atualmente em uso.

Foram realizadas algumas tentativas com a sensibilização de placas com frações Fab do AcMo K₂124, servindo como anticorpo de captura para amostras contendo β_2 GPI solúvel. A presença da proteína foi então determinada com AcMo K₂2 não digerido seguido de anticorpo secundário anti-IgG_{FC} de camundongo conjugado à peroxidase.

Os testes preliminares não mostraram sensibilidade e especificidade satisfatórias, uma vez que a reação ocorreu mesmo nas cavidades onde não havia AcMo K₂124_{Fab} sensibilizando a placa (Figura 48).

O projeto de desenvolvimento do teste ELISA direto está sendo reestruturado. Em uma próxima etapa, será utilizada uma combinação de anticorpos biotinilados (para detecção) e não biotinilados (para captura) para garantir maior sensibilidade e especificidade do teste

Figura 48 – ELISA direto (sanduíche) realizado em placa adsorvida com diferentes quantidades de AcMo anti- $\beta_2\text{GPI}$ K₂₁₂₄_{Fab}. Amostras de $\beta_2\text{GPI}$ foram diluídas em PBS nas concentrações de 0 a 150 $\mu\text{g/mL}$. AcMo anti- $\beta_2\text{GPI}$ K₂₂ (1/2000) e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Peroxidase (1/4000). Reação revelada com OPD 1 mg/mL e H_2O_2 , bloqueada com H_2SO_4 4N. (DO) densidade ótica $\lambda=492$ nm.

4. DISCUSSÃO

Os produtos da purificação da β_2 GPI a partir de plasma ou soro humano foram caracterizados no laboratório. A caracterização tem sido obtida por meio de SDS-PAGE 12,5% corado pela prata, imunoblot e ELISA direto, desde que o procedimento foi estabelecido no grupo. Os resultados destes testes foram reunidos para compor a documentação dos diversos lotes produzidos. Este registro permitiu efetuar a mudança da resina cromatográfica sem perda das características de identidade e pureza. Ao contrário, observou-se um ganho de homogeneidade e o rendimento foi otimizado, a partir da reprodutibilidade do perfil da migração em SDS-PAGE. A mudança na composição dos tampões de separação foi necessária.

A maior densidade de sítios de ligação da nova resina foi acompanhada de uma maior susceptibilidade da ligação da β_2 GPI à concentração de sal. Por esta razão, a força iônica das soluções de lavagem e eluição foi reduzida, para que a proteína não fosse lavada da coluna juntamente com ligantes mais fracos. Entretanto, já era de conhecimento do grupo que a β_2 GPI em solução aquosa apresenta um comportamento de agregação dependente de sal, concentração e pH da solução, que modifica seu perfil eletroforético e outras propriedades físicas da molécula (POZZI, 2008).

A massa molecular da β_2 GPI, baseada na sua sequência de aminoácidos é 40 kDa, mas o SDS-PAGE produz bandas múltiplas com peso molecular aparente entre 43 e 66 kDa que, segundo a literatura, se deve à glicosilação extensiva de cinco sítios no terceiro e quarto domínios (POLZ; WURM; KOSTNER, 1980; CAI; GUO; SHI, 1996; BRIGHTON et al., 1996). As diferenças na densidade de glicosilação são citadas como a principal fonte de variação no peso molecular aparente (GALAZKA et al., 1998). No entanto, existe alguma controvérsia sobre o número e a posição das glicosilações na molécula de β_2 GPI (POLZ; WURM; KOSTNER, 1980; de LAAT et al., 2006; SODIN-SEMRL; ROZMAN, 2007). A coloração dos géis de SDS-PAGE 12,5 % por Alcina Blue (Figura 19), confirmam a glicosilação das principais bandas presentes na β_2 GPI purificada. A distribuição do peso molecular aparente das frações eluídas da coluna de afinidade sugere que a proteína possa ancorar-se na forma de agregados ou agregar-se sobre a superfície da resina e que a eluição a partir desses sítios se dá pela liberação destas formas agregadas.

A β_2 GPI pode sofrer clivagens proteolíticas entre os resíduos Lys317 e Thr318 tanto durante a purificação de plasma humano por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-heparina, como em algumas condições patológicas, pela ação de plasmina (HORBACH et al., 1999), o que poderia explicar as bandas com peso entre 30 e 45 kDa observadas em alguns lotes purificados no laboratório. O ácido perclórico também é citado como causa direta de uma maior flexibilidade e/ou quebra da molécula da β_2 GPI por clivagem das cadeias de açúcar, de pontes dissulfeto, ou até mesmo de pontes peptídicas, diminuindo o peso molecular aparente da molécula (CAI; GUO; SHI, 1996). As bandas com 30 a 45 kDa também já foram interpretadas como produtos da completa desglicosilação da molécula, já que apresentam-se nos géis de SDS-PAGE com migração semelhante às de proteína recombinante, que difere da proteína purificada (nativa) por não apresentar glicosilação, o que determinaria seu menor peso molecular aparente (de LAAT et al., 2006). Nossos resultados não mostraram glicosilação nas frações que migram com este peso molecular aparente.

Agregados multiméricos puderam ser observados em alguns dos lotes purificados, com peso molecular superior a 116 kDa. Estas bandas foram descritas por Galazka et al. (1998) e têm sido observadas por mais de um grupo, desde então.

Há ainda nos géis de SDS-PAGE dos lotes de β_2 GPI purificada, a presença de bandas na região de 90 kDa. Estas bandas costumam ser interpretadas como dímeros, uma vez que seu peso molecular pode ser considerado equivalente ao de duas moléculas em sua forma monomérica e foram reconhecidas pelo AcMo anti- β_2 GPI 5F7.

O perfil eletroforético das frações eluídas da coluna cromatográfica durante o processo de purificação, mostrou que a dimerização foi favorecida nesta etapa. Foi possível observar que as frações da frente de eluição, apresentavam somente bandas com peso molecular alto, seguidas por uma região em que as bandas principais mostravam peso molecular entre 60 e 90 kDa. Passado o pico de eluição, predominaram frações contendo uma banda única, na região de 45 kDa, a forma monomérica da proteína segundo a literatura. Sugeriu-se que estas frações finais do pico de eluição representassem uma população homogênea de moléculas de β_2 GPI purificada (Figuras 16 e 17). É possível, no entanto, que a conformação das moléculas de β_2 GPI sofra influência da alta concentração presente na frente de eluição da coluna cromatográfica, o que favoreceria o surgimento de dímeros entre

outros padrões de apresentação da proteína. Não é possível excluir a presença de contaminantes como causa de microheterogeneidade na migração da proteína purificada no SDS-PAGE.

Tanto a agregação quanto mudanças conformacionais têm potencial para modificar o peso molecular aparente da β_2 GPI no SDS-PAGE (CAI; GUO; SHI, 1996). Um mecanismo possível para esse efeito é a variação decorrente de diferenças na densidade de ligação a SDS, já que alterações estruturais podem favorecer a redução da molécula e expor diferencialmente alguns sítios de ligação, modificando a relação massa/carga. Açúcares e organominerais associados à β_2 GPI, também podem ser responsáveis por este fenômeno, pois aumentam a massa de agregados mistos com a proteína e provocam desvio da relação massa/carga. Dependendo do tipo e da quantidade de contaminante não protéico associado à proteína, a técnica de SDS-PAGE pode ser suficientemente sensível para discriminar múltiplas bandas, para uma única proteína presente em agregados mistos.

A variação do perfil eletroforético observada entre as frações de β_2 GPI eluída da coluna de Sepharose-Heparina não se mostrou dependente da concentração, uma vez que não houve alteração após a diluição das soluções (Figura 18). A concentração das amostras de banda única resultou em um aumento discreto na velocidade de migração (com diminuição do peso molecular aparente), sugerindo que a concentração da proteína pode servir para a remoção de algum eventual contaminante. A ligação fraca entre a proteína e um contaminante cujo efeito seja a diminuição da mobilidade no gel de SDS-PAGE é referendada pelo efeito do pulso da voltagem aplicada ao gel, que resulta no aparecimento de moléculas mais móveis e na reunião das múltiplas bandas de peso molecular aparente próximo.

Em trabalhos anteriores do grupo, os eventos de mudança conformacional da β_2 GPI mostraram-se dependentes da força iônica e pH da solução da proteína (POZZI et al., 2007). A distribuição das bandas em diferentes pesos moleculares aparentes não apresentou correlação com os resultados dos imunoblotes, evidenciando a especificidade dos AcMos para determinadas conformações ou composições de agregados de proteína.

Todos os lotes de β_2 GPI purificada no laboratório apresentaram múltiplas bandas com peso molecular entre 45 e 90 kDa. A banda de 45 kDa foi sempre reconhecida pelo anticorpo comercial (5F7) nos imunoblotes. A alta sensibilidade do

AcMo 5F7 para a banda de 45 kDa nos permitiu visualizar a reação mesmo em situações em que esta banda era facilmente revelada na coloração do gel pela prata. Os AcMos reconheceram com baixa afinidade a banda de 66 kDa, mais frequente em soluções concentradas e em meio ácido. Os dímeros da proteína, representados por uma banda com cerca de 90 kDa foram reconhecidos pelo 5F7 na concentração utilizada, embora com baixa sensibilidade em comparação à banda de 45 kDa.

A interferência da variação de pH nos ensaios para detecção de β_2 GPI *in vitro* foi testada em reações de Dot Blot e Imunoblot. Todos os anticorpos testados conservaram a capacidade de reconhecimento da proteína nas faixas de pH: 5,5 (MES), 8,0 (Tris), 10,25 (Carbonato-bicarbonato) e água deionizada. Para minimizar a interferência das diferenças de força iônica entre os tampões utilizados, foram realizadas também reações com tampão Britton-Robinson (pH 3 a 10). As respostas foram mais intensas em pH básico nas reações de Dot Blot (Figuras 27 e 33). Nas reações de imunoblot, no entanto, foi observada uma intensa reação dos AcMos 5F7 e K₂2 em pH 3,0 (Figura 36). Testes adicionais para determinação de um padrão de reconhecimento destes AcMo associado a efeitos de pH e oxidação ainda serão necessários. O Dot Blot não é adequado para investigação de efeitos discretos de conformação e não depende da separação das subfrações do antígeno. Por outro lado, verificou-se em Dot-Blot que o SDS utilizado na eletroforese pode interferir na reação da β_2 GPI com os AcMos (Figura 34). O padrão de reconhecimento da proteína pelos AcMos 5F7 e K₂2 mostrou diferenças no reconhecimento dependente de pH. Apenas o K₂2 foi capaz de reconhecer a banda de 90k Da, em meio alcalino (Figura 36). Em meio ácido ou neutro, ambos foram equivalentes.

Foram observadas diferenças importantes no padrão de reconhecimento das subfrações pelos diversos anticorpos produzidos em imunoblot (Figura 35). Estes achados sugerem que a conformação do antígeno é determinante da sensibilidade do reconhecimento pelos AcMos.

Dentre os AcMo produzidos, os anticorpos K₂2 e K₂124 foram os que apresentaram maior homogeneidade de resposta. Os demais AcMo produzidos mostraram baixa reprodutibilidade no imunoblot e baixa sensibilidade em ELISA direto. O reconhecimento de diferentes bandas no imunoblot pelos AcMo K₂2 e K₂124 sugere que o sítio de clivagem possa estar envolvido nesse reconhecimento.

Alguns autores relatam que a ligação dos AcMo à β_2 GPI é uma ligação monovalente de baixa afinidade, uma vez que a ligação pode ser desfeita por influências externas que interferem na exposição de epítomos críticos presentes na proteína nativa, reconhecidos pelos anticorpos anti- β_2 GPI (TINCANI et al., 1996; REDDEL et al., 2000).

Segundo de LAAT et al. (2006), a influência da mudança conformacional da proteína induzida por fatores como a desglicosilação, ligação à lipoproteínas ou imobilização da proteína em superfície negativa pode ser utilizada para aumentar ou diminuir a sensibilidade do reconhecimento por auto-anticorpos humanos de pacientes com Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (APS). Este grupo descreve a ligação de anticorpos anti- β_2 GPI a β_2 GPI através do domínio I da proteína. Ainda segundo de Laat et al. (2006), esta ligação, apesar de monovalente e de baixa avidéz, pode ser altamente favorecida pela exposição deste primeiro domínio (considerado epítomo crítico), ou até mesmo através de ligação bivalente. Ligações bivalentes como forma de estabilização da ligação da β_2 GPI com IgG anti- β_2 GPI também foram demonstradas por Roubey et al. (1995). O grupo de Roubey mostrou que fragmentos Fab, obtidos de auto-anticorpos presentes em pacientes com APS, não ligam-se à β_2 GPI, o que também sustenta a importância da ligação bivalente na estabilização da ligação da β_2 GPI às imunoglobulinas.

Os resultados deste trabalho não demonstram comportamento similar para fragmentos Fab obtidos através da digestão do AcMo K₂2. O AcMo K₂2_{Fab} mostrou sensibilidade e especificidade de reconhecimento semelhante ao anticorpo não digerido nos ensaios de imunoblot (Figura 44).

A aplicabilidade do AcMo K₂2 em ensaios para determinação de β_2 GPI em amostras biológicas foi confirmada para o ELISA indireto em soro e linfa, e para imuno-histoquímica em fígado e intestino (íleo).

As medidas de concentração de β_2 GPI em soro e linfa dos animais submetidos ao modelo de sepse e translocação bacteriana, feita por ELISA indireto, mostraram que em situações de grande estímulo inflamatório, a concentração plasmática da β_2 GPI apresenta-se significativamente reduzida no soro, mas se mantém inalterada na linfa (Tabela 6). Uma característica peculiar da β_2 GPI é a sua distribuição entre formas livre e associada a diferentes frações de lipoproteínas presentes na linfa e no sangue. Esta propriedade pode ser determinante da sua

distribuição nos compartimentos da circulação sanguínea e linfática, e relevante à sua função.

Os resultados das reações imuno-histoquímicas realizadas em tecidos de fígado e íleo destes animais revelaram mudanças no padrão de marcação conforme a condição inflamatória à qual o animal foi exposto (Figura 40). Na sepse, a proteína localizou-se na porção periférica dos lobulos hepáticos. Esta marcação intracitoplasmática focal e granulosa observada no fígado dos ratos submetidos à sepse grave pode ser comparada morfológicamente a sítios contendo proteína denaturada ou domínios de secreção. Ao observar os mesmos tecidos de fígado corados por Vermelho Congo em microscópio de polarização de luz, notou-se a presença de um aspecto refringente que, em um primeiro momento, não foi considerado positivo para estruturas amilóides. Considerando resultados mais recentes de estudo do padrão de agregação da proteína, que permite que esta forme estruturas organizadas capazes de polarizar a luz espontaneamente, voltamos a observar os tecidos corados por Vermelho Congo. Nesta segunda observação, mais cuidadosa, notamos que a refringência presente nos tecidos apresentava-se nas mesmas localizações onde a β_2 GPI foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal, especialmente nos cortes de fígado dos animais submetidos à sepse. Estes resultados sugerem que a β_2 GPI apresente uma natureza amilóide que pode estar relacionada tanto à sua capacidade de formar agregados organizados, como ao tipo de auto-anticorpos que a proteína é capaz de desencadear *in vivo*, favorecendo a formação de imunocomplexos nestas regiões. Não foram observadas alterações significativas no padrão de marcação para β_2 GPI no íleo.

A presença de marcação positiva nas lâminas de controle negativo foi inicialmente considerada reação de fundo inespecífica (Figura 41). Diante da observação da co-localização das regiões marcadas com AcMo K₂2 e a reação dos controles negativos, foram realizados diversos ensaios para estudar possíveis ligações inespecíficas do sistema de revelação utilizado (EnVision®) com as amostras de tecido utilizadas.

A reação imuno-histoquímica foi simulada em ensaios com β_2 GPI adsorvida em placas de ELISA. Nestes testes, as cavidades de controle negativo (ausência do AcMo K₂2) não apresentaram reação visível (Figura 42). Concluiu-se, portanto, que

o polímero utilizado no sistema de revelação do ensaio não se ligava diretamente à β_2 GPI a ponto de produzir reação colorimétrica visível.

Em testes complementares, a reação foi feita com AcMo K₂F_{ab}. Nos testes em placa, o kit EnVision[®] não revelou a reação entre os fragmentos Fab e a β_2 GPI adsorvida. Pode-se concluir que a utilização do AcMo K₂F_{ab} nos ensaios imunohistoquímicos não seria revelado através do kit EnVision[®]. Sendo assim, foi possível utilizar AcMo K₂F_{ab} nos fragmentos de tecido como tentativa de saturação dos sítios de ligação da β_2 GPI à imunoglobulinas. Os resultados mostraram reação positiva em sítios coincidentes aos dos tecidos onde foi aplicado o anticorpo primário não digerido (Figura 46), o que reforça a idéia de que não há ligação inespecífica da proteína às imunoglobulinas contidas no polímero, uma vez que os eventuais sítios para uma eventual ligação do polímero na β_2 GPI já estariam ocupados pela presença dos fragmentos Fab do AcMo, adicionados em um momento anterior da reação.

Ainda na tentativa de elucidar a reação positiva nas lâminas controle, foram realizados ensaios com dupla marcação tecidual, utilizando sistemas de revelação diferentes. Em um primeiro momento, foi aplicado sobre os tecidos um anticorpo anti-IgG de rato conjugado à peroxidase. A localização das imunoglobulinas de rato foi revelada com DAB e H₂O₂, produzindo cor castanha. Em seguida, aplicou-se o anticorpo monoclonal anti- β_2 GPI, seguido do polímero de revelação do kit EnVision[®], produzindo cor vermelha onde houvesse β_2 GPI. As marcações mostraram-se coincidentes, indicando presença de grandes quantidades de imunoglobulina nos mesmos sítios de localização da β_2 GPI (Figura 46). Estes resultados indicam a presença de auto-anticorpos com especificidade para este antígeno em particular, ou uma especificidade de ligação da β_2 GPI para imunoglobulinas em geral.

Imunoblotes realizados com o soro dos animais submetidos às diferentes condições do modelo experimental revelaram a presença de anticorpos anti- β_2 GPI no soro de todos os animais testados, resultado que sustenta a primeira hipótese (Figura 47).

Os resultados obtidos a partir do modelo animal sugerem efeitos sobre a compartimentalização da β_2 GPI na fisiopatologia inicial da seps.

O perfil de reação e a sensibilidade apresentada por alguns dos AcMo anti- β_2 GPI produzidos, abrem possibilidade para o desenvolvimento de novas metodologias para detecção de β_2 GPI ou seus anticorpos circulantes em amostras

biológicas. Entre as perspectivas, o desenvolvimento de um ELISA direto (sanduíche), de análise mais simples do que o ELISA indireto (de competição) atualmente em uso.

Foram realizados alguns ensaios piloto para desenvolvimento do ELISA direto para detecção da β_2 GPI em solução. Para tanto, o AcMo K₂124, que apesar de pouco sensível em relação ao K₂2, mostrou-se capaz de revelar a presença de β_2 GPI em reações pouco suscetíveis à concentração de anticorpo utilizada (Figura 30), foi submetido à digestão enzimática por papaína para obtenção de fragmentos Fab. Foram realizados ensaios com placas sensibilizadas com frações Fab do AcMo K₂124. Tais frações serviriam como anticorpo de captura para amostras contendo β_2 GPI solúvel. O AcMo K₂2 não digerido foi utilizado como anticorpo de revelação, seguido do anticorpo secundário anti-IgG_{Fc} de camundongo conjugado à peroxidase. Os testes preliminares não mostraram sensibilidade e especificidade satisfatórias. Ao contrário, os resultados mostraram que a reação revelada não dependeu da presença do AcMo K₂124_{Fab} adsorvido na placa, apresentando resultados positivos em cavidades onde não havia AcMo K₂124_{Fab}. Este resultado indicou que a β_2 GPI das soluções testadas ligou-se diretamente na placa, apesar da etapa de bloqueio de proteínas e sem a necessidade do anticorpo de captura (Figura 48). É possível que a natureza da placa escolhida para este ensaio tenha interferido nos resultados, uma vez que as cavidades da placa utilizada apresentam superfície altamente negativa, fator que favorece a ligação da β_2 GPI em locais que possam ter permanecido expostos após a etapa de bloqueio.

5. CONCLUSÕES

A purificação da β_2 GPI por cromatografia de afinidade em resina Sepharose-Heparina 6 Fast Flow (GE Healthcare) permite obter a proteína nativa, na forma monomérica, com rendimento de $38,7 \pm 15$ mg/L de plasma humano.

Dímeros e formas clivadas da proteína podem ser identificados por SDS-PAGE e imunoblot. Outros contaminantes não protéicos podem estar presentes, compondo agregados solúveis de peso molecular alto e tamanho variável. Dentre os possíveis contaminantes podem estar açúcares e organominerais.

Os anticorpos monoclonais anti- β_2 GPI produzidos no laboratório, clones K₂57, K₂II-3, K₂33, K₂2, K₂37 e K₂124 reconhecem a proteína purificada adsorvida sobre suporte sólido (dot-blot, imunoblot, ELISA direto) e em solução (ELISA indireto). Os diversos anticorpos mostram diferentes especificidades para a forma monomérica, com peso molecular aparente de 45kDa, para os dímeros (90kDa) e para as formas clivadas da proteína (<40kDa).

Os anticorpos monoclonais produzidos no laboratório reconhecem β_2 GPI em amostras biológicas (fragmentos de tecido incluídos em parafina e soro).

Os testes imunohistoquímicos apresentam interferências devido à presença de imunoglobulinas endógenas dos tecidos, possivelmente auto-anticorpos com especificidade para β_2 GPI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ADACHI, Y.; SUGIMOTO, K.; SATO, A.K.; MORI, K.J. Identification of negative regulator of interleukin-3 (NIL-3) in bone marrow. **Cell Structure and Function**, Kyoto, v.27, p.81-89, 2002.

ANDREOLI, L.; MALACARNE, F.; CERIBELLI, A.; KUTSCHERA, I.; TINCANI, A. Anti-cardiolipin and anti- β_2 -Glycoprotein I antibodies – Performance of new commercial ELISA kits. **Annals of The New York Academy of Sciences**, Oxford, v.1109, p.531-537, 2007.

BALASUBRAMANIAN, K.; KILLION, J.J.; SCHROIT, A.J. Estimation of plasma β_2 -glycoprotein I levels by competitive ELISA. **Thrombosis Research**, Oxford, v.92, p.91-97, 1998.

BALASUBRAMANIAN, K.; MAITI, S.N.; SCHROIT, A.J. Recruitment of beta-2-glycoprotein 1 to cell surface in extrinsic and intrinsic apoptosis. **Apoptosis**, Philadelphia, v.10, p.439-446, 2005. BOUMA, B.; de GROOT, P.G.; van den ELSEN, J.M.; RAVELLI, R.B.; SCHOUTEN, A.; SIMMELINK, M.J.; DERKSEN, R.H.; KROON, J.; GROS, P. Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. **EMBO Journal**, Oxford, v.18, n.19, p.5166-5174, 1999.

BRIGHTON, T.A.; HOGG, P.J.; DAI, Y.P.; MURRAY, B.H.; CHONG, B.H.; CHESTERMAN, C.N. β_2 -Glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.93, p.185-194, 1996.

BU, C.; GAO, L.; XIE, W.; ZHANG, J.; HE, Y.; CAI, G.; McCRAE, K.R. β_2 -Glycoprotein I is a cofactor for tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. **Arthritis & Rheumatism**, Philadelphia, v.60, n.2, p.559-568, 2009.

BUTTARI, B.; PROFUMO, E.; MATTEI, V.; SIRACUSANO, A.; ORTONA, E.; MARGUTTI, P.; SALVATI, B.; SORICE, M.; RIGANÒ, R. Oxidized β_2 -glycoprotein I induces human dendritic cell maturation and provokes a T helper type 1 response. **Blood**, New York, v.106, p.380-387, 2005.

CAI, G.; GUO, Y.; SHI, J. Purification of apolipoprotein H by polyethylene glycol precipitation. **Protein Expression Purification**, San Diego, v.8, p.341-346, 1996.

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. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.25845-25849, 1995.

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

EBNER, S.; HOFER, S.; NGUYEN, V.A.; FÜRHAPTER, C.; HEROLD, M.; FRITSCH, P.; HEUFLER, C.; ROMANI, N. A Novel role for IL-3: Human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern¹. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.168, p.6199–6207, 2002.

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. **Thrombosis Research**, Oxford, v.90, p.131-137, 1998.

GEORGE, J.; GILBURD, B.; HOJNIK, M.; LEVY, Y.; LANGEVITZ, P.; MATSUURA, E.; KOIKE, T.; SHOENFELD, Y. Target recognition of β_2 -Glycoprotein I (β_2 GPI)-dependent anticardiolipin antibodies: evidence for involvement of the fourth domain of β_2 GPI in antibody binding. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.160, p.3917-3923, 1998.

GIANNAKOPOULOS, B.; PASSAM, F.; IOANNOU, Y.; KRILLIS, S.A. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. **Blood**, Washington, v. 113, p.985-994, 2009.

GOMES, L.F.; GONÇALVES, L.M.; FONSECA, F.L.; CELLI, C.M.; VIDELA, L.A.; CHAIMOVICH, H.; JUNQUEIRA, V.B. β_2 -glycoprotein I (Apolipoprotein H) modulates uptake and endocytosis associated chemiluminescence in rat Küpffer cells. **Free Radical Research**, Amsterdam, v.36, p.741-747, 2002.

HAMMEL, M.; SCHWARZENBACHER, R.; GRIES, A.; KOSTNER, G.M.; LAGGNER, P.; PRASSL, R. Mechanism of the interaction of β_2 -GPI with negatively charged phospholipid membranes. **Biochemistry**, Washington, v.40, p.14173-14181, 2001.

HORBACH, D.A.; van OORT, E.; LISMAN, T.; MEIJERS, J.C.; DERKSEN, R.H.; de GROOT, P.G. β_2 -Glycoprotein I is proteolytically cleaved *in vivo* upon activation of fibrinolysis. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.81, p. 87-95, 1999.

IEKO, M.; ICHIKAWA, K.; TRIPLETT, D.A.; MATSUURA, E.; ATSUMI, T.; SAWADA, K.; KOIKE, T. β_2 GPI is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. **Arthritis & Rheumatism**, Philadelphia, v.42, n.1, p.167-174, 1999.

KATO, H.; ENJOJI, K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine β_2 -glycoprotein I: The presence of five sushi domains. **Biochemistry**, Washington, v.30, p.11687-11694, 1991.

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. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, p.697-709, 2001.

KOCH, S.; DONARSKI, N.; GOETZE, K.; KRECKEL, M.; STUERENBURG, H.J.; BUHMANN, C.; BEISIEGEL, U. Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.42, n.7, p.1143-1151, 2001.

KOH, I.H.; SILVA, R.M. Novel in vitro small intestinal graft model for study of bacterial in the rat. **Transplantation Proceedings**, New York, v.28, p.2667-2668, 1996.

KOH, I.H.; MONTERO, E.F.; KELLER, R.; SILVA, M.H.; GOLDENBERG, S.; SILVA, R.M. Can bacterial translocation to the mesenteric lymph node be correlated with systemic infection? **Transplantation Proceedings**, New York, v.28, p.2673-2674, 1996.

de LAAT, B.; DERKSEN, R.H.; van LUMMEL, M.; PENNING, M.T.; de GROOT, P.G. Pathogenic anti- β_2 -glycoprotein I antibodies recognize domain I of β_2 -glycoprotein I only after a conformational change. **Blood**, New York, v.107, p.1916-1924, 2006.

LOZIER, J.A.; TAKAHASHI, N.; PUTNAM, F.W.O. Complete amino acid sequence of human plasma β_2 -glycoprotein I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.81, p.3640-3644, 1984.

MATSUURA, E.; INAGAKI, J.; KASAHARA, H.; YAMAMOTO, D.; ATSUMI, T.; KOBAYASHI, K.; KAIHARA, K.; ZHAO, D.; ICHIKAWA, K.; TSUTSUMI, A.; YASUDA, T.; TRIPLETT, D.A.; KOIKE, T. Proteolytic cleavage of β_2 -glycoprotein I: reduction of antigenicity and structural relationship. **International Immunology**, Oxford, v.12, n.8, p.1183-1192, 2000.

MEHDI, H.; ASTON, C.E.; SANGHERA, D.K.; HAMMAN, R.F.; KAMBOH, M.I. Genetic variation in the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. **Human Genetics**, Berlin, v.105, p.63-71, 1999.

MIYAKIS, S.; LOCKSHIN, M.D.; ATSUMI, T.; BRANCH, D.W.; BREY, R.L.; CERVERA, R.; DERKSEN, R.H.; de GROOT, P.G.; KOIKE, T.; MERONI, P.L.; REBER, G.; SHOENFELD, Y.; TINCANI, A.; VLACHOYIANNPOULOS, P.G.; KRILIS, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Malden, v.4, p.295-306, 2006.

MOESTRUP, S.K.; SCHOUSBOE, I.; JACOBSEN, C.; LEHESTE, J.R.; 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. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.102, n.5, p.902-909, 1998.

NAKAYA, Y.; SCHAEFER, J.; BREWER, H.B. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, 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. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v.11, p.265-270, 1980.

POZZI, F.M. **Estudos de interação de β_2 -glicoproteína I em solução aquosa e com interfaces lipídicas**. São Paulo, 2008. 87p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

POZZI, F.M.; BEGALLI, J.H.; PEREIRA, E.M.; DAGHASTANLI, K.R.P.; POLITI, M.J.; CUCCOVIA, I.M.; GOMES, L.F. Agregação de β_2 -glicoproteína I em solução aquosa: efeitos de concentração, pH e força iônica. In: SEMANA FARMACÉUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 12., São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. In: **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas São Paulo**, v.43, supl.2, p.57 res. FCF110, 2007.

REDDEL, S.W.; WANG, Y.X.; SHENG, Y.H.; KRILIS, S.A. Epitope studies with anti- β_2 -glycoprotein I antibodies from autoantibody and immunized sources. **Journal of Autoimmunity**, London, v.15, p.91-96, 2000.

ROUBEY, R.A.S.; ROUBEY, R.A.; EISENBERG, R.A.; HARPER, M.F.; WINFIELD, J.B. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize β_2 -Glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of Ag density and bivalent binding. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.154, p.954-960, 1995.

SANGUERA, D.K., WAGENKNECHT, D.R.; McINTYRE, J.A.; KAMBOH, M.I. Identification of structural mutations in fifth domain of Apolipoprotein H which affect phospholipid binding. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.6, p.311-316, 1997a.

SANGUERA, D.K.; KRISTENSEN, T.; HAMMAN, R.F.; KAMBOH, M.I. Molecular basis of the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) protein polymorphism. **Human Genetics**, Berlin, v.100, p.57-62, 1997b.

SCHOUSBOE, I. β_2 -Glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. **Blood**, New York, v.66, n.5, p.1086-1091, 1985.

SCHOUSBOE, I.; RASMUSSEN, M.S. The effect of β_2 -glycoprotein I on the dextran sulfate and sulfatide activation of the contact system (Hageman factor system) in the blood coagulation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v.20, p.787-792, 1988.

SILVA, R.M.; KELLER, R.; MONTERO, E.F.; SILVA, M.H.; GOLDENBERG, S.; KOH, I.H. Role of Peyer's Patch in bacterial translocation. **Transplantation Proceedings**, New York, v.28, p.2672-2673, 1996.

SILVA, R.M.; MONTERO, E.R.; NETO, U.F.; KOH, I.H. The role of the small bowel as a barrier for bacterial septic shock. **Thrombosis Research**, Oxford, New York, v.30, n.6, p.2553-2554, 1998..

SODIN-SEMRL, S.; ROZMAN, B. β_2 -Glycoprotein I and its clinical significance: from gene sequence to protein levels. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v.6, p.547-552, 2007.

SCHWARZENBACHER, R.; ZETH, K.; DIEDERICHS, K.; GRIES, A.; KOSTNER, G.M., LAGGNER, P.; PRASSL, R. Crystal structure of β_2 -glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. **EMBO Journal**, Oxford, v.18, n.22, p.6228-6239, 1999.

TINCANI, A.; SPATOLA, L.; PRATI, E.; ALLEGRI, F.; FERREMI, P.; CATTANEO, R.; MERONI, P.; BALESTRIERI, G. The anti- β_2 -glycoprotein I activity in human anti-phospholipid syndrome sera is due to monoreactive low-affinity autoantibodies directed to epitopes located on native β_2 -glycoprotein I and preserved during species evolution. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.157, p.5732-5738, 1996.

WONG, R.C.W.; FAVALORO, E.J.; ADELSTEIN, S.; BAUMGART, K.; BIRD, R.; BRIGHTON, T.A.; EMPSON, M.; GILLIST, D.; HENDLE, M.J.; LAURENT, R.; MALLON, D.; POLLOCK, W.; SMITH, S; STEELE, R.H.; WILSON, R.J. Consensus guidelines on anti- β_2 glycoprotein I testing and reporting. **Pathology**, Oxon, v.40, n. 1, p. 58-63, 2008.

YASUDA, S.; ATSUMI, T.; IEKO, M.; KOIKE, T. β_2 -Glycoprotein I, anti- β_2 -glycoprotein I, and fibrinolysis. **Thrombosis Research**, Oxford, v. 114, p.461-465, 2004.

ANEXOS

Anexo A - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado / Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

AnexoB - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/168/2009
Protocolo CEP/FCF/535
CAAE: 0036.0.018.000-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Produção, caracterização e aplicação analítica e Anticorpos Monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI)
Pesquisador Responsável:	Carolina Nigro Stella
Orientador:	Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	

II - Sumário Geral do Protocolo:

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína produzida principalmente no fígado e em enterócitos e é considerada uma proteína de fase aguda. A β_2 GPI liga-se a superfícies contendo lipídios negativamente carregados como fosfatidilserina (PS) e cardiolipina (CL), vários lipídios oxidados e também a DNA e a heparina. É também capaz de aumentar a depuração de triglicerídeos por estimular a lipase lipoprotéica e de ligar-se a lipídios modificados na superfície de LDL oxidada *in vitro*. Além de ligar-se a plaquetas ativadas, inibe a fase de contato da cascata de coagulação. Após ancorar-se a membranas, a proteína sofre mudanças conformacionais e oligomerização, o que contribui para sua antigenicidade e para a indução de autoimunidade *in vivo*. Considerando o envolvimento da β_2 GPI na resposta inflamatória aguda e crônica em diferentes compartimentos, a detecção desta proteína em amostras de tecidos e fluidos biológicos pode agregar valor no entendimento de alguns processos fisiopatológicos importantes. O objetivo do presente estudo é produzir anticorpos monoclonais anti- β_2 -glicoproteína I para ensaios clínicos.

Os objetivos do presente estudo são:

- Purificação e caracterização da β_2 GPI humana.
- Estudo e melhoria da estabilidade de padrões da proteína humana purificada.
- Obtenção e caracterização de Anticorpos Monoclonais anti- β_2 GPI humana.
- Aprimorar metodologias analíticas (ELISA, imunohistoquímica, biosensores) para determinação de β_2 GPI em tecidos e fluidos biológicos.
- Entender e controlar os fenômenos relacionados à agregação e a estabilidade do antígeno, para minimizar a interferência com os testes diagnósticos disponíveis no mercado.

Pretende-se que os resultados obtidos possam ser utilizados futuramente como referência para o desenvolvimento de insumos alternativos à β_2 glicoproteína I derivada de sangue humano.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Tipo de estudo: experimental

Descrição da Casuística:

Não há inclusão de sujeitos de pesquisa. Na Folha de Rosto consta o número zero de indivíduos.

Para a obtenção do antígeno, serão utilizadas bolsas de plasma humano doadas pelo Dr. Fábio Lima Lino, CRM 94849, diretor do Serviço de Hemoterapia do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", São Paulo, conforme carta de doação anexa. As bolsas de plasma utilizadas neste procedimento são inadequadas para uso em transfusões por motivo de volume insuficiente, flutuação de temperatura de armazenamento ou prazo de validade vencido. A manipulação do material enviado ao laboratório será realizada pela pesquisadora responsável, auxiliada por pessoal treinado. Serão observadas as boas práticas de laboratório e a utilização de equipamentos de proteção individual. Considerando o rendimento e o consumo de β 2GPI purificada nos ensaios, estima-se a utilização de aproximadamente 10 litros de plasma por ano. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para pesquisa. A identidade dos doadores das bolsas de plasma não será conhecida pelos pesquisadores envolvidos, uma vez que o material doado sairá do Serviço de Hemoterapia sem qualquer identificação do doador.

III – Situação do Projeto: APROVADO em reunião de 14/12/2009.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 14 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Anexo C - Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 16/2008**CERTIFICADO**

*Certificamos que o Projeto “Produção de anticorpos monoclonais para beta 2-glicoproteína I” (Protocolo CEEA nº178), de responsabilidade da pesquisadora **Carolina Nigro Stella** sob a orientação da Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 14/04/2008.*

São Paulo, 14 de abril de 2008.

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Suplente da Presidente da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

Ofício CEEA/FCF/ 12 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Produção de anticorpos monoclonais para $\beta 2$ -glicoproteína I ($\beta 2$ GPI)**" (Protocolo nº 215), de responsabilidade da pesquisadora **Carolina Nigro Stella** sob a orientação da Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 16 de fevereiro 2009.

São Paulo, 10 de março de 2009.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal - CEEA/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5850874/1 - Carolina Nigro Stella

Email: carolina.stella@usp.br
Data de Nascimento: 03/07/1980
Cédula de Identidade: RG - 300144945 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas -
Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2004

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 06/07/2007
Início da Contagem de Prazo: 06/07/2007
Data Limite: 06/01/2010
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ligia Ferreira Gomes - 06/07/2007 até o presente. E.Mail: lfgomes@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/07/2007
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 24/06/2009
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em
06/07/2007
Matrícula de Acompanhamento em
19/07/2009

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2009

Impresso em: 25/11/09 12:11:53

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5850874/1 - Carolina Nigro Stella

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757 - 1/2	Seminários em Análises Clínicas II	06/08/2007	18/11/2007	30	2	80.0	A	N	Concluída
BMI5865 - 2/2	Bases Celulares e Moleculares da Inflamação da Imunidade Natural	06/08/2007	26/08/2007	45	0	0.0	-	N	Pré - matrícula indeferida
BMA5811 - 3/2	Metodologias de Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução Empregadas para Material Biológico	04/09/2007	08/10/2007	75	5	100.0	A	N	Concluída
BMI5867 - 2/2	Bases Celulares e Moleculares da Resposta Imunológica Humoral	10/09/2007	30/09/2007	45	0	0.0	-	N	Pré - matrícula indeferida
BMA5818 - 3/2	Metodologia de Ensino em Avaliação Macroscópica da Morfologia Humana: Técnicas Anatômicas	16/10/2007	24/12/2007	60	4	100.0	A	N	Concluída
BMA5796 - 5/1	Anatomia Funcional do Sistema Nervoso Entérico	26/10/2007	22/11/2007	60	4	100.0	A	N	Concluída
FBC5793 - 8/2	Seminários em Análises Clínicas	11/03/2008	23/06/2008	30	2	87.0	A	N	Concluída
FBC5724 - 3/3	Métodos Laboratoriais para Investigação de Derrames Cavitários	08/04/2008	16/06/2008	60	4	100.0	A	N	Concluída
VPS5717 - 4/1	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	04/08/2008	13/10/2008	30	0	0.0	-	N	Pré - matrícula indeferida
BMI5853 - 3/1	Imunobiologia dos Tumores	26/08/2008	15/09/2008	60	4	100.0	A	N	Concluída
FBA5728 - 2/8	Aprimoramento Didático	07/10/2008	03/11/2008	60	4	100.0	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de dissertação	
Disciplinas:	25	25	29
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2009

Impresso em: 25/11/09 12:11:53