

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química  
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos  
Biotecnológicos

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CARDIOLIPINA  
EM SOROS REAIS UTILIZANDO LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS**

Moysés Ost Damm Martins  
Mestrando

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana  
Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno  
Co-orientadora

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química  
da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção  
do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas, São Paulo

Julho de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M366d                      Martins, Moysés Ost Damm  
                                 Detecção de anticorpos anti-cardiolipina em soros reais utilizando  
lipossomas polimerizados / Moysés Ost Damm Martins.--Campinas,  
SP: [s.n.], 2008.

                                 Orientadores: Maria Helena Andrade Santana, Sônia Maria Alves  
Bueno

                                 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Engenharia Química.

                                 1. Lipossomos. 2. Cardiolipinas. 3. Auto-anticorpos. 4.  
Nanotecnologia. 5. Imunoensaio. 6. Biossensores. I. Santana, Maria  
Helena Andrade. II. Bueno, Sônia Maria Alves. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Detection of anti-cardiolipin antibodies from real sera using polymerized liposomes

Palavras-chave em Inglês: Polymerized liposomes, Cardiolipin, IgG anti-cardiolipin, Nanotechnology, Immunoassays, Biosensors

Área de concentração: Desenvolvimento de processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Paulo de Tarso Hennies, Fábio César Gozzo

Data da defesa: 30/07/2008

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química  
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

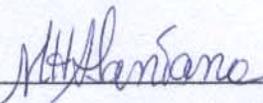
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CARDIOLIPINA  
EM SOROS REAIS UTILIZANDO LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS**

Autor: Moysés Ost Damm Martins

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Helena Andrade Santana

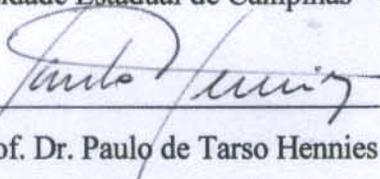
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sônia Maria Alves Bueno



---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Helena Andrade Santana

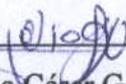
Universidade Estadual de Campinas – FEQ



---

Prof. Dr. Paulo de Tarso Hennies

Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda

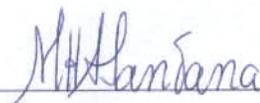


---

Prof. Dr. Fábio César Gozzo

Universidade Estadual de Campinas – IQ

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Moysés Ost Damm Martins e aprovada pela comissão julgadora em 30 de julho de 2008.



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana  
Universidade Estadual de Campinas – FEQ

A minha amada esposa e a nossa maior conquista de nome ***ALICIA MARTINS***

## AGRADECIMENTOS

*O meu agradecimento vai a todos que colaboraram de alguma forma, direta ou indireta, para o desenvolvimento do meu trabalho. Gostaria de destacar:*

*Ao meu SENHOR e SALVADOR, AMIGO de todas as horas, **JESUS CRISTO**, que me deu vida, saúde, proteção, motivação e me cercou de pessoas maravilhosas sem as quais não seria ninguém;*

*Pessoas como meu pai Silas Martins, minha mãe Schirley Martins, meus irmãos Ricardo Martins e Michelle Martins. Sem estes, realmente não existiria, não cresceria, enfim, não seria nada;*

*Minha amada esposa Adriana. Você sabe que é minha sustentação aqui neste planeta. Com quem compartilho tudo. Mulher que está sempre a minha frente e de quem tenho grande admiração. Amei-te desde o primeiro momento e te amo cada dia mais;*

*À Professora Maria Helena Andrade Santana pela orientação, extrema competência e dedicação ao meu complexo trabalho, fatores fundamentais para o desenvolvimento e entendimento do mesmo;*

*À professora Sônia pelas preciosas orientações na parte de purificação de anticorpos;*

*Aos professores Ricardo Zollner e Carlos Roque pelo trabalho interdisciplinar;*

*Aos professores Everson Miranda e Ângela Moraes por cederem equipamentos e reagentes de seus laboratórios;*

*Aos colegas do Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental Bruna, Carina, Leonardo, Maira, Margarida, Priscila, Rúbia, Thiago, pela amizade e cooperação;*

*À minha querida amiga de todas as horas, Thais Rigoletto. Sem você, eu não teria forças para terminar o mestrado. Você apareceu e se entregou no meu trabalho. Não conseguirei nunca te agradecer pela verdadeira amizade demonstrada nestes poucos anos que nos conhecemos. Que Deus te abençoe ricamente;*

*Ao meu irmão negro Leonardo França, conselheiro, professor e amigo para todas as horas. Você faz parte da minha família;*

*Ao meu irmão branco Igor Bresolin, pela verdadeira amizade, pela prontidão em ajudar, pelo caráter. Valeu “cara”;*

*Às minhas queridas amigas de sempre Beatriz, Aline e Luciana pela solidariedade, companheirismo, incentivo e tantas outras qualidades, impossíveis de serem sintetizadas em tão poucas palavras. Nunca esquecerei tudo que vocês fizeram por mim.*

*Aos meus queridos colegas de laboratórios tão importantes para a minha formação: Isa, Carol, Paula Timóteo, Érika, Geórgia, Goran, Cristiane, Ana Paula, Tashima, Ivana, Érica, Ivanildo, Luciana, Mariana, Lucimara, Elaine, Amanda, Gilson;*

*Aos demais alunos, professores e funcionários da FEQ/UNICAMP;*

## RESUMO

Neste trabalho, foi estudada a detecção da IgG-anticardiolipina presente em soros de pacientes com doenças autoimunes, utilizando lipossomas polimerizados. A vantagem desse sistema é o reconhecimento molecular e transdução de sinal em uma única etapa. O uso de soros reais, ao invés de soros de referência, objetivou avaliar a potencialidade dos lipossomas polimerizados para aplicação em diagnóstico clínico-laboratorial. Os estudos foram realizados com “pools” de soros de pacientes com doenças auto-imunes, os quais foram previamente caracterizados através da dosagem de três níveis de IgG-específica designados como alta (5152,01 µg/mL), média (2030,49 µg/mL) e baixa concentração (13,39 e 14,03 µg/mL). Soro sadio, com concentração de IgG anti-cardiolipina 5,58 µg/mL foi usado como controle. Os lipossomas monoméricos foram compostos do ácido diacetilênico 10,12-tricosadiinóico e cardiolipina. A polimerização foi feita por irradiação de luz ultravioleta com a máxima absorção na região do azul. As interações foram estudadas com a cardiolipina livre e na superfície dos lipossomas polimerizados. A discriminação entre os soros autoimunes e soro sadio foi estudada em lipossomas polimerizados, através da diluição dos soros ou através da sua purificação com gel de sepharose- proteína G, o grau de polimerização e a concentração de cardiolipina. Os resultados mostram que as ligações específicas são predominantes em relação às inespecíficas, porém os componentes não específicos exercem interferência expressiva. Nos lipossomas polimerizados, os padrões de absorbâncias do vermelho e do azul com o tempo, são diferentes para os soros autoimunes e sadio, resultando em sinais espectrais maiores para o soro sadio. A diluição ou purificação muda o padrão de absorbância do azul, a qual decresceu com a interação, intensificando o sinal colorimétrico do vermelho resultante. A polimerização e a concentração de cardiolipina intensificam os sinais colorimétricos, porém não discriminaram a olho nu a diferença entre soro sadio e autoimune. O estudo dos efeitos da diluição e purificação apontam condições onde a discriminação do sinal pode ser maximizada. Esses resultados mostram a potencialidade dos lipossomas polimerizados para a detecção de anticorpos anticardiolipina em soros reais em ensaio de etapa única, e demonstram a factibilidade da análise espectral no estudo de interações moleculares em sistemas complexos.

*Palavras-chave: Lipossomas polimerizados, cardiolipina, anticorpos anti-cardiolipina, nanotecnologia, imunoensaios, Biossensores.*

## Abstract

This work studies the detection of anticardiolipin IgG present in the sera of patients with autoimmune diseases, using polymerized liposomes. The advantage of this system is the molecular recognition and transduction of signal in a single step. The use of real sera, instead of reference sera, aimed to evaluate the potentiality of polymerized liposomes to application in clinical-laboratorial diagnosis. The studies were carried out using pools of sera from patients with autoimmune diseases, which were previously characterized through the dosage of specific IgG level. Three levels of specific-IgG were selected, which were classified as high (5152,01  $\mu\text{g/mL}$ ), medium (2030,49  $\mu\text{g/mL}$ ) and low concentration (13,39 e 14,03  $\mu\text{g/mL}$ ). Serum from healthy individuals, with 5,58  $\mu\text{g/mL}$  IgG anti-cardiolipin was used as control. The monomeric liposomes were composed by the diacetylenic acid 10,12-tricosadiynoic and cardiolipin. The polymerization was performed by irradiation in the UV wave length, with the maximum absorption in the blue region. The interactions were studied on the free cardiolipin and on the surface of polymerized liposomes. The discrimination between autoimmune and health sera was studied in polymerized liposomes through the dilution of sera, purification of sera using sepharose- protein G gel, the polymerization level and the cardiolipin concentration. The results show that the specific binding are predominant in related to the inspecific ones, but the interference of non-specific components is significant. The patterns of absorbance in red and blue along time in polymerized liposomes are different for the autoimmune sera and healthy serum. The dilution or purification changes the absorbance pattern in the blue, which decreasing as a consequence of the interaction, intensifying the final red signal. The polymerization and the cardiolipin concentration in liposomes intensified the colorimetric signals, but they don't discriminate by naked eye the differences between autoimmune and health sera. The study of the effects of dilution and purification pointed out to conditions where the signal discrimination may be maximized. These results show the potentialities of polymerized liposomes to detection of anticardiolipin antibodies in real sera using a single step assay. Furthermore, they demonstrate the factibility of the spectral analysis on the study of molecular interactions in complex systems.

*keywords:* polymerized liposomes, *cardiolipin*, IgG anti-cardiolipin, nanotechnology, immunoassays, biosensors.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVO.....	4
CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 SISTEMA IMUNE E ANTICORPOS.....	6
3.2 DOENÇAS AUTO-IMUNES.....	9
3.3 CARDIOLIPINA E SUA INTERAÇÃO COM ANTICORPOS.....	11
3.4 LIPOSSOMAS EM IMUNOENSAIOS.....	14
3.5 LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS.....	15
3.6 ANÁLISE ESPECTRAL DA INTERAÇÃO ENTRE LIGANTE E RECEPTOR....	22
3.7 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS.....	28
CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 MATERIAIS.....	31
4.2 MÉTODOS.....	32
4.2.1 Preparação de amostras de soro humano.....	32
4.2.2 Quantificação de proteínas.....	32
4.2.3 Seleção de “Pools” de soros de indivíduos acometidos de doenças auto-imunes...32	
4.2.4 Purificação dos soros.....	34
4.2.4.1 Ensaio Cromatográfico.....	34
4.2.4.2 Purificação da IgG: Ensaios em tubos do tipo eppendorf.....	35
4.2.4.3 Eletroforese SDS-PAGE.....	37
4.2.4.4 Dosagem de IgA, IgG e IgM e anticorpos anti-cardiolipina (IgG) nos soros.....	37
4.2.5 Preparação dos lipossomas.....	38
4.2.6 Caracterização dos lipossomas.....	38
4.2.6.1 Determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanho.....	38
4.2.6.2 Quantificação da cardiolipina.....	39
4.2.7 Polimerização.....	40
4.2.8 Ensaios com cardiolipina livre.....	40

4.2.9	Determinação colorimétrica dos auto-anticorpos.....	41
4.2.9.1	Influência da diluição dos soros.....	42
4.2.9.2	Influência do tempo de polimerização.....	44
4.2.9.3	Influência da concentração de cardiolipina e da concentração de IgG no soro purificado.....	45
CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		47
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS “POOLS” DE SOROS.....	47
5.1.1	– Níveis de IgG–específica.....	47
5.1.2	– Absorbância dos soros e da cardiolipina em tampão fosfato.....	49
5.1.3	– Diâmetro médio e polidispersidade dos agregados dos constituintes dos soros em solução.....	52
5.2	INTERAÇÃO ENTRE OS SOROS E A CARDIOLIPINA LIVRE EM TAMPÃO FOSFATO.....	53
5.2.1	– Interação entre soro sadio (SS) e cardiolipina.....	53
5.2.2	– Interação entre cardiolipina e soro com alta concentração de IgG-específica (AIA).....	57
5.2.3	– Fração de sítios ocupados.....	61
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MONOMÉRICOS E POLIMERIZADOS.....	65
5.3.1	Incorporação da cardiolipina.....	65
5.3.2	Diâmetro médio e distribuição de tamanhos.....	65
5.3.3	Polimerização dos lipossomas monoméricos.....	67
5.4	INTERAÇÃO ENTRE OS SOROS E OS LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS CONTENDO CARDIOLIPINA.....	69
5.4.1	Influência da diluição dos soros.....	69
5.4.2	Estequiometria da interação.....	76
5.4.3	Influência do tempo de polimerização dos lipossomas.....	78
5.4.4	Influência da concentração de cardiolipina nos lipossomas.....	81

5.5 INTERAÇÃO ENTRE OS SOROS PURIFICADOS E OS LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS CONTENDO CARDIOLIPINA.....	83
5.5.1 Verificação do desempenho relativo ao gel de agarose-proteína G na purificação dos soros.....	83
5.5.2. Influência da concentração de IgG no soro purificado na interação com lipossomas polimerizados.....	86
5.5.3 Influência da concentração de cardioplipina nos lipossomas.....	90
5.6 DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO.....	92
5.6.1 Influência da diluição dos soros.....	92
5.6.2. Influência do tempo de polimerização dos lipossomas.....	96
5.6.3. Influência da concentração de IgG no soro purificado.....	98
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	100
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Propriedades físico-químicas das imunoglobulinas (modificado de ROITT et al., 1999).....	8
Tabela 5.1: Níveis de anticorpos anti-cardiolipina (IgG) presentes nos "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças autoimunes.....	48
Tabela 5.2: Níveis de anticorpos em termos de IgG total e específica (IgG anti-cardiolipina) presentes nos "pools" selecionados de soros de amostras séricas de pacientes com doenças autoimunes.....	49
Tabela 5.3 – Volume de soro adicionado ( $V_a$ ), volume total da solução ( $V_t$ ) e concentrações de IgG- específica (IgG anti-cardiolipina) ( $C_s$ ), dos soros AIA, AIM, AIB e SS. Solução de soros em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. AIA, AIM, AIB- soros autoimunes com alta ( 5,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), média (2,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e baixa (0,013 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) concentração de IgG específica (IgG <sub>espec.</sub> ). SS- soro sadio com 0,0057 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (IgG <sub>espec.</sub> ).....	50
Tabela 5.4 – Diâmetro médio e polidispersidade dos soros sadio (SS) e autoimune (AIA) com concentrações de IgG-específica 0,0058 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 5,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. Medidas feitas com os soros diluídos 20 vezes.....	52
Tabela 5.5 – Absorbâncias do soro sadio em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 sem cardiolipina ( $A_0$ ) e com cardiolipina ( $A_c$ ). Os subscritos de $A_c$ representam as concentrações de cardiolipina (0,1 a 1,0 mM).....	56
Tabela 5.6 – Absorbâncias do soro autoimune (AIA) em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 sem cardiolipina ( $A_0$ ) e com cardiolipina ( $A_c$ ). Os subscritos de $A_c$ representam as concentrações de cardiolipina (0,1 a 1,0 mM).....	59
Tabela 5.7: Estequiometria da interação entre IgG-específica e cardiolipina livre em tampão fosfato.....	64
Tabela 5.8 – Diâmetro médio dos lipossomas antes e após a polimerização.....	67
Tabela 5.9 – Comportamento comparativo dos valores de CR, Pbf e Averde/Aazul.....	72
Tabela 5.10: Balanço de massa para proteína total, IgA, IgG e IgM da cromatografia em gel Agarose-proteína G.....	85
Tabela 5.11: Concentração de IgG total dos soros nas frações de eluição obtidas após a purificação com diferentes quantidades de gel Agarose.....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Planejamento experimental para avaliação do desempenho de lipossomas polimerizados na detecção de anticorpos antifosfolípidos.....	4
Figura 3.1 – Estrutura do anticorpo (imunoglobulina G) (LEHNINGER et al., 2000).....	8
Figura 3.2 – Espectro das doenças auto-imunes (Adaptado de ROITT et al., 1999).....	10
Figura 3.3 – Fórmula estrutural condensada da cardiolipina (DEVLIN, 1997).....	11
Figura 3.4 – Configuração de uma vesícula polimerizada composta de ácido 10,12-tricosadiinoico e cardiolipina como ligante de afinidade para detecção de auto-anticorpos (adaptado de CABRAL et al., 2003).....	22
Figura 3.5 - Interação de hexobarbital com citocromo P-450 como um exemplo de uma ligação em que o sinal espectroscópico decorre da receptor. (a) Diferentes curvas mostrando a perturbação do espectro do citocromo P-450 na região 400-450 nm. (b) A parcela da máxima perturbação, em função da concentração de hexobarbital, Cs*. (Winzor e Sawyer, 1995).....	26
Figura 3.6 - Avaliação da estequiometria da ligação entre receptor-ligante por titulação. Curvas foram construídos com base em um único sítio do receptor com uma constante de ligação ( $K_{AS}$ ) de $10^6 M^{-1}$ e valores de $10^4$ (a) (b) $10^{-5}$ , e (c) $10^{-6}$ para a concentração total de receptor ( $Ca^*$ ). (Winzor e Sawyer, 1995).....	27
Figura 3.7 – Esquema dos ligantes utilizados em cromatografia de afinidade (adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).....	29
Figura 4.1 – Ilustração referente aos princípios do ensaio utilizando Kit Varelista IgG anti-cardiolipina (adaptado do manual de KIT VARELISA, PHARMACIA DIGNOSTICS, 2003).....	34
Figura 4.2 – Montagem experimental do ensaio cromatográfico.....	35
Figura 4.3 – Foto de placas utilizadas nestes ensaios com lipossomas e soros purificados e não purificados (retirada da Internet, <a href="http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm">www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm</a> ).....	42
Figura 4.4 – Mapa de placa montada para o estudo da influência da diluição dos soros na resposta colorimétrica. B = branco; AIA = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação e sem diluição; AIA 1/20 = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação diluído 1/20; AIA 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação diluído 1/100; AIM = Soro auto-imune de média concentração sem	

purificação e sem diluição; AIM 1/20 = Soro auto-imune de média concentração sem purificação diluído 1/20; AIM 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação diluído 1/100; AIB1 = Soro auto-imune de baixa concentração sem purificação e sem diluição; AIB1-1/20 = Soro auto-imune de baixa concentração sem purificação diluído 1/20; SS = Soro sadio sem purificação e sem diluição; SS 1/20 = Soro sadio sem purificação diluído 1/20; SS 1/100 = Soro sadio sem purificação diluído 1/100; C+ = Controle positivo do kit Varelista; C- = Controle negativo do kit Varelista; AIAG = Soro auto-imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G sem diluição; AIAG 1/20 = Soro auto imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/20; AIAG 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/100; AIMG = Soro auto-imune de média concentração purificado com Sepharose proteína-G sem diluição; AIMG 1/20 = Soro auto-imune de média concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/20; AIMG 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/100; AIB1G = Soro auto-imune de baixa concentração purificado com Sepharose proteína-G sem diluição; AIB1G 1/20 = Soro auto-imune de baixa concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/20; IgGF = imunoglobulina G comercial com a mesma concentração aproximada de IgG dos soros de seres humanos, sem diluição; IgGF1/20 = imunoglobulina G comercial diluída 1/20; IgGF1/100 = imunoglobulina G comercial diluída 1/100. Soros purificados com 100 µL de gel Sepharose-proteína G.....43

Figura 4.5 – Mapa de placa montada para o estudo da influência do tempo de polimerização na resposta colorimétrica, soros purificados com 200 µL de gel Sepharose Proteína G. B = branco; AIA = soro auto-imune alta conc.; AIM = soro auto-imune de média conc.; AIB1 = soro auto-imune de baixa conc.; AIAG = soro auto-imune purificado de alta conc.; AIMG = soro auto-imune purificado de média conc.; AIB1G = soro auto-imune purificado de baixa conc.; SS = soro sadio; AIB2 1/1 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/1; AIB2 1/11 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/11; SS = soro sadio; SSG = Soro sadio purificado; P1 = lipossomas polimerizados por 5 min; P2 = lipossomas polimerizados por 10 min; P3 = lipossomas polimerizados por 20 min.....45

Figura 4.6 – Mapa de placa montada para o estudo da influência da concentração de IgG dos soros purificados na resposta colorimétrica. B = branco; AIA = soro auto-imune alta conc.; AIM = soro auto-imune de média conc.; AIB1 = soro auto-imune de baixa conc.; AIAG 200 = soro auto-imune de alta concentração purificado com 200 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIAG 600 = soro auto-imune de alta concentração purificado com 600 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIMG 200 = soro auto-imune de média concentração purificado com 200 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIMG 600 = soro auto-imune de média concentração purificado com 600 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIBG 200 = soro auto-imune de baixa concentração purificado com 200 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIBG 600 = soro auto-imune de baixa concentração purificado com 600 microlitros de Sepharose-proteínas G; SS = soro sadio; AIB2 1/1 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/1; AIB2 1/11 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/11 SSG = Soro sadio purificado.....46

Figura 5.1: Perfis de absorvância dos soros autoimunes e sadio dispersos em solução de tampão fosfato (25 mM, pH 7,0) em função de (A) concentração de IgG total (Ct) e ( B e C) concentração de IgG-específica (Cs). AIA, AIM, e AIB são os soros autoimunes com concentrações de IgG-específica alta (5,15µg/µL), média (2,03µg/µL) e baixa (0,013µg/µL) respectivamente. SS é o soro sadio com 0,00558µg/µL de IgG-específica. (D) Perfil de absorvância da cardioplipina em solução de tampão fosfato (25 mM, pH 7,0) em função da sua concentração Ca, onde “a”designa acceptor.....51

Figura 5.2 – Absorvâncias do soro sadio nas suas formas em equilíbrio, livre e complexada com cardioplipina, ambos dispersos em solução tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. Detecção da formação dos complexos na faixa de comprimentos de onda entre 410 e 470 nm do soro sadio (SS). Nos retângulos à direita tem-se as quantidades adicionadas de SS à solução de cardioplipina nas concentrações (A) 0,1 mM (B) 0,3 mM (C) 0,5 mM (D) 0,7 mM (E) 1,0 mM.....55

Figura 5.3 – (A) Perfis representativos da adição de SS ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 e da interação entre a cardioplipina (acceptor) com o ligante (IgG-específica ) proveniente do soro sadio. Cs é a concentração de IgG-específica. (B) Variação da absorvância das dispersões do acceptor cardioplipina (Aa) em função da sua concentração Ca.....57

Figura 5.4 – Absorbâncias do soro autoimune AIA nas suas formas em equilíbrio, livre e complexada com cardiolipina, ambos dispersos em solução tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. Detecção da formação dos complexos na faixa de comprimentos de onda entre 410 e 470 nm do soro autoimune (AIA). Nos retângulos à direita tem-se as quantidades adicionadas de AIA à solução de cardiolipina nas concentrações (A) 0,1 mM (B) 0,3 mM (C) 0,5 mM (D) 0,7 mM (E) 1,0 mM.....	58
Figura 5.5 – (A) Perfis representativos da adição de AIA ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 e da interação entre a cardiolipina (acceptor) com o ligante (IgG-específica ) proveniente do soro autoimune AIA. Cs é a concentração de IgG-específica. (B) Variação da absorbância das dispersões do acceptor cardiolipina (Aa) em função da sua concentração Ca.....	60
Figura 5.6 – Variação do parâmetro espectral Fa (fração de sítios ocupados) com a razão entre as concentrações de ligante IgG-específica (Cs) e acceptor cardiolipina (Ca) com concentração inicial 0,5 mM (A) SS e AIB (B) AIA e AIM, e (C) Fa em função da razão entre IgG-total e acceptor. As absorbâncias foram medidas a 410 nm.....	62
Figura 5.7: Distribuição de tamanhos dos lipossomas monoméricos compostos do ácido 10,12 tricosadiinóico e 20% de cardiolipina. A distribuição populacional é em termos de intensidade de luz espalhada.....	66
Figura 5.8: Espectros de polimerização dos lipossomas compostos de ácido 10,12 tricosadiinóico com 20% de cardiolipina, concentração do ácido: 0,5mM. Solvente: em água.....	67
Figura 5.9: Fotografias dos lipossomas polimerizados em diferentes estágios de polimerização: azul ( $\lambda = 635\text{nm}$ ), púrpura ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) e rosa ( $\lambda = 480\text{nm}$ ).....	68
Figura 5.10: Espectro de polimerização dos lipossomas compostos de ácido 10,12 tricosadiinóico com 30% de cardiolipina, concentração 0,5mM. Tempo de polimerização: 40 minutos.....	69
Figura 5.11: Respostas colorimétricas em função do tempo e da diluição dos soros para lipossomas polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardiolipina (A) AIA (B) AIM, (C) AIB (D) SS.....	70

Figura 5.12: Respostas colorimétricas em função do tempo e da diluição, para o ensaio com polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardiolipina. (A) Soros sem diluição, (B) Soros diluídos 1:20, (C) Soros diluídos 1:100.....	73
Figura 5.13: Evolução da coloração em termos dos perfis de absorbância do vermelho e do azul (A), e da razão Avermelho/Aazul (A490/A640) (B) para os diversos soros sem diluição em função do tempo, para o ensaio com polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardiolipina: quadrado invertido AIA, quadrado AIM, triângulo AIB e cruz SS.....	74
Figura 5.14: Evolução da coloração em termos da razão Avermelho/Aazul (A490/A640) para o soro AIB a varias diluições em função do tempo, para o ensaio com polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardiolipina.....	76
Figura 5.15: Variação do parâmetro espectral Fa (fração de sítios ocupados), com a diluição para o soro AIB.....	77
Figura 5.16: Respostas colorimétricas em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 20% de cardiolipina polimerizados por 5 minutos (P1), 10 minutos (P2) e 20 minutos (P3). (A) AIA nas diversas polimerizações, (B) AIM nas diversas polimerizações, (C) AIB1 nas diversas polimerizações, (D) SS nas diversas polimerizações.....	79
Figura 5.17: Evolução da razão Avermelho/Aazul em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 20% de cardiolipina polimerizados por 5 minutos (P1), 10 minutos (P2) e 20 minutos (P3). (A) AIA nas diversas polimerizações, (B) AIM nas diversas polimerizações, (C) AIB nas diversas polimerizações, (D) SS nas diversas polimerizações.....	80
Figura 5.18: Respostas colorimétricas em função do tempo. (A) Ensaio com lipossomas contendo 30% de cardiolipina e polimerização de 40 minutos. (B) Ensaio com lipossomas contendo 20% de cardiolipina e polimerização de 20 minutos.....	81
Figura 5.19: Evolução da razão Avermelho/Aazul em função do tempo. (A) Ensaio com lipossomas contendo 30% de cardiolipina e polimerização de 40 minutos. (B) Ensaio com lipossomas contendo 20% de cardiolipina e polimerização de 20 minutos.....	82
Figura 5.20: Perfil cromatográfico de soro humano sadio em gel de Agarose-proteína G com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. Injeção de 0,67 mL de soro humano sadio	

diluído na proporção de 1:2 em tampão de adsorção. Tampão de adsorção, Fosfato de sódio 20 mM pH7,4. Solução de dessorção, Ácido cítrico 100 mM pH 2,6. Volume das frações de adsorção, 6,0 mL. Volume das frações de eluição, 4,6 mL. Volume do leite, 2,0 mL. Os picos 1 e 2 indicam os picos de proteína obtidos. As setas indicam início das etapas de lavagem (A) e eluição (B).....83

Figura 5.21: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% de cromatografia de soro humano sadio em gel de Agarose-proteína G. Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas sob condições desnaturantes e não-redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (fosforilase b, 97 kDa; albumina, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa); Faixa 2: IgG comercial Aventis (Alemanha); Faixa 3: Fração da lavagem 1 (referente a fração da lavagem coletada no tubo de ensaio codificado com o número 1); Faixa 4: Fração da lavagem 2 (referente a fração da lavagem coletada no tubo de ensaio codificado com o número 2); Faixa 5: Fração de eluição 6 (referente a fração de eluição coletada no tubo de ensaio codificado com o número 6); Faixa 6: Fração de eluição 7 (referente a fração de eluição coletada no tubo de ensaio codificado com o número 7).....84

Figura 5.22: Curvas contendo as respostas colorimétricas em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 30% de cardioplipina polimerizados por 40 minutos. AIAG 200 = soro autoimune de alta concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIAG 600 = soro autoimune de alta concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 200 = soro autoimune de média concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 600 = soro autoimune de média concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 200 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 600 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; SSG 200 = soro sadio purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; SSG 600 = soro sadio purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G. (A) AIA sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (B) AIM sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (C) AIB sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros

de agarose-proteína G. (D) SS sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G.....88

Figura 5.23: Curvas contendo as razões Vermelho/Azul em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 30% de cardioplipina polimerizados por 40 minutos. AIAG 200 = soro autoimune de alta concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIAG 600 = soro autoimune de alta concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 200 = soro autoimune de média concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 600 = soro autoimune de média concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 200 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 600 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; SSG 200 = soro sadio purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; SSG 600 = soro sadio purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G. (A) AIA sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (B) AIM sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (C) AIB sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (D) SS sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G.....89

Figura 5.24: Evolução da coloração em termos dos perfis de absorbância do vermelho e do azul para soros purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G (A) e com 600 microlitros de agarose-proteína G (B) sem diluição em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 30% de cardioplipina polimerizados por 40 minutos contendo 20% de cardioplipina, onde: quadrado invertido AIA, quadrado AIM, triângulo AIB e cruz SS(azul-absorbância no azul e vermelho-absorbância no vermelho respectivamente).....90

Figura 5.25: Curvas contendo as razões Vermelho/Azul em função do tempo para os soros purificados com 200 microlitros de gel agarose-proteína G, adicionados aos lipossomas contendo 20% e 30% de cardioplipina.....91

Figura 5.26: Fotografia da placa de polietileno com o ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardioplipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 minutos. Abaixo é

apresentado o mapa da placa com as condições usadas em cada poço. As siglas AI são dos soros autoimunes de alta (AIA), média (AIM) e baixas (AIB1, AIB2) concentrações de IgG-específica. Quando terminadas com G as siglas designam os soros purificados, e as outras os sem purificação. SS é o soro sadio, C+ C- são os controles positivo e negativo do kit Varelista; 1/20 e 1/100 são as diluições dos soros. B é o branco (ausência de soro). Soros purificados com 100 µL de proteína G.....94

Figura 5.27: Fotografia das placas de polietileno (A) Ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 minutos, (B) Parte da placa de polietileno do ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 (P1), 10 (P2) e 20 minutos (P3).....95

Figura 5.28: Fotografia da placa de polietileno com o ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 (P1), 10 (P2) e 20 minutos (P3). Abaixo é apresentado o mapa da placa com as condições usadas em cada poço. As siglas são as mesmas descritas na Figura 4.7. Os números 1/1 e 1/11 significam diluições.....97

Figura 5.29: Fotografia da placa de polietileno com o ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (70%) e cardiolipina (30%), polimerizados com radiação UV por 40 minutos. Abaixo é apresentado o mapa da placa com as condições usadas em cada poço. As siglas são as mesmas descritas na Figura 4.7. Os números 1/1 e 1/11 significam diluições, e 200 , 600 significam a quantidade de gel de Agarose-proteína G usado na purificação dos soros..99

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A determinação de anticorpos antifosfolípidos em soros de pacientes com doenças autoimunes é usualmente feita através de ensaio heterogêneo em fase sólida designado como ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Esse ensaio padronizado é comercializado na forma de kits (geralmente importados) que utilizam placas de poliestireno recobertas com antígeno específico. Apesar de constituir uma poderosa técnica extensamente usada para diagnóstico clínico-laboratorial, os custos associados ao ensaio ELISA ainda são elevados. Além disso, este ensaio é composto de várias etapas, as quais aliadas ao controle impreciso da densidade de antígenos sobre as placas, conduzem muitas vezes à variabilidade de resultados obtidos em diferentes laboratórios, bem como utilizando diferentes kits.

Com o objetivo de contornar as limitações acima citadas na determinação de anticorpos antifosfolípidos utilizando o ensaio ELISA, neste projeto foi proposto um ensaio alternativo utilizando lipossomas polimerizados contendo na sua superfície o ligante de afinidade cardiolipina, visando o desenvolvimento de um kit para aplicações em diagnóstico clínico-laboratorial. Em termos de kit diagnóstico, a cardiolipina é representativa dos fosfolípidos no diagnóstico clínico-laboratorial de doenças auto-imunes que compõem a “Síndrome Anti-fosfolípide”. Lipossomas com ligantes de afinidade mimetizam as membranas celulares com receptores específicos na sua superfície.

A extensão da polimerização dos lipossomas produz alterações no espectro de absorção de luz da solução, que nos instantes iniciais tem a máxima absorção na região do azul, passando para o púrpura e vermelho, em decorrência das tensões criadas na estrutura dos lipossomas com conseqüente desalinhamento progressivo das insaturações.

O ensaio homogêneo com lipossomas polimerizados é composto de 1 etapa somente: a solução de lipossomas polimerizados na cor azul, em proporção definida, é simplesmente adicionada ao soro em análise. Mudanças de cor da solução, praticamente instantâneas e visíveis a olho nu ocorrem quando os anticorpos estão presentes no meio.

Assim, a solução adquire a coloração púrpura, rosa ou vermelho, conforme a concentração de anticorpos específicos adsorvidos. Não há portanto a necessidade de utilização de anticorpo conjugado e etapa de reação enzimática para desenvolvimento de cor, característicos do ensaio ELISA.

Devido às suas características, o ensaio lipossomal pode ser usado de forma qualitativa e quantitativa. Quando usado de forma qualitativa, este ensaio pode ser útil para a seleção prévia de soros de pacientes com doenças imunológicas, tais como doenças autoimunes, para posterior diagnóstico clínico-laboratorial. A detecção a olho nu da mudança de cor da solução, permite que esse ensaio qualitativo seja feito com facilidade também em campo, sem a necessidade de utilização de equipamentos adicionais para leitura ou transdução do sinal produzido. Além disto, o ensaio também permite a análise quantitativa da adsorção dos anticorpos, através da leitura da intensidade de cor em espectrofotômetro e calibração prévia do sistema.

O estudo de lipossomas polimerizados como biossensores, datam do final da década de 90, quando os trabalhos foram voltados para a detecção de estruturas supramoleculares como bactérias e organelas celulares. Os trabalhos de detecção de anticorpos são mais recentes, com estudos de poucos grupos, que utilizaram anticorpos específicos e não específicos em soluções-padrões como soros de referência. A detecção de anticorpos anti-cardiolipina em lipossomas também foi estudada anteriormente pelo nosso grupo, utilizando soro de referência de kit diagnóstico e IgG não específica comercial. Foram usados lipossomas magnéticos e lipossomas polimerizados, de mesma composição que os utilizados neste trabalho. Ensaio com soros reais foram feitos de modo preliminar, resultando na motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

Dentro deste contexto, o presente trabalho estudou inicialmente a interação entre os soros e a cardiolipina livre em solução. A análise espectral foi utilizada para determinação da estequiometria da ligação aceptor-ligante. Os lipossomas polimerizados foram preparados a partir do ácido diacetilênico 10,12-tricosadiinóico cujas insaturações sofrem polimerização por irradiação com luz ultravioleta. A polimerização foi feita em tempos pré-determinados, de modo a se ter diferentes intensidades de coloração azul, decorrentes da extensão da polimerização. Nesse ponto a polimerização foi interrompida, e os lipossomas polimerizados foram armazenados ou colocados em presença de soros sadio ou de

indivíduos doentes. As mudanças de cor produzidas pela adsorção dos anticorpos foram analisadas através do padrão dos perfis de absorbância no azul e no vermelho com o tempo, da razão entre as absorbâncias no vermelho e no azul, e através do parâmetro Resposta Colorimétrica, que quantifica a mudança percentual da absorbância no azul inicial.

Para avaliação do desempenho dos lipossomas polimerizados na aplicação em questão, foi estabelecido o esquema experimental do Esquema 1. Este planejamento envolveu o trabalho conjunto dos 4 sub-grupos de pesquisa da Unicamp, que trabalharam em sincronia desde a síntese dos fosfolipídios diacetilênicos até os ensaios com “pools” de soros de indivíduos acometidos com doenças autoimunes. Deste modo os ácidos diacetilênicos foram sintetizados no Laboratório de Síntese de Substâncias Orgânicas (LASSO/IQ), sob a coordenação do Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia; os lipossomas polimerizados preparados e caracterizados no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, LDPB/FEQ, sob a orientação da Profa. Maria Helena Andrade Santana; a purificação dos soros no Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia, LIMBio/FEQ, sob a orientação da Profa. Dra. Sonia Maria Alves Bueno, e os ensaios colorimétricos realizados no Laboratório de Imnologia Clínica e Alergia (LICA), de cuja soroteca os “pools” de soros foram disponibilizados, coordenados pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner.

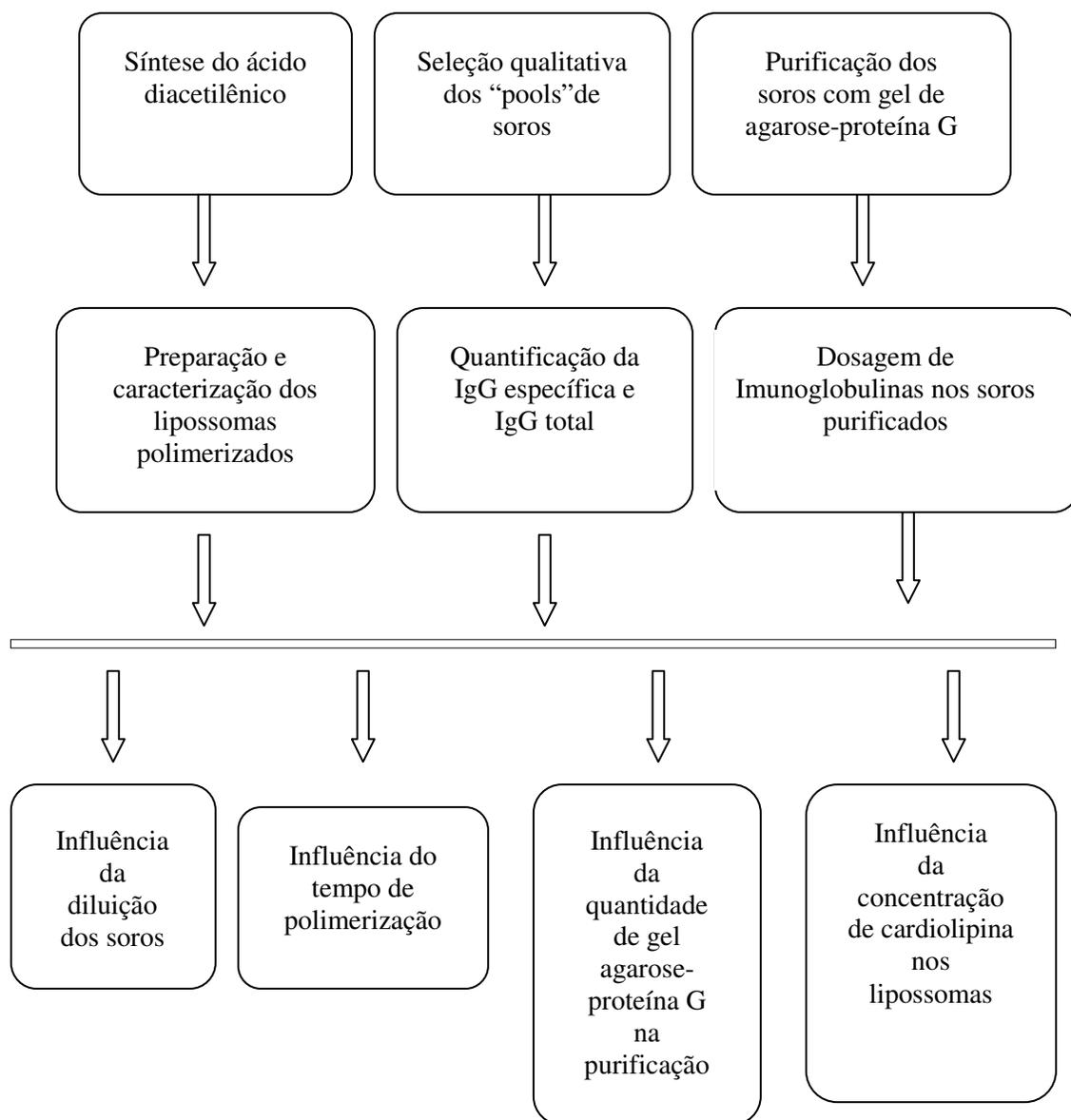


Figura 1.1 – Planejamento experimental para avaliação do desempenho de lipossomas polimerizados na detecção de anticorpos antifosfolípidos.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi estudar as interações entre a IgG-específica de anticorpos anticardiolipina proveniente em “pools” de soros reais (de pacientes acometidos de doenças autoimunes) e a cardiolipina presente na superfície de lipossomas polimerizados, de modo a avaliar a potencialidade desse sistema para a aplicação em diagnóstico clínico-laboratorial, com a análise em uma única etapa e discriminação a olho nu, do sinal colorimétrico resultante da interação de soros autoimunes e soro sadio.

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão dos aspectos abordados no presente trabalho. Pela multidisciplinaridade do tema, essa revisão não tem o objetivo de descrever de maneira exaustiva e completa os tópicos aqui abordados. Porém, a descrição apresentada visa fundamentá-los cientificamente, permitir o entendimento da sua inserção no tema e dar suporte à interpretação dos resultados experimentais.

#### 3.1 SISTEMA IMUNE E ANTICORPOS

O sistema imunitário dos vertebrados é uma grandiosa rede de moléculas e células com um só objetivo: distinguir entre o que é e o que não é próprio do indivíduo. Esta capacidade discriminativa é conhecida como “self tolerance” ou tolerância aos componentes próprios do organismo. Sua função primordial é de proteger os vertebrados contra microorganismos tais como vírus, bactérias e parasitas. Suas características de destaque são a especificidade, a adaptação e a memória. Os elementos de reconhecimento da resposta imunitária humoral são proteínas solúveis chamadas anticorpos ou imunoglobulinas, produzidas pelas células plasmáticas. Na resposta imunitária celular, os linfócitos T matam células que apresentem padrões estranhos em sua superfície. Também estimulam a resposta humoral ao ajudar as células B, as precursoras das células plasmáticas (STRYER, 1992; (ABBAS et al., 2002). As imunoglobulinas são proteínas sintetizadas *in vivo* em resposta à presença de uma substância estranha. São secretadas pelas células plasmáticas, que são derivadas dos linfócitos B. Essas proteínas solúveis são os elementos de reconhecimento da resposta imunitária humoral. Cada anticorpo tem afinidade específica para o material estranho que estimulou a sua síntese. Uma molécula estranha capaz de promover a formação de anticorpo é chamada de antígeno ou imunogênio (STRYER, 1992).

Os anticorpos, que representam 20% das proteínas plasmáticas, são imunoglobulinas (Ig) que reagem especificamente com o antígeno que estimulou a sua produção. As imunoglobulinas são glicoproteínas compostas de 82 a 96% de proteínas e 4 a

18% de carboidratos. Cada molécula de imunoglobulina é composta basicamente de duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas unidas por ligações dissulfeto conforme ilustrado na Figura 3.1. As cadeias pesadas têm massa molecular de 50 000 Da e as cadeias leves, em torno de 23 000 Da (ROITT et al., 1999). Existem diferentes formas de imunoglobulinas humanas e essa variedade é típica dos mamíferos em geral. São conhecidas cinco classes de imunoglobulinas. São elas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Existem quatro subclasses de IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) e duas subclasses de IgA (IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) (VLUG A & VAN REMORTEL P, 1989). Através da clivagem enzimática da molécula de IgG pela papaína, obtém-se dois fragmentos, denominados Fc e Fab. O fragmento Fab (região amino terminal) contém os sítios de ligação com o antígeno. O fragmento Fc (região carboxila terminal) não possui atividade de anticorpo, mas está envolvido na transferência placentária, na fixação de complemento, na ligação à várias células e outras atividades biológicas (JAWETS et al., 1998).

As classes e subclasses de imunoglobulinas são determinadas pelo tipo da sua cadeia pesada. As estruturas das cadeias pesadas diferem na seqüência de aminoácidos, no comprimento das cadeias e no conteúdo de carboidratos. Os diferentes isotipos de Ig possuem funções biológicas diferentes. Segundo ROITT et al. (1999), as propriedades biológicas das imunoglobulinas nos seres humanos são:

- IgM: produzida nos primeiros estágios da resposta imune.
- IgG: a mais abundante do soro, produzida nos últimos estágios da resposta imune.
- IgA: é a mais abundante em secreções exócrinas (saliva, lágrimas, muco brônquico e muco intestinal). Primeira linha de defesa contra antígenos bacterianos e virais.
- IgD: receptor de ligação (antígeno-células B), raros no soro, não havendo até o momento, outra função biológica descrita.
- IgE: baixos níveis no soro, importante ao conferir proteção contra parasitas; possui função nas reações alérgicas.

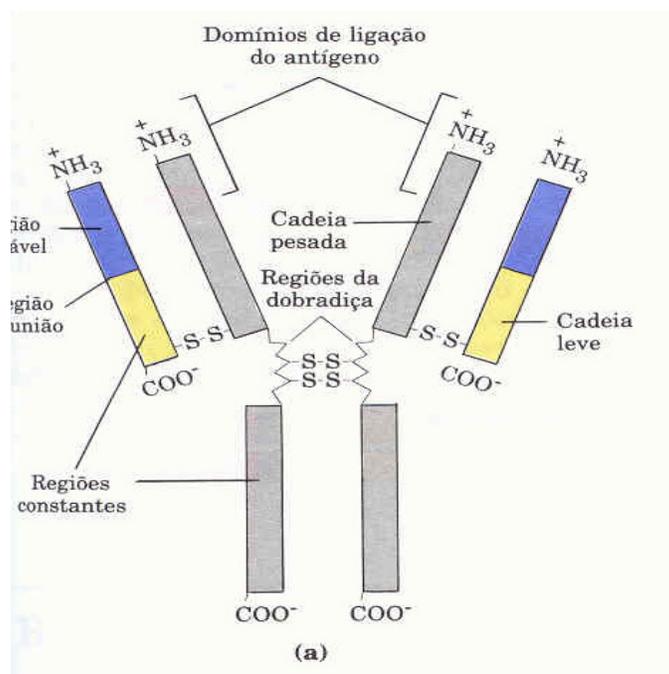


Figura 3.1 – Estrutura do anticorpo (imunoglobulina G) (LEHNINGER et al., 2000)

Algumas propriedades físico-químicas das imunoglobulinas são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Propriedades físico-químicas das imunoglobulinas (modificado de ROITT et al., 1999)

	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Massa molecular (kDa)	160	185	200	150	900
Teor de carboidratos (%)	7-11	9-14	12	2-3	12
Total de imunoglobulina no soro adulto (%)	13	0-1	0,002	80	6

As quatro subclasses de IgG diferem principalmente na região intermediária em termos de número de resíduos envolvidos e número de pontes dissulfeto. Os níveis de subclasses de IgG no soro são influenciados por vários fatores como: idade, raça e sexo (VLUG A & VAN REMORTEL P, 1989).

Há evidências de que a maioria dos auto-anticorpos presentes em pacientes com doenças auto-imunes órgão não-específicas são predominantemente das subclasses IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> (MARAN et al., 1997).

### **3.2 DOENÇAS AUTO-IMUNES**

A imunidade específica ou imunidade adquirida, que é extraordinária capacidade de distinguir entre diferentes microrganismos e macromoléculas, é um poderoso mecanismo do organismo para a eliminação de microrganismos patogênicos e outras substâncias antigênicas estranhas. Os mecanismos efetores da imunidade específica, como o complemento (sistema de proteínas do soro e da superfície celular que interagem mutuamente e com outras moléculas do sistema imune para gerar importantes efetores das respostas imunes inatas e adquiridas), fagócitos (células responsáveis pela fagocitose), células inflamatórias e citocinas (proteínas produzidas por tipos celulares muito diferentes que medeiam as reações inflamatórias e imunes) não são, em si, específicos para os antígenos estranhos. Portanto, as respostas imunes e a inflamação concomitante são freqüentemente acompanhadas pela lesão local e sistêmica aos tecidos normais próprios. Contudo, normalmente tais efeitos colaterais patológicos são controlados e autolimitados, cedendo com a eliminação do antígeno estranho. Ademais, os indivíduos normais são tolerantes com relação aos seus próprios antígenos, e não desenvolvem respostas imunes contra os tecidos autólogos (ABBAS et al., 2002). Entretanto, distúrbios podem ocorrer e desencadear processos auto-imunes, nos quais são produzidos anticorpos que reagem com componentes próprios do indivíduo (ROITT et al., 1999). Neste caso os anticorpos são denominados auto-anticorpos. Numerosas evidências indicam que reações auto-imunes são causa de certas enfermidades humanas, conhecidas como doenças auto-imunes (COTRAN et al., 2000).

As doenças auto-imunes podem ser divididas em órgão específicas e órgão não-específicas (ROITT et al., 1999). Tais distúrbios podem ser vistos na forma de um espectro (Figura 3.2) onde em uma extremidade estão às doenças órgão específicas apresentando auto-anticorpos séricos específicos a um determinado órgão. Na outra extremidade do espectro estão as doenças órgão não-específicas, podendo ser exemplificada pelo lupus eritematoso sistêmico (LES).

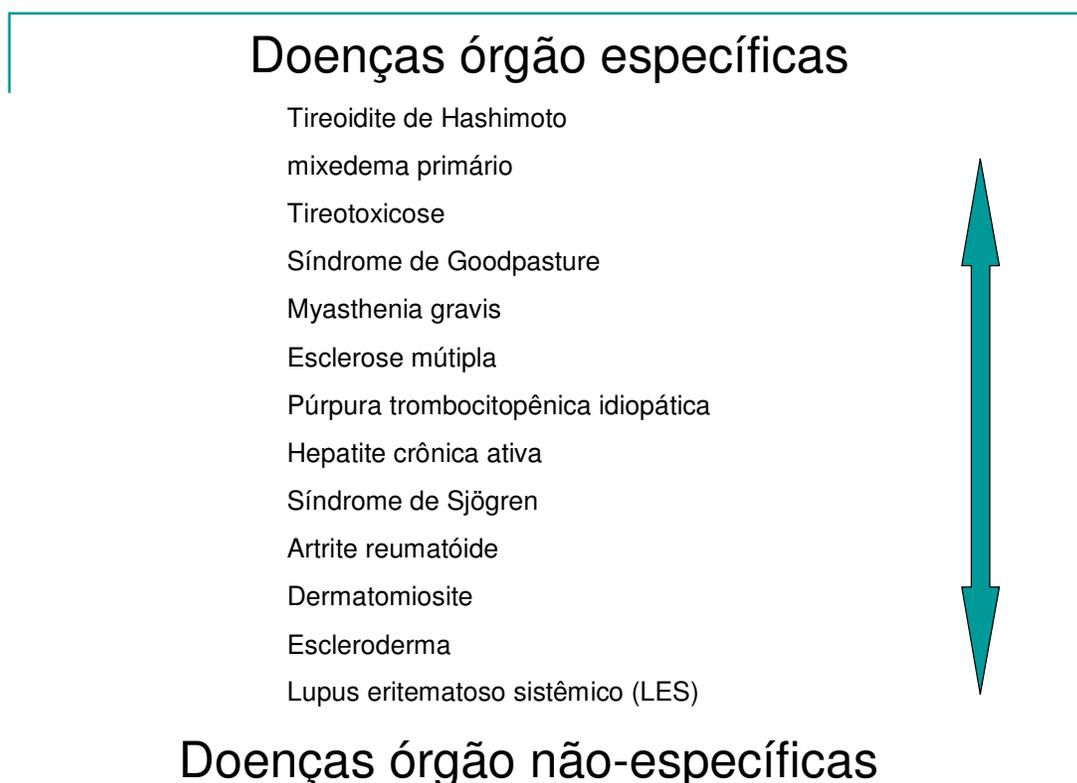


Figura 3.2 – Espectro das doenças auto-imunes (Adaptado de ROITT et al., 1999)

O LES é uma doença auto-imune multissistêmica crônica que afeta, sobretudo, indivíduos do sexo feminino. Os principais sintomas desta doença são: erupções cutâneas, artrite e glomerulonefrite (inflamação dos glomérulos renais); mas também são comuns: anemia e envolvimento do sistema nervoso central (ABBAS et al., 2002). Encontra-se uma variada coleção de auto-anticorpos, alguns dos quais reagem com o DNA e outros

constituintes das células do organismo (ROITT et al., 1999). Dentre os auto-anticorpos presentes em pacientes com LES destaca-se os anti-fosfolípidos dirigidos, principalmente, contra componentes presentes no núcleo. Os anticorpos anti-fosfolípidos podem ser detectados em 26% dos casos de pacientes com LES. O antígeno da reação é a cardiolipina, que está clinicamente associada ao desenvolvimento de trombose e trombocitopenia que, em ginecologia, estão relacionadas à morte intra-uterina ou aborto. Os auto-anticorpos anti-cardiolipina podem ser das classes IgA, IgG e IgM (FERREIRA & ÀVILA, 1996). A determinação de IgM pode indicar o início da doença auto-imune, IgG é encontrada em estágios progressivos da doença. Os auto-anticorpos do tipo IgA estão freqüentemente associados com a presença de IgG.

### 3.3 CARDIOLIPINA E SUA INTERAÇÃO COM ANTICORPOS

A cardiolipina é um fosfolípido duplo contendo quatro cadeias de ácidos graxos. Na Figura 3.3, é apresentada a sua fórmula estrutural.

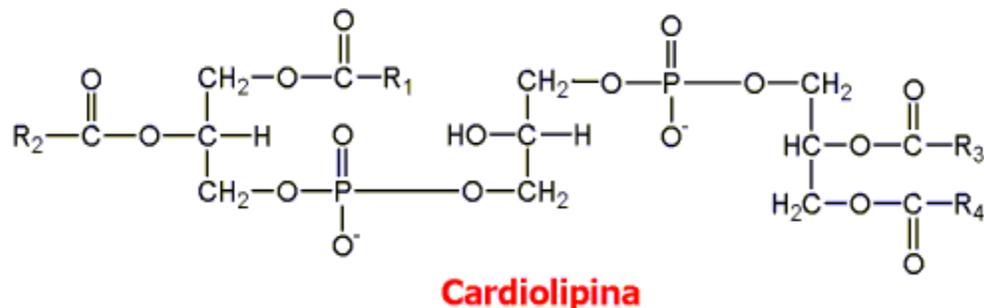


Figura 3.3 – Fórmula estrutural condensada da cardiolipina (DEVLIN, 1997).

Esse fosfolípido pode ser obtido por síntese química ou pode ser extraído da membrana mitocondrial interna, na qual existe na proporção de 20 mol% do total de lipídios, constitui o principal fosfolípido com carga negativa e desempenha importante função estrutural e no transporte de íons cálcio. Em geral, a cardiolipina isolada de mamíferos é altamente insaturada nos seus grupos laterais R, e especificamente enriquecida em ácido linoléico.

Uma das características marcantes da molécula de cardiolipina é o polimorfismo que apresenta em dispersões aquosas. Em excesso de tampão, o sal sódico de cardiolipina bovina organiza-se em bicamadas extendidas como caracterizado por ressonância magnética de fósforo,  $^{31}\text{P-NMR}$ . Entretanto, a interação com íons cálcio induz uma transição de fase reversível de bicamada para a fase hexagonal,  $\text{H}_{\text{II}}$ . À temperaturas fisiológicas ( $36,5^\circ\text{C}$ ) predomina a fase hexagonal. A estrutura formada entre a cardiolipina e lipídios formadores de bicamada não é bem determinada, porém a interpretação da estruturação através do modelo de micelas invertidas intrabcamada é suportado por evidências experimentais (Kruijff et al., 1982).

A cardiolipina pura não reage efetivamente com anticorpos. A molécula deve estar associada com lipídios auxiliares para ótima reatividade com anticorpos. A máxima reatividade envolvendo fixação de complemento foi obtida com a mistura cardiolipina, fosfatidilcolina e colesterol (Maltaner & Maltaner, 1945).

Os requerimentos estruturais da cardiolipina para reações com anticorpos humanos e de coelhos foi extensamente estudado na década de 60, devido à importância da cardiolipina no diagnóstico sorológico de sífilis. Estabeleceu-se que a fosfatidilcolina é o principal lipídio auxiliar na ligação de anticorpos com cardiolipina. A função da fosfatidilcolina não é atribuída à cabeça polar, mas à estruturação da cardiolipina nas suas caudas apolares, promovendo a fixação do complemento ou a reação de aglutinação com anticorpos *in vitro*, além de também elicitar a produção de anticorpos para cardiolipina em coelhos (Faure and Coulon-Morelac, 1963; Inoue and Nojima, 1967, 1969).

Takashi et al., 1979 investigou a influência da fluidez da membrana lipossomal, associada à presença de colesterol, na reação de cardiolipina com anticorpos. Esses autores concluíram que a ligação de anticorpos a lipossomas contendo cardiolipina é independente do estado físico da membrana, porém o desencadeamento da reação de aglutinação de lipossomas e ativação do complemento requer um estado mais fluido das membranas.

Estudos posteriores utilizando soros de pacientes com sífilis, demonstraram o alto grau de especificidade estrutural de anticorpos anti-cardiolipina e fosfolipídios (Costello and Green, 1986). Esses autores concluíram que a cardiolipina é um haptén e requer a presença da fosfatidilcolina para a sua completa reatividade. Experimentos adicionais de reatividade em papel de nitrocelulose, mostraram que a ligação do anticorpo com a

cardiolipina foi através da porção  $F_{ab}$  do anticorpo. Dados de anticorpos ligados em função do aumento da concentração do soro, mostraram comportamento hiperbólico característico de saturação. A linearização destes dados mostrou que a constante de afinidade  $K_d$  foi a mesma para diferentes soros, os quais diferiram somente no constante de máxima ligação na saturação (recíproca da quantidade de moles de IgG ligado por antígeno). Baseado nessas constantes, os mesmos autores calcularam a estequiometria de ligação, obtendo valores da ordem de 11.000 a 16.000 moles de cardiolipina por mol de anticorpo anti-IgG ligado.

Esses resultados confirmaram as observações qualitativas dos trabalhos anteriores e demonstraram que a ligação entre IgG autoimune e a cardiolipina, embora específica, pode ser caracterizada pelo reconhecimento do anticorpo por múltiplas moléculas, ao invés do reconhecimento de um sítio de ligação particular na molécula do antígeno. Esse conjunto de moléculas pode estar na forma de bicamadas, que é a estrutura adquirida pela cardiolipina em solução aquosa.

Estudos mais recentes enfocaram a seletividade da ligação de IgG anti-cardiolipina em lipossomas magnéticos contendo fosfatidilcolina e cardiolipina. A quantificação da ligação foi feita diretamente através de análise espectral da ligação dos anticorpos, e indiretamente através de curvas de “brackthrough” (Pinho et al., 2008). Esses estudos mostraram, em ambos os casos, a seletividade da ligação dos anticorpos anti-cardiolipina presentes nos soros de pacientes com doenças auto-imunes, em relação a soros sadios, e a saturação ocorreu envolvendo vários moles de cardiolipina. Adicionalmente os autores também mostraram que na saturação, a quantidade de IgG específica ligada por mmol de cardiolipina era bem menor, quando foi usado soro de referência (432U/mmol), comparada à quantidade de saturação obtida para “pool” de soros de pacientes com doenças auto-imunes, sem nenhum tratamento prévio ( $1,53 \times 10^8$  U/mmol).

### 3.4 LIPOSSOMAS EM IMUNOENSAIOS

A nanotecnologia tem ocupado uma posição relevante no desenvolvimento de biossensores. Demonstra-se que a sensibilidade e desempenho de biossensores é melhorada com o uso de nanomateriais. Adicionalmente, os nanomateriais têm permitido a introdução de novos sinais nas tecnologias de transdução em biossensores, como também análises simples e rápidas *in vivo*. Uma revisão extensa das aplicações de filmes e partículas nanométricas em biossensores é apresentada por Li Sijiao et al., 2004.

Os lipossomas fazem parte das estruturas nanoparticuladas que se auto-agregam mimetizando as células vivas. A sua estrutura suporta a incorporação de moléculas de biorreconhecimento tal como nas membranas celulares. Os lipossomas são também usados para amplificar sinais óticos, de ondas sonoras eletroquímicas (Rongen et al., 1997; Hianik et al., 1999; Baumner et al., 2003).

CHAIMOVICH et al., (1996), preparou vesículas unilameres pequenas de cardiopina e fosfatidilcolina encapsulando um corante como marcador. A ligação de anticorpos anti-CL à cardiopina (CL) na superfície dos lipossomas promoveu um rearranjo na bicamada, conduzindo ao vazamento do seu conteúdo interno.

Anticorpos anti-CL encontrados em pacientes portadores do lupus eritematoso sistêmico (LES) e sífilis, são capazes de se ligar a CL independentemente da 2-glicoproteína (2-GPI) a baixa força iônica (CHAIMOVICH et al., 1996).

Janoff et al., (1983), explorou o fato da cardiopina servir como antígeno para anticorpos anti-ds DNA, desenvolveram um ensaio colorimétrico baseado em lipossomas contendo cardiopina para a detecção de anticorpos presentes no soro de pacientes com lupus eritematoso sistêmico. Os autores encapsularam um corante (Arsenazo III) capaz de se ligar a íons divalentes permeados em decorrência da mudança da cardiopina para a fase H<sub>II</sub>. A ligação dos anticorpos estabiliza a estrutura impedindo o acesso dos cátions e mantendo inalterada a cor original do corante.

Pinho et al., 2008, estudou a seletividade na adsorção de anticorpos antifosfolípidos sobre magnetolipossomas contendo cardiopina. Os resultados analisados por curvas de 'breakthrough', obtidas da análise frontal da adsorção em sistema de magnetoforese,

mostraram uma diferença de 10% para a IgG total adsorvida de soros de indivíduos com doenças auto-imune e sadios.

Cabral (2000) estudou a preparação e caracterização de lipossomas polimerizados de ácido diacetilênico, e as respostas colorimétricas obtidas com lipossomas contendo 20% de cadiolipina. O estudo da interação com soro de referência, que constituiu a maior parte do seu trabalho, foi reportado em Cabral et al., 2003, demonstrando a especificidade da interação e a diferença nas respostas colorimétricas para o soro de referência (soro autoimune purificado) e uma IgG-não específica. Neste caso, tratando-se de compostos purificados, as RC mostraram-se bem distintas, assim como a visualização a “olho nu” permitiu claramente a observação das diferenças de coloração.

Poucos experimentos foram feitos com soros autoimunes e soro sadio reais, ambos sem purificação (Cabral, 2000). No entanto, os resultados já mostraram que nesse caso a diferenciação torna-se mais difícil, demandando uma maior investigação das variáveis que contribuem para o desenvolvimento da resposta imunológica.

Os resultados obtidos por Cabral, motivaram o desenvolvimento do presente trabalho. Um detalhamento maior dos resultados obtidos por Cabral, é aqui feito comparativamente, no capítulo de resultados e discussão.

### **3.5 LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS**

Lipossomas polimerizados constituem um tipo de agregado no qual as moléculas anfifílicas de fosfolipídios contendo insaturações ao longo da unidade molecular que constitui os grupos polimerizáveis são organizadas na forma de bicamada. Semelhantes aos lipossomas convencionais, essas estruturas formam-se em meio aquoso através da aplicação de energia ao sistema (LEHNINGER et al., 2000). Kulusheva et al., 2001, traz uma extensa revisão sobre a exploração das vesículas polimerizadas no desenvolvimento de sensores colorimétricos inteligentes. Essas vesículas são compostas de três componentes principais: fosfolipídios, componentes estruturais das membranas biológicas, um conjugado polimérico poliacetilênico como composto insaturado polimerizável e moléculas solúveis na membrana, contendo epítomos ou fragmentos de proteínas que são reconhecidos pelos anticorpos submetidos a teste.

As insaturações nas cadeias de hidrocarbonetos dos compostos poliacetilênicos permitem a polimerização dos monômeros por irradiação com luz UV, e os lipossomas polimerizados apresentam propriedades diferenciadas em relação aos convencionais, tais como: aumento da estabilidade, tempo de circulação *in vivo* e amplificação das características óticas como sinal e amplitude do espectro de absorção (CHARYCH et al., 1998). Após a irradiação UV, a dispersão das vesículas apresenta coloração azul. Entretanto, quando anticorpos são adicionados e reconhecem sítios de afinidade sobre a sua superfície, a vesícula é estruturalmente distorcida mediante a ligação do anticorpo, causando a mudança de cor para o vermelho. Essa transição colorimétrica é rápida, e acontece em consequência de interações específicas com uma variedade de compostos biológicos, demonstrando a potencialidade desses lipossomas como sensores colorimétricos.

Os ácidos diacetilênicos e seus derivados possuem duas ligações triplas conjugadas na molécula. São de ocorrência rara na natureza, e na sua maioria são obtidos através de síntese química.

Uma rota sintética bem utilizada para a obtenção dos ácidos graxos diacetilênicos envolve alquilações seqüenciais dos átomos de carbono 1 e 4 do composto 1,4-bis(trimetilsilil)butadieno (BTMSBD) com haletos de alquila adequados. Utilizando esta rota, são preparados quatro isômeros posicionais do ácido octadecadiinóico, além dos ácidos 12,14 - pentacosadiinóico e 12,14 - heptacosadiinóico, todos com bons rendimentos (XU et al., 1992). Este método proporciona a obtenção dos ácidos diacetilênicos, que é a etapa mais crítica da síntese dos fosfolipídeos diacetilênicos, de uma maneira mais simples e apresentando bons rendimentos. Além disso, o composto 1,4 - bis(trimetilsilil)butadieno é disponível comercialmente. O polímero diacetilênico forma-se a partir da reação de adição do tipo 1-4 dos monômeros diacetilênicos e iniciado por irradiação UV apresenta inicialmente a coloração azul (HENNIES, 2001).

Os ácidos diacetilênicos e seus derivados fosfolipídicos possuem importantes aplicações na área biológica, mimetizando biomembranas, bem como na área médico-farmacêutica, formando filmes poliméricos para o revestimento de superfícies, melhoramento da biocompatibilidade de implantes ou circuitos extra-corpóreos, em lipossomas para a liberação controlada de fármacos e aplicações como biossensores

(CHARYCH & NAGY, 1996; CHARYCH & PAN, 1997; CABRAL, 2000). Estes ácidos formam estruturas agregadas semelhantes aos lipossomas, embora contenham somente uma cadeia carbônica na molécula. Se os grupos R dos monômeros diacetilênicos forem projetados para transmitir o caráter anfifílico à molécula, o monômero reativo pode ser altamente organizado em filmes ou vesículas, formando agregados moleculares (CHARYCH et al. 1998).

Um dos aspectos mais fascinantes da química dos poliacetilenos é o cromismo desses materiais. Esses diacetilenos quando polimerizados sofrem transição de cor em solução decorrente de mudanças no pH, temperatura ou quando submetidos à irradiação UV (TAMURA et al., 1991). Os efeitos de transição e mudanças de cor em filmes de Langmuir-Blodgett polimerizados do ácido 10,12 - pentacosadiinóico a diferentes temperaturas foram acompanhados em espectrofotômetro. A transição de cor é atribuída à mudança do comprimento do conjugado efetivo, resultado da desordem do esqueleto polimérico. Desse modo, quando as triplas ligações estão alinhadas, conjugadas em um mesmo plano, a estrutura absorve a luz na faixa de comprimento de onda do azul (620nm), passando para o vermelho (550nm), em decorrência das tensões, com conseqüente perda das conjugações. Abaixo da temperatura de fusão dos monômeros do ácido polidiacetilênico, a transição é reversível, enquanto que acima dessa temperatura a mudança do azul para o vermelho pode ser explicada pela oscilação vigorosa e o emaranhamento das cadeias laterais, descaracterizando a estrutura original e provocando mudanças irreversíveis no esqueleto conjugado.

Lipossomas polimerizados de ácidos diacetilênicos apresentam as mesmas propriedades de transição e mudança de cor que os ácidos diacetilênicos em monocamadas de Langmuir-Blodgett. Essas vesículas são sensíveis a mudanças de cor do azul ao vermelho, por perturbações impostas ao sistema, como alterações na temperatura ou mesmo ligação de uma molécula na superfície da vesícula.

Os estudos sobre as propriedades crônicas dos lipossomas de ácidos diacetilênicos mostraram que a transição de cor do azul ao vermelho está associada com a mudança conformacional do esqueleto do ácido de uma forma planar para uma não planar. A localização das insaturações na cadeia lateral parece desempenhar uma função crítica nessa mudança de estrutura (CHARYCH et al., 1998). As transições de cor das lipossomas

polimerizados podem ser monitoradas por espectroscopia de absorção visível. Observam-se picos característicos da fase azul nos comprimentos de onda 620-640nm e da fase vermelha em 490-540nm. CHARYCH et al., 1988, definiu o parâmetro Resposta Colorimétrica, CR, para quantificar a intensidade de mudanças de cor nos lipossomas polimerizados. A resposta colorimétrica representa a percentagem de mudança do azul em relação à sua percentagem inicial,  $Pb_o$ , definida como:

$$Pb_o = A_{azul} / [A_{azul} + A_{vermelho}] \times 100\% \quad (3.1)$$

Onde  $A$  é a absorbância em ambos os comprimentos de onda. A resposta colorimétrica que caracteriza a conversão percentual à fase vermelha a uma dada temperatura e tempo é expressa pela Equação 2.2:

$$CR = (Pb_o - Pb_f) / Pb_o \times 100\% \quad (3.2)$$

Onde  $Pb_f$  é a percentagem final de azul após a transição termocrômica.

Os lipossomas de ácidos diacetilênicos convertem totalmente a fase azul à vermelha na faixa de temperaturas entre 61-68 °C. A resposta colorimétrica é dependente do posicionamento da tripla ligação ao longo da cadeia acila. O efeito da posição do grupo diacetilênico pode ser compreendido melhor em termos de energia coesiva da cadeia alquil entre o grupo diino e a cabeça polar. A energia coesiva para o C-3 da cadeia alquil do ácido com o grupo diino na posição 5,7 foi de ~ 20 KJ/mol comparada a ~ 55 KJ/mol para o C-8 do ácido polidiacetilênico (PDA) com o grupo diino na posição 10,12. Esses dados sugerem que quanto mais distante a ligação tripla estiver da cabeça polar, mais rígida a ligação em torno do carbono que antecede o grupo diino, estando a estabilização do conjugado associada à fase azul (CHARYCH et al., 1998).

A natureza multivalente da superfície dos lipossomas oferece a possibilidade de associação de ligantes biológicos de modo semelhante às membranas celulares. Essa característica possibilita os estudos de aplicações desse sistema como biossensores (CHARYCH & NAGY, 1996).

As propriedades de reconhecimento molecular e transdução de sinal dessas estruturas representam um modelo atrativo para o desenvolvimento de biossensores (CHARYCH & NAGY, 1996). Lipossomas são provavelmente a estrutura mais rudimentar e que melhor mimetizam as membranas biológicas. Essas membranas sintéticas formam estruturas supramoleculares altamente organizadas que se assemelham às superfícies de células naturais na região interfacial. Associadas a um polímero conjugado cromofórico são capazes de transduzirem, através de propriedades óticas de absorção de luz, os eventos de reconhecimento molecular ocorrido na interface (CHARYCH & PAN, 1997).

CHARYCH e colaboradores (1993) produziram um agregado polimerizado em bicamada, composto de uma monocamada de octadeciltriclorosilano e uma monocamada de um filme de LB-PDA (Langmuir-Blodgett – ácidos polidiacetilênicos) funcionalizado com ácido siálico, para detectar eventos de reconhecimento molecular. Os autores escolheram o filme de LB-PDA para poder explorar as suas propriedades crômicas. Os monômeros lipídicos diacetilênicos foram polimerizados em monocamadas por irradiação com luz UV. Este filme foi projetado para sofrer mudança de cor, azul à vermelho, devido a interações receptor-ligante ocorrendo na superfície da bicamada. CHARYCH e colaboradores (1995) também realizaram um experimento semelhante, utilizando lipossomas PDA (ácidos polidiacetilênicos) funcionalizados com ácido siálico. Este sistema apresentou as vantagens de reconhecimento molecular e transdução do sinal molecular em uma única etapa. A bicamada resultante apresentou uma absorção máxima no espectro visível de 620 nm característico da cor azul. Quando este filme foi incubado com o vírus influenza A, a ligação da hemaglutinina viral ao resíduo de ácido siálico na superfície, resultou na mudança de cor do azul para vermelho (550 nm). Estes resultados demonstram que a transição de cor do PDA surge da ligação de afinidade entre a hemaglutinina e o ácido siálico.

O grau da mudança de cor foi rapidamente quantificado por espectroscopia de absorção na região visível. A resposta colorimétrica foi diretamente proporcional à quantidade de vírus ligada.

CHARYCH (1995) na continuação de seus trabalhos, utilizando lipossomas-PDA de cor azul (resultante de 8 min de irradiação) e púrpura (resultante de 24 min. de irradiação), obteve respostas colorimétricas diferentes para uma mesma quantidade de hemaglutinina. A

incubação da solução de lipossomas azul com 60 unidades de hemaglutinina de vírus influenza produziu uma resposta colorimétrica de 47%, enquanto os lipossomas púrpura, com a mesma quantidade de hemaglutinina viral, produziu uma resposta de 87%. Especulou-se que o aumento da sensibilidade do sinal dos lipossomas púrpura deveu-se ao aumento do conteúdo do polímero. A fim de estudar os efeitos de adsorção não específica, os lipossomas foram preparados sem o ácido siálico na matriz lipídica. Estes lipossomas não apresentaram mudança de cor quando expostos ao vírus. A natureza específica da interação entre o vírus influenza e o ácido siálico foi confirmada por experimentos de inibição competitiva, mostrando que se adsorção não específica ocorre na superfície, parece não afetar a cor das soluções lipossômicas.

Outro trabalho semelhante foi realizado pelo mesmo grupo (1997), utilizando moléculas do gangliosídeo  $G_{m1}$  como receptores na superfície de lipossomas. As vesículas foram compostas de 95% de ácido 5-7-docosadiinóico e 5% de  $G_{m1}$ . A polimerização foi efetuada com lâmpada UV 254 nm por 60 minutos, conduzindo à formação de cadeia polimérica com duplas e triplas ligações conjugadas, e o desenvolvimento de cor azul escuro/púrpura.

No ensaio colorimétrico, incubou-se, com a toxina do cólera, os lipossomas contendo  $G_{m1}$ . Determinou-se o espectro de absorção da luz na região visível. A análise dos espectros obtidos foram feitas comparando a intensidade do pico a 620 nm (azul) com o pico a 490 nm (vermelho). A percentagem da fase azul a 620 nm foi então determinada pela relação percentual da sua intensidade da absorção a 620nm em relação à absorção total (620 + 490nm). A resposta colorimétrica foi calculada pela variação percentual da fração da fase azul após exposição à toxina (CHARYCH & PAN, 1997).

Os resultados mostraram comportamento sigmoidal, sugerindo cooperatividade na transição colorimétrica, ou seja, a ligação do toxina ao gangliosídeo torna favorável as ligações subsequentes. A variação da cor indicou que a ligação toxina-gangliosídeo produziu perturbações no esqueleto do polímero, devido à movimentação da cauda da molécula de gangliosídeo imersa no interior da matriz polimérica. A sensibilidade da resposta colorimétrica foi maior quando o posicionamento do grupo diacetilênico situou-se mais próximo à superfície dos lipossomas. A resposta na ausência de gangliosídeo foi de somente 6%, contra 43% com a presença de 233 (g/ml de toxina, podendo considerar

positivos os testes com CR maior que 7%. A substituição da toxina do coléra por outras proteínas, tais como a BSA (albumina de soro bovino), avidina e aglutinina de germe de trigo, produziu resposta negativa em todos os casos.

Seguindo a linha de reconhecimento molecular de biomoléculas em vesículas polimerizadas, MA et al. (1998) utilizaram uma matriz PDA incorporada com um glicolípido, DGG (dioctadecil gliceril éster(-glicosídeo), para reconhecimento de *Escherichia coli* em solução de NaCl. Para isto foram usados dois tipos de diacetilenos: ácido 2,4-tricosadiinóico (TCDA) e ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA). Houve mudança de cor (azul/vermelho) nas vesículas de TCDA/DGG quando expostas à solução de NaCl com *E. coli*. O mesmo não aconteceu com as vesículas de PCDA/DGG, comprovando que a posição do grupo diacetilênico no lipídio desempenha uma função dominante na resposta colorimétrica.

CABRAL (2000), estudou o reconhecimento molecular e desenvolvimento de sinal colorimétrico em lipossomas polimerizados compostos do ácido 10,12 tricosadiinóico, contendo cardiolipina na sua estrutura, como ligante de afinidade, para a detecção de anticorpos anti-fosfolípidos. Os lipossomas foram preparados por sonicação, com 20% de cardiolipina, produzindo vesículas unilamelares monodispersas, com diâmetro médio  $230 \pm 30$  nm. A preparação dessas estruturas foi reprodutível, e as vesículas foram estáveis durante 5 meses. Os resultados da adsorção de anticorpos foram expressos em termos de Imunoglobulina G total. O sinal colorimétrico foi caracterizado pela mudança de coloração das soluções do “azul” e “púrpura” para rosa. O sistema apresentou boa sensibilidade e especificidade, nos testes com soro de referência anti-cardiolipina (usado na calibração de kits diagnóstico dos ensaios ELISA) para esses auto-anticorpos e imunoglobulinas G não específicas. A diferença entre as respostas colorimétricas com soro sadio e soro de referência foi de 60%. Os ensaios com soro de referência demonstraram a potencialidade de detecção do sistema, e a sua aplicabilidade em diagnóstico clínico-laboratorial com o diferencial vantajoso do reconhecimento molecular e transdução de sinal em uma única etapa de análise. No entanto, o trabalho de CABRAL restringiu-se ao soro de referência, o qual é um soro proveniente de indivíduos com doenças auto-imunes, porém submetido à um tratamento prévio de purificação.

Na Figura 3.4 tem-se a configuração de uma vesícula polimerizada composta de ácido diacetilênico e cardiolipina como ligante de afinidade para detecção de auto-anticorpos.

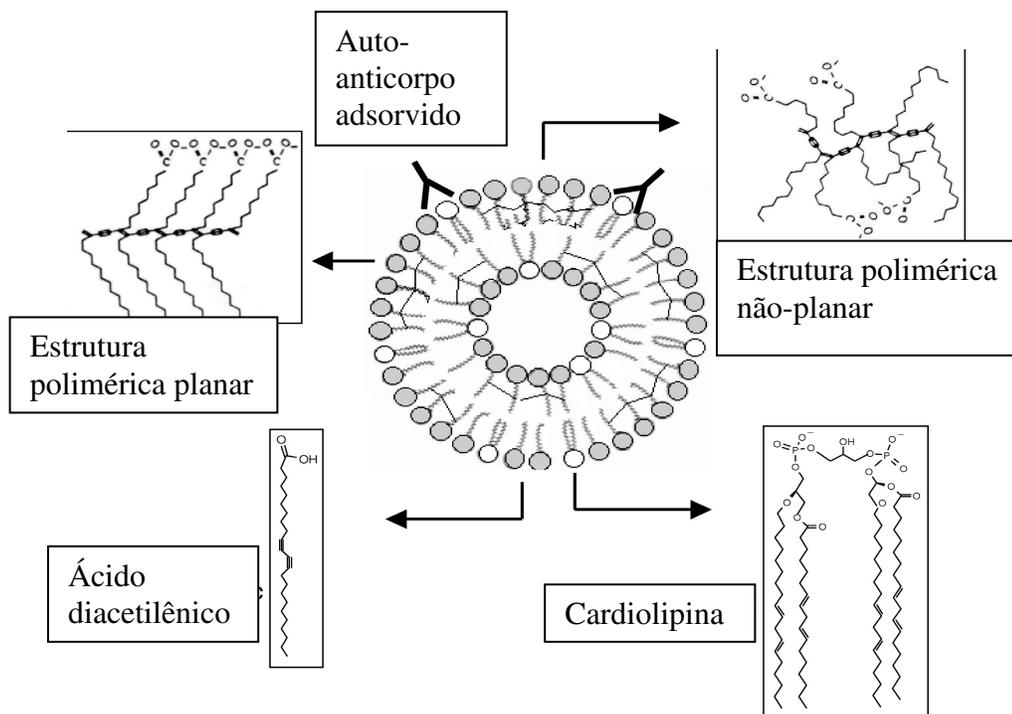


Figura 3.4 – Configuração de uma vesícula polimerizada composta de ácido 10,12-tricosadiinoico e cardiolipina como ligante de afinidade para detecção de auto-anticorpos (adaptado de CABRAL et al., 2003).

### 3.6 ANÁLISE ESPECTRAL DA INTERAÇÃO ENTRE LIGANTE E RECEPTOR

A associação entre ligante e receptor para formar um complexo é freqüentemente acompanhada por perturbações nas características espectrais de espalhamento de luz de um dos compostos, que geram o sinal proveniente da formação do complexo ligante-receptor. Nos estudos de interação não covalente, quando o receptor é uma partícula recebe o nome de receptor.

O estudo da mistura entre o receptor A (cardiolipina) e o ligante S (anticorpo) possibilita definirmos operacionalmente uma função de ligação,  $r$ , como a relação molar da quantidade de ligante total ligada ao receptor. Tendo em vista o fato do receptor e ligante estarem contidos no mesmo volume, temos:

$$r = (C_S^* - C_S)/C_A^* \quad (3.3)$$

onde  $C_S$  é a concentração de ligante livre em solução,  $C_S^*$  e  $C_A^*$  são respectivamente as concentrações totais de ligante e receptor presentes na solução. Uma vez que esta função corresponde à média do número de moléculas associadas com cada molécula do receptor, segue-se que o seu valor se encontra dentro do intervalo  $0 \leq r \leq p$  para um receptor que contenha  $p$  sítios de interação com o ligante. Em algumas investigações, resultados têm sido relatados em termos da fração de saturação dos sítios de ligação do receptor,  $fa$ , definida como  $r/p$ , com valores limitados entre zero e um. Para o uso de  $fa$  ao invés de  $r$ , faz-se necessário o prévio conhecimento de  $p$  ou de alguns parâmetros diretamente relacionados com  $p$ .

Desde que as concentrações totais de receptor e ligante ( $C_A^*$  e  $C_S^*$ ) sejam conhecidas ou possam ser determinadas, a avaliação de  $r$  claramente exige a mensuração de  $C_S$ , concentração de ligante livre, ou  $C_S^* - C_S$ , concentração de ligante vinculado ao receptor. A quantificação do ligante complexado ao receptor ou o conhecimento de propriedades relacionadas a ele, podem ser feitas através de técnicas espectrais ou através da utilização da tecnologia de biossensores. Para a concentração de ligante livre,  $C_S$ , mais freqüentemente, contudo, são empregadas outras técnicas. De forma geral, os procedimentos para avaliação da concentração de ligante livre numa mistura entre receptor-ligante, implica na criação de uma solução contendo apenas a fase ligante, presente numa concentração que possa ser relacionada com o seu equilíbrio na mistura. Para este propósito, podem ser utilizadas técnicas experimentais como a diálise, ultrafiltração e diafiltração, equilíbrio de partição e cromatografia em gel.

Na determinação da função de ligação ( $r$ ) através da medição do  $C_S$  ou ( $C_S^* - C_S$ ), é extremamente importante que o método utilizado não perturbe o equilíbrio. Extremo cuidado deve, portanto, ser exercido no uso de procedimentos baseados em

radioimunoensaios para as medições de  $C_s$  após precipitação de todo o complexo antígeno-anticorpo pela adição de sulfato de amônio. Apenas nos casos em que as taxas de formação e dissociação do complexo são muito lentas é que a concentração de ligante livre no sobrenadante corresponde ao do equilíbrio na mistura antes da adição de sulfato de amônio. Para sistemas com uma rápida associação/dissociação, a concentração de ligante livre medido poderia se referir ao novo equilíbrio atingido pela mudança drástica da força iônica do meio.

Do mesmo modo, a validade para os ensaios com filtros de nitrocelulose comumente utilizados para o estudo da interação entre proteínas e ácidos nucléicos, bem como muitos sistemas ELISA e radioimunoensaios em fase sólida, devem ser submetidos a exames rigorosos. Para todos estes ensaios, são medidas as concentrações de ligante complexado associado à fase sólida depois da remoção do ligante não complexado por lavagem do filtro ou placa com tampão apropriado. Para uma boa confiabilidade sobre os resultados obtidos por esses processos, é necessário demonstrar a independência de  $r$  em relação ao volume de tampão utilizado para remover o ligante livre. O fato da utilização de tampão gelado ser geralmente recomendado para a lavagem do ligante não complexado com vistas a garantir uma diminuição da dissociação do complexo, é um procedimento questionável. Se for verdade que a taxa de dissociação do complexo pode ser reduzida pela diminuição da temperatura, um procedimento deste tipo também introduz a possibilidade de que a posição de equilíbrio pode ser perturbada, em conformidade com as relações de Gibbs-Helmholtz.

A partir da discussão geral acima, se deve evidentemente corrigir protocolo experimental. Pode-se dar origem a uma estimativa de  $r$  por uma mistura com valores definidos de  $C_s$  e  $Ca^*$ . Uma série de tais experimentos com o mesmo  $Ca^*$  porém com vários níveis de  $C_s^*$ , permite a construção de uma curva de ligação, já que  $r$  é dependente de  $C_s$ .

Tendo considerado métodos de avaliação da função de ligação através da medição da concentração ligante livre,  $C_s$ , em misturas contendo receptores ( $Ca^*$ ) e ligantes ( $C_s^*$ ), pode-se agora se avaliar métodos espectrais para a medição do  $C_s^* - C_s$ , diferença entre a concentração de ligante total e livre em tais misturas.

A associação de um ligante com um receptor para formar um complexo é muitas vezes acompanhada pela perturbação das características espectrais de um dos reagentes. Como exemplo, pode-se citar a perturbação de espectro do citocromo P-450, por ligantes como o hexobarbital (Estabrook et al., 1972). A mudança espectral não só nos diz algo sobre os grupos nas moléculas que podem ser afetados pelo fenômeno de associação, mas também fornece informações para a quantificação do próprio equilíbrio de ligação. Em alguns casos, a sensibilidade das técnicas espectroscópicas devem ser grandes para o acompanhamento do experimento, em particular nos casos em que há quantidades limitadas de ligante ou receptor. Titulações espectroscópicas geralmente envolvem a medição de um parâmetro espectral, em função da  $Cs^*$ . Pelo fato do parâmetro espectral estar relacionado com a concentração do complexo, a quantidade de ligante livre é o resultado da diferença entre  $Cs$  e  $Cs^* - Cs$ , a concentração de ligante envolvidos na formação do complexo com receptor.

Técnicas espectroscópicas demandam pureza espectroscópica. Isto é, o sinal deve resultar de uma única espécie. A presença de impurezas que contribuam para o sinal espectroscópico deve, portanto, ser evitada. Pequenos níveis de sinal de fundo, como do solvente, podem ser toleradas, desde que sejam feitas correções apropriadas com um branco. Esses sinais são inertes, e não interferem na reação em estudo. As dificuldades surgem quando a impureza contribui para o sinal espectroscópico ou interfere no processo de ligação através do acoplamento ao ligante ou por concorrência com o ligante em relação aos sítios de ligação do receptor. Devido às investigações quantitativas obrigatórias da afinidade de ligação e estequiometria de interação, são necessárias a preparação de reagentes com alta pureza. É necessário dispor de uma estimativa precisa do total concentração de ligante, uma vez que a concentração de ligante livre é inferida como a diferença entre  $Cs$  e  $Cs^* - Cs$ . Do mesmo modo, um valor exato da concentração total de receptor,  $Ca^*$ , é necessária para a avaliação da função de ligação.

Como é bem conhecido, a aplicação de técnicas espectroscópicas demandam pureza dos componentes em solução, para que se tenha informações quantitativas exatas sobre o sistema. No entanto, em se tratando da análise de fenômenos biológicos que ocorrem *in vivo*, é inevitável a consideração da complexidade do sistema, de modo que o sacrifício do rigor experimental, em favor da utilização de sistemas reais, torna-se plenamente

justificável. Nesse contexto, a análise espectral fornece informações sobre as moléculas ou grupos envolvidos, e permite com aproximações adequadas a determinação da estequiometria da ligação e a sua constante de equilíbrio.

Os resultados de uma típica titulação de ligação, em que o sinal espectroscópico decorre do receptor podem ser visualizados na Figura 3.5. Desde que cada sítio ocupado do receptor provoque uma equivalente mudança no sinal espectroscópico, a fração de ligação de sítios ocupados,  $f_a$ , será dada pela mudança fracionária no parâmetro espectral ( $y$ ). Assim,

$$f_a = (Y - Y_f)/(Y_b - Y_f) \quad (3.4)$$

onde  $Y_b$  e  $Y_f$  são os sinais do receptor quando os sítios estão totalmente ocupados e desocupados, respectivamente. Nesta fase, a concentração de ligante complexado não pode ser determinada, a menos que o número de sítios ocupados (estequiometria da reação) seja conhecido. Este pode ser encontrado a partir de uma outra experiência.

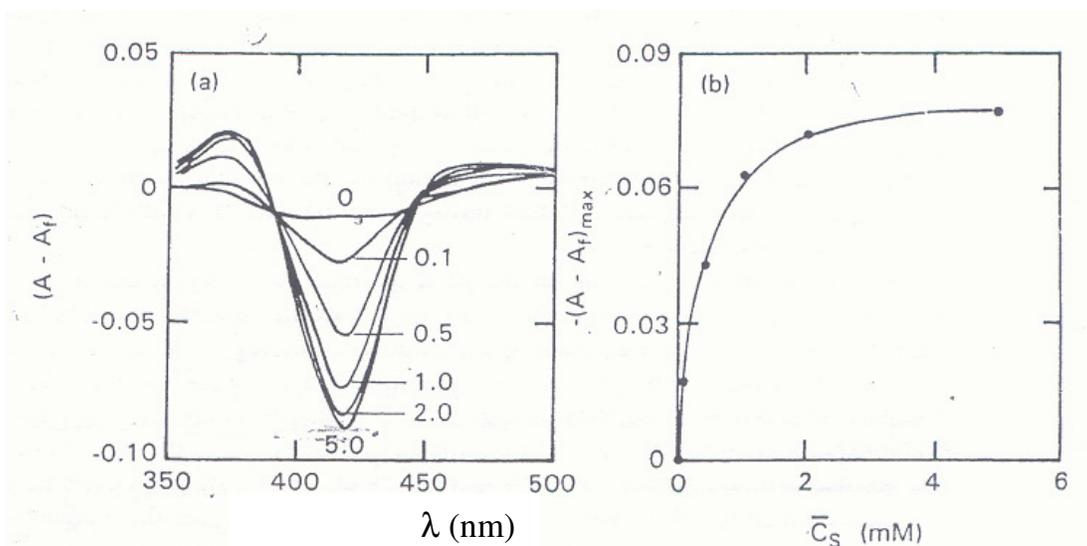


Figura 3.5 - Interação de hexobarbital com citocromo P-450 como um exemplo de uma ligação em que o sinal espectroscópico decorre da receptor. (a) Diferentes curvas mostrando a perturbação do espectro do citocromo P-450 na região 400-450 nm. (b) A parcela da máxima perturbação, em função da concentração de hexobarbital,  $C_s^*$ . (Winzor e Sawyer, 1995)

Para determinação da estequiometria de reação, deve realizar uma titulação que é realizada sob condições em que a concentração do receptor é muito mais elevada do que a constante de dissociação (recíproco da constante de associação), da reação de ligação. Os dados da titulação podem ser transformados em um gráfico de  $f_a$  contra razão de ligante total adicionado ao receptor total, como na figura 3.6. A estequiometria da reação é então inferida por extrapolação linear dos dois segmentos do gráfico ao seu ponto de interseção, que representa o ponto final da titulação. Na curva da Figura 3.6, pode observar o ponto em que esta extrapolação é feita, imediatamente quando a concentração de receptor ultrapassa largamente a constante de dissociação para a interação. Contudo, a partir da curva b da Figura 3.6, esta condição é claramente o limite inferior para a extrapolação de dois segmentos lineares para a obtenção da estequiometria. Alta afinidade de ligação é, portanto, uma vantagem do ponto de vista da concentração do receptor necessária para atingir a estequiometria de ligação. Somente depois que a estequiometria tenha sido determinada, é possível avaliar a constante de ligação de uma titulação em condições onde existam diferentes proporções de ligante complexado e livre.

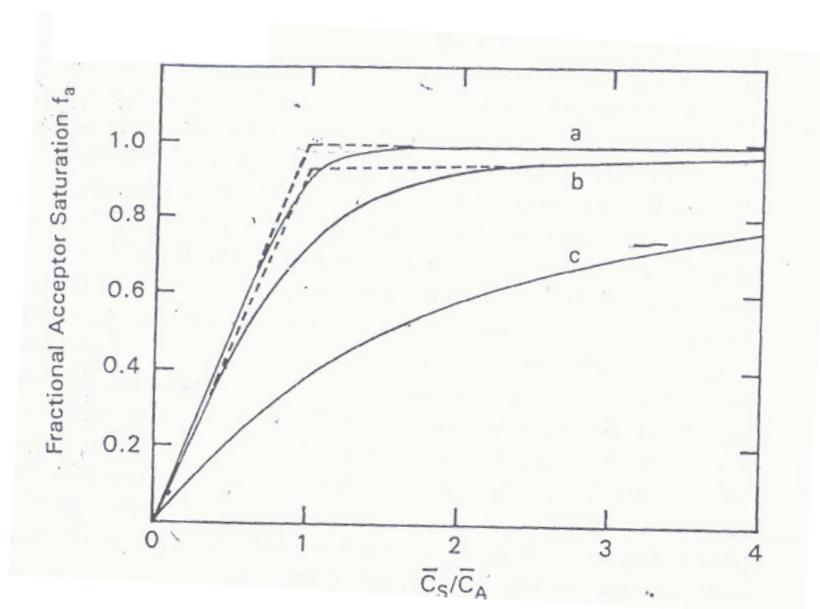


Figura 3.6 - Avaliação da estequiometria da ligação entre receptor-ligante por titulação. Curvas foram construídas com base em um único sítio do receptor com uma constante de ligação ( $K_{AS}$ ) de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  e valores de  $10^4$  (a)  $10^5$ , e (c)  $10^6$  para a concentração total de receptor ( $C_{A^*}$ ). (Winzor e Sawyer, 1995)

### 3.7 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS

Os vários métodos de separação de bioprodutos baseiam-se nas diferenças das propriedades físicas, químicas e funcionais dos anticorpos tais como carga, tamanho, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, forma e função.

Dentre outros métodos de purificação de IgG do soro humano, temos os que são baseados na adsorção seletiva. Neste caso, a cromatografia de afinidade é um método de adsorção seletiva bastante utilizado para purificação de anticorpos se apresentando como um método bastante seletivo. A purificação de anticorpos por cromatografias de afinidade segue basicamente duas estratégias, a primeira explora a capacidade de reconhecimento e ligação com antígenos, que são características relativas à região Fab do anticorpo. A segunda explora as partes constantes e a região Fc do anticorpo, que apresentam capacidade de interação com várias proteínas, aminoácidos e outras moléculas específicas, que são imobilizados na matriz cromatográfica para a interação com a proteína (HUSE et al., 2002). Existem dois tipos de ligantes de afinidade empregados nos processos de adsorção seletiva: os ligantes bioespecíficos e os pseudobioespecíficos (BURNOUF et al., 1998), dependendo do tipo de ligante e a força da interação entre o ligante e a biomolécula. Tanto os sistemas pseudobioespecíficos como os bioespecíficos são regidos por: complementaridade da carga, hidrofobicidade e forma entre ligante e biomolécula, se diferenciado pela magnitude das forças envolvidas. Na Figura 3.7 temos uma classificação, segundo VIJAYALAKSHMI (1989), das várias técnicas de cromatografia de afinidade com base no tipo de ligante usado.

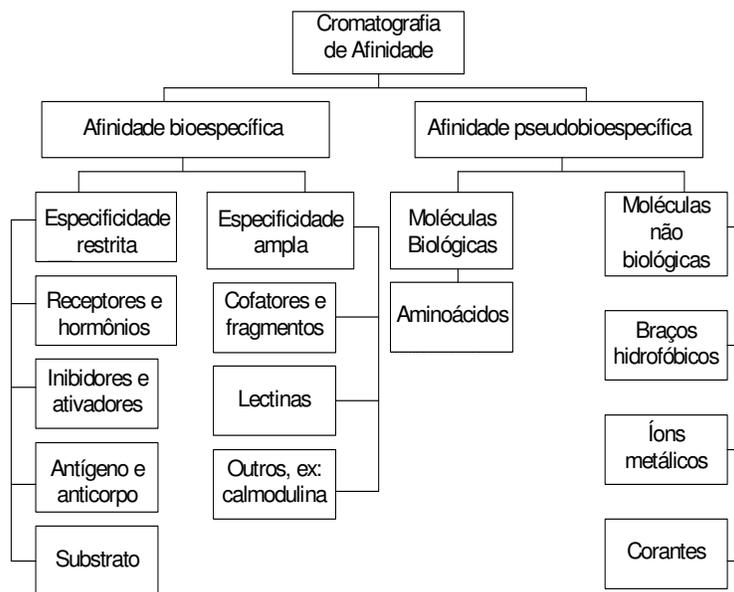


Figura 3.7 – Esquema dos ligantes utilizados em cromatografia de afinidade (adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).

Os ligantes bioespecíficos são compostos biológicos, que possuem alta afinidade e especificidade por proteínas, além de custo elevado. Estão sujeitos a sofrer desnaturação e contaminação bacteriana. Por isso são inviáveis em algumas aplicações como em algumas produções comerciais em larga escala.

Cromatografias de imunoafinidade, que utilizam antígenos ou anticorpos imobilizados na matriz, são muito específicas e apresentam ótimos valores de recuperação e purificação, mas a sua grande limitação é a necessidade de se obter ligantes purificados em quantidades relativamente altas, para serem acoplados a matriz. Como alternativa à cromatografia de imunoafinidade, tem-se utilizado a cromatografia de afinidade com proteínas A, G ou L imobilizadas para a purificação de anticorpos de várias fontes (LEIBL et al., 1993; LÜTKEMEYER et al., 1999; FAHRNER e BLANK, 1999). No caso da proteína G (isolada das linhagens do grupo G *Streptococcal*, MM igual a 22,6 kDa) esta é mais indicada como ligante para purificação de anticorpos de origem humana por apresentar afinidade por todas as subclasses de IgG, ligando-se também à parte Fc da imunoglobulina. AYBAY e IMIR (2000) utilizaram proteína G imobilizada para purificar anticorpos monoclonais murinos do tipos IgG<sub>1</sub> a partir de sobrenadante de cultura celular,

uma vez que IgG<sub>1</sub> murina se liga mais fortemente à proteína G do que à proteína A, obtendo pureza maior que 95 %. As classes IgM, IgA e IgD adsorvem fracamente em proteína G, indicando uma seletiva reatividade com IgG em contraste com a proteína A (BJÖRCK & KRONVALL, 1984; AKERSTRÖM et al., 1985; BOYLE & REIS, 1987).

BAROCCI & NOCERA (1993), compararam os suportes Sepharose-proteína A e Sepharose-proteína G na remoção *in vitro* de auto-anticorpos do tipo IgG de amostras séricas de pacientes com insuficiência renal e a Sepharose-proteína G mostrou-se mais eficiente.

Os ligantes pseudobioespecíficos são espécies que, apesar de serem menos específicos nas interações com as moléculas que em relação aos ligantes bioespecíficos, apresentam seletividade notável, suficiente, em muitos casos, para atingir o grau de purificação esperado. Apresentam menor custo fixo, maior estabilidade química e microbiológica que em relação aos ligantes bioespecíficos propiciando menor custo operacional devido a menor necessidade de controle das condições do processo. Além disso, apresentam alto potencial de recuperação (VIJAYALAKSHMI, 1989).

A cromatografia de pseudobioafinidade com peptídeos e aminoácidos imobilizados também é uma alternativa utilizada na purificação de anticorpos monoclonais. Histidina e histamina foram utilizados como ligantes por EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1991), sendo obtido recuperação de 90 % e fator de purificação de 56, do total de anticorpos injetados na coluna.

Apesar da cromatografia de pseudobioafinidade ser uma excelente alternativa, em alguns casos, cromatografias com estes ligantes pseudobioespecíficos proporcionam interações mais fracas com as biomoléculas ou anticorpos de interesse que em relação as cromatografias com ligantes bioespecíficos.

Como os ligantes bioespecíficos são aqueles que interagem com a proteína através dos seu sítios de ligação, da mesma forma como ocorre na natureza, como por exemplo: interação antígeno-anticorpo, receptor-hormônio, etc, este tipo de interação é mais forte e específica, o que garante alta seletividade e conseqüentemente, alto grau de pureza (VIJAYALAKSHMI, 1989).

## CAPÍTULO 4

### MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais, equipamentos e a metodologia utilizada nos experimentos.

#### 4.1 MATERIAIS

A cardiolipina (Sigma, EUA) foi usada como acceptor nos estudos espectrais. O ácido 10,12 tricosadiinóico, utilizado na preparação dos lipossomas foi sintetizado no Instituto de Química da UNICAMP, utilizando metodologia descrita por Bittman com protocolos aperfeiçoados por Hennies (2001). Os “pools” de soros foram provenientes da soroteca do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Os demais reagentes usados na preparação dos lipossomas e nas análises realizadas, foram todos de grau analítico e a sua procedência encontra-se especificada na descrição da metodologia.

Para a purificação dos soros foram usadas soluções tamponantes preparadas com: ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) da Sigma (EUA), fosfato de sódio monobásico e dibásico, cloreto de sódio da Labsynth (Brasil), hidroximetil aminometano (TRIS) da Merck (Alemanha). Nos experimentos de adsorção da IgG utilizou-se o gel de afinidade Sepharose-proteína G da Amersham Biosciences (Suécia). Segundo o fabricante, a proteína G recombinante foi produzida em *Escherichia coli*, possui massa molecular de 17000 Dalton e apresenta dois sítios de ligação. O sítio de ligação da proteína G nativa com a albumina foi geneticamente retirado evitando-se assim ligações indesejáveis com a albumina. Ainda de acordo com o fabricante, a proteína G foi imobilizada em Sepharose ativada com brometo de cianogênio (CNBr).

## 4.2 MÉTODOS

### *Preparação e Caracterização dos Soros*

#### 4.2.1 Preparação de amostras de soro humano

Alíquotas de sangue humano sadio foram coletadas em tubos sem anticoagulante e mantidas a temperatura ambiente em tubos de vidro por 3 horas, para aglutinação. Passado este tempo, os tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 5500 g a temperatura de 15° C. Após este procedimento, o sobrenadante (soro) foi recolhido e dividido em volumes iguais de 500 µL em eppendorfs com capacidade de 1,5 mL, da LabCenter (Brasil) e congelados.

#### 4.2.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras foi feita medindo-se a absorvância a 595 nm em espectrofotômetro (Beckman, DU 60, EUA) utilizando-se o método de BRADFORD (1976), com albumina do soro bovino da Sigma (EUA) como proteína de referência.

#### 4.2.3 Seleção de “Pools” de soros de indivíduos acometidos de doenças auto-imunes

“Pool” de soros é uma solução formada a partir da mistura de amostras séricas de diferentes indivíduos. A seleção de "pools" de soros auto-imunes foi realizada através de dosagem de autoanticorpos anti-cardiolipina utilizando o kit Varelista IgG anti-cardiolipina (Pharmacia Diagnostics, Alemanha). Os ensaios foram conduzidos em placas para microtitulação com 96 poços. Inicialmente, diluiu-se os soros 1:101 com tampão diluente (tampão PBS). Em seguida, as tiras da placa (com 8 poços cada uma) foram colocadas firmemente em suporte de tiras e estas foram lavadas com 300 µL/poço de tampão de lavagem (tampão PBS). Após a lavagem, dispensou-se 100 µL/poço de calibradores, controles e amostras diluídas dos "pools" de soros nos poços adequados e as tiras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, aspirou-se o fluido dos

poços e lavou-os três vezes com tampão de lavagem. Dispensou-se, em seguida, 100  $\mu\text{L}$ /poço de conjugado IgG anti-humano PRS (peroxidase de rábano silvestre) em todos os poços deixando incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Aspirou-se o líquido dos poços e lavou-os três vezes com tampão de lavagem. A revelação da reação foi possibilitada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de substrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) nos poços, incubando-os por 10 minutos em câmara escura. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$ /poço de solução de ácido sulfúrico 0,5 mol/L. A medida colorimétrica foi realizada a 450 nm, em leitor ELISA (SpectraMax, Modelo 190, EUA) usando como branco os poços contendo substrato TMB nos quais foi adicionado o calibrador 1 (solução com concentração de anticorpos anti-cardiolipina igual a zero). Para a confecção da curva de calibração foram utilizados 6 calibradores contidos no kit Varelista apresentando anticorpos anti-cardiolipina em várias concentrações. Com base nos dados obtidos neste experimento, escolheu-se 4 "pools" de amostras séricas. Um "pool" de alta concentração de anticorpos anti-cardiolipina (AIA), outro "pool" com média concentração de anticorpos anti-cardiolipina (AIM), um terceiro "pool" com baixa concentração de anticorpos anti-cardiolipina (AIB1) e um quarto "pool" também com baixa concentração de anticorpos anti-cardiolipina (AIB2).

Na Figura 4.1 tem-se a representação esquemática dos princípios deste ensaio. Os poços de uma microplaca estão revestidos com antígeno bovino da cardiolipina. Os anticorpos IgG específicos para a cardiolipina presentes no soro humano ligam-se ao antígeno. Numa segunda etapa, o segundo anticorpo marcado enzimaticamente (conjugado), liga-se ao complexo antígeno-anticorpo, o que leva a formação de um complexo antígeno-anticorpo-conjugado marcado enzimaticamente. O complexo antígeno-anticorpo marcado pela enzima converte o substrato adicionado, formando-se uma solução colorida. A razão de formação de cor a partir do cromogénio é função do complexo do conjugado com o anticorpo ligado, logo é proporcional à concentração inicial dos anticorpos respectivos presentes no soro humano.

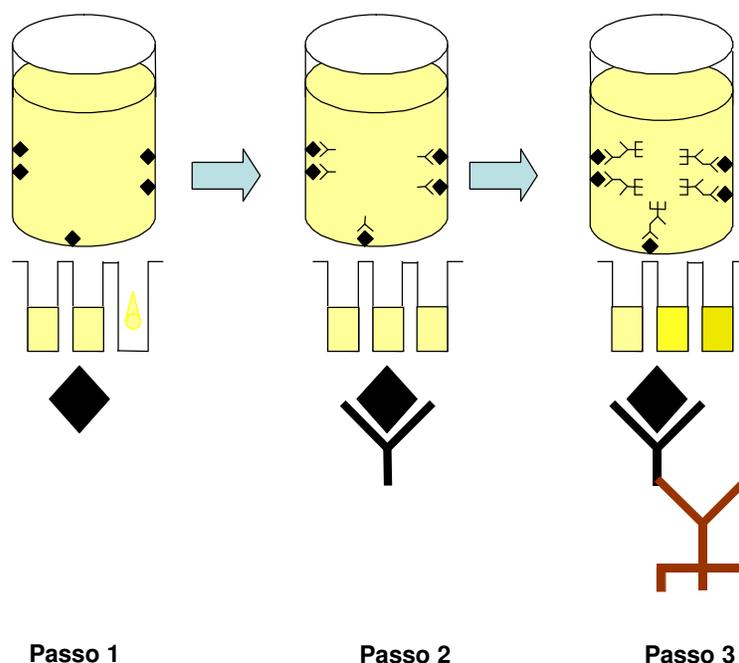


Figura 4.1 – Ilustração referente aos princípios do ensaio utilizando Kit Varelista IgG anti-cardiolipina (adaptado do manual de KIT VARELISA, PHARMACIA DIGNOSTICS, 2003).

#### 4.2.4 Purificação dos soros

##### 4.2.4.1 Ensaio Cromatográfico

Para verificação do desempenho do gel de sepharose-proteína G adquirido da Amersham Biosciences (Suécia), foi feito ensaio cromatográfico à temperatura de  $\pm 24^{\circ} \text{C}$  em um sistema de cromatografia de baixa pressão Protech Biochromatography System (Gilson, França). A bomba peristáltica deste aparelho está acoplado na entrada da coluna cromatográfica, que por sua vez tem a sua saída ligada a um detetor que mede a absorvância a 280 nm e gera, em registrador, um cromatograma referente aos dados obtidos. As frações são recolhidas em tubos de ensaio que estão inseridos em um coletor de frações. Todos as cromatografias foram realizadas com vazão de 0,5 mL/min. Na Figura 4.2 apresenta-se um esquema da montagem experimental deste sistema cromatográfico.

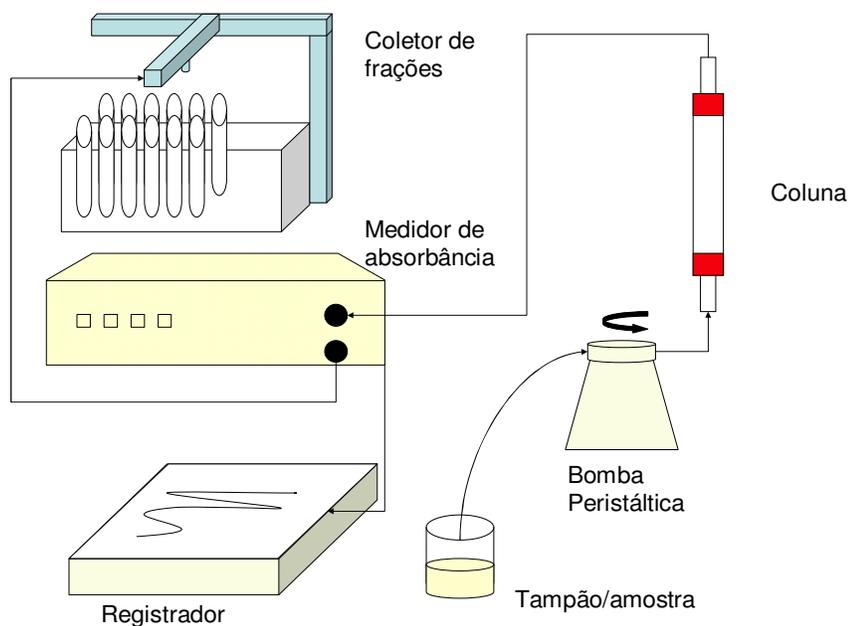


Figura 4.2 – Montagem experimental do ensaio cromatográfico

O experimento foi realizado em coluna cromatográfica da Amersham Biosciences (Suécia) de 100 mm de comprimento, 15 mm de diâmetro externo e 10 mm de diâmetro interno. A coluna foi preenchida com 2 mL de gel Sepharose-porteína G e equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 durante meia hora. Em seguida, a coluna foi alimentada com 0,6 mL de soro humano sadio diluído na proporção de 1:2 (0,6 mL de soro diluído com 1,2 mL de tampão de equilíbrio) e frações de 6 mL foram sendo coletadas nos tubos de ensaio. Posteriormente, fez-se a eluição da IgG adsorvida com a solução de ácido cítrico 100 mM pH 2,6. Foram coletadas frações de eluição de 3 mL em tubos contendo 1,6 mL de tampão Tris-HCl 1 M e pH 8,5. Este tampão tem a função de neutralizar o pH do meio evitando a desnaturação da IgG. O suporte cromatográfico foi regenerado com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e lavado com azida sódica 15mM. Terminado o experimento, fez-se o balanço de massa e armazenaram-se as frações coletadas em geladeira, para posterior dosagem de imunoglobulinas por nefelometria e análise por eletroforese SDS-PAGE.

#### 4.2.4.2 Purificação da IgG: Ensaios em tubos do tipo eppendorf

Os soros de indivíduos sadios e os "pools" de soros contendo anticorpos anti-cardiolipina foram purificados em gel de agarose com proteína G imobilizada (Proteína G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences, Suécia).

Antes de se dar início ao procedimento de purificação, o gel Sepharose-proteína G foi equilibrado com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, misturando-se, em um tubo de vidro, gel e tampão em iguais volumes, fornecendo solução de gel diluído na proporção de 1:1.

Com o tubo de vidro em movimento, pipetou-se 200  $\mu$ L de solução de gel e este volume foi transferido para tubos do tipo Eppendorf de 2 mL. Em seguida, adicionou-se ao gel 600  $\mu$ L de soro diluído em tampão fosfato na proporção 1:2, e os tubos foram agitados para cima e para baixo lentamente por 10 vezes. Feito isto, adicionaram-se aos tubos 1 mL do tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 (tampão de lavagem), agitando-os por mais 10 vezes. Em seguida, o material foi centrifugado por 5 minutos (5.500 g) a 24°C, utilizando a centrífuga Centrifuge 5804 R, Eppendorf (EUA). Os sobrenadantes foram coletados e analisados através de medidas das absorvâncias a 280 nm. O procedimento de adição do tampão de lavagem (1,5 mL) ao gel repetiu-se até que a absorvância dos sobrenadantes fossem próximas de zero (0,01 nm). Finalizada a etapa de lavagem, a eluição dos anticorpos adsorvidos no gel foi efetuada adicionando-se 0,5 mL de solução de ácido cítrico 100 mM pH 2,6. Os tubos Eppendorfs foram agitados por 10 vezes e centrifugados nas mesmas condições citadas anteriormente. Os sobrenadantes foram coletados em tubos Eppendorfs contendo previamente 265  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 1 M pH 8,5 para neutralização do pH do meio. A dosagem de imunoglobulinas da fração eluída foi feita por nefelometria. Ao término do experimento, o gel de afinidade foi re-equilibrado com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e armazenado em solução contendo azida sódica na concentração de 15 mM. Todos os ensaios de purificação foram realizados em quadruplicata.

Foram realizados também mais dois ensaios com procedimento idêntico ao acima descrito, alterando-se apenas a quantidade de gel adicionada aos tubos Eppendorfs (400  $\mu$ L

e 1.200 µL, respectivamente), com o objetivo de obter soluções mais concentradas em anticorpos na fração eluída.

#### 4.2.4.3 Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polycrylamide Gel Electrophoresis)

Para as eletroforeses foram utilizados acrilamida da Sigma (EUA), glicina da Merck (Alemanha), dodecil sulfato de sódio (SDS) da Bio-Rad (EUA), nitrato de prata da Gennabras (Brasil), marcadores de baixa massa molecular da Amersham Biosciences (Suécia).

As análises de eletroforese SDS em gel de poliacrilamida a 7,5 % foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Laemmli (1970). Foi feita eletroforese em condição não redutora. As amostras foram acrescidas de tampão com SDS, mas sem β-mercaptoetanol, e aquecidas a 100° C por 7 minutos. A separação das proteínas foi conduzida utilizando cuba vertical Power-pac 300 da Bio-Rad (EUA) com voltagem constante de 180 V. O procedimento de coloração foi realizado com nitrato de prata, segundo o protocolo descrito por Morrysey (1981).

#### 4.2.4.4 Dosagem de IgA, IgG e IgM e anticorpos anti-cardiolipina (IgG) nos soros

As medidas das concentrações de IgA, IgG e IgM dos soros purificados e não purificados foram feitas por nefelometria, no aparelho Array Protein System, Beckman (EUA) seguindo o manual de instruções do equipamento. O princípio do método (nefelometria) baseia-se no espalhamento da luz obtida por partículas (complexos) em suspensão na solução, medida quando esta é submetida a um raio luminoso incidente. Essas partículas são formadas por reações de imunoprecipitação decorrentes do contato entre o anticorpo específico e o antígeno. A variação da intensidade do espalhamento de luz é medida pelo nefelômetro e convertida em unidades de concentração (mg/dL).

As medidas de IgG específica a cardiolipina dos soros purificados e não purificados foram feitas em kit Varelista da Pharmacia Diagnostics (Alemanha).

## *Preparação e Caracterização dos Lipossomas*

### 4.2.5 Preparação

Para preparação dos lipossomas foi utilizado ácido 10,12 tricosadiinóico, sintetizado no Instituto de Química da UNICAMP, com protocolos aperfeiçoados por HENNIES et al., (2001).

Os lipossomas compostos pelo ácido 10,12 tricosadiinóico e cardiolipina foram preparados pelo método de BANGHAM (NEW, 1990), através da hidratação do filme seco de lipídios com posterior sonicação, utilizando modificações no protocolo introduzidas por CABRAL (2000). As concentrações de cardiolipina foram 20% e 30% em relação à concentração total de ácido diacetilênico 1 mM.

Para preparação dos lipossomas com 20 % de cardiolipina, inicialmente adicionou-se 500 µL do ácido 10,12 tricosadiinóico previamente sintetizado e solubilizado em clorofórmio, a 2500 µL de cardiolipina (CL) (Sigma, EUA) e completou-se o volume até 10 mL com clorofórmio, grau analítico (Merck, Alemanha). Para preparação dos lipossomas 30 % fez-se o mesmo procedimento acima descrito alterando-se as quantidades de ácido que passou a ser de 424 µL e 3750 µL de cardiolipina.

O filme seco foi formado no fundo do balão de vidro após a evaporação à vácuo do solvente em evaporador rotatório (Art Lab, Brasil) por 40 minutos inicialmente à temperatura ambiente (10 minutos) e após à temperatura de 55°C. Para a hidratação do filme seco adicionou-se 10mL de água deionizada, grau Milli-Q (Millipore, EUA), deixando-se o balão girando durante 30 minutos à 80°C (temperatura acima da transição de fases dos componentes da mistura), permitindo assim a formação de vesículas multilamelares. Os lipossomas foram homogeneizados e tornaram-se unilamelares através de sonicação em sonicador modelo UC 50 (Sonics & Materials INC, EUA) à 80°C durante 25 minutos e de modo intermitente (30 segundos ligado e 30 segundos desligado).

### 4.2.6 Caracterização

#### 4.2.6.1 Determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanho

O raio hidrodinâmico e a distribuição de tamanho dos lipossomas foram determinados por espectroscopia de espalhamento quase elástico da luz – “quase- elastic light scattering” – em equipamento de detecção de espectro Malvern Autosizer (EUA), modelo 4700 com feixe de luz produzido por uma fonte de laser He-Ne com potência de 32mW. A análise dos dados foi feita através do software PCS 4700. As medidas foram realizadas a um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente.

Para cálculo do raio hidrodinâmico utilizou-se a Equação de Stokes-Einstein:

$$R_h = (kT) / (6D\mu) \quad (4.1)$$

Onde  $R_h$  é o raio hidrodinâmico médio,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $D$  é o coeficiente de difusão das partículas e  $\mu$  é a viscosidade do solvente.

#### 4.2.6.2 Quantificação da cardiolipina

A cardiolipina foi quantificada através do teor total de fosfato inorgânico nas amostras, segundo CHEN et al., 1956, pois a cardiolipina é o único fosfolípido existente na composição dos lipossomas. Este método consiste na oxidação com  $H_2SO_4$  dos compostos de carbono a carbono elementar, sendo este transformado posteriormente em  $CO_2$  pela ação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O fósforo é convertido em ortofosfato, que forma um complexo com molibdato de amônio, sendo em seguida reduzido pelo ácido ascórbico, fazendo surgir a cor azul. A intensidade da cor azul produzida é proporcional ao teor de cardiolipina presente na amostra, o qual é quantificada através da curva de calibração de absorbância x concentração de fósforo, previamente construída.

Utilizou-se 100 $\mu$ L de solução em cada tubo de ensaio (amostras, padrões fosfato e o branco), juntamente com 500 $\mu$ L de  $H_2SO_4$  10N. Os tubos foram aquecidos em placa térmica em capela a 200°C por 30 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 165 $\mu$ L de peróxido de hidrogênio, livre de fosfato a cada um dos tubos de

ensaio. Os tubos de ensaio foram aquecidos a 200°C por 30 minutos em capela e, em seguida, esfriados à temperatura ambiente.

Adicionou-se 4mL de água grau Milli-Q, 500µL de solução de molibdato de amônio e 500µL de solução de ácido ascórbico 0,8% e aqueceram-se os tubos em água fervente por 7 minutos, resfriando-se em seguida à temperatura ambiente. Mediu-se a intensidade da cor azul a 830 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-2000, EUA).

#### 4.2.7 Polimerização

A polimerização dos lipossomas foi feita através de radiação ultravioleta, utilizando lâmpada UV (Phillips, Brasil) cuja intensidade, medida no local de posicionamento da cubeta contendo a solução lipossomal (5 cm da fonte) foi de 3,55mW/cm<sup>2</sup>.

A suspensão de lipossoma foi diluída a 0,5 mmolar com água, grau Milli-Q e colocado em cubeta de quartzo de 3 mL. Em seguida, o lipossoma foi resfriado a 4 °C por 15 minutos em jaqueta térmica (Banho térmico Tecnal, Brasil) e este lipossoma dentro da cubeta de quartzo foi colocada a 5 cm da lâmpada UV para se iniciar a irradiação. Os lipossomas preparados com 20 % de cardiolipina, foram deixados à frente da lâmpada de UV em três diferentes tempos de 5, 10 e 20 minutos. Os lipossomas preparados com 30 % de cardiolipina foram polimerizados deixando-os à frente da lâmpada por 40 minutos. A polimerização foi acompanhada através dos espectros de absorção das amostras a diferentes tempos de exposição à irradiação UV. Os espectros na região do visível foram extraídos na região compreendida entre 400 a 700 nm.

Os ensaios de polimerização foram realizados para determinar os tempos de polimerização das suspensões para as faixas do azul ( $\lambda = 635\text{nm}$ ), púrpura ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) e rosa ( $\lambda = 480\text{nm}$ ).

### ***Estudos Espectrais da Interação entre IgG e Cardiolipina***

#### 4.2.8 Ensaio com cardiolipina livre

A interação entre IgG específica (anti-cardiolipina) e a cardiolipina resulta na formação de um complexo onde atuam ligações do tipo não covalente.

No estudo dessas interações define-se o par ligante e aceptor, no qual o ligante, designado por “S”, é o menor soluto e possui um único sítio de ligação e o aceptor, designado por “A” é o maior soluto, no caso do aceptor ser de natureza particulada.

Os ensaios espectrais com a cardiolipina livre foram baseados nas perturbações causadas nas características espectrais de absorção da luz de um composto d aceptor em solução (Winzor e Sawyer, 1995).

Os ensaios para a detecção da interação anticorpo (IgG anticardiolipina) e antígeno (cardiolipina) foram conduzidos em cubeta de quartzo de 3 mL usando espectrofotômetro para determinação da absorbância das soluções. As soluções de concentrações na faixa de 0,1 a 1,0 mM de cardiolipina foram preparadas em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, e sonicadas em banho a temperatura ambiente, para dispersão dos agregados lipídicos formados. O mesmo tampão fosfato foi utilizado como controle para leitura no espectrofotômetro. A formação do complexo cardiolipina-anticorpo, foi monitorada através da titulação do aceptor com o ligante, mediante a adição de volumes definidos dos soros à solução de cardiolipina livre em tampão fosfato, tendo na cubeta de referência uma solução de cardiolipina em tampão fosfato na concentração do ensaio. As leituras foram feitas inicialmente na faixa espectral de 200 nm e 900 nm, para identificação da faixa de comprimento de onda mais adequada para a detecção dos complexos (faixa de 410 a 470nm). Os resultados foram analisados em termos das mudanças espectrais da dispersão de cardiolipina, causadas pela adição dos soros e através do parâmetro espectral ,  $F_a$  , que caracteriza a fração de sítios ocupados, definido pela Equação 3.1, conforme abordagem desenvolvida por Winzor e Sawyer, 1995.

$$F_a = (A - A_f) / (A_b - A_f) \quad (4.2)$$

onde  $F_a$  é a fração dos sítios ocupados do aceptor,  $A$  é a absorbância das dispersões na presença de quantidade conhecida de IgG específica (determinada pelo volume de soro adicionado),  $A_b$  é a absorbância quando todos os sítios do aceptor estão ocupados (valor aprox. constante obtido no final da titulação) e  $A_f$  é a absorbância da dispersão de cardiolipina antes da adição dos soros, representativa do sinal espectral correspondente aos sítios do aceptor completamente livres. Nessa análise, a cardiolipina foi considerada como

aceptor, e os anticorpos, analisados em termos de IgG específica (anticardiolipina), como ligante.

#### 4.2.9 Determinação colorimétrica dos auto-anticorpos

Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de fundo chato, contendo 96 poços (Figura 4.3), fazendo-se a adição total dos soros.



Figura 4.3 – Foto de placas utilizadas nestes ensaios com lipossomas e soros purificados e não purificados (retirada da Internet, <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>).

##### 4.2.9.1 Influência da diluição dos soros

Estes ensaios tiveram como objetivo estudar a influência da diluição dos soros na resposta colorimétrica. Para a realização desses ensaios, foram empregados "pools" de soros auto-ímmunes (AIA, AIM e AIB) purificados com 100  $\mu$ L de gel Sepharose-proteína G e não purificados, IgG (Aventis, Alemanha, neste trabalho referida como IgG comercial),

controles positivo e negativo do kit Varelisa e soro sadio não purificado, não diluídos e diluídos nas proporções 1:20 e 1:100 com mistura dos tampões ácido cítrico 100mM pH 2,6 e Tris-HCl 1 M e pH 8,5. Foram utilizados 150µL de lipossomas polimerizados na faixa do azul e 50µL dos "pools" de soros auto-imunes purificados e não purificados, controles, branco, soro sadio e IgG comercial nas diluições especificadas acima. Como controle (branco) utilizou-se 150 µL de lipossomas e 50µL da mistura dos tampões ácido cítrico 100mM pH 2,6 e Tris-HCl 1 M pH 8,5 (a mistura resulta em pH neutro). O esquema da placa montada para a realização deste experimento está apresentado na Figura 4.4. Foram realizadas varreduras em espectrômetro (SpectraMax 190, EUA) na faixa de 400 a 700 nm, a cada 10 minutos até 1 hora após a primeira leitura. Antes de cada leitura, o sistema foi agitado por 5 segundos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C +
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
B	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C +
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
C	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C +
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
E	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	IgGF	IgGF	IgGF	C -
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
F	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	IgGF	IgGF	IgGF	C -
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
G	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	IgGF	IgGF	IgGF	C -
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 4.4 – Mapa de placa montada para o estudo da influência da diluição dos soros na resposta colorimétrica. B = branco; AIA = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação e sem diluição; AIA 1/20 = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação diluído 1/20; AIA 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação diluído 1/100; AIM = Soro auto-imune de média concentração sem purificação e sem diluição; AIM 1/20 = Soro auto-imune de média concentração sem purificação diluído 1/20; AIM 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração sem purificação diluído

1/100; AIB1 = Soro auto-imune de baixa concentração sem purificação e sem diluição; AIB1-1/20 = Soro auto-imune de baixa concentração sem purificação diluído 1/20; SS = Soro sadio sem purificação e sem diluição; SS 1/20 = Soro sadio sem purificação diluído 1/20; SS 1/100 = Soro sadio sem purificação diluído 1/100; C+ = Controle positivo do kit Varelista; C- = Controle negativo do kit Varelista; AIAG = Soro auto-imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G sem diluição; AIAG 1/20 = Soro auto imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/20; AIAG 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/100; AIMG = Soro auto-imune de média concentração purificado com Sepharose proteína-G sem diluição; AIMG 1/20 = Soro auto-imune de média concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/20; AIMG 1/100 = Soro auto-imune de alta concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/100; AIB1G = Soro auto-imune de baixa concentração purificado com Sepharose proteína-G sem diluição; AIB1G 1/20 = Soro auto-imune de baixa concentração purificado com Sepharose proteína-G diluído 1/20; IgGF = imunoglobulina G comercial com a mesma concentração aproximada de IgG dos soros de seres humanos, sem diluição; IgGF1/20 = imunoglobulina G comercial diluída 1/20; IgGF1/100 = imunoglobulina G comercial diluída 1/100. Soros purificados com 100 µL de gel Sepharose-proteína G.

#### *4.2.9.2 Influência do tempo de polimerização*

Este ensaio foi realizado para estudar a influência do tempo de polimerização dos lipossomas na resposta colorimétrica. Este ensaio foi feito com pools" de soros auto-ímmes (AIA, AIM e AIB) e soro sadio purificados com 200 µL de gel Sepharose-proteína G e não purificados. Polimerizou-se os lipossomas em três tempos: P1 = 5 minutos, P2 = 10 minutos e P3 = 20 minutos. Foram utilizadas para este ensaio as mesmas quantidades de lipossomas e soros, como também o procedimento descrito no item 3.2.11.1. O esquema da placa montada para a realização deste experimento está apresentado na Figuras 3.6. Do mesmo modo foram realizadas varreduras em espectrômetro na faixa de 400 a 700 nm, a cada 10 min até 1 h após a primeira leitura. Antes de cada leitura o sistema foi agitado por 5s.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AIM P1	AIM P2	AIM P3	AIA P1	AIA P2	AIA P3	AIB1 P1	AIB1 P2	AIB1 P3	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
										P1	P2	P3
B	AIM P1	AIM P2	AIM P3	AIA P1	AIA P2	AIA P3	AIB1 P1	AIB1 P2	AIB1 P3	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
										P1	P2	P3
C	AIM P1	AIM P2	AIM P3	AIA P1	AIA P2	AIA P3	AIB1 P1	AIB1 P2	AIB1 P3	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
										P1	P2	P3
D	B P1	B P1	B P1	SS P1	SS P1	SS P1	SS P2	SS P2	SS P2	SS P3	SS P3	SS P3
E	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB2	AIB2	AIB2
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
F	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB2	AIB2	AIB2
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
G	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB2	AIB2	AIB2
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
H	B P2	B P2	B P2	B P3	B P3	B P3	SSG P1	SSG P1	SSG P2	SSG P2	SSG P3	SSG P3

Figura 4.5 – Mapa de placa montada para o estudo da influência do tempo de polimerização na resposta colorimétrica, soros purificados com 200  $\mu$ L de gel Sepharose Proteína G. B = branco; AIA = soro auto-imune alta conc.; AIM = soro auto-imune de média conc.; AIB1 = soro auto-imune de baixa conc.; AIAG = soro auto-imune purificado de alta conc.; AIMG = soro auto-imune purificado de média conc.; AIB1G = soro auto-imune purificado de baixa conc.; SS = soro sadio; AIB2 1/1 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/1; AIB2 1/11 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/11; SS = soro sadio; SSG = Soro sadio purificado; P1 = lipossomas polimerizados por 5 min; P2 = lipossomas polimerizados por 10 min; P3 = lipossomas polimerizados por 20 min.

#### 4.2.9.3 Influência da concentração de cardiolipina e da concentração de IgG no soro purificado

Neste experimento, aumentou-se a quantidade de cardiolipina na preparação dos lipossomas de 20 para 30 %. Aumentou-se também o tempo de polimerização para 40 min, de modo a atingir uma coloração azul compatível com os outros experimentos, uma vez que a presença de cardiolipina na estrutura lipossomal dificulta a aproximação das cadeias e

conseqüentemente a polimerização. Além disso, purificou-se os "pools" de soros com 200 e 600 µL de Sepharose-proteína G. Um esquema da placa montada neste experimento está mostrado na Figura 3.7. Os procedimentos usados foram descritos no item 3.2.11.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AIM	AIM	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	AIB2	AIB2	AIB2
										1/1	1/1	1/11
B	AIM	AIM	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	AIB2	AIB2	AIB2
										1/1	1/1	1/11
C	AIM	AIM	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	AIB2	AIB2	AIB2
										1/1	1/1	1/11
D	B	B	B	B	B	B	B	B	B	AIB2	AIB2	AIB2
										1/11	1/11	1/11
E	AIMG	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB1G
	200	200	600	600	200	200	600	600	200	200	600	600
F	AIMG	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB1G
	200	200	600	600	200	200	600	600	200	200	600	600
G	AIMG	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB1G
	200	200	600	600	200	200	600	600	200	200	600	600
H	SSG	SSG	SSG	SSG								
	200	200	200	200	200	200	600	600	600	600	600	600

Figura 4.6 – Mapa de placa montada para o estudo da influência da concentração de IgG dos soros purificados na resposta colorimétrica. B = branco; AIA = soro auto-imune alta conc.; AIM = soro auto-imune de média conc.; AIB1 = soro auto-imune de baixa conc.; AIAG 200 = soro auto-imune de alta concentração purificado com 200 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIAG 600 = soro auto-imune de alta concentração purificado com 600 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIMG 200 = soro auto-imune de média concentração purificado com 200 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIMG 600 = soro auto-imune de média concentração purificado com 600 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIBG 200 = soro auto-imune de baixa concentração purificado com 200 microlitros de Sepharose-proteínas G; AIBG 600 = soro auto-imune de baixa concentração purificado com 600 microlitros de Sepharose-proteínas G; SS = soro sadio; AIB2 1/1 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/1; AIB2 1/11 = soro auto-imune de baixa concentração 2 diluído 1/11 SSG = Soro sadio purificado.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS “POOLS” DE SOROS

##### 5.1.1 – Níveis de IgG -específica

"Pool" de soros é uma solução formada a partir da mistura de amostras séricas de diferentes indivíduos. Segundo disponibilidade do banco de soros do Laboratório de Imunologia Experimental e Alergia, foram preparados 47 "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças autoimunes e estes soros foram caracterizados segundo os níveis de anticorpos anti-cardiolipina, através da dosagem dos níveis de IgG- específica (Tabela 4.1).

Dentre 47 “pools” de soros pertencentes ao LIAE/FCM/UNICAMP, foram selecionados quatro "pools" de soros para avaliação das interações entre os anticorpos (IgG) contidos nos soros e a cardiolipina nas formas livre e ligada à superfície de lipossomas polimerizados. O "pool" de nº 10, com alta concentração de IgG- específica (5152,01 µg/mL), aqui chamado de AIA; o "pool" nº 46, com média concentração de IgG- específica (2030,49 µg/mL), AIM, e os “pools” nº 30 nº 5 com baixa concentração de IgG anti-cardiolipina (13,39 µg/mL e 14,03 µg/mL) AIB1 e AIB2 respectivamente, aqui designados indistintamente como AIB.

Para efeito de simplificação neste trabalho, “pools” de soros serão aqui chamados apenas de soros. Soros autoimunes e soros sadios referem-se aos soros de indivíduos com doenças autoimunes e soros de indivíduos sadios.

Tabela 5.1: Níveis de anticorpos anti-cardiolipina (IgG) presentes nos "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças autoimunes.

"Pool"	Concentração (µg/mL)
1	27,24
2	82,52
3	13,00
4	94,13
*5	14,03
6	49,40
7	32,74
8	42,67
9	73,49
*10	5152,01
11	9,78
12	41,90
13	91,11
14	8,89
15	9,43
16	11,92
17	9,32
18	7,56
19	15,62
20	7,80
21	8,45
22	19,79
23	39,48
24	9,79
25	10,52
26	21,85
27	33,61
28	24,47
29	21,63
*30	13,39
31	8,40
32	7,96
33	14,93
34	17,89
35	7,57
36	10,67
37	9,45
38	8,88
39	7,79
40	15,17
41	11,58
42	9,42
43	28,04
44	8,25
45	16,75
*46	2030,49
47	13,60

\*"pool" de soro selecionado para estudo

A Tabela 5.2 resume as concentrações de IgG total e específica dos soros selecionados.

Tabela 5.2: Níveis de anticorpos em termos de IgG total e específica (IgG anti-cardiolipina) presentes nos “pools” selecionados de soros de amostras séricas de pacientes com doenças autoimunes.

<b>“Pool”</b>	<b>IgG total (mg/mL)</b>	<b>IgG-específica (µg/mL)</b>
<b>05 AIB2</b>	15,90	14,04
<b>10 AIA</b>	16,30	5152,01
<b>30 AIB1</b>	17,40	13,38
<b>46 AIM</b>	16,20	2030,49
<b>*SS</b>	15,00	5,58

\*SS- Soro Sadio

#### 5.1.2 – Absorbância dos soros e da cardiolipina em tampão fosfato

A determinação da absorbância dos soros em tampão fosfato fez-se necessária por duas razões: para a sua utilização como controle no estudo espectral da interação entre a cardiolipina livre e a IgG-específica contida nos soros, e para observação do comportamento da dispersão dos soros em meio aquoso tamponado, o qual será também considerado na análise posterior das interações dos soros com a cardiolipina.

A absorbância dos soros foi determinada a diferentes concentrações de IgG-específica (Cs), obtidas após a adição de volumes conhecidos de soro à solução de tampão fosfato. A Tabela 5.3 apresenta os valores de Cs calculados, considerando-se a concentração inicial de IgG-específica de cada soro, o volume de soro adicionado e a variação do volume total da solução.

Tabela 5.3 – Volume de soro adicionado ( $V_a$ ), volume total da solução ( $V_t$ ) e concentrações de IgG-específica (IgG anti-cardiolipina) (Cs), dos soros AIA, AIM, AIB e SS. Solução de soros em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. AIA, AIM, AIB- soros autoimunes com alta ( 5,15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), média (2,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e baixa (0,013 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) concentração de IgG específica (IgG<sub>espec.</sub>). SS- soro sadio com 0,0057  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (IgG<sub>espec.</sub>).

$V_a$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_t$ ( $\mu\text{L}$ )	*Cs <sub>AIA</sub> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	*Cs <sub>AIM</sub> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	*Cs <sub>AIB</sub> x 10 <sup>4</sup> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	*Cs <sub>SS</sub> x 10 <sup>4</sup> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
20	2020	0,05	0,02	1,32	0,55
70	2070	0,17	0,07	4,52	1,89
120	2120	0,29	0,12	7,57	3,16
170	2170	0,40	0,16	10,48	4,37
220	2220	0,51	0,20	13,26	5,53
270	2270	0,61	0,24	15,91	6,64
320	2320	0,71	0,28	18,46	7,70
370	2370	0,80	0,32	20,89	8,71

$$*C_s = ([\text{IgG}_{\text{espec.}}] \times V_a) / V_t$$

As Figuras 5.1 (a e b) mostram a variação da absorbância para as diferentes concentrações de IgG-específica (Cs) dos soros, apresentadas na Tabela 5.3. Observa-se que em todos os casos os perfis são aproximadamente lineares com coeficientes angulares na seguinte ordem: AIM > AIA e AIB > SS, embora a concentração de IgG total seja aproximadamente igual para todas as amostras (Tabela 5.2). Esses resultados revelam a heterogeneidade em termos de composição dos soros dos indivíduos com doenças auto-imunes, um dos fatores que mais dificultam a detecção e quantificação dos auto-anticorpos.

A Figura 5.1 (c) apresenta os perfis de absorbância dos soros em solução de tampão fosfato em função das concentrações correspondentes de IgG-total (Ct), quando volumes conhecidos de soros são adicionados à cubeta de análise. Nesse caso, observa-se que os coeficientes angulares dos perfis são semelhantes para os soros autoimunes, porém claramente diferentes do soro sadio.

Desses resultados pode-se concluir que diferentes fatores influenciam o espalhamento de luz nos dois grupos de soros. Esses fatores incluem a composição e a agregação dos componentes do soro. O aspecto turvo dos soros facilmente observável a olho nu, é um indicativo da presença de agregados de dimensões coloidais na dispersão. Cabral (2000) trabalhando com soro de referência, o qual é um soro autoimune com concentração mais elevada de IgG decorrente de purificação prévia, mostrou que a sua absorbância em tampão fosfato é menor que a do soro SS ou dos soros autoimune. Esse

resultado sugere que a pureza dos soros contribui para a redução do tamanho dos agregados formados em solução.

Para a cardioplipina (Figura 5.1 (d)), observa-se um perfil também linear, semelhante ao dos soros. Os níveis de absorvância obtidos também indicam a presença de agregados coloidais na dispersão, o que é uma decorrência natural, devido à natureza lipídica e o caráter anfifílico da cardioplipina.

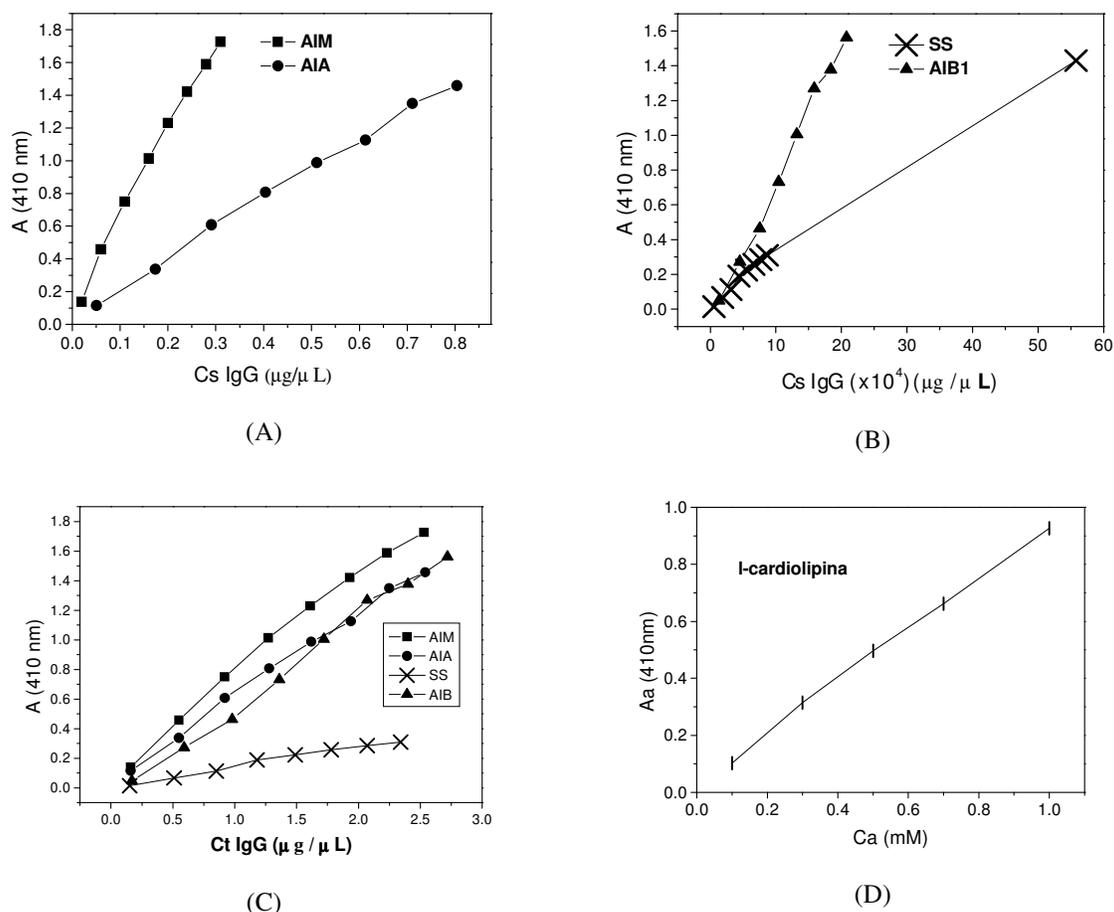


Figura 5.1: Perfis de absorvância dos soros autoimunes e sadio dispersos em solução de tampão fosfato (25 mM, pH 7,0) em função de (A e B) concentração de IgG-específica (Cs) e (C) concentração de IgG total (Ct). AIA, AIM, e AIB são os soros autoimunes com concentrações de IgG-específica alta (5,15µg/µL), média (2,03µg/µL) e baixa (0,013µg/µL) respectivamente. SS é o soro sadio com 0,00558µg/µL de IgG-específica. (D) Perfil de absorvância da cardioplipina em solução de tampão fosfato (25 mM, pH 7,0) em função da sua concentração Ca, onde “a” designa acceptor.

### 5.1.3 – Diâmetro médio e polidispersidade dos agregados dos constituintes dos soros em solução.

A heterogeneidade dos soros também se manifesta através das diferenças de tamanhos dos seus agregados coloidais. Esses efeitos foram observados para os soros SS e AIA, representativos dos grupos aqui classificados. O diâmetro médio e polidispersidade medidos através de espalhamento de luz com laser de alta potência (método dinâmico “quasi elastic light scattering”) resultaram nos valores apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Diâmetro médio e polidispersidade dos soros sadio (SS) e autoimune (AIA) com concentrações de IgG-específica 0,0058  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 5,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  respectivamente. Medidas feitas com os soros diluídos 20 vezes.

Soro	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade
SS	51,0	0,59
AIA	194,2	1,00

Em ambos os casos, a polidispersidade dos agregados é alta, indicando grande heterogeneidade no tamanho das partículas. Para o SS, com diâmetro médio de partículas 51nm, a distribuição populacional em termos de intensidade de luz espalhada revelou partículas com tamanhos de 3,6 até 721,4 nm. A distribuição em termos da média ponderada do número de partículas mostrou que a maioria (80%) das partículas possui diâmetros na faixa de 5 a 40 nm. No caso do AIA, a distribuição é muito mais larga, com partículas de tamanhos desde 13,7 a 1375,8 nm, porém a maior parte (94%) das partículas encontra-se na faixa de 13,7 a 70 nm. A análise conjunta das duas distribuições de tamanhos (intensidade e número) fornece informações úteis para a interpretação do tamanho das partículas presentes na dispersão. A distribuição por intensidade fornece toda a faixa de tamanhos de partículas, com a média ponderada da intensidade proporcional ao diâmetro elevado à sexta potência. A distribuição por número fornece o diâmetro predominante na dispersão, onde a média ponderada é proporcional ao diâmetro elevado à primeira potência. Assim, partículas de maior tamanho podem apresentar médias

ponderadas elevadas em termos de intensidade, embora representem minoria em termos de número na dispersão.

Os resultados da Tabela 5.4 refletem-se nos perfis de absorvância da Figura 5.1, uma vez que a intensidade de espalhamento de luz é diretamente proporcional ao número e tamanho das partículas coloidais presentes na dispersão. Observa-se que o tamanho predominante dos agregados no soro AIA é aproximadamente duas vezes maior que no soro SS. No caso de AIM e AIB os tamanhos devem ser semelhantes ao AIA, considerando a semelhança das absorvâncias mostradas na Figura 5.1 (c).

## **5.2 INTERAÇÃO ENTRE OS SOROS E A CARDIOLIPINA LIVRE EM TAMPÃO FOSFATO**

Para a análise espectral da interação entre a IgG-específica presente nos soros e a cardiolipina livre, os soros foram adicionados à varias concentrações da cardiolipina previamente dispersa em tampão fosfato. Aqui também, a limitação dos soros AIM e AIB permitiram apenas os ensaios em relação à cardiolipina livre 1 mM em tampão fosfato.

### **5.2.1 – Interação entre soro sadio (SS) e cardiolipina**

A Figura 5.2 apresenta as varreduras espectrais na região de comprimentos de onda 410 a 470nm, onde foram anteriormente detectadas as maiores perturbações na absorvância decorrentes da interação com formação de complexo, entre a cardiolipina (acceptor) e a IgG (ligante). Nesses ensaios foram usados soro sadio e a cardiolipina nas concentrações 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 1,0 mM, ambos dispersos em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. As mudanças espectrais foram analisadas conforme metodologia proposta por Winzor e Sawyer, 1995.

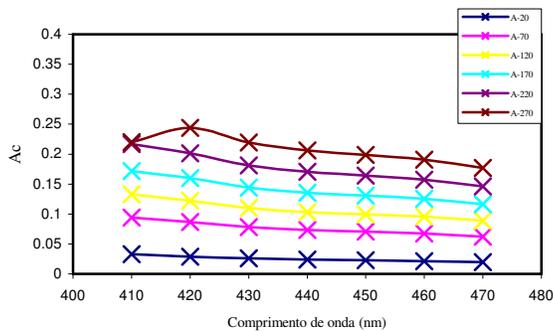
As varreduras de cada figura correspondem às absorvâncias decorrentes da adição de um volume conhecido de soro, especificado no retângulo à direita, à uma determinada concentração de cardiolipina dispersa em tampão fosfato. Observando-se os espectros, verifica-se que quando os primeiros volumes de soro são adicionados, as linhas são paralelas e equidistantes, com pequena variação na absorvância. À medida que aumenta a quantidade de soro adicionado, há um salto no nível da absorvância, que corresponde ao

sinal de detecção no qual predominam os efeitos do complexo formado. A partir daí, os espectros voltam a apresentar variações menores na absorbância, que são decorrentes somente do aumento da concentração de soro no meio. A perturbação no padrão do sinal de detecção pode ser melhor observada para as maiores concentrações de cardiolipina usadas (Figura 5.2 C,D,E).

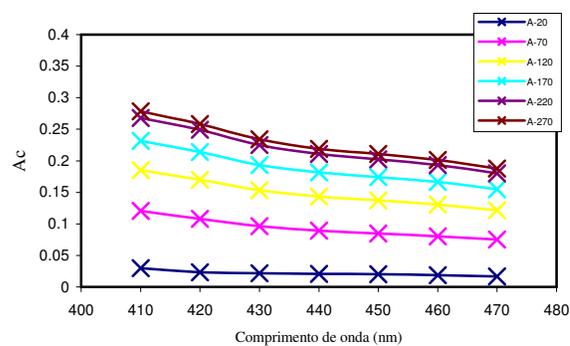
Comparando-se os espectros deste trabalho com os obtidos por Winzor e Sawyer, 1995, verifica-se que no nosso caso a detecção da formação dos complexos por absorbância produz variações muito mais suaves nos espectros. Esse efeito é devido à natureza complexa e multicomponente dos soros, em relação aos complexos formados com substâncias puras como exemplificado pelos autores.

Observa-se na Figura 5.2, que para cada adição de soro a absorbância mantém-se aproximadamente constante em toda a faixa de comprimento de onda entre 410 e 470nm. Portanto, nas análises subsequentes serão consideradas as absorbâncias somente em um dos comprimentos de onda (410 nm).

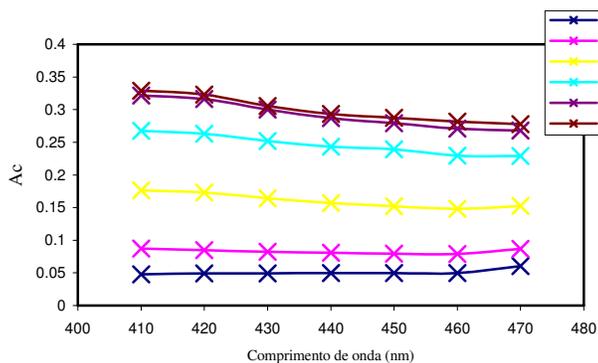
A Tabela 5.5 apresenta os sinais de absorbância a 410nm, decorrentes da adição de soro sadio ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 ( $A_0$ ) e da interação do soro sadio com a cardiolipina em várias concentrações ( $A_c$ ). Os valores de  $A_c$  representam os efeitos espectrais do soro sadio nas suas formas em equilíbrio, livre e complexada com cardiolipina, uma vez que foram subtraídos da absorbância da cardiolipina livre na concentração correspondente, usada como controle.



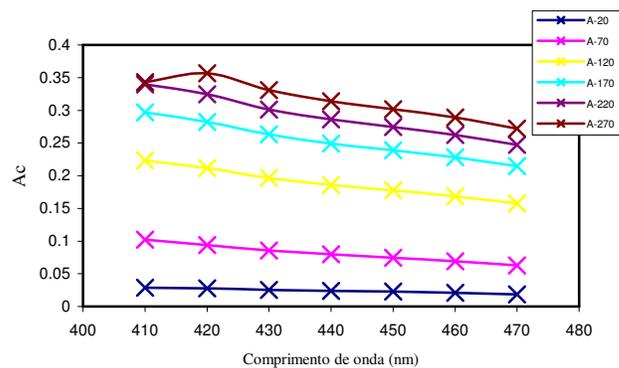
(A)



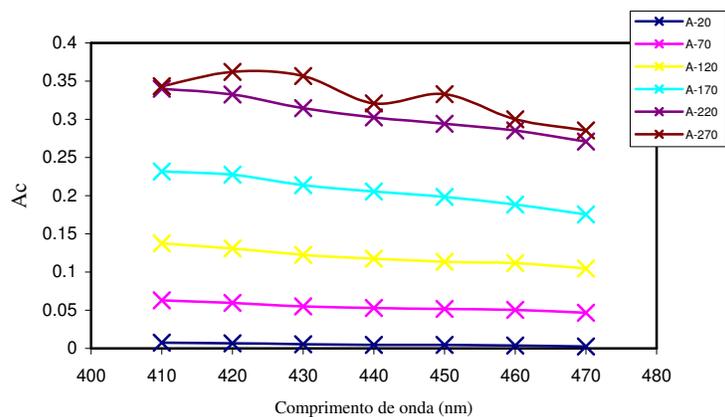
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 5.2 – Absorbâncias do SS nas suas formas em equilíbrio, livre e complexada com cardiolipina, ambos dispersos em solução tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. Detecção da formação dos complexos na faixa de comprimentos de onda entre 410 e 470 nm do SS. Nos retângulos à direita tem-se as quantidades ( $\mu\text{L}$ ) adicionadas de SS à solução de cardiolipina nas concentrações (A) 0,1 mM (B) 0,3 mM (C) 0,5 mM (D) 0,7 mM (E) 1,0 mM.

Tabela 5.5 – Absorbâncias do soro sadio em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 sem cardioplipina ( $A_0$ ) e com cardioplipina (Ac). Os subscritos de Ac representam as concentrações de cardioplipina (0,1 a 1,0 mM).

$C_{SS} \times 10^4$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	$A_0$	Ac <sub>0,1</sub>	Ac <sub>0,3</sub>	Ac <sub>0,5</sub>	Ac <sub>0,7</sub>	Ac <sub>1,0</sub>
0,55	0,0138	0,0330	0,0297	0,0478	0,0289	0,0073
1,89	0,0667	0,0940	0,1206	0,0873	0,1020	0,0630
3,16	0,1124	0,1327	0,1850	0,1762	0,2234	0,1373
4,37	0,1889	0,1717	0,2313	0,2674	0,2967	0,2316
5,53	0,2236	0,2169	0,2678	0,3218	0,3399	0,3398
6,64	0,2575	0,2200	0,2782	0,3289	0,3433	0,3434
7,70	0,2847	---	---	---	---	---
8,71	0,3095	---	---	---	---	---

$C_{SS}$  – Concentração de IgG-específica no soro sadio (variações obtidas por diluição);  $A_0$  e Ac<sub>0,1</sub> a Ac<sub>1,0</sub> - Absorbâncias a 410nm, dos complexos resultantes da interação entre soro sadio e cardioplipina nas concentrações de 0,1 a 1,0.

A Figura 5.3 apresenta os perfis de absorbância em função da concentração de IgG-específica do soro sadio, adicionado ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 sem cardioplipina e com a presença de cardioplipina em diversas concentrações. Esses perfis evidenciam com maior clareza os efeitos da formação dos complexos na absorbância das dispersões.

Os resultados mostram perfis com tendência hiperbólica para baixas concentrações de cardioplipina (0,1 e 0,3 mM), passando para a forma sigmoidal (aprox.) para as maiores concentrações (0,5 – 1,0 mM). A variação dos perfis bem como a sua forma sigmoidal é devida a autoagregação do acceptor, tal como reportado por Winzor e Sawyer, 1995. A forma sigmoidal observada pode ser resultante da reestruturação inicial dos agregados.

A formação de complexos entre os componentes do soro e o acceptor cardioplipina pode também ser evidenciada comparando-se os perfis na presença de cardioplipina com o perfil do soro sadio somente, adicionado ao tampão fosfato (Figuras 5.3 e 5.1). No primeiro caso o perfil apresenta clara tendência à saturação, enquanto no último caso, o perfil é linear, correspondendo à variação na absorbância decorrente somente da adição de soro ao meio. Portanto, as formas hiperbólica ou sigmoidal dos perfis, características de saturação de sítios ativos, representa a titulação com formação de complexo, dos sítios do acceptor

cardiolipina com o ligante IgG presente no soro. Observa-se que uma saturação é obtida mesmo para o soro sadio. Tratando-se de soro sadio, com concentração de IgG específica muito baixa, a saturação tem maior influência da adsorção não específica dos outros componentes do soro.

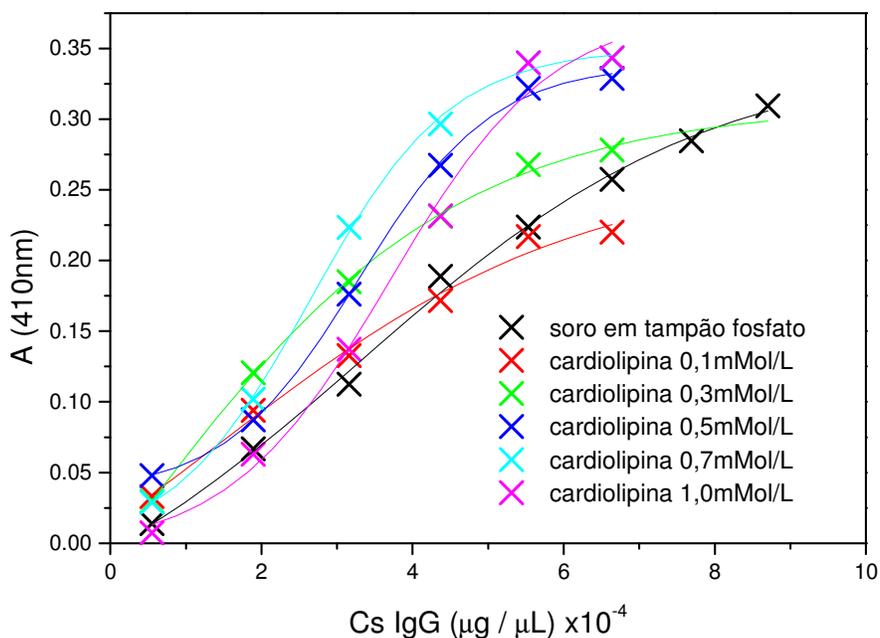
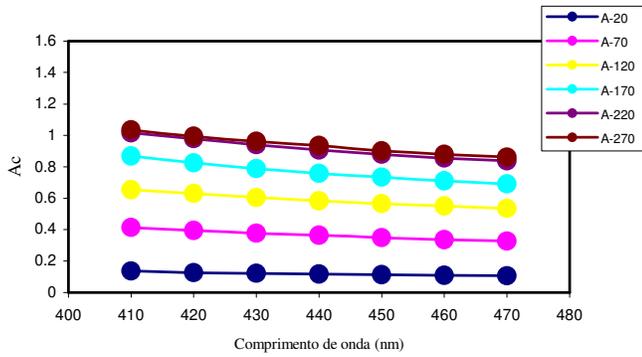


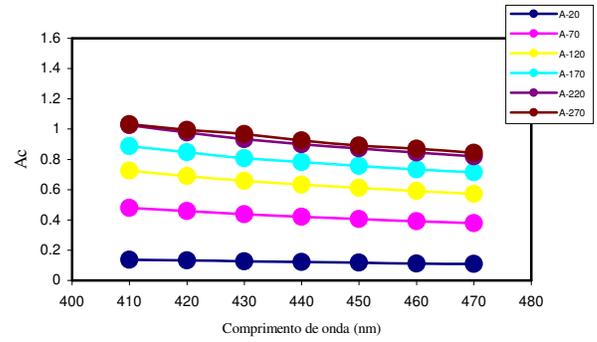
Figura 5.3 – Perfis representativos da adição de SS ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 e da interação entre a cardiolipina (acceptor) com o ligante (IgG-específica) proveniente do soro sadio. Cs é a concentração de IgG-específica.

### 5.2.2 – Interação entre cardiolipina e soro com alta concentração de IgG-específica (AIA)

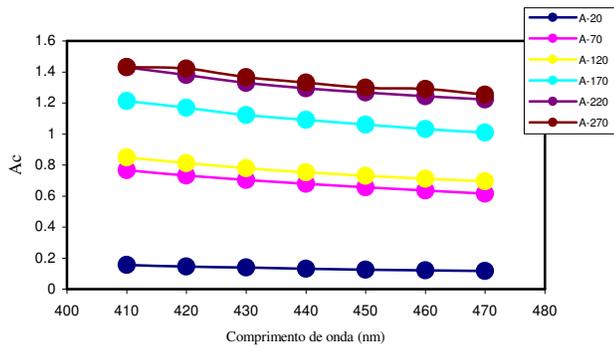
A Figura 5.4 apresenta os sinais espectrais decorrentes da perturbação do espectro da solução de cardiolipina pela adição do soro autoimune AIA, para as concentrações de cardiolipina 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 1,0 mM respectivamente.



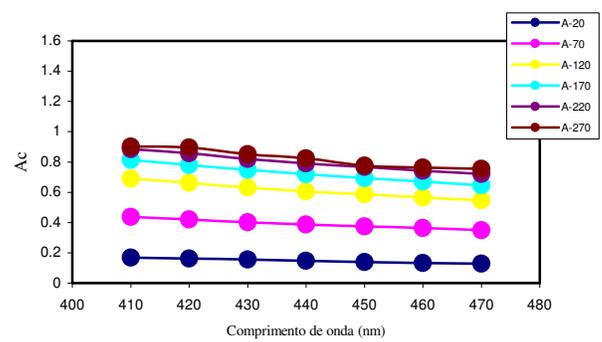
(A)



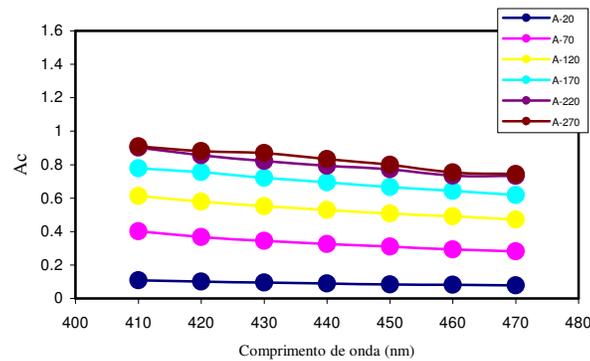
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 5.4 – Absorbâncias do soro AIA nas suas formas em equilíbrio, livre e complexada com cardiolipina, dispersos em solução tampão fosfato 25 mM, pH 7,0. Detecção da formação dos complexos na faixa de comprimentos de onda entre 410 e 470 nm. Nos retângulos à direita tem-se as quantidades ( $\mu\text{L}$ ) adicionadas de AIA à solução de cardiolipina nas concentrações (A) 0,1 mM (B) 0,3 mM (C) 0,5 mM (D) 0,7 mM (E) 1,0 mM.

Do mesmo modo que para o soro sadio, observa-se claramente a formação do complexo ligante-aceptor, pelo distanciamento das retas paralelas a partir da adição de 70  $\mu$ L de soro, gerando uma diferença no sinal espectral de 1,0 – 1,5 unidades.

A Tabela 5.6 apresenta os sinais de absorvância a 410nm. Estes valores são decorrentes da adição do soro autoimune AIA ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 ( $A_0$ ) e da interação do soro autoimune AIA com a cardiolipina em várias concentrações (Ac). Os valores de Ac representam os efeitos espectrais do soro AIA nas suas formas em equilíbrio, livre e complexada com cardiolipina, uma vez que foram subtraídos da absorvância da cardiolipina livre na concentração correspondente, usada como controle.

Tabela 5.6 – Absorvâncias do soro autoimune (AIA) em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 sem cardiolipina ( $A_0$ ) e com cardiolipina (Ac). Ac representa as concentrações de cardiolipina (0,1 a 1,0 mM).

$C_{SAIA}(\mu\text{g}/\mu\text{L})$	$A_0$	$Ac_{0,1}$	$Ac_{0,3}$	$Ac_{0,5}$	$Ac_{0,7}$	$Ac_{1,0}$
0,051	0,1151	0,1360	0,1363	0,1564	0,1675	0,1088
0,174	0,3571	0,4133	0,4804	0,7663	0,4376	0,4010
0,292	0,6078	0,6547	0,7249	0,8496	0,6904	0,6125
0,404	0,8077	0,8683	0,8865	1,2122	0,8127	0,7782
0,511	0,9875	1,0157	1,0254	1,4298	0,8841	0,9024
0,613	1,1263	1,0344	1,0333	1,4327	0,9021	0,9085
0,710	1,3492	---	---	---	---	0,8571
0,804	1,4576	---	---	---	---	0,8994

$C_{SAIA}$  – Concentração de IgG-específica no soro sadio (variações obtidas por diluição);  $A_0$  e  $Ac_{0,1}$  a  $Ac_{1,0}$  - Absorvâncias a 410nm, dos complexos resultantes da interação entre soro sadio e cardiolipina nas concentrações de 0,1 a 1,0.

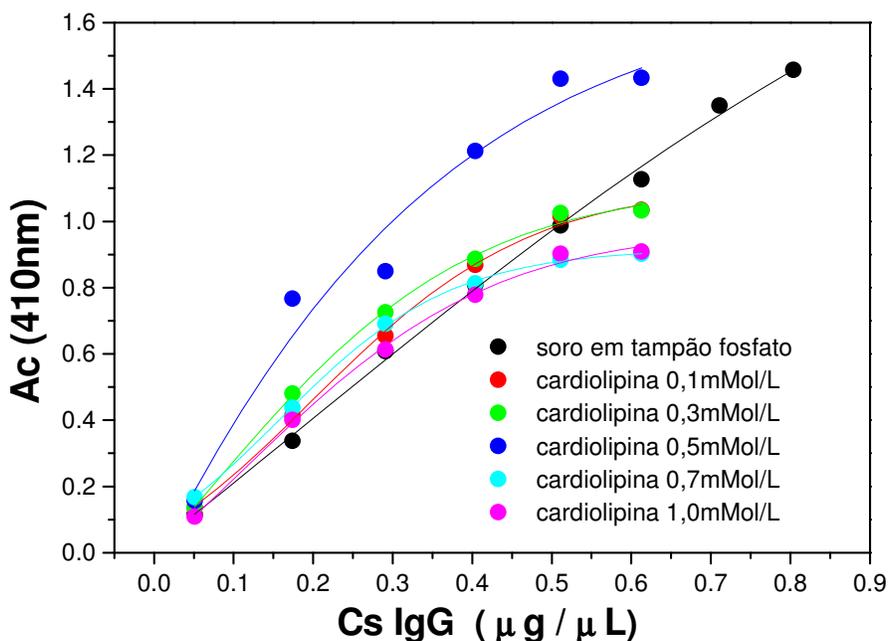


Figura 5.5 –Perfis representativos da adição de AIA ao tampão fosfato 25 mM, pH 7,0 e da interação entre a cardioplipina (acceptor) com o ligante (IgG-específica ) proveniente do soro autoimune AIA. Cs é a concentração de IgG-específica.

A Figura 5.5 apresenta os perfis de absorbância para o soro AIA, em função da concentração de IgG-específica à várias concentrações de cardioplipina. Observa-se neste caso, que todos os perfis apresentam tendência à saturação. Portanto, esses perfis também representam a ligação entre AIA e cardioplipina.

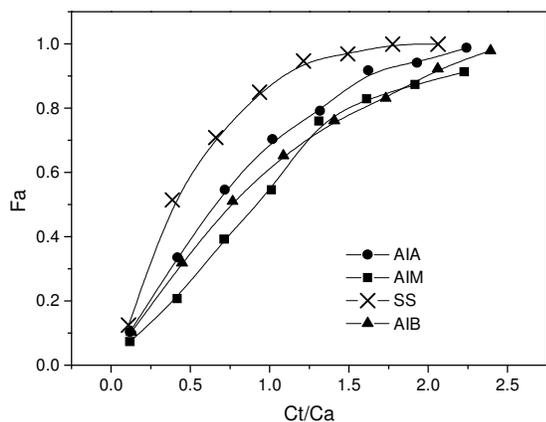
Os resultados da Figura 5.5 também mostram que não há variação significativa da absorbância para a formação dos complexos nas várias concentrações de cardioplipina, exceto para 0,5 mM, na qual o nível de absorbância gerado é superior para todas as concentrações de IgG. Isso é indicativo de que a intensidade do sinal resultante da interação entre a cardioplipina e os soro depende da razão ligante/acceptor. Portanto, a concentração de 0,5 mM de cardioplipina representa a situação mais adequada para a determinação da estequiometria da ligação, através da fração de sítios ocupados.

Comparando-se as Figuras 5.3 e 5.5, observa-se que nos máximos sinais espectrais obtidos para os soros SS e AIA, os valores de absorbância são aproximadamente 0,35 e 1,50 unidades respectivamente, diferindo cerca de 5 vezes. Esse resultado demonstra a factibilidade da análise espectral para a detecção qualitativa e quantitativa da formação dos complexos entre os anticorpos e a cardioplipina em dispersão. A absorbância gerada pela formação dos complexos entre a IgG específica e a cardioplipina constitui o efeito principal em relação aos efeitos secundários dos demais componentes do soro. Os complexos

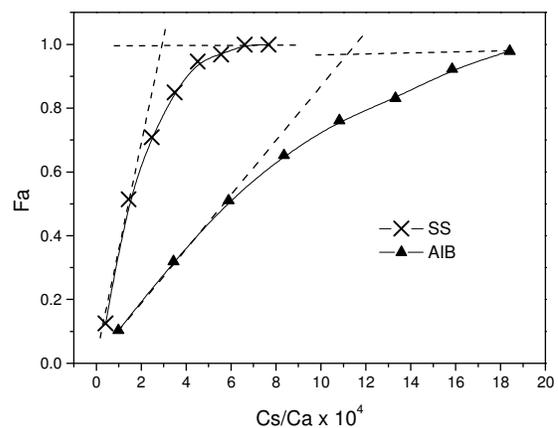
formados por AIA são de maiores tamanhos ou estão em maior concentração comparados aos formados com SS.

### 5.2.3 – Fração de sítios ocupados

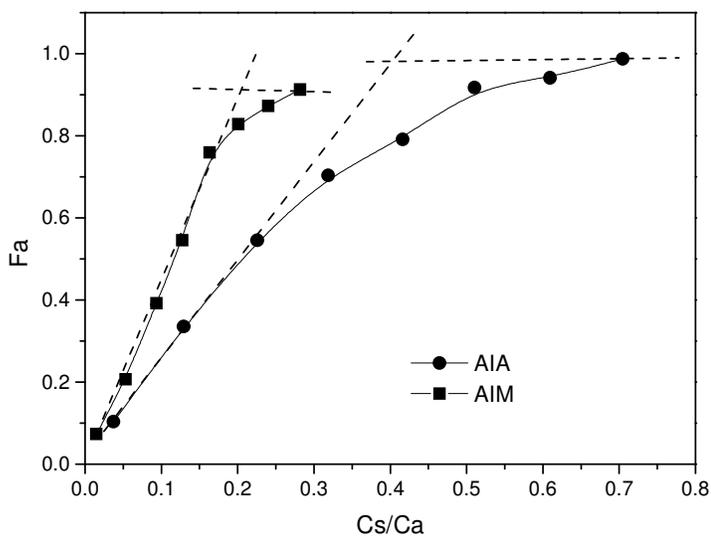
A Figura 5.6 mostra comparativamente a fração de sítios ocupados,  $F_a$ , para a concentração 0,5 mM do acceptor cardiolipina (Ca).



(A)



(B)



(C)

Figura 5.6 – Variação do parâmetro espectral  $F_a$  (fração de sítios ocupados) para a concentração de cardiolipina 0,5 mM (A) Em função da razão entre concentrações de IgG-total e acceptor (B) SS e AIB (C) AIA e AIM. As absorvâncias foram medidas a 410 nm.

Das curvas da Figura 5.6 (A), observa-se que para uma mesma concentração de acceptor, cardiolipina, (Ca), o parâmetro  $F_a$  é maior para o SS comparado aos soros autoimunes. Esse resultado sugere que os complexos formados com SS são maiores que os formados com os soros autoimunes, ou há maior interação da cardiolipina com os SS.

Comparando-se as curvas da Figura 5.6 (B e C) com a exemplificada na metodologia de Winzor e Sawyer, 1995 (Figura 3.6 deste trabalho), observa-se que para os soros autoimunes, embora haja mudança da inclinação inicial da curva, não há um patamar muito bem definido na faixa de concentrações estudada. Esse comportamento sugere as seguintes situações: a primeira onde há uma relação de equilíbrio entre a IgG-específica ligada à cardiolipina e livre na solução, ou a segunda onde todos os sítios da cardiolipina foram titulados, porém, devido à presença de agregados no soro, o excesso adicionado dificulta a obtenção de um patamar bem definido de absorvância na saturação. Sabendo-se que a ligação antígeno-anticorpo é muito específica, podemos considerar que a constante de dissociação para a interação é muito baixa, o que assegura a titulação de todos os sítios disponíveis do acceptor, e a ausência de anticorpos livres em equilíbrio ao final da titulação. Por outro lado, a ligação da IgG-específica com a cardiolipina envolve várias moléculas do acceptor na forma estruturada, como demonstrado por Costello e Green, 1986, o que corrobora com a hipótese de que todos os sítios de cardiolipina disponíveis foram titulados.

Admitindo a segunda hipótese, pode-se considerar que a saturação bem definida obtida com o SS corresponde ao nível de ligação não específica, e que a titulação dos sítios de cardiolipina ocorre mesmo com AIB, que contém baixa concentração de IgG-específica.

A partir destas considerações, a estequiometria da interação pode ser inferida pela interseção de dois segmentos lineares que delineiam a mudança de inclinação das curvas conforme metodologia descrita por Winzor e Sawyer, 1995. Nos casos em que a presença de poucos pontos na região de maior absorvância, considerou-se o último ponto como representativo da região do patamar de saturação. Os valores de  $C_s/C_a$  nos pontos de interseção são mostrados na Tabela 5.7 e representam o ponto de máxima interação entre ligante-acceptor.

Tabela 5.7: Estequiometria da interação entre IgG-específica e cardiolipina livre em tampão fosfato.

Soro	Estequiometria $C_s/C_a$
SS	$3,0 \times 10^{-4}$
AIB	$1,1 \times 10^{-3}$
AIM	0,2
AIA	0,4

Os resultados da Tabela 5.7 mostram a estequiometria relativa à Cs/Ca . Na saturação são ligadas muito mais moléculas de IgG-específica dos soros autoimunes, do que dos componentes não específicos do SS, refletindo a especificidade da ligação. Entre os soros, as diferenças das razões estequiométricas são da mesma ordem de grandeza das diferenças da concentração de IgG-específica nos soros, ou seja: Cs/Ca em AIB é uma ordem de grandeza maior que para o SS, AIM e AIA são da mesma ordem de grandeza e cerca de 100 vezes maiores que AIB. Estes resultados sugerem que para saturar a mesma quantidade de sítios de cardiolipina necessita-se de muito maior concentração de IgG-específica em AIA e AIM do que em AIB.

A interpretação dos resultados dos soros autoimunes requer uma análise mais aprofundada da interação entre a IgG-específica e a cardiolipina e a formação dos respectivos complexos, o que demanda caracterizações adicionais. Os agregados presentes nos soros autoimunes parecem exercer influência marcante nos resultados obtidos, bem como a interferência dos outros constituintes dos soros os quais são diferentes para os autoimunes e SS.

Outro fator importante é o estado da agregação da cardiolipina, uma vez que conforme reportado por Costello and Green, 1986, a estequiometria de ligação de 1 mol de anticorpo anticardiolipina requer uma estruturação lipídica e portanto vários moles de cardiolipina. Os mesmos autores mostraram também que a constante de afinidade antígeno-anticorpo foi a mesma para os vários soros estudados, porém a constante de máxima ligação identificou que a IgG-específica reconhece múltiplas moléculas do antígeno cardiolipina ao invés de um sítio particular na molécula do antígeno.

## **5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MONOMÉRICOS E POLIMERIZADOS**

### **5.3.1 Incorporação da cardiolipina**

Os lipossomas monoméricos, preparados somente com o ácido 10,12 tricosadiinóico, mostraram-se instáveis com tendência à agregação após 48 horas da

preparação. Essa instabilidade deve-se provavelmente à tendência de formação de micelas inversas causada pela pequena dimensão da região hidrofílica em relação à hidrofóbica dos ácidos insaturados, que desfavorece a formação de bicamadas e a vesiculação que constituem a estrutura lipossomal.

A presença da cardiolipina estabilizou a estrutura dos lipossomas devido à maior dimensão da sua cabeça hidrofílica, quando comparada ao grupo carboxila, que constitui a parte hidrofílica, ou grupo de cabeça, dos ácidos diacetilênicos. A incorporação da cardiolipina nos lipossomas de ácido diacetilênico foi praticamente total, de acordo com a quantificação através do teor total de fosfato inorgânico nas amostras, segundo CHEN et al., 1956.

### 5.3.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos

Os lipossomas monoméricos contendo 20% de cardiolipina apresentaram uma única população, com diâmetro médio 166 nm e distribuição de tamanhos de 36 a 600nm. Um exemplo típico das medidas de diâmetro desses lipossomas é apresentado na Figura 4.7.

Para os lipossomas contendo 30% de cardiolipina, após a polimerização de 40 minutos, o diâmetro médio foi de 207 nm com 81,8 % da população em 234,1 nm. Esses resultados indicam que a inserção de cardiolipina na bicamada lipídica aumenta o diâmetro médio dos lipossomas.

Os tamanhos foram reprodutíveis dentro de um erro de 5%, e estão coerentes com resultados anteriores do grupo, nos quais para os lipossomas com 20% de cardiolipina e preparados nas mesmas condições o diâmetro médio foi 170 nm, com 80% da população em 220nm (CABRAL, 2000). Na Tabela 5.8 é apresentado comparativamente os valores de diâmetro médio destes lipossomas.

Distribuição  
dos Tamanhos

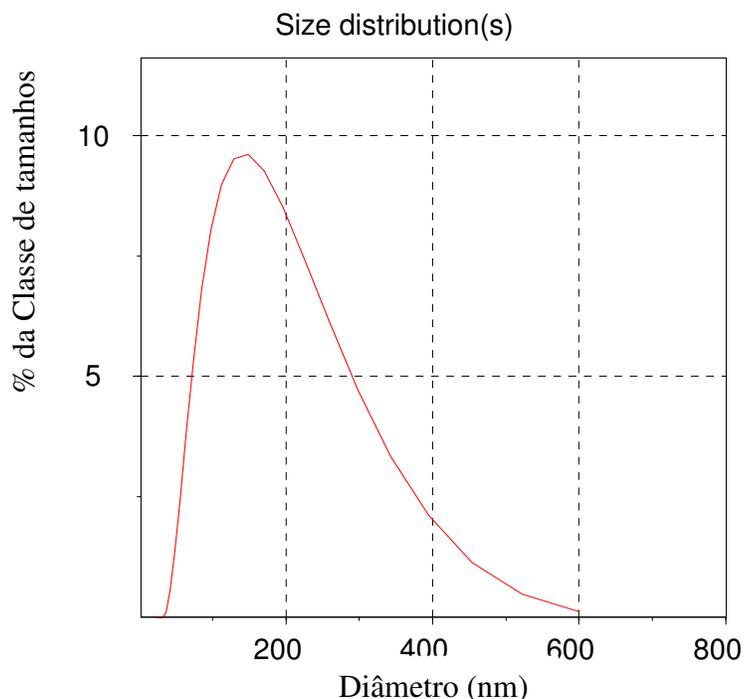


Figura 5.7: Distribuição de tamanhos dos lipossomas monoméricos compostos do ácido 10,12 tricosadiinóico e 20% de cardiolipina. A distribuição populacional é em termos de intensidade de luz espalhada.

Tabela 5.8 – Diâmetro médio dos lipossomas antes e após a polimerização

	Diâmetro médio antes da polimerização (nm)	Diâmetro médio depois da polimerização (nm)
Lipossomas - 20 % de cardiolipina	166	170
Lipossomas - 30 % de cardiolipina	-	207

### 5.3.3 Polimerização dos lipossomas monoméricos

O desenvolvimento da cor azul quando os lipossomas monoméricos são submetidos à radiação ultra-violeta indica o avanço da polimerização. A Figura 5.8 apresenta os espectros de absorção de luz para a polimerização dos lipossomas contendo 20% de

cardiolipina, durante os tempos 5, 10 e 20 minutos, denominados de lipossomas P1, P2 e P3 respectivamente.

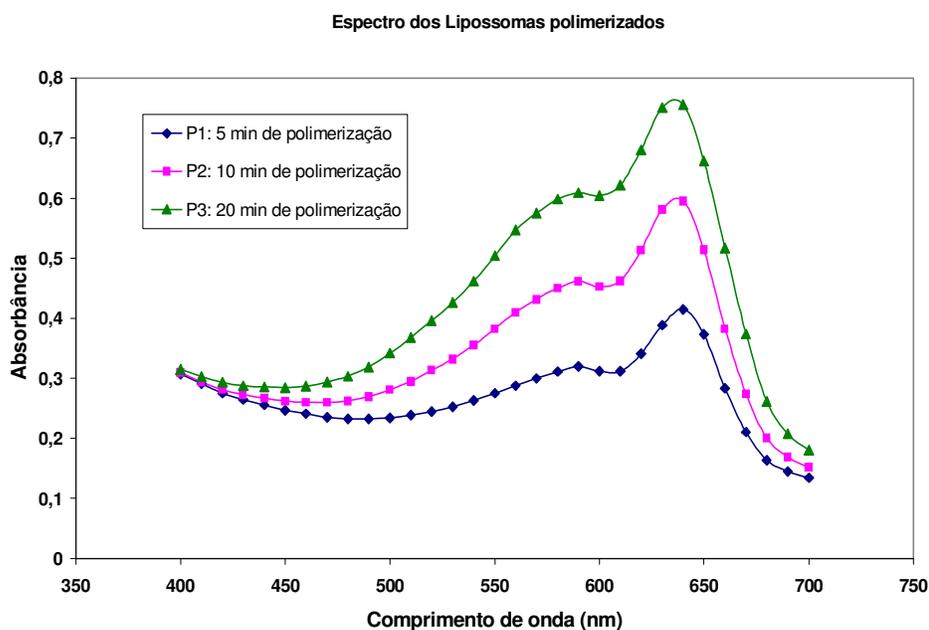


Figura 5.8: Espectros de polimerização dos lipossomas compostos de ácido 10,12 tricosadiinóico com 20% de cardiolipina, concentração do ácido: 0,5mM. Solvente: em água.

Para todos os tempos de polimerização usados, observa-se nos espectros da Figura 5.8, inicialmente o aparecimento de um pico na região do azul ( $\lambda = 635-640\text{nm}$ ), caracterizando a polimerização dos lipossomas. Com o prolongamento da irradiação aparecem um pico menor que se desloca progressivamente em direção à cor púrpura ( $\lambda = 540$ ). O aumento do tempo de polimerização até 20 minutos produziu aumentos correspondentes na intensidade de absorção no azul, embora a absorção na cor púrpura sempre estivesse presente, mesmo em baixa intensidade, em todos os espectros. Esses espectros foram semelhantes aos obtidos nos trabalhos anteriores do grupo (CABRAL, 2000). A continuidade da irradiação conduziria ao aparecimento da coloração rosa ( $\lambda = 480$ ) e finalmente vermelho, em 120 minutos, com o total desaparecimento do pico referente à cor azul, completando assim a polimerização. As fotografias da Figura 4.9 mostram as colorações obtidas nos vários estágios da polimerização.

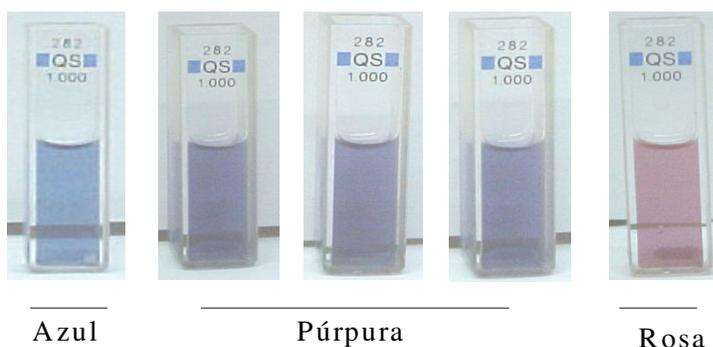


Figura 5.9: Fotografias dos lipossomas polimerizados em diferentes estágios de polimerização: azul ( $\lambda = 635\text{nm}$ ), púrpura ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) e rosa ( $\lambda = 480\text{nm}$ ).

No caso dos lipossomas preparados com 30 % de cardiolipina, o tempo de exposição à radiação UV foi de 40 minutos. Observa-se que neste caso, apesar do maior tempo de irradiação, a intensidade da absorbância no azul foi comparável à obtida com 5 minutos para os lipossomas contendo 20% de cardiolipina (Figura 5.10).

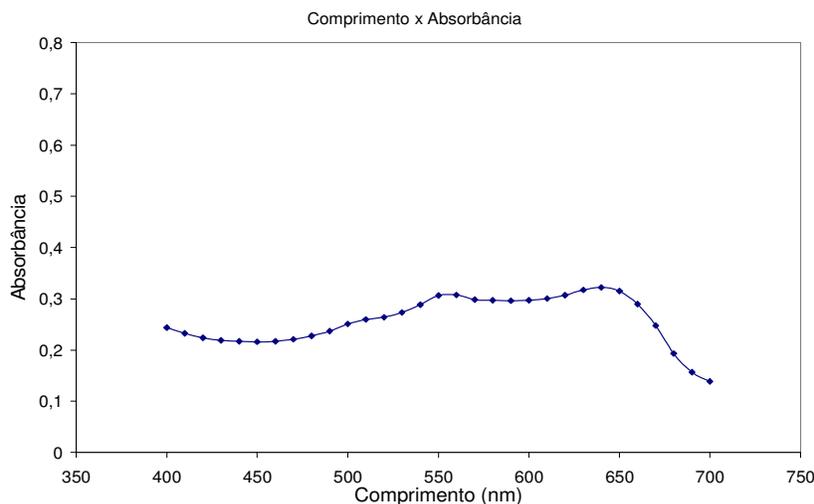


Figura 5.10: Espectro de polimerização dos lipossomas compostos de ácido 10,12 tricosadiinóico com 30% de cardiolipina, concentração 0,5mM. Tempo de polimerização: 40 minutos

Esse comportamento deve-se ao efeito adverso da cardiolipina sobre a polimerização, uma vez que as suas caudas hidrofóbicas inseridas na bicamada, aumentam a distância entre as insaturações presentes nas cadeias do ácido diacetilênico, diminuindo assim a intensidade de polimerização.

## 5.4 INTERAÇÃO ENTRE OS SOROS E OS LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS CONTENDO CARDIOLIPINA

A análise da interação entre os soros e a cardiolipina presente na superfície de lipossomas polimerizados foi feita em termos dos seguintes parâmetros: Absorbâncias individuais do vermelho (490nm) e do azul (640nm); razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ ,  $A(490)/A(640)$  e Resposta Colorimétrica (RC).

Os valores de RC são analisados com base nas equações (3.1; 5.2 e 3.2) do item revisão bibliográfica que dão origem à sua definição.

$$Pb_o = A_{\text{azul}}/[A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}] \times 100\% \quad (3.1)$$

$$Pb_f = A_{\text{azul}}^f/[A_{\text{azul}}^f + A_{\text{vermelho}}^f] \times 100\% \quad (5.2)$$

$$RC = (Pb_o - Pb_f) / Pb_o \times 100\% \quad (3.2)$$

$$A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}} = (1-Pb_f)/Pb_f \quad (5.3)$$

Conforme descrito, a RC é caracterizada pela conversão ao vermelho à uma dada temperatura e tempo, ou seja a percentagem final de azul, determinada em  $Pb_f$ . O  $Pb_o$ , definido pela equação (3.1), tem a mesma definição que  $Pb_f$ , e se refere à percentagem de azul inicial e é calculado utilizando-se as absorbâncias no azul e vermelho dos lipossomas polimerizados, antes da adição dos soros. O  $Pb_o$  depende somente da polimerização dos lipossomas. Portanto, o  $Pb_f$  é o fator determinante da RC.

A Tabela 5.9 auxilia a compreensão dos resultados, ilustrando as relações entre CR,  $Pb_f$  e a razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ . Esses valores foram calculados para  $Pb_o$  igual a 1, ou seja considerando no início a absorbância no vermelho igual a zero. Observa-se que quanto maior a CR, maior é  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$  e menor é o  $Pb_f$ .

Tabela 5.9 – Comportamento comparativo dos valores de CR,  $Pb_f$  e  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ .

RC (%)	$Pb_f$ (%)	$(A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}})_f$
100	0	$\infty$
90	10	9

80	20	4
70	30	2,3
60	40	1,5
50	50	1,0
40	60	0,67
30	70	0,42
20	80	0,25
10	90	0,10
0	100	0,0

A análise conjunta dos perfis em termos dos parâmetros selecionados permite um melhor entendimento dos efeitos colorimétricos da interação dos soros com a cardiolipina, comparada à análise somente por RC, como em geral é encontrada na literatura. Observa-se também que o comportamento dos perfis individuais no vermelho e no azul apresenta maior sensibilidade na distinção dos soros autoimunes.

A Figura 5.11 apresenta os resultados obtidos. Observa-se na Figura 5.11 (A) que o padrão de comportamento da absorbância no vermelho é igual para todos os soros: cresce em relação ao valor inicial, logo após a adição dos soros, atingindo um patamar que mantém-se aproximadamente constante durante 60 minutos. Nos patamares, as absorbâncias seguem a seguinte ordem: AIA>AIM>AIB>SS. O padrão de comportamento da absorbância no azul é igual para os soros autoimunes, porém diferente para o SS, cuja absorbância diminui em relação ao valor inicial, logo após a sua adição, permanecendo constante em um patamar inferior. Na região do patamar, a absorbância no vermelho é 3,2 vezes maior que no azul para o SS, enquanto que para os soros autoimunes as razões são próximas, e em torno de 1,7 (aprox.). (Figura 5.11 B). Em termos de RC, tem-se 60% para o SS, 45% para o AIB e AIM e 40% para o AIA. O padrão distinto do comportamento do perfil de absorbância no azul para o SS em relação aos soros autoimunes explica a sua maior RC.

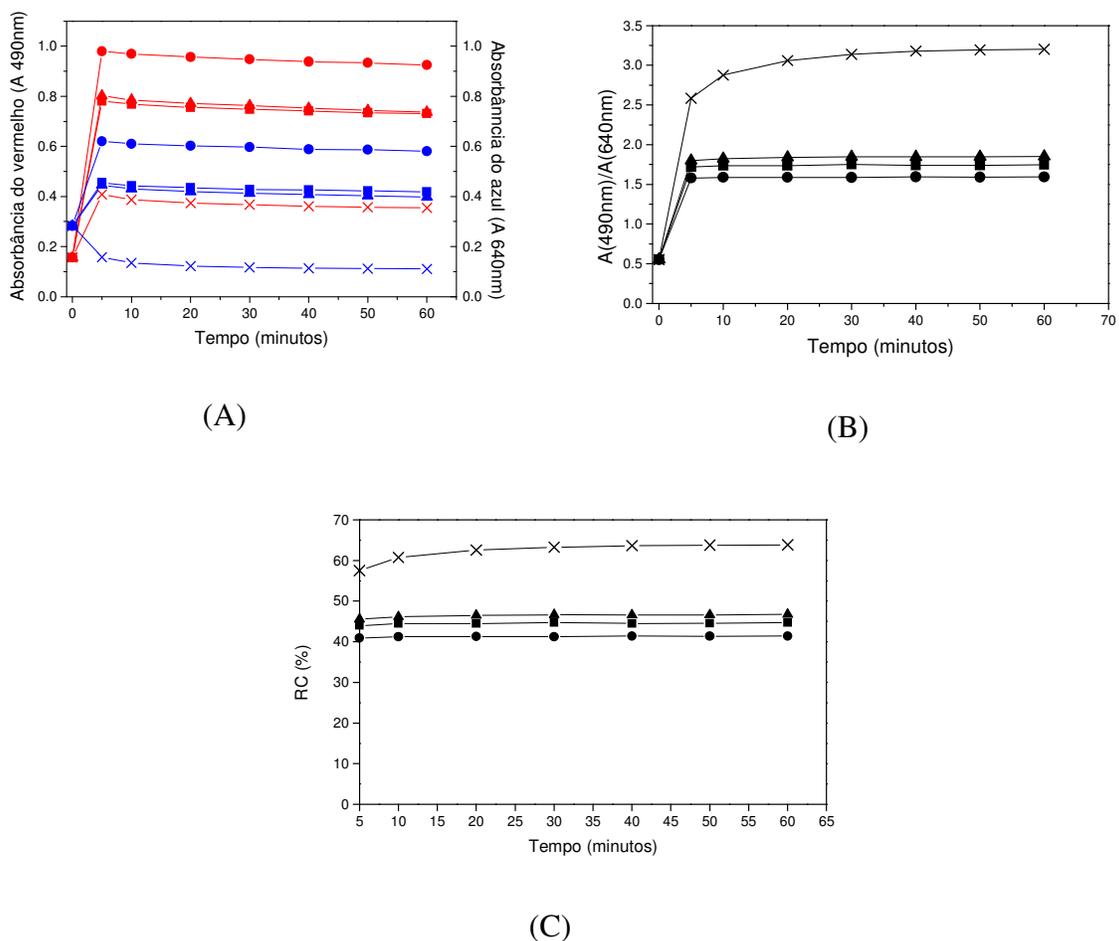


Figura 5.11: Perfis representativos dos efeitos colorimétricos para os diversos soros sem diluição em função do tempo, para o ensaio com lipossomas polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardiolipina. Absorbâncias individuais no vermelho e no azul (A), razão  $A_{vermelho}/A_{azul}$  ( $A_{490}/A_{640}$ ) (B), Resposta Colorimétrica, RC, (C). Símbolos: ●AIA, ■AIM, ▲AIB e x SS.

Sabe-se que a mudança de coloração é uma consequência do tensionamento conformacional da estrutura lipossomal em decorrência de mudanças no seu ambiente, como por exemplo uma ligação de afinidade entre um composto e o seu sítio específico. Portanto, para compostos purificados a correlação entre a ligação e o tensionamento

conformacional da estrutura lipossomal é direta, resultando em maior conversão do azul para o vermelho.

No presente estudo, que trata de soros autoimunes reais (sem purificação), o tensionamento é resultante da ligação da IgG-específica com a cardiolipina e também da adsorção não específica de outros componentes do soro sobre a superfície dos lipossomas. Portanto, as interações são muito mais complexas, devendo-se considerar na análise, também os efeitos da interferência dos outros componentes, que se fazem presentes tanto na competição pela superfície na adsorção, quanto no estado de agregação dos soros em solução, ou também na formação dos complexos com o reconhecimento de múltiplas moléculas ao invés de um sítio particular na molécula da cardiolipina.

Neste contexto, no caso de soros autoimunes reais (sem purificação) não podemos inferir em uma relação direta entre a concentração de IgG-específica nos soros e o tensionamento da estrutura lipossomal. Caracterizações adicionais da adsorção competitiva dos componentes dos soros na superfície dos lipossomas, da estequiometria da ligação por métodos mais específicos e da conformação molecular dos lipossomas nos sítios polidiacetilênicos polimerizados, permitirão uma análise mais direta e precisa da relação entre o tensionamento da estrutura. Além das características da ligação, a coloração dos soros reais também é muito diferente dos soros purificados, mesmo para o SS. Todos os soros reais apresentam coloração amarelada, o que pode interferir na RC.

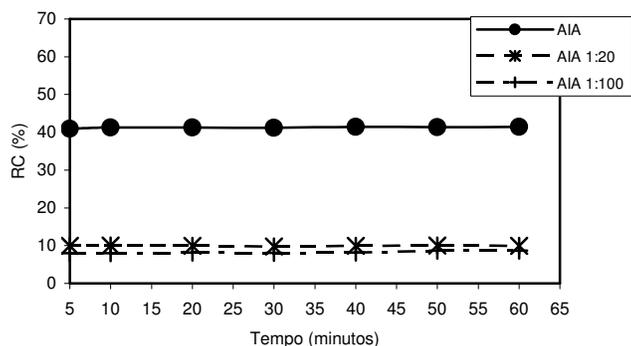
À essas considerações, adiciona-se que o reconhecimento de múltiplas moléculas de cardiolipina na ligação de anticorpos anticardiolipina inicialmente identificado por Costello and Green (1986), para a cardiolipina livre foi posteriormente confirmado por Pinho et al. 2008 para a cardiolipina na superfície de lipossomas magnéticos, e por Cabral (2000) para a cardiolipina na superfície de lipossomas polimerizados de mesma composição dos lipossomas usados no presente trabalho.

#### 5.4.1 Influência da diluição dos soros

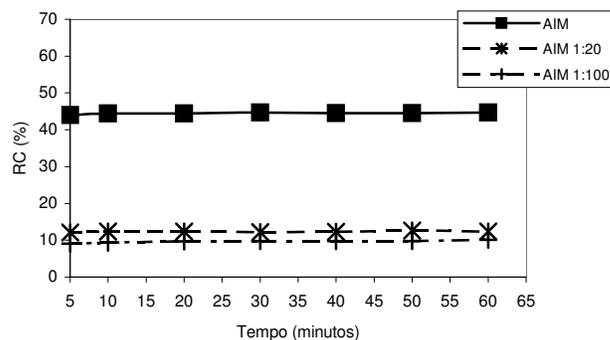
A influência da diluição na interação dos soros na interação com os lipossomas polimerizados contendo cardiolipina foi analisada, visando reduzir a interferência dos

componentes não específicos dos soros. Nos ensaios, os soros diluídos foram adicionados aos lipossomas 0,5 mM com 20% de cardioplipina que foram polimerizados por 5 minutos. Na Figura 5.12 são apresentadas as respostas colorimétricas (RC) obtidas para os soros em função das diluições 1:20 e 1:100, em comparação com os soros não diluídos.

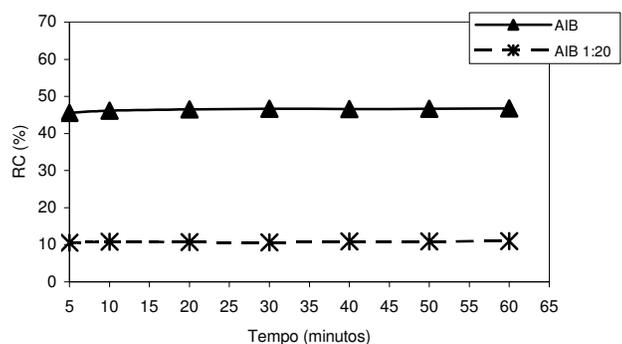
Em todos os casos a RC é instantânea ou resolvida nos 10 minutos iniciais, mantendo-se constante até 60 minutos. Observa-se também que a RC foi muito sensível à diluição para todos os soros, e que nos níveis de diluição 1:20 e 1:100 há uma forte redução para 10%, e as curvas se confundem para todos os soros.



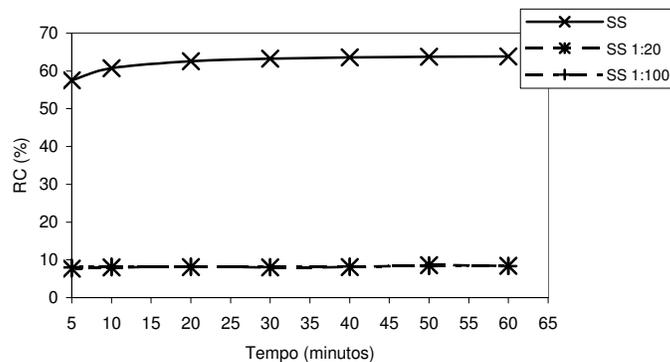
(A)



(B)



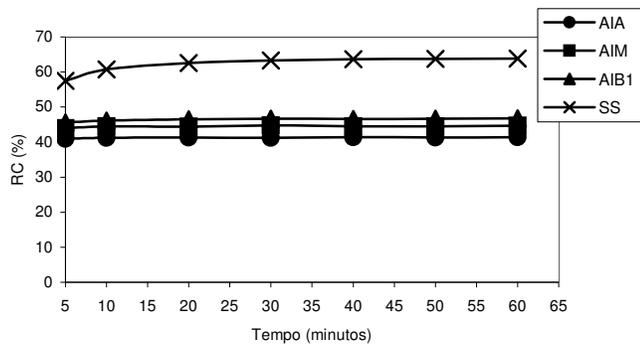
(C)



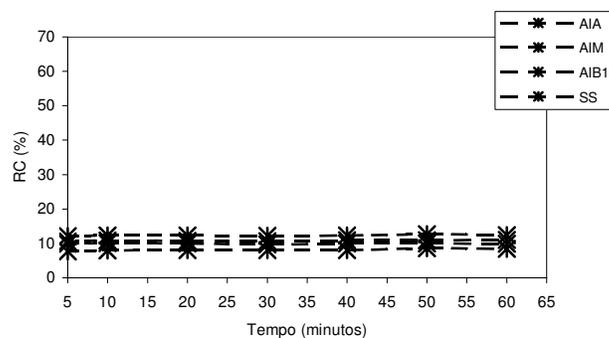
(D)

Figura 5.12: Respostas colorimétricas em função do tempo e da diluição dos soros para lipossomas polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardioplipina (A) AIA (B) AIM, (C) AIB (D) SS.

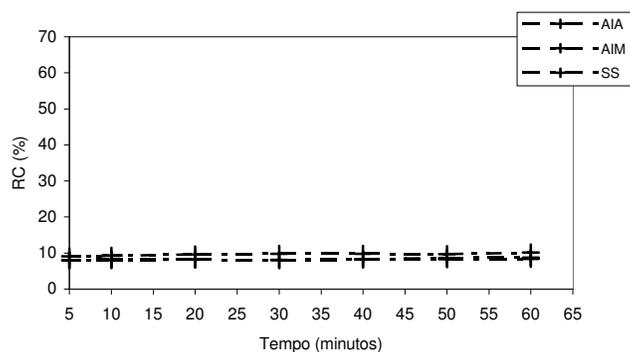
A Figura 5.13 ilustra conjuntamente as RCs dos vários soros e a perda da sensibilidade devido aos níveis elevados de diluição.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.13: Respostas colorimétricas em função do tempo e da diluição, para o ensaio com polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardioplipina. (A) Soros não diluídos, (B) Soros diluídos 1:20, (C) Soros diluídos 1:100.

A Figura 5.14 apresenta comparativamente para o soro AIB, os efeitos colorimétricos da diluição incluindo também as diluições 1:1 e 1:11. A Figura 5.14 (A) ilustra os perfis no azul e vermelho individualmente. Observa-se que os perfis no vermelho mostram o mesmo padrão de comportamento, crescendo inicialmente até atingir um patamar, para todas as diluições. Na região do patamar, a absorbância no vermelho foi maior para a diluição 1:1 comparada à absorbância do soro não diluído, demonstrando que a diluição reduz a interferência dos outros componentes do soro, intensificando a coloração decorrente da ligação específica. Para a absorbância no azul, o padrão de comportamento do perfil do soro diluído 1:1 diferencia-se dos demais perfis, por apresentar um crescimento inicial seguido de decaimento progressivo até um patamar, onde a absorbância tende a

estabilizar-se em um valor superior ao inicial, porém no mesmo nível do soro não diluído. Na diluição 1:11 o padrão dos perfis é igual ao dos soros sem diluição, porém com o perfil no azul superior ao no vermelho, o qual apresenta valores muito baixos de absorbância.

A Figura 5.14 (B) mostra a razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ . Todos seguem um mesmo padrão, com exceção do perfil para a diluição 1:1, cujo crescimento é gradativo, desenvolvendo-se em 60 minutos. Para a diluição 1:11 verifica-se a perda de sensibilidade, com razão baixa (menor que 1) entre as absorbâncias, semelhante à obtida para a diluição 1:20.

Estes resultados indicam que diluições acima de 1:11 incrementam a mudança de cor no vermelho em relação ao soro não diluído, demonstrando a nossa hipótese inicial de que a diluição é eficiente para a redução do efeito dos interferentes.

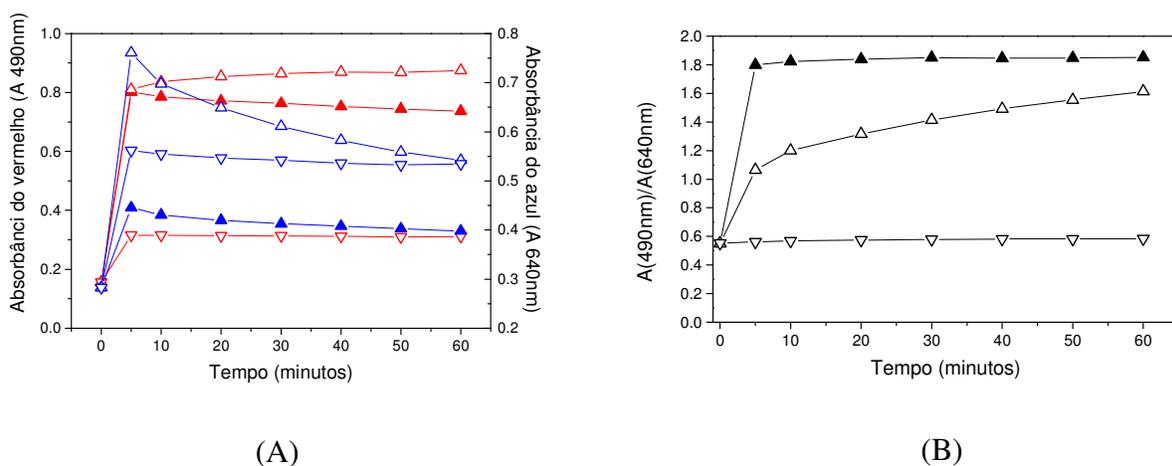


Figura 5.14: Evolução da coloração (A) Perfis individuais do azul e do vermelho. (B) Perfis  $A_{490}/A_{640}$  ( $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ ) para o soro AIB a varias diluições em função do tempo, para o ensaio com polimerizados durante 5 minutos (0,5 mM) contendo 20% de cardiolipina. Sem diluição  $\blacktriangle$ , diluição 1:1  $\triangle$ ; diluição 1:11  $\nabla$ .

#### 5.4.2 Estequiometria da interação

Para a análise da estequiometria da interação, torna-se necessário a determinação do parâmetro espectral,  $F_a$ , obtido no item 5.2.3, para as interações entre os soros e a cardiolipina livre.

Como  $F_a$  representa a fração de sítios ocupados em relação ao número total de sítios, nesse caso foi calculada pela razão entre a absorbância no vermelho e a soma das absorbâncias no vermelho e no azul, representando os sítios totais (Eq. 5.4).

$$F_a = A_v / (A_v + A_{az}) \quad (5.4)$$

Onde  $A_v$  é a absorbância no vermelho e  $A_{az}$  é a absorbância no azul

O comportamento da ocupação fracional dos sítios de ligação com relação à diluição, foi determinado somente para o AIB, devido à reduzida quantidade de dados com diluições.

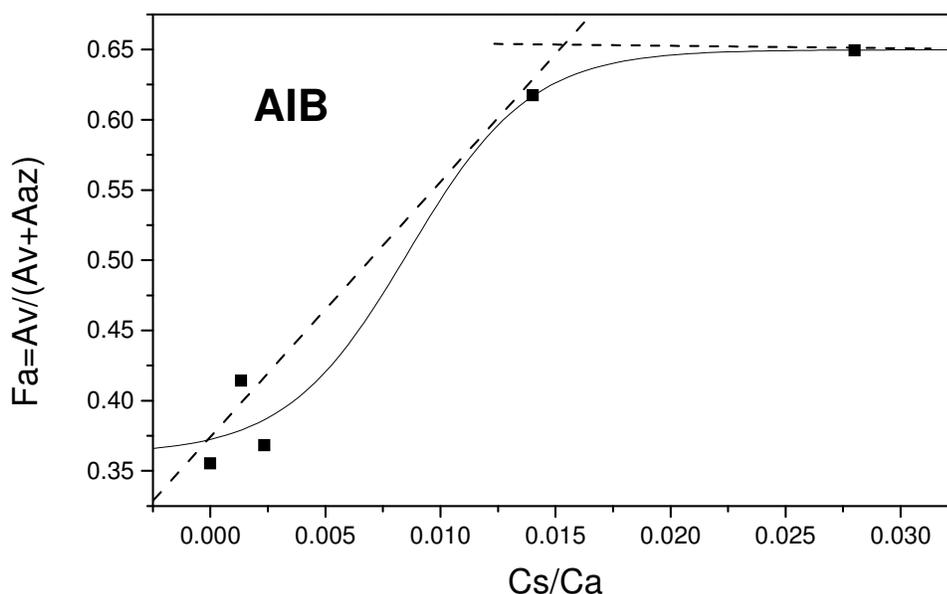


Figura 5.15: Variação do parâmetro espectral  $F_a$  (fração de sítios ocupados), com a diluição para o soro AIB.

Os resultados mostram que considerando os sinais colorimétricos no vermelho e azul, a fração de sítios ocupados passa por um máximo na diluição próxima 1:1, correspondendo à estequiometria da ligação. A condição estequiométrica representa a situação de maior sinal colorimétrico, onde os efeitos dos interferentes do soro são reduzidos em relação ao soro sem diluição, mantendo a sensibilidade de mudança de cor do sistema.

Comparando os parâmetros RC e razão molar de IgG-específica por mmol de cardioplipina, na situação AIB 1:1, com os valores reportados por Cabral (2000), no máximo desenvolvimento de sinal colorimétrico, para lipossomas polimerizados de mesma composição e soro de referência (soro autoimune purificado e concentrado em IgG-específica), tem-se que: para o soro de referência, com concentração de IgG-específica 10U/mL, e IgG total 0,5 mg/mL, a RC estequiométrica, ou na saturação foi 70%, correspondendo à relação de  $47 \times 10^3$  U/mmol de cardioplipina. No caso do soro AIB do presente trabalho, com concentração de IgG-específica 14U/mL e IgG total 17 mg/mL, a RC na saturação foi 45% (considerando a diluição 1:1), o que corresponde à relação  $23 \times 10^3$  U/mmol de cardioplipina. Portanto, em soros autoimunes reais com concentração semelhante de IgG-específica, a RC é reduzida em relação ao soro de referência, porém, também correlaciona-se diretamente com a quantidade de IgG-específica ligada /mol de cardioplipina. Para a ligação com “pool” de soros autoimune usado por Cabral (2000), com concentração de IgG-específica 80 U/mL e IgG total 160 mg/mL, foi obtida uma RC de 40% com uma relação de aproximadamente  $80 \times 10^3$  U/mmol de cardioplipina. Comparando-se as razões entre as concentrações de IgG-específica ( $(80\text{U/mL})/(14\text{U/mL}) = 5,7$ ) e IgG-específica/mmol de cardioplipina ao final da interação ( $(80 \times 10^3 \text{ U/mmol cardioplipina}) / (23 \times 10^3 \text{ U/mmol de cardioplipina}) = 3,47$ ), o resultado sugere uma boa proporcionalidade, demonstrando a especificidade da ligação na cardioplipina localizada na superfície dos lipossomas: e a relação IgG-específica/mmol de cardioplipina

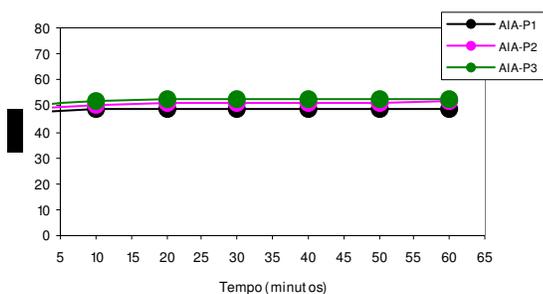
A interação com lipossomas polimerizados, por produzir um sinal colorimétrico mais intenso, que identifica melhor a ligação do que simplesmente a medida da absorbância das dispersões a 410nm, como foi feito para a interação dos soros com a cardioplipina livre, justifica os resultados obtidos para o sistema livre. Sendo a quantidade de IgG-específica ligada menor para soros autoimunes, necessita-se de muito maior concentração de IgG-específica para a saturação, quanto maior for a concentração de IgG-específica nos soros.

Com relação às ligações não específicas, Cabral (2000) obteve RC aproximadamente zero usando IgG-inespecífica (Sandoz, Suíça). O SS no mesmo trabalho, apresentou RC muito maior que zero (aprox. 50%), o que mostra a maior adsorção do soro sadio, mesmo com concentração muito especificade IgG-específica. No mesmo trabalho, a RC do SS foi maior que a RC do soro autoimune, concordando com os resultados do presente trabalho.

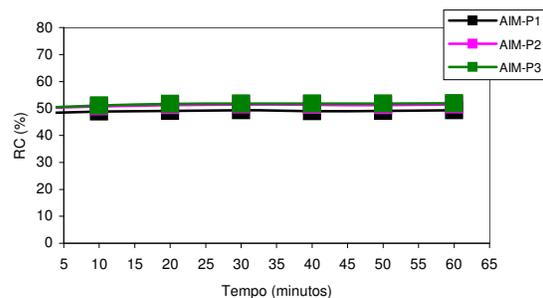
### 5.4.3. Influência do tempo de polimerização dos lipossomas

A influência do tempo de polimerização dos lipossomas no sinal colorimétrico é apresentada na Figura 5.16. Os lipossomas foram polimerizados por 5 minutos (P1), 10 minutos (P2) e 20 minutos (P3) e submetidos à interação com os soros (A) AIA, (B) AIM, (C) AIB e (D) SS. Este ensaio teve por intuito avaliar a possível melhoria da sensibilidade dos sinais colorimétricos com o aumento da polimerização dos lipossomas. Observa-se que para os diversos soros há muito pouca variação (menor que 20%) na intensidade da resposta colorimétrica com o grau de polimerização.

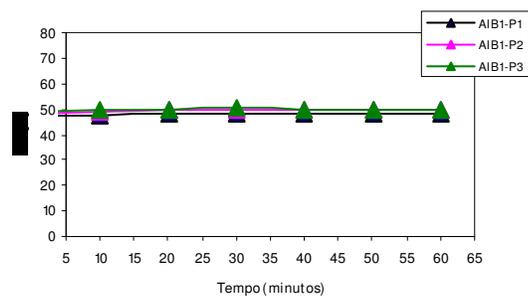
Os sinais colorimétricos obtidos são apresentados na Figura 4.16 em termos de RC e na Figura 4.17 em termos da razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ .



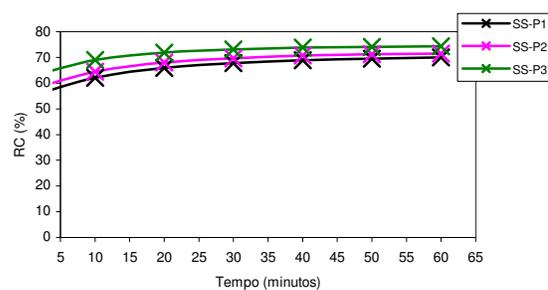
(A)



(B)

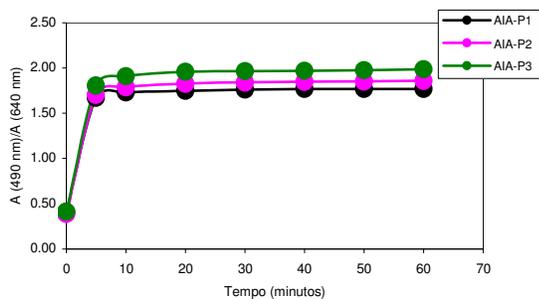


(C)

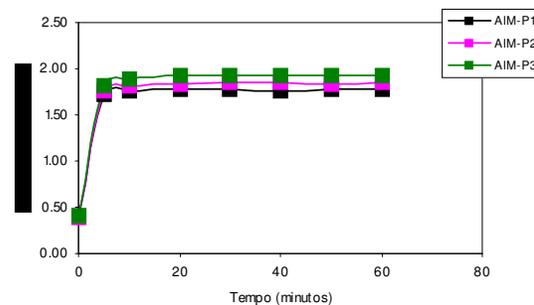


(D)

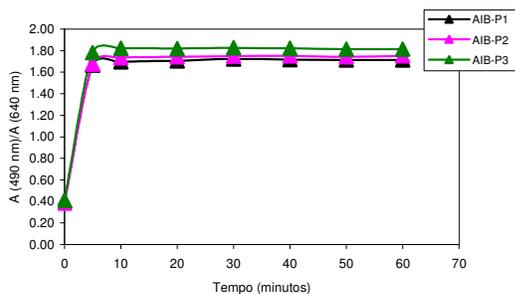
Figura 5.16: Respostas colorimétricas em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 20% de cardiolipina polimerizados por 5 minutos (P1), 10 minutos (P2) e 20 minutos (P3). (A) AIA nas diversas polimerizações, (B) AIM nas diversas polimerizações, (C) AIB1 nas diversas polimerizações, (D) SS nas diversas polimerizações.



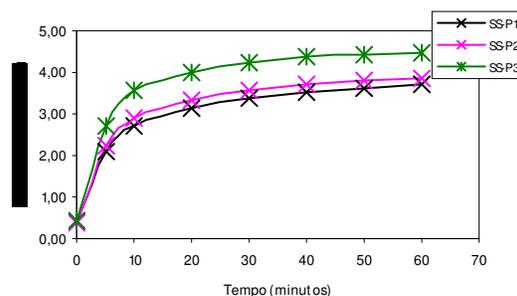
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 5.17: Evolução da razão Vermelha/Azul em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 20% de cardiolipina polimerizados por 5 minutos (P1), 10 minutos (P2) e 20 minutos (P3). (A) AIA nas diversas polimerizações, (B) AIM nas diversas polimerizações, (C) AIB nas diversas polimerizações, (D) SS nas diversas polimerizações.

Observa-se nas Figuras 5.16 e 5.17 que o aumento do grau de polimerização conduziu a um aumento sutil nos sinais colorimétricos para os soros autoimunes. Os maiores efeitos foram observados para o SS, demonstrando maior capacidade de desenvolvimento do sinal colorimétrico na estrutura lipossomal. A razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$  para o SS ao final da adsorção foi 1,4 vezes maior quando o tempo de polimerização passou de 5 minutos (P1) a 20 minutos (P3).

#### 5.4.4. Influência da concentração de cardioplipina nos lipossomas

A Figura 5.18 (A) apresenta os perfis de RC para adição dos soros aos lipossomas com 30% de cardioplipina. Observa-se que as RCs são menores que as obtidas com lipossomas contendo 20% de cardioplipina para todos os soros (Figura 5.18 (B)). Analisando-se a razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$ , podemos notar comportamento semelhante à RC, para todos os soros, como já esperado.

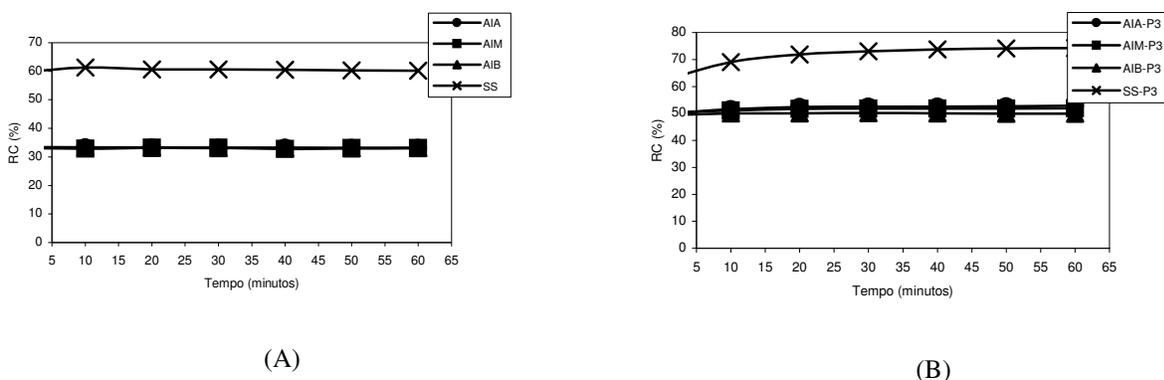


Figura 5.18: Respostas colorimétricas em função do tempo. (A) Ensaio com lipossomas contendo 30% de cardioplipina e polimerização de 40 minutos. (B) Ensaio com lipossomas contendo 20% de cardioplipina e polimerização de 20 minutos.

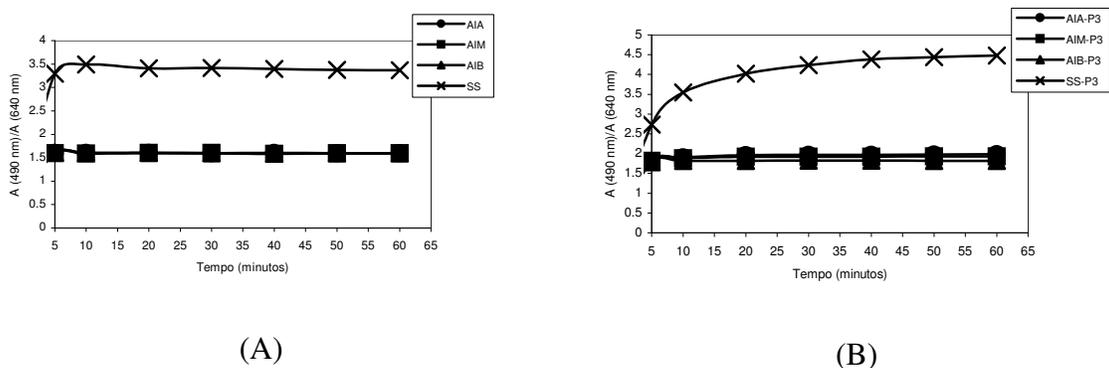


Figura 5.19: Evolução da razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$  em função do tempo. (A) Ensaio com lipossomas contendo 30% de cardioplipina e polimerização de 40 minutos. (B) Ensaio com lipossomas contendo 20% de cardioplipina e polimerização de 20 minutos.

A menor intensidade de sinal colorimétrico no vermelho pode ser explicada pela maior interferência da cardioplipina no tensionamento das insaturações, como foi observado na polimerização, onde as intensidades de cor obtidas no azul e no vermelho foram bem inferiores à da cardioplipina à concentração de 20% em lipossomas polimerizados (Figura 5.10).

## 5.5 INTERAÇÃO ENTRE OS SOROS PURIFICADOS E OS LIPOSSOMAS POLIMERIZADOS CONTENDO CARDIOLIPINA

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção da IgG-específica foi utilizada a estratégia de purificação da IgG dos soros autoimunes e sadio antes dos ensaios de adsorção.

### 5.5.1 Verificação do desempenho relativo ao gel de agarose-proteína G na purificação dos soros

Com o objetivo de determinar a capacidade e a seletividade do gel Agarose-proteína G em adsorver IgG a partir do soro humano, foi realizado um ensaio cromatográfico tendo-se fosfato de sódio a 20 mM pH 7,4 como tampão de equilíbrio. O perfil cromatográfico obtido no ensaio foi caracterizado por dois picos de tamanhos bem diferenciados.

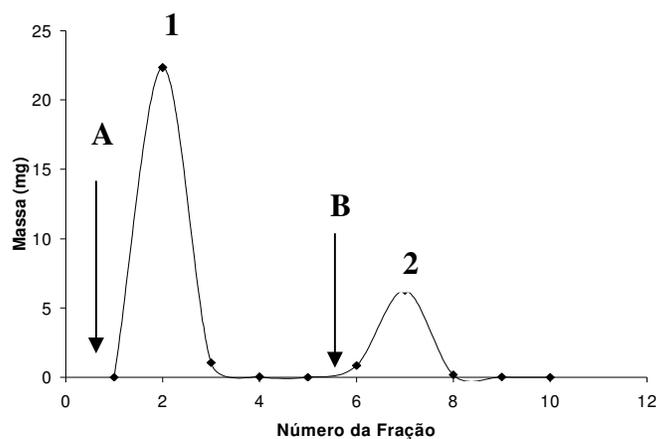


Figura 5.20: Perfil cromatográfico de soro humano sadio em gel de Agarose-proteína G com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. Injeção de 0,67 mL de soro humano sadio diluído na proporção de 1:2 em tampão de adsorção. Tampão de adsorção, Fosfato de sódio 20 mM pH7,4. Solução de dessorção; Ácido cítrico 100 mM pH 2,6. Volume das frações de adsorção: 6,0 mL. Volume das frações de eluição: 4,6 mL. Volume do leito: 2,0 mL. Os picos 1 e 2 indicam os picos de proteína obtidos. As setas indicam início das etapas de lavagem (A) e eluição (B).

As frações de lavagem e eluição foram agrupadas e analisadas através de eletroforese SDS-PAGE sob condições desnaturantes e não redutoras, cujo resultado está apresentado na Figura 5.21. As faixas 3 e 4, referentes as frações de lavagem são compostas majoritariamente de impurezas com pouca IgG. Analisando-se as faixas 5 e 6, que correspondem as frações de eluição a pH 2,6, nota-se que foi adsorvido grandes quantidades de IgG e provavelmente IgM (proteína que ficou retida no início do gel).

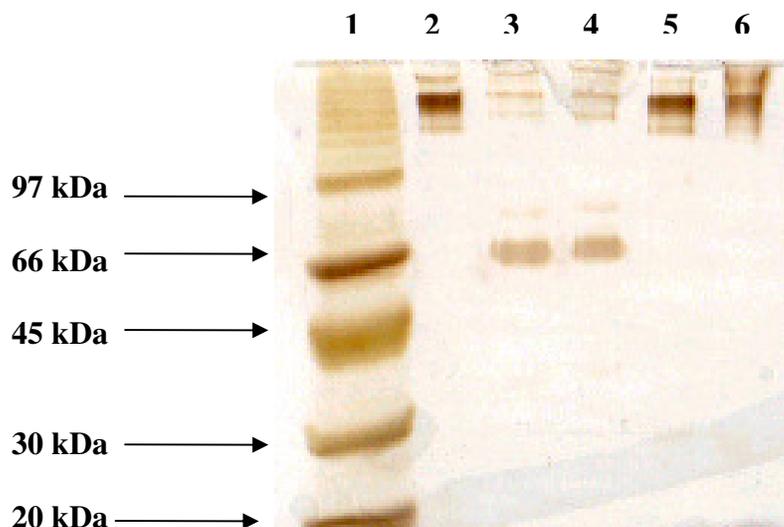


Figura 5.21: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% de cromatografia de soro humano sadio em gel de Agarose-proteína G. Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas sob condições desnaturantes e não-redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (fosforilase b, 97 kDa; albumina, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa); Faixa 2: IgG comercial Aventis (Alemanha); Faixa 3: Fração da lavagem 1 (referente a fração da lavagem coletada no tubo de ensaio codificado com o número 1); Faixa 4: Fração da lavagem 2 (referente a fração da lavagem coletada no tubo de ensaio codificado com o número 2); Faixa 5: Fração de eluição 6 (referente a fração de eluição coletada no tubo de ensaio codificado com o número 6); Faixa 6: Fração de eluição 7 (referente a fração de eluição coletada no tubo de ensaio codificado com o número 7).

As frações de injeção, lavagem e eluição da cromatografica realizada com soro humano sadio também foram analisadas pelo método de Bradford (para dosagem de proteína total) e por nefelometria (para dosagem de IgG, IgA e IgM). Os balanços de massa são apresentados na Tabela 5.10. Observa-se que o gel Agarose-proteína G apresenta alta capacidade de adsorção de IgG (praticamente toda IgG injetada foi adsorvida no gel) e adsorve, em menor quantidade, IgM e IgA. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o gel Agarose-proteína G é adequado para a purificação dos soros uma vez que os autoanticorpos produzidos durante a resposta imune pertencem, principalmente às classes de imunoglobulinas G, M e A (FERREIRA E ÁVILA, 1996).

Tabela 5.10: Balanço de massa para proteína total, IgA, IgG e IgM da cromatografia em gel Agarose-proteína G.

	Alimentação		Lavagem		Eluição		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Proteína total	30,5	100,0	23,4	76,7	7,3	23,9	30,7	100,6
IgA	1,94	100,00	1,50	77,32	0,18	9,28	1,68	86,60
IgG	9,00	100,00	< 0,05	-	8,10	90	≅ 8,10	90
IgM	0,93	100,00	0,63	67,74	0,47	50,54	1,10	118,26

Após os ensaios cromatográficos confirmarem a excelente adsorção seletiva da IgG por parte do sistema agarose-proteína G, fez-se as purificações dos soros em eppendorfs (2,0 mL) com 100, 200 e 600 µL do mesmo gel. Na Tabela 5.11 temos a dosagem dos níveis de IgG totais dos soros nas frações de eluição obtidas após purificação com diferentes quantidades de gel agarose-proteína G. Não foi possível se analisar os níveis de IgG-específica dos mesmos já que as concentrações de anticorpos anti-cardiolipina eram obtidas através dos experimentos realizados no kit varelisa. Conforme procedimento já descrito no item materiais e métodos, o varelisa baseia os seus procedimentos considerando-se soro intacto, sem passagem por lavagens e eluições, etapas

concernentes ao processo de purificação. Por isso, resultados das concentrações de IgG-específica oriundos da aplicação dos soros purificados ao kit varelista poderiam não ser confiáveis, explicando assim o fato de não ter sido obtidos os mesmos valores para este trabalho.

Tabela 5.11: Concentração de IgG total dos soros nas frações de eluição obtidas após a purificação com diferentes quantidades de gel Agarose

<b>Soros</b>	<b>Quantidade de gel (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>IgG (mg/mL)</b>
AIA	100	0,63
AIM	100	0,70
AIB1	100	0,75
SS	100	0,95
AIA	200	0,92
AIM	200	0,81
AIB1	200	2,22
SS	200	0,61
AIA	600	1,91
AIM	600	1,62
AIB1	600	2,40
SS	600	1,37

#### 5.5.2. Influência da concentração de IgG no soro purificado na interação com lipossomas polimerizados

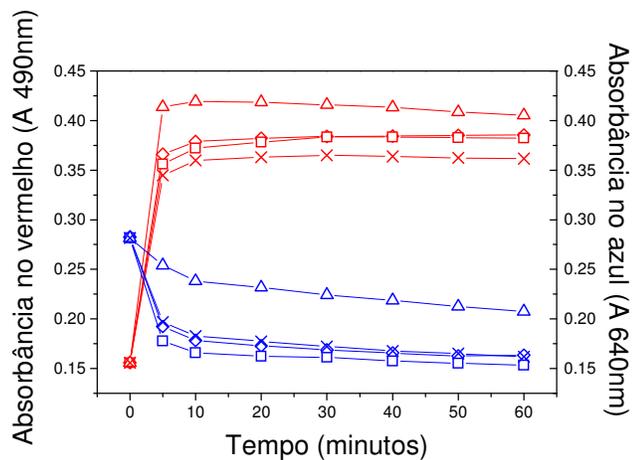
Com o intuito de avaliar o efeito de possíveis interferentes presentes nos soros que pudessem estar adsorvendo não especificamente na cardiolipina presente nos lipossomas polimerizados, foram purificados AIA, AIM, AIB e SS de acordo com os procedimentos explicitados no item 4.2.4.2 dos materiais e métodos e os resultados em termos de IgG total são mostrados na Tabela 5.11. Estes soros purificados, bem como os não purificados, foram adicionados aos lipossomas polimerizados por 40 minutos contendo 30% de cardiolipina. Os ensaios para os soros purificados foram conduzidos sob as mesmas condições que a dos não purificados e analisados em função das absorbâncias no vermelho (490 nm) e no azul (640 nm), da razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$  e da resposta colorimétrica RC, em função do tempo (Figuras 5.22 a 5.24).

Analisando-se a Figura 5.22, obtidas para lipossomas com 30% de cardiolipina, observa-se que a purificação muda o padrão de resposta da absorbância no azul para os soros autoimunes, em

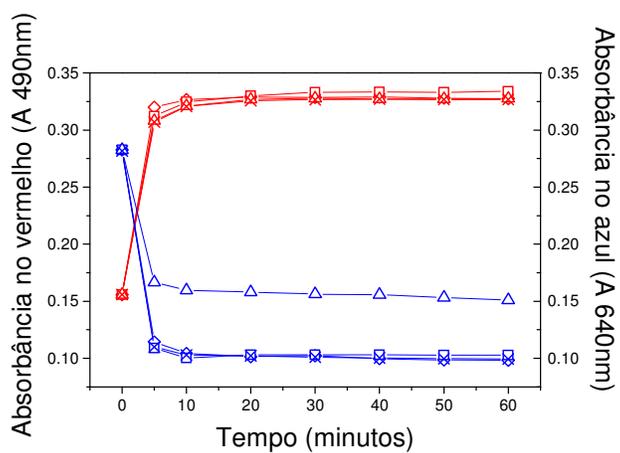
relação ao padrão de resposta dos soros não purificados, apresentando-se igual ao do SS. A purificação não altera o padrão de resposta da absorbância no vermelho. Como esperado, a intensidade de cor no vermelho é maior para os soros purificados com 600 microlitros de gel agarose-proteína G, seguido dos purificados com 200 microlitros do mesmo gel. A razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$  (Figura 5.23) mostra que para AIA e AIM as razões são maiores que para os mesmos soros sem purificação. Para AIB essa diferença só é observada quando a purificação é feita com 600 microlitros de gel agarose-proteína G. Para o SS o perfil do soro sem purificação iguala-se ao do SS purificado com 600 microlitros de gel agarose-proteína G.

A Figura 5.24 mostra as RCs dos soros autoimunes purificados também apresentam diferenças significativas em relação aos não purificados. Para os soros autoimunes a purificação com 600 microlitros de gel agarose-proteína G elevou as RCs para 50% (aprox.), enquanto que as RCs dos soros não purificados situou-se em torno de 40%. Esse efeito é resultante da mudança do padrão anteriormente caracterizado, da absorbância no azul. No caso do SS a purificação com 600 microlitros de gel agarose-proteína G resultou no mesmo nível de RC (60%), que o soro não purificado. Para a purificação com 200 microlitros de gel agarose-proteína G, não houve aumento expressivo dos sinais dos soros purificados em relação aos não purificados, devido à maior diluição na purificação.

Este conjunto de resultados mostra que a purificação com gel agarose-proteína G é promissora para eliminação dos interferentes nos soros autoimunes e elevar a RC. No entanto, observa-se que as purificações realizadas no presente trabalho diluíram muito os soros, reduzindo de cerca de sete vezes a IgG total em relação aos soros não purificados (Tabelas 5.2 e 5.11). Nessa condição, a discriminação colorimétrica em relação ao SS fica ainda mais dificultada.



(A)



(B)

Figura 5.22: Evolução da coloração em termos dos perfis de absorbância do vermelho e do azul para soros purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G (A) e com 600 microlitros de agarose-proteína G (B) sem diluição em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 30% de cardioplipina polimerizados por 40 minutos, onde:  $\diamond$  AIA,  $\square$  AIM,  $\Delta$  AIB e X SS (azul-absorbância no azul e vermelho-absorbância no vermelho respectivamente).

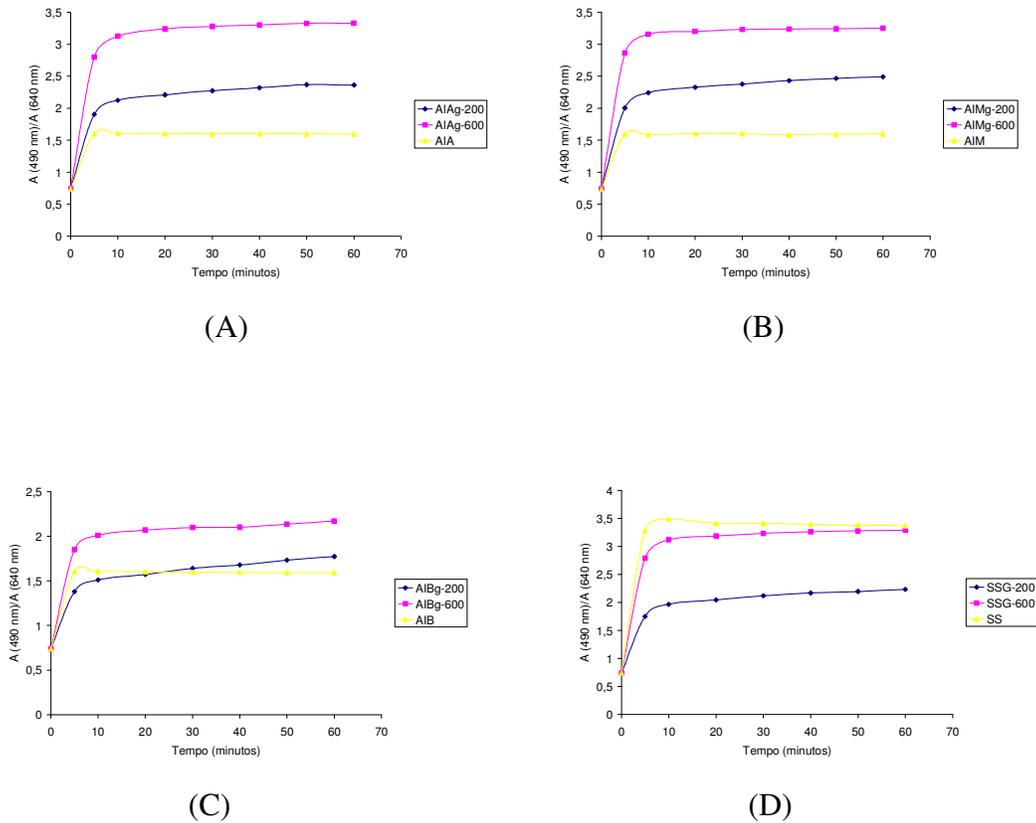


Figura 5.23: Curvas contendo as razões Vermelha/Azul em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 30% de cardiolipina polimerizados por 40 minutos. AIAG 200 = soro autoimune de alta concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIAG 600 = soro autoimune de alta concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 200 = soro autoimune de média concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 600 = soro autoimune de média concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 200 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 600 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; SSG 200 = soro sadio purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; SSG 600 = soro sadio purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G. (A) AIA sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (B) AIM sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (C) AIB sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (D) SS sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G.

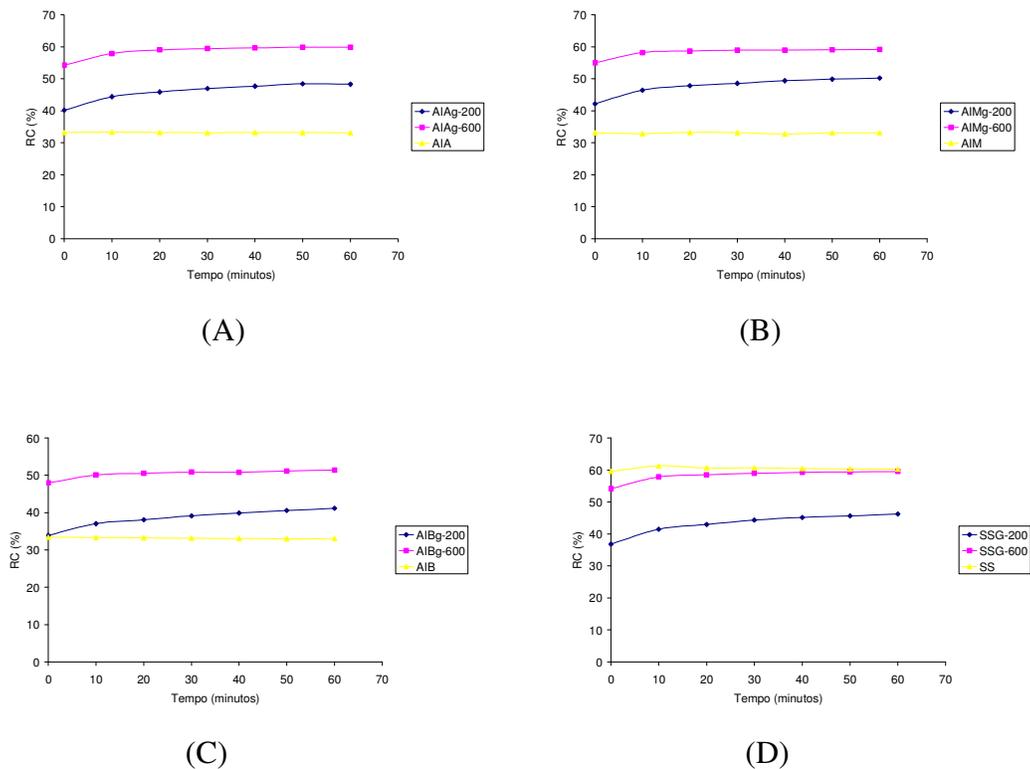


Figura 5.24: Curvas contendo as respostas colorimétricas em função do tempo, para o ensaio com lipossomas contendo 30% de cardiolipina polimerizados por 40 minutos. AIAG 200 = soro autoimune de alta concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIAG 600 = soro autoimune de alta concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 200 = soro autoimune de média concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIMG 600 = soro autoimune de média concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 200 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; AIB1G 600 = soro autoimune de baixa concentração purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G; SSG 200 = soro sadio purificado com 200 microlitros de agarose-proteína G; SSG 600 = soro sadio purificado com 600 microlitros de agarose-proteína G. (A) AIA sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (B) AIM sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (C) AIB sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G. (D) SS sem purificação e purificado com 200 e 600 microlitros de agarose-proteína G.

### 5.5.3 Influência da concentração de cardioplipina nos lipossomas

Para a análise do efeito da concentração de cardioplipina nos lipossomas, foram feitos ensaios com os soros purificados com 200 microlitros de gel agarose-proteína G e que foram adicionados aos lipossomas contendo 20% de cardioplipina polimerizados por 30 minutos. Os resultados em termos da razão de absorbâncias Vermelha/Azul são apresentados na Figura 5.25, juntamente com os resultados obtidos através da adição dos soros purificados aos lipossomas com 30% de cardioplipina polimerizados por 40 minutos. Para os soros autoimunes, observa-se um aumento no sinal relativo a razão Vermelha/Azul pela adição dos mesmos aos lipossomas com 30% de cardioplipina em relação aos sinais das mesmas adições feitas aos lipossomas com 20% de cardioplipina. Esta não é a tendência para o SS que apresenta maior sinal da razão Vermelha/Azul quando adicionado aos lipossomas contendo 20% de cardioplipina.

Portanto, a purificação com 200 microlitros de proteína G em lipossomas polimerizados com 20% de cardioplipina discriminou expressivamente o SS em relação aos soros autoimunes, para lipossomas com 20% de cardioplipina. Esse resultado explica-se devido à maior sensibilidade estrutural dos lipossomas com 20% de cardioplipina em relação à mudança de cor devido às mudanças ambientais, como verificado anteriormente nas curvas de polimerização.

Ensaio futuros devem ser realizados para otimização do sinal colorimétrico com purificações na região de 200 microlitros de gel de proteína G, e em sistema de purificação que resulte em menor diluição dos soros.

Dentro deste contexto, conclui-se que a purificação dos soros representa uma estratégia valiosa para a discriminação entre os soros saudáveis e autoimunes.

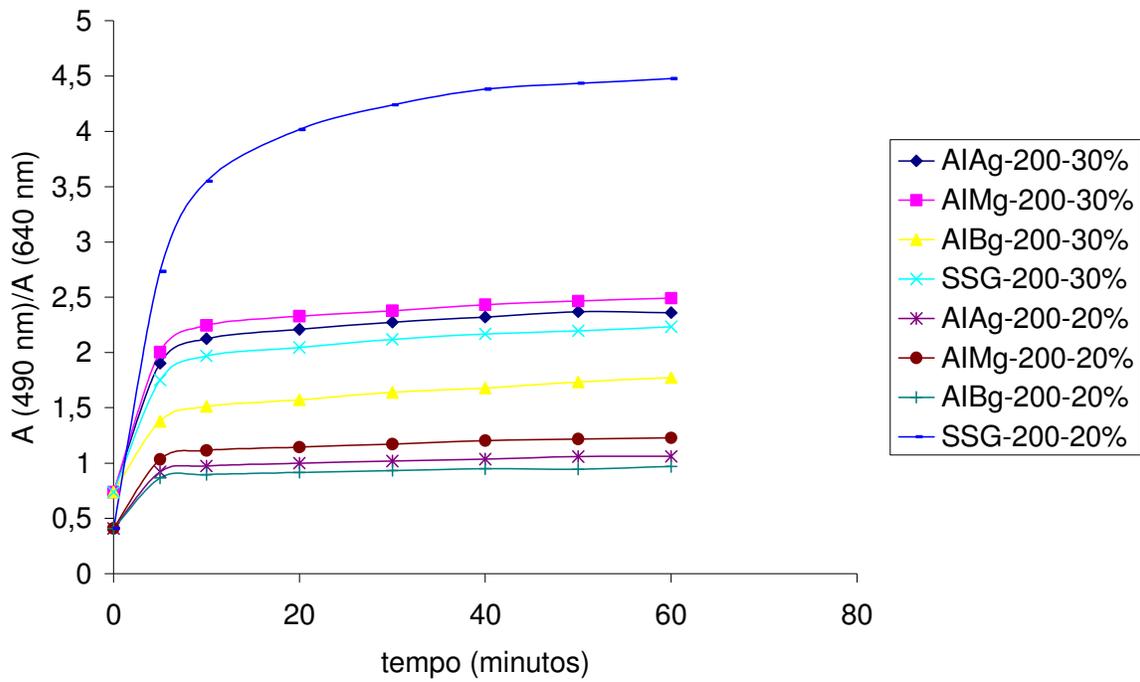


Figura 5.25: Curvas contendo as razões Avermelho/Azul em função do tempo para os soros purificados com 200 microlitros de gel agarose-proteína G, adicionados aos lipossomas contendo 20% e 30% de cardiolipina

## 5.6 DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO

Para a aplicação mais ampla dos lipossomas polimerizados no diagnóstico de doenças auto-imunes, é necessário que, além da discriminação das interações em termos da leitura de absorbâncias, haja também uma discriminação das interações dos soros com relação à cor vista a “olho nu”. Essa característica permitirá uma primeira seleção dos soros de pacientes com doenças auto-imunes em relação aos soros sadios. Em uma segunda etapa, somente os soros classificados como de pacientes com doenças auto-imunes deverão ser investigados com maior detalhe, tornando o primeiro diagnóstico mais rápido e de menor custo. Nesse contexto, serão apresentadas neste item, a visualização colorimétrica a “olho nu”, dos ensaios anteriormente analisados em termos de absorbância no vermelho.

### 5.6.1 Influência da diluição dos soros

Na Figura 5.26 é apresentada uma fotografia da placa de polietileno com a especificação das condições em cada poço, mostrando as diferentes colorações obtidas no ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados e soros purificados e não purificados. Nesse caso, foi também usada solução de imunoglobulina comercial como controle negativo, ou de adsorção inespecífica. Adicionalmente foram também usados os controles positivo e negativo do kit Varelista.

Observa-se na placa, que a resposta colorimétrica é visível a olho nu somente para os soros não diluídos e sadio. Nesse caso há o aparecimento de coloração rosa claro, para os soros não purificados, rosa púrpura de baixa intensidade para os soros purificados e não diluídos, e a coloração azul púrpura para o controle positivo do kit Varelista. O soro sadio não diluído, apesar de límpido apresentou viragem com coloração amarelada, semelhante aos soros autoimunes, embora esses últimos apresentem-se turvos. Nas diluições 1/20 e 1/100 praticamente não se observam mudanças na coloração das soluções.

Relacionando estes resultados com os perfis de sinais colorimétricos do capítulo anterior, tem-se que para os soros sem diluição, embora haja distinção entre as RCs dos soros SS e autoimunes, essa diferença não é perceptível a olho nu.

Na Figura 5.27 é mostrada comparativamente uma montagem com a fotografia da placa da Figura 5.26 onde se estudou a influência da diluição e a fotografia das três últimas

fileiras da placa da Figura 5.28, onde se estudou a influência do tempo de polimerização, onde se usou a diluição 1:1. O mapa das placas que acompanha a figura identifica a condição usada em cada ensaio.

Observa-se que, conforme já comentado neste item, as diluições 1:20 e 1:100 não permitiram de forma considerável uma detecção visual de mudança de cor. Os soros não diluídos e não purificados demonstraram uma mudança de cor do azul para o tom amarelo, dificultando a sua discriminação visual. No entanto, para o soro AIB diluído 1:1, pode-se observar nitidamente um tom vermelho mais intenso, desejável para o ensaio colorimétrico. Um fato importante a ser citado neste caso é o da boa sensibilidade do método que consegue discriminar para um soro autoimune com baixa concentração de IgG-específica (AIB) e permite uma boa visualização da mudança de cor do sistema passando da região do azul para a região do vermelho. Esses resultados mostram também que a viragem de cor para o vermelho permite melhor discriminação entre os soros auto-ímmunes e o soro sadio (Figura 5.27 B). Portanto, a diluição dos soros é fator preponderante na visualização diferenciada das respostas colorimétricas a olho nu, e a faixa de diluição mais adequada é a de pequena diluição, tal como 1:1.

Esses resultados indicam que diluições acima de 1:10 devem ser investigadas em trabalhos futuros, para otimização do sinal colorimétrico.

Relacionando com os perfis dos sinais colorimétricos do capítulo anterior, tem-se que essa diferenciação na cor já tinha sido identificada através das mudanças percentuais da razão  $A_{\text{vermelho}}/A_{\text{azul}}$  ao final da adsorção, em relação à mesma razão inicial.

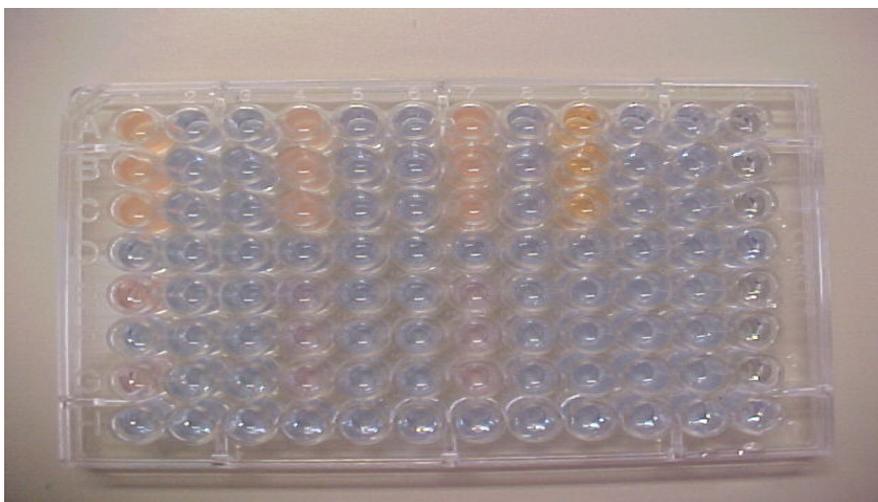
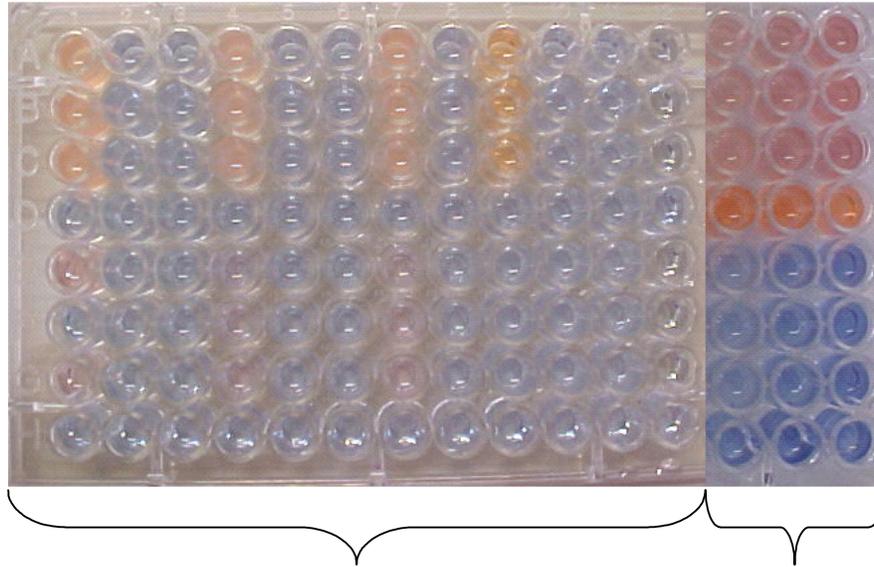


Figura 5.26: Fotografia da placa de polietileno com o ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 minutos. Abaixo é apresentado o mapa da placa com as condições usadas em cada poço. As siglas AI são dos soros autoimunes de alta (AIA), média (AIM) e baixas (AIB1, AIB2) concentrações de IgG-específica. Quando terminadas com G as siglas designam os soros purificados, e as outras os sem purificação. SS é o soro sadio, C+ C- são os controles positivo e negativo do kit Varelista; 1/20 e 1/100 são as diluições dos soros. B é o branco (ausência de soro). Soros purificados com 100  $\mu$ L de proteína G. Mapa da placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C +
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
B	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C +
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
C	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
D	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	IgGF	IgGF	IgGF	C -
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
E	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	IgGF	IgGF	IgGF	C -
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
F	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	IgGF	IgGF	IgGF	C -
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
G	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100	
H												



(A)

(B)

Figura 5.27: Fotografia das placas de polietileno (A) Ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 minutos, (B) Parte da placa de polietileno do ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 (P1), 10 (P2) e 20 minutos (P3). Mapa das placas:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	10	11	12
A	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C+	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		P1	P2	P3
	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C+	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
B		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		P1	P2	P3
	AIM	AIM	AIM	AIA	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	C+	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
C		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		P1	P2	P3
	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	SS P3	SS P3	SS P3
D	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	C-	AIB2	AIB2	AIB2
		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	C-	AIB2	AIB2	AIB2
E		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	C-	AIB2	AIB2	AIB2
F		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	I <sub>2</sub> GF	C-	AIB2	AIB2	AIB2
G		1/20	1/100		1/20	1/100		1/20		1/20	1/100		1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	SSG P2	SSG P3	SSG P3
H															

### 5.6.2. Influência do tempo de polimerização dos lipossomas

Pode-se observar que nesse caso houve viragem do azul para o tom amarelado, para os soros não purificados. Ressalta-se novamente a interferência da turbidez dos soros na RC. A coloração correspondente ao soro sadio no ensaio também foi novamente amarelada. Para os soros purificados houve mudança de cor para o azul púrpura. Nesse caso a purificação foi feita com 200 $\mu$ L de gel de Agarose-proteína G, visando obter uma maior concentração de autoanticorpos. Em todos os casos a intensidade das cores aumentou significativamente com o grau de polimerização dos lipossomas. No canto direito superior da placa, a coloração rosa púrpura que aparece é devido à diluição do soro AIB 1/1.

Estes resultados mostram que, a redução das interferências dos demais componentes do soro, quer através de diluição ou purificação, traz benefícios ao desenvolvimento da cor e detecção a “olho nu”. No entanto altas diluições, maiores que 1:10, não promovem a viragem da cor para o rosa ou vermelho, permanecendo no azul para os soros não purificados, e no púrpura para os soros purificados.

O tempo de polimerização não discriminou adequadamente o SS dos soros autoimunes reais ou purificados.

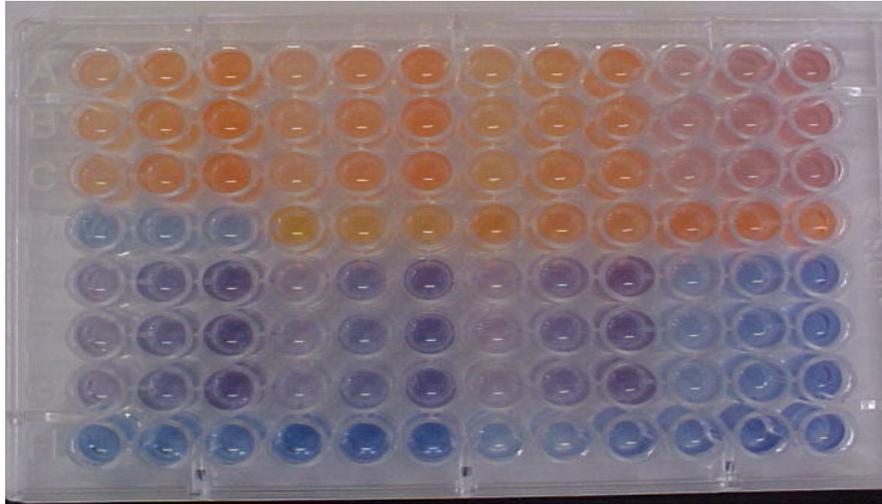


Figura 5.28: Fotografia da placa de polietileno com o ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (80%) e cardiolipina (20%), polimerizados com radiação UV por 5 (P1), 10 (P2) e 20 minutos (P3). Abaixo é apresentado o mapa da placa com as condições usadas em cada poço. As siglas são as mesmas descritas na Figura 4.7. Os números 1/1 e 1/11 significam diluições.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AIM P1	AIM P2	AIM P3	AIA P1	AIA P2	AIA P3	AIB1 P1	AIB1 P2	AIB1 P3	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
A	AIM P1	AIM P2	AIM P3	AIA P1	AIA P2	AIA P3	AIB1 P1	AIB1 P2	AIB1 P3	P1	P2	P3
B	AIM P1	AIM P2	AIM P3	AIA P1	AIA P2	AIA P3	AIB1 P1	AIB1 P2	AIB1 P3	AIB2 1/1	AIB2 1/1	AIB2 1/1
C	B P1	B P1	B P1	SS P1	SS P1	SS P1	SS P2	SS P2	SS P2	P1	P2	P3
D	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB2	AIB2	AIB2
E	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
F	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB2	AIB2	AIB2
G	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	1/11 P1	1/11 P2	1/11 P3
H	B P2	B P2	B P2	B P3	B P3	B P3	SSG P1	SSG P1	SSG P2	SSG P2	SSG P3	SSG P3

### 5.6.3. Influência da concentração de IgG no soro purificado

As mudanças de cor decorrentes do ensaio colorimétrico para avaliação da influência da concentração de IgG nos soros, foram feitos utilizando soros purificados com 200 e 600 $\mu$ L de gel de agarose-proteína G . Os resultados são mostradas na Figura 5.29. Neste caso o ensaio foi feito com lipossomas contendo 30% de cardiolipina. Pode-se observar que em todos os casos as colorações tendem para o rosa mais escuro com maior intensidade. A coloração do ensaio com soro sadio foi semelhante à dos autoimunes, tanto sem purificação quanto com purificação.

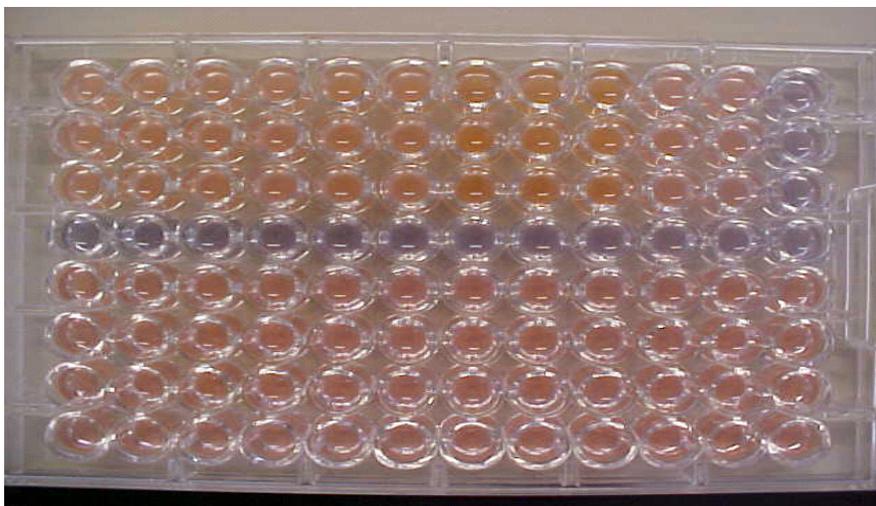


Figura 5.29: Fotografia da placa de polietileno com o ensaio colorimétrico usando lipossomas polimerizados compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico (70%) e cardiolipina (30%), polimerizados com radiação UV por 40 minutos. Abaixo é apresentado o mapa da placa com as condições usadas em cada poço. As siglas são as mesmas descritas na Figura 4.7. Os números 1/1 e 1/11 significam diluições, e 200 , 600 significam a quantidade de gel de Agarose-proteína G usado na purificação dos soros.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AIM	AIM	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	AIB2	AIB2	AIB2
A										1/1	1/1	1/11
	AIM	AIM	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	AIB2	AIB2	AIB2
B										1/1	1/1	1/11
	AIM	AIM	AIA	AIA	AIB1	AIB1	SS	SS	SS	AIB2	AIB2	AIB2
C										1/1	1/1	1/11
	B	B	B	B	B	B	B	B	B	AIB2	AIB2	AIB2
D										1/11	1/11	1/11
	AIMG	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB1G
E	200	200	600	600	200	200	600	600	200	200	600	600
	AIMG	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB1G
F	200	200	600	600	200	200	600	600	200	200	600	600
	AIMG	AIMG	AIMG	AIMG	AIAG	AIAG	AIAG	AIAG	AIB1G	AIB1G	AIB1G	AIB1G
G	200	200	600	600	200	200	600	600	200	200	600	600
	SSG	SSG	SSG	SSG								
H	200	200	200	200	200	200	600	600	600	600	600	600

Os resultados obtidos mostram que para a visualização e discriminação dos sinais colorimétricos a “olho nu”, o fator preponderante é a redução das interferências no desenvolvimento da cor. O aumento do nível de polimerização auxilia no desenvolvimento do sinal colorimétrico, porém de forma secundária. A purificação dos soros, não favoreceu de modo expressivo a visualização do sinal colorimétrico, provavelmente devido à diluição dos soros. A diluição 1:1 do soro AIB permitiu a intensificação do sinal colorimétrico na direção do vermelho. Otimização da diluição na faixa de pequena diluição de maximizar o sinal colorimétrico e permitir a sua diferenciação a olho nu. Para o soro sadio, não foram feitos experimentos com diluições na faixa de 1:1, e portanto não se pode afirmar sobre a diferenciação de cor a olho nu com relação aos soros autoimunes. No entanto, da análise feita para o comportamento dos vários soros, pode-se inferir sobre duas situações: a primeira, de que a diluição pode resultar em perda de sensibilidade na resposta colorimétrica devido à baixa concentração de IgG-específica no SS, e manutenção da coloração azul com a diluição. A segunda, talvez a mais plausível, vem da análise do desenvolvimento da cor, ou seja da relação da mudança A vermelho/A azul ao final da adsorção em relação ao inicial. Essa mudança representa 76% da inicial, para o SS não diluído. Para o máximo sinal colorimétrico obtido, com AIB 1:1, a mudança foi de 50%. Portanto há forte indício de que baixas diluições intensificarão muito mais a coloração vermelha do SS em relação ao AIB. Apesar disto, acredita-se que tendo-se otimizado o sinal colorimétrico dos soros autoimunes, principalmente o AIB, quanto à diluição, haja uma diferenciação clara a olho nu entre os soros SS e autoimunes.

No caso da purificação, a otimização deverá ser feita para o nível de purificação com 200 microlitros de proteína G.

A investigação e análise de todas as variáveis, realizadas no presente trabalho, permitiu identificar tendências importantes para a aplicação dos lipossomas polimerizados no diagnóstico de doenças auto-imunes, que apontam para uma região de otimização do sinal colorimétrico. Os resultados aqui obtidos contribuem para o desenvolvimento de sensores colorimétricos utilizando lipossomas polimerizados, cujo reconhecimento da molécula de interesse e a transdução de sinal ocorrem em uma única etapa. Em particular, estes resultados são úteis para a detecção de anticorpos anti-cardiolipina e o diagnóstico de doenças autoimunes.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

#### 6.1 CONCLUSÕES

O trabalho experimental realizado e os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- . A cardiolipina nas suas formas livre ou na superfície de lipossomas polimerizados é seletiva para a ligação da IgG-específica presente nos soros de pacientes com doenças autoimnes , porém a interação sofre a interferencia marcante de componentes não específicos dos soros.
- Para os soros autoimunes reais sem diluição, há diferença entre o padrão dos perfis de absorbância no azul com o tempo, comparado ao perfil de absorbância no azul do soro sadio.
- A diluição ou a purificação reduzem os interferentes e intensificam a absorbância final na cor vermelha, por mudarem o padrão de absorbância no azul, reduzindo-a com o tempo.
- Os maiores sinais de absorbância são verificados na região da estequiometria da ligação.
- A discriminação dos sinais colorimétricos em relação aos soros sadios ocorre com maior intensidade com a diluição ou a purificação, e em menor intensidade com o nível de purificação ou com a concentração de cardiolipina nos lipossomas.
- A diluição dos soros e a purificação constituem as melhores estratégias para a discriminação colorimétrica a olho nu, entre os soros autoimunes e sadio.
- As regiões de baixa diluição (proxima de 1:1), e de baixa purificação ( $\leq$  200 microlitros de proteína G) são as mais promissoras para a discriminação do sinal colorimétrico à olho nu entre os soros autoimne e sadio. Entretanto faz-senecessária uma otimização do sistema para o refinamento e determinação da condição ótima.

- Os lipossomas polimerizados são promissores para aplicações em diagnóstico clínico-laboratorial, com reconhecimento molecular e transdução do sinal colorimétrico em uma única etapa.

## **6.2 SUGESTÕES**

- Estudar mais profundamente a ligação resultante da interação entre acadiolipina e a IgG-específica em soros reais , através de métodos mais sofisticados de caracterização molecular.
- Otimizar a condição de maior discriminação do sinal colorimétrico entre soros autoimune e sadio, em relação à diluição ou purificação dos soros.
- Realizar estudos de campo para a seleção de soros de pacientes com doenças autoimnes, utilizando os sérosos ao invés de “pools”.
- Determinar a reprodutibilidade dos sinais e a validação do sistema para diagnóstico clínico-laboratorial.

## CAPÍTULO 6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A., LICHTMAN A., POBER J. *Imunologia Celular e Molecular*. Revinter Ltda. p. 343-529, Quarta edição, 2002.
- AKERSTRÖM, B., BRODIN, T., REIS, K., BJÖRCK, L. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of Immunology*, v. 135, n. 4, p. 2589-2592, 1985.
- AYBAY, C., IMIR, T. Development of a rapid, single-step procedure using protein G affinity chromatography to deplete fetal calf serum of its IgG and to isolate murine IgG<sub>1</sub> monoclonal antibodies from supernatants of hibridoma cells. *Journal of Immunological Methods*. v. 233, p. 77-81, 2000.
- BAROCCI, S., NOCERA, A. *In vitro* removal of anti-HLA IgG antibodies from highly sensitized transplant recipients by immunoadsorption with protein A and protein G Sepharose columns: a comparison. *Transplant International*, v. 6, p. 26-33, 1993.
- BJÖRCK, L., KRONVALL, G. Purification and some properties of *streptococcal* protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology*, v. 133, p. 969-974, 1984.
- BOYLE, M. D. P., REIS, K. J. Bacterial Fc receptores. *Bio/Technology*, v. 5, n. 7, p. 697-703, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976.
- BURNOUF, T., GOUBRAN, H., RADOSEVICH, M. Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 715, p. 65-80, 1998.
- CABRAL, ELAINE CHRISTINE DE MAGALHÃES, *Reconhecimento Molecular de Autoanticorpos e desenvolvimento de Sinal Colorimétrico utilizando Lipossomas*

- Polimerizados*, Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Dissertação (Mestrado), Setembro de 2000.
- CABRAL, E. C., HENNIES, P. T., CORREIA, C. R. D., ZOLLNER, R. L., SANTANA, M. H. A. Preparation and Characterization of Diacetylene Polymerized Liposomes for Detection of Autoantibodies, *Jornal of Liposome Research*, v. 13, p. 199-211, 2003
- CHAIMOVICH, H., GREMIÃO, M. P. D., CELLI, C. M. Anticardiolipin antibodies from syphilis and Systemic lupus erythematosus induce leakage in cardiolipin vesicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p. 489-494, 1996.
- CHARYCH, D., NAGY, O. J., SPEVAK, W., BEDNARSKY, M. D. Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by a polymerized bilayer assembly. *Science*, v. 261, p. 585-588, 1993.
- CHARYCH, D., REICHERT, A., NAGY, J. O., SPEVAK, W. Polydiacetylene liposomes functionalized with sialic-acid bind and colorimetrically detected influenza-virus. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, p. 829-30, 1995.
- CHARYCH, D., NAGY, J. O. Artificial cell membranes for diagnostic and therapeutics. *Chemtech*, v. 26, nº 9, p. 24-28, 1996.
- CHARYCH, D., PAN, J. J. Molecular recognition and colorimetric detection of Cholera toxin by poly(diacetylene)liposomes incorporating Gm1 Ganglioside. *Langmuir*, v. 13, p. 1365-1357, 1997.
- CHARYCH, D., OKADA, S., PENG S. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. *Accounts of chemical research*, v. 31, p. 229-39, 1998.
- CHARYCH, D., OKADA, S. Y., JELINEK, R. Induced color change of conjugated polymeric vesicles by interfacial catalysis of phospholipase A<sub>2</sub>. *Angewandte Chemie International edition*, v. 38, p. 656-659, 1999.
- CHEN, P. S., TORIBARA, T. Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 1756-1758, 1956.
- COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6<sup>o</sup> edição, p. 101-202, 2000.
- DEVLIN, T. M. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. Philadelphia, John Wiley & Sons, 4<sup>o</sup> edição, 1997.

- EL-KAK, A., VIJAYALAKSHMI, M. A. Study of the separation of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. *Journal of Chromatography*. v. 570, p. 29-41, 1991.
- FAHRNER, R. L., BLANK G. S. Real time control of antibodies loading during protein A affinity chromatography using an on-line assay. *Journal of Chromatography*. v. 849, p. 191-196, 1999
- FERREIRA, A. W., ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 302p, 1996.
- HENNIES, PAULO DE TARSO. *Síntese de Fosfatidilcolinas diacetilênicas, preparação e caracterização de Lipossomas polimerizados para aplicações na liberação controlada de medicamentos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Tese (doutorado), 2001.
- HENNIES, P. T., SANTANA, M. H. A., CORREIA, C. R. D. Synthesis of the Diacetylenic Phospholipids 1,2-(10',12'- Heptadecadiynoyl)- sn- Glycero-3-Phosphatidylcholine and 1,2-(4',6'- Tricosadiynoyl) sn- Glycero-3-Phosphatidylcholine. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 12, nº 1, p. 64-72, 2001.
- HUSE, K., BÖHME, H., SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 51, p. 217-231, 2002.
- JANOFF, A. S., CARPENTER-GREEN, S., WEINER, A. L., SEIBOLD, J., WEISSMANN, G., OSTRO, M. J. Novel liposome composition for a rapid colorimetric test for systemic lupus erythematosus. *Clin. Chem.*, 29: p. 1587-1592, 1983.
- JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A., BROOKS, G. F., BUREL, J. S. *Imunologia – In microbiologia médica*. Guanabara Koogan, p. 89-108, 1998.
- KRUIJFF, B. de, VERKLEIJ, A. J., LEUNISSEN-BIJVELT, J., VAN ECHTELD, C. J. A., HILLE, J., RIJNBOUT, H. Further aspects of the Ca<sup>2+</sup> dependent polymorphism of bovine heart cardiolipin. *Biochimica et biophysica acta*, v. 693, p. 1-12, 1982.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M., *Princípios de bioquímica*, p. 190-191, 202-203, 636-638, 2000.
- LEIBL, H., ERBER, W., EIBL, M., MANNHALTER, J. W., Separation of polysaccharide-specific human immunoglobulin G subclasse using a Protein A Superose column with a pH gradient elution system. *Journal of Chromatography*. v. 639, p. 51-56, 1993.

- LÜTKEMEYER, D., AMESKAMP, N., TEBBE, H., WITTLER, J., LEHMANN, J.,  
Estimation of cell damage in bench and pilot-scale affinity expanded bed  
chromatography for the purification of monoclonal antibodies. *Biotechnology and  
Bioengineering*. v. 65, p. 114-119, 1999.
- MA, Z., LI, J., LIU, M., CÃO, J., ZOU, Z., TU, J., JIANG, L. Colorimetric detection of  
Escherichia Coli by polydiacetylene vesicles functionalized with glycolipid. *Journal  
of the American Chemical Society*, v. 120, p. 12678-12679, 1998.
- MANUAL DE KIT VARELISA IgG ANTI-CARDIOLIPINA, PHARMACIA  
DIGNOSTICS, ALEMANHA, 2003
- MARAN, R., DUEYMES, M., LE CORRE, R., REN AUDINEAU, Y., SHOENFELD, Y.,  
YOUINOU, P. IgG subclasses of human autoantibodies. *Annais Medicine Interne*,  
v. 148, n. 1, p. 29-38, 1997
- NEW, R. R. C. Liposomes: a practical approach. *New York*; IRL press, 1990.
- PETRI, M. Epidemiology of the Antiphospholipid Antibody Syndrome. *J Autoimm* v. 15,  
p. 145-151, 2000.
- REBER, G., ARYIEUX, J., COMBY, E., DEGENNE, D., DEMOERLOOSE, P.,  
SANMARCO, M., POTRON, G. Multicenter evaluation of nine commercial Kits  
for the quantitation of cardiolipin antibodies. *Tromb Haemostasis*, v. 3, p. 444-452,  
1995.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., *Imunologia*. São Paulo, Manole Ltda, 1999.
- SITE <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>
- SITE <http://www.vli-research.com>
- STRYER, L. *Bioquímica*. Guanabara Koogan, 3<sup>o</sup> Edição, p. 729-753, 1992.
- TAKASHI, T., INOUE, K., NOJIMA, S. Immune reactions of liposomes containing  
cardiolipin and their relation to membrane fluidity.  
*J. Biochem.*, v. 87 p. 679- 685, 1980.
- TAMURA, H., NORIHISA, M., OGAWA, K. Analysis of color transitions and changes on  
Langmuir-Blodgett films of a polydiacetylene derivative. *Langmuir*, v. 7, p. 2336-  
2341, 1991.
- VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography *Trends in  
Biotechnology*, v. 7, p. 71-76, 1989
- VLUG, A., VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses.  
*American Clinical Laboratory*, v. 8, p. 28-36, 1989.

WINZOR, D.J., SAWYER W. H. Quantitative characterization of ligand binding, ed. Wiley-Liss, Inc, New York, 1995.

XU, Z., HUI, S. W., YU, H., BITTMAN, R. Microdomain Structures in Polymerizable and Nonpolymerizable diacetylenic Phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir*, v. 8, p. 2724-2729, 1992.