

Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental

15. Quantificação de marcadores humorais de inflamação, de resposta imune e de lesão tissular nos animais infectados

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

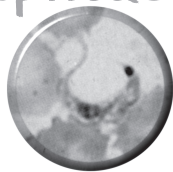


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Capítulo 15



Quantificação de Marcadores Humorais de Inflamação, de Resposta Imune e de Lesão Tissular nos Animais Infectados

Tania C. Araújo-Jorge, Paulo R. Z. Antas & Solange Lisboa de Castro

Devido à heterogeneidade da doença tanto em camundongos como em humanos, os parâmetros parasitológicos (parasitemia, tempo de sobrevivência, mortalidade) e imunológicos específicos (ativação de células T por antígeno de *Trypanosoma cruzi* e anticorpos antiparasita) podem não se correlacionar diretamente com o grau de lesão. O acompanhamento de parâmetros inflamatórios e do desenvolvimento de lesões tissulares durante o curso da infecção por *T. cruzi* pode ser bastante informativo.

Como foi discutido nos Capítulos 4 e 9, diferentes aspectos da resposta inflamatória e imune podem ser estudados experimentalmente em camundongos infectados pelo *T. cruzi*. A avaliação dos níveis ou da atividade de diferentes componentes destas respostas é feita em material colhido dos animais em diferentes tempos após a infecção, seja por acompanhamento individual de um mesmo animal por longo tempo, quando apenas sangue, fezes e urina podem ser colhidos, seja por sacrifício do animal, quando então células provenientes de diferentes tecidos podem ser analisadas, bem como seus produtos de secreção.

O sangue é um material valioso, especialmente para a análise dos componentes humorais das respostas inflamatória e imune. Plasma ou soro podem ser obtidos, a depender do uso ou não de anticoagulantes, respectivamente. Dosagens de imunoglobulinas totais e específicas, em seus diversos tipos e isotipos, de complexos imunes, de citocinas, de proteínas de fase aguda, de moléculas de adesão solúveis, de enzimas, de metabólitos de nitrogênio (por exemplo, óxido nítrico), sais e outros oligoelementos, são parâmetros que podem ser pesquisados e acompanhados no plasma ou no soro, tanto individualmente como em agrupamentos de *pool*. Os procedimentos para coleta de sangue, plasma ou soro já foram descritos no Capítulo 13. No presente capítulo vamos nos concentrar nos procedimentos para análise de marcadores humorais de inflamação e de resposta imune ativas, bem como de lesão muscular e miocárdica.

Partimos então do pressuposto que o experimento foi realizado e foi colhido sangue de animais individuais, que rendeu, por animal, até 30 μ l de plasma ou soro por sangria na cauda ou no plexo orbitário, ou até 500 μ l por sangria com punção cardíaca. O material pode ser analisado individualmente ou em *pool*.

Vamos nos deter em ensaios que utilizam espectrofotômetro de microplacas (leitor ELISA) por considerá-los extremamente práticos e confiáveis, e disponíveis na maioria dos laboratórios de pesquisa em imunoparasitologia. Serão descritos protocolos para:

ELISA

- sorologia específica (convencional) e não específica (resposta humoral)
- dosagem de proteínas de fase aguda: SAP (resposta inflamatória)
- dosagem de citocinas: IFN- γ e TNF- α (respostas inflamatória e humoral)

Ensaio em microplaca

- dosagem de CK e CKMB (lesão tissular)

15.1 ELISA: Sorologia Específica (Convencional), Não Específica e Proteínas Séricas Diversas

O método de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é um ensaio imunoenzimático, onde se aproveita, entre outras coisas, o princípio de interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Este princípio tem como fundamentos:

- todo Ag tem a propriedade de gerar, *in vivo*, um Ac, dado por sua própria nomenclatura (*antigen = antibody generator*);
- todo Ag tem uma alta constante de afinidade (Kd) por seu Ac;
- epitopos antigênicos de uma molécula geram distintos anticorpos (Acs) para si;
- uma vez ligados, Acs e Ags dificilmente podem ser separados, graças às interações que ocorrem;
- dado o princípio de maturação da afinidade, certos Acs serão o “espelho” dos Acs que os geraram.

O método de ELISA se constitui essencialmente de uma hierarquia de interações Ag=Ac, onde em cada etapa temos atuando os mesmos fundamentos. Esta hierarquia (ou “pirâmide”) está calçada em um suporte, ou matriz, que geralmente é uma placa de poliestireno, material ideal para a primeira ligação (revestimento). Uma vez ligado à placa, dificilmente se consegue reverter a interação, daí as placas para ELISA serem descartáveis.

Após sucessivas etapas, onde se varia grandemente o pH, o último procedimento também se baseia em outra propriedade, esta agora um fundamento bioquímico:

- toda enzima possui o seu substrato e com ele poderá interagir, respeitando-se o pH, a temperatura, o tampão e os co-fatores necessários à reação.

No final do experimento, pode-se observar uma cor intensa nas cavidades da placa, o que se considera um padrão de positividade. Porém nuances de cor também ocorrem, até se chegar ao transparente, ou branco. Para se quantificar essas diferenças, usa-se um aparelho do tipo espectrofotômetro para microplaca (*ELISA reader*), para se distinguir o gradiente de cor, que quantificará a densidade óptica (DO) de cada poço da placa, comparando esta a do ar ou a de outro poço que seja definido como padrão negativo de reação. Os aparelhos mais modernos acoplam-se a programas computadorizados para cálculos diversos, que podem definir limiares, tirar médias, fazer regressões lineares e logarítmicas e calcular automaticamente a concentração de um poço-teste quando fornecida a de uma curva-padrão referência. Destacaremos os protocolos para a obtenção dos dados e trataremos apenas brevemente da análise dos dados gerados.

As etapas gerais de um ELISA são:

- revestimento das placas com o Ag ou o Ac de captura;
- bloqueio de sítios inespecíficos de ligação na placa;
- incubação com o material para teste e padrões para serem capturados;
- incubação com o Ac para revelação da ligação do antígeno ou anticorpo capturado;

- revelação desse Ac (direta, se estiver diretamente conjugado à enzima traçadora, ou indireta, se depender de outra etapa de revelação ou amplificação), através de um ensaio de atividade enzimática com o substrato apropriado para a enzima usada como marcadora do Ac;
- leitura no espectrofotômetro e análise dos resultados.

Em qualquer ELISA os tampões utilizados nas diferentes etapas visam variar o pH.

- pH 9,6: o pH alcalino é o ideal para a sensibilização e o bloqueio da placa, uma vez que a ligação de proteínas à placa de poliestireno é facilitada neste pH. Pode-se adicionar azida sódica (NaN_3) como agente preservativo no tampão nestas etapas, pois ainda haverá muitas lavagens antes da incubação com o anticorpo conjugado à enzima;
- pH 7,0 - 7,4: o pH neutro é empregado a partir da lavagem da placa, até a incubação com o substrato;
- pH 4,0 - 4,2: o pH ácido é o ideal para que a peroxidase clive a H_2O_2 . Deve ser ajustado de acordo com a enzima utilizada como traçador.

Utilizam-se três tipos básicos de ELISA, cujos princípios são:

- *captura*: baseia-se no uso de um Ag aderido à placa, *para a captura dos Acs* por ele gerados. É o ELISA empregado em sorologias de rotina.
- *sanduíche*: baseia-se na formação seqüencial de um “sanduíche” de Ac-Ag-Ac, quando as placas são revestidas com um anticorpo muito específico *para a captura de um Ag específico*. Necessita um par de Acs bem específicos para o Ag que se quer detectar, gerados em animais de espécies diferentes. É o ELISA usado para a dosagem de Acs circulantes, imunocomplexos, citocinas, proteínas séricas, anticorpos idiotípicos e antiidiotípicos. etc.
- *competitivo*: este ELISA se fundamenta na competição entre um Ag solúvel, que se quer quantificar, e outro com as mesmas características e especificidades, com o qual se revestiu a placa, por um Ac específico para esse Ag. Substitui o ELISA sanduíche quando não se dispõe de um par de Acs, mas sim de um Ac específico e do Ag purificado.

Muitos sistemas já são comercializados em forma de *kits* para a dosagem de diversas proteínas, bem como para o sorodiagnóstico de certas infecções. Na maioria dos *kits* a placa já vem sensibilizada e bloqueada, iniciando-se as reações na terceira etapa.

As enzimas mais utilizadas em ensaios ELISA são peroxidase e fosfatase alcalina. Descreveremos protocolos com o uso de peroxidase, mas que podem ser adaptados para o uso de conjugados marcados com outras enzimas. O substrato para peroxidase é tetra-metil-benzidina (TMB), que dá um produto de reação azul, lido a 450 nm. O substrato para fosfatase alcalina é o nitro-fenil-fosfato (NPP), que dá um produto amarelo, lido a 405 nm. Um cuidado importante é não utilizar azida nestas últimas etapas, pois ela inibe a ação da peroxidase.

Descrevemos a seguir o material de uso geral para ELISA, seguido de protocolos de preparo de Ag para sorologia específica anti *T. cruzi* ou então de sistemas de ELISA para quantificação de imunoglobulinas ou isotipos totais, proteínas de fase aguda e citocinas que podem indicar a evolução da resposta inflamatória e imune.

Material

- protocolo de distribuição das amostras na placa (sempre em triplicata, e sem esquecer poços controles para PBS -branco)
- placas de poliestireno ELISA fundo chato (existem placas apropriadas para melhor adsorção do Ag)
- tubos de microcentrífuga
- placas de microtitulação para diluição, fundo em U
- micropipetas monocal e multicanal de 20 a 200 μl
- ponteiros para as micropipetas, em suportes adequados
- cubas para as soluções de Ac
- recipiente para tampão de lavagem

- filme plástico de PVC
- papel ou tecido absorvente
- cuba para descarte de líquidos
- cuba para neutralização de placas acidificadas
- estufa ou banho-maria para incubação a 37°C
- leitor espectrofotométrico de microplacas
- um sistema de aspiração/lavagem de placas é recomendável, composto por bomba de vácuo, recipiente para tampão de lavagem e sistema para distribuição para lavadora automática
- todos os Acs conjugados a enzimas ou outros traçadores precisam ser prévia e periodicamente titulados e aliqüotados, além de ter sua especificidade previamente testada.

A Tabela 1 mostra as soluções utilizadas no ELISA. Quando se prepara um ELISA com 50 µl de Ag/poço, calcula-se um consumo de 6 ml/placa. Para 100 µl/poço, calcula-se um consumo de 12 ml/placa

Tabela 1 – Soluções usadas para ELISA

Soluções	Sigla	pH	Concentração		Função
			Estoque	Uso	
Tampão carbonato de sódio	TCO ₄	9,6	1 M (10x)	0,1 M	Sensibilização
BSA - albumina bovina	BSA	9,6		1%	Bloqueio
Leite desnatado (comercial)	LDN	9,6		4%	Bloqueio
Tampão fosfato	TPO ₄	7,2-7,4	1 M (10x)	0,1 M	Incubação
Tampão fosfato-salina ¹ +0,05 % Tween 20	PBS-T	7,2-7,4		0,1 M	Lavagens/ diluição
Tampão citrato-fosfato	TCP	4,0	1 M (10x)	0,1 M	Revelação
TMB em DMSO	TMB		10 mg/ml		Revelação
H ₂ O ₂ em água	H ₂ O ₂		3 %	0,006 %	Revelação
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	STOP	1,0	6,6 M	6,6 M	Interrupção
Hidróxido de sódio (NaOH)	Soda	12	0,1 M	0,1 M	Neutralização

¹solução NaCl 0,85% (154 mM)

15.1.1 Sorologia específica anti *T. cruzi* por ELISA

Preparo de Antígeno

a. Parasita fixado em paraformaldeído

Pode-se usar quaisquer dos estágios do *T. cruzi* como Ag particulado para captura de imunoglobulinas anti *T. cruzi*. Os métodos que dão maior rendimento de parasitas são os mais comumente empregados (ver Capítulo 10): cultura de epimastigotas em meio LIT, metacicloênese para obtenção de tripomastigotas metacíclicos em meio definido, cultura de células para obtenção de amastigotas ou tripomastigotas. Podem ser utilizados em reações de imunofluorescência (10³ a 10⁵/poço) ou ELISA (2 x 10³ a 2 x 10⁵ células/poço). Os antígenos particulados favorecem especialmente a captura de IgM, pois os epitopos de carboidratos, muito reativos a IgM, são preservados.

Com qualquer dos procedimentos para obtenção dos parasitas, para serem utilizados como Ag, após sua obtenção eles deverão passar pelas seguintes etapas:

- lavar 2x em tampão;
- fixar em paraformaldeído 1% por 15 min ou 0,1 % por 24 h;
- lavar 2x em tampão;
- contar o número de parasitas em câmara de Neubauer;
- ajustar a concentração para 10^8 parasitas/ml (100X concentrado);
- preparar alíquotas para uso (5×10^4 parasitas/poço, em 50 μ l): 6 ml de suspensão a 10^6 parasitas/ml para cada placa de ELISA ou 5 ml de suspensão a 5×10^6 parasitas/ml para dez lâminas de imunofluorescência (5 μ l/poço nas lâminas).

Obs: um cuidado adicional pode ser tomado, com o tratamento inicial das placas com etanol 70% por 10 minutos, seguido de descarte do etanol e secagem com vento (secador de cabelos).

b. Ags solúveis de *T. cruzi* (congelamento e descongelamento)

Para a quantificação de IgG e outros isotipos de Ig, costuma-se dar preferência ao uso de frações antigênicas solúveis dos parasitas, epi-, ama- ou tripomastigotas. São preparados como se segue:

- obter os parasitas (2×10^9 células/ml);
- lavar 3x em solução salina com centrifugação a 2.000g;
- ressuspender 1:3 em água destilada;
- realizar três a cinco ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se banhos de nitrogênio líquido ou gelo seco alternado com banho-maria a 37°C;
- centrifugar a 26.000 g por 1 h a 4°C;
- recuperar o sobrenadante;
- dialisar o sobrenadante contra PBS pH 7,4;
- quantificar o teor de proteína (medida da DO a 280 nm);
- liofilizar (optativo) ou alíquotar a 10-100 μ g/ml em PBS com 0,1% de azida sódica, mas sem detergente nem proteína extra.

Obs: o Ag é utilizado a 1 a 10 μ g/ml, num volume de 50 μ l para os poços nas placas ELISA.

Existem outros protocolos para preparo de Ags de *T. cruzi*, por processos variáveis de extração química e, mais recentemente por produção de Ags recombinantes. Os métodos acima citados são os que fornecem Ags brutos para captura de Acs, o que pode levar à reações cruzadas com infecções por outros tripanosomatídeos, mas que são absolutamente úteis e suficientes para a avaliação da resposta imune humoral de animais experimentalmente infectados.

Anticorpos anti-isotipos conjugados a enzimas

O Ag de *T. cruzi* usado vai capturar Igs dos diversos isotipos, e a sorologia determinará Ig total, IgG, IgM ou qualquer outro isotipo que se pretenda investigar, a depender do Ac utilizado na etapa de detecção e revelação da imunoglobulina capturada. Muitos fabricantes comercializam Acs (simples e conjugados a enzimas) para esta finalidade. Para um ELISA mais rápido, recomenda-se que este Ac anti Ig ou isotipo de camundongo já seja conjugado com peroxidase. É importante o teste prévio de reatividade do conjugado enzimático tanto ao Ag usado para sensibilizar a placa, como ao agente usado para bloqueio. Às vezes, em função dessa reatividade cruzada, que leva a altas leituras nos poços controles sem o soro teste, é necessária a mudança do bloqueador, de BSA para leite desnatado, ou para soro normal da espécie em que foi obtido o conjugado. É importante também que o conjugado seja previamente titulado com diluições seriadas sobre placas revestidas com soro normal de camundongo 10%.

Procedimento para sorologia anti *T. cruzi*

A Tabela 2 resume a seqüência de etapas do ELISA para a sorologia anti *T. cruzi*. Para esse procedimento seqüencial, ressaltamos as seguintes observações:

- as soluções estoque dos Ags devem ser alíquotadas em volumes suficientes para até cinco placas, em PBS. Evitar congelar e descongelar repetidamente as mesmas alíquotas. Pode-se adicionar 0,1% de azida sódica (NaN_3) como preservativo para evitar contaminação (concentração final de uso: 0,01%);
- a etapa de sensibilização pode ser feita no dia anterior, com a incubação das placas com o Ag na geladeira. Não é necessária lavagem da placa antes do bloqueio;
- a solução de bloqueio pode variar e deve ser testada para cada ELISA durante sua padronização. Pode-se usar BSA 1%, leite desnatado 4%, ou glicina 1%. Verter a placa com o Ag, bater sobre tecido absorvente e colocar a solução de bloqueio;
- as placas sensibilizadas e bloqueadas podem ser estocadas na geladeira, mas sua eficácia para capturar o Ag deve ser testada para determinação do prazo de validade;
- para todas as etapas de lavagem (três vezes) é preciso verter a solução final de tampão, bater bem a placa em tecido absorvente para retirar o excesso;
- opcionalmente, pode-se proceder nas etapas de incubação com PBS-T, obtendo-se a mesma eficácia.

Tabela 2 – Etapas seqüenciais na realização do ELISA de captura

Etapa	Tampão	Volume ($\mu\text{l}/\text{poço}$)	Tempo	IgM	IgG
Sensibilização (Ag)	TCO_4	50	18 h	1:500 ¹	1:1000 ²
Bloqueio	TCO_4	100	2 h	BSA	BSA
Lavagem	PBS-T	encher			
Soros	PBS	50	2 h	1: 50 ³ 1: 250 ⁴	1:100 ³ 1:500 ⁴
Lavagem	PBS-T	encher			
Antiisotipo peroxidase	PBS	50	1 h	titulável	titulável
Lavagem	PBS-T	encher			
Substrato	TCP	50	variável		
Final	STOP	50	instantâneo		

¹Ag Epi fixado; ²Ag solúvel; ³para soro de camundongo; ⁴para soro humano

15.1.2 Captura de Ig's totais e isotipos para sorologia não específica (ELISA sanduíche)

Uma das características clássicas da infecção experimental por *T. cruzi* é a ativação policlonal e a hipergamaglobulinemia poliisotípica (ver Capítulo 4), com destaque para os isotipos IgG2a e IgG2b. O sistema mais simples de monitoramento deste processo é o ELISA sanduíche, como descrito no item 15.1.

Material

- os mesmos reagentes usados para ELISA (Tabela 1)
- imunoglobulina purificada para construção de curva padrão (opcional); a opção simples para cálculo das variações nos níveis de Ig's observadas a diferentes dias pós-infecção é o cálculo da razão entre a DO obtida com as amostras infectadas em relação à DO média de amostras colhidas dos animais antes da infecção, ou de controles não infectados com a mesmo tempo de cativeiro e experimentação que os infectados
- pares de anticorpos para o sanduíche (Tabela 3)

Tabela 3 – Pares de anticorpos para a sorologia não específica

Ig a ser dosada	1º anticorpo (placa)	2º anticorpo ¹	Conjugado-enzima ²
Ig total	Policlonal de coelho anti Ig total de camundongo	Policlonal de cabra anti Ig total de camundongo adsorvido para Ig de coelho	Coelho anti IgG de cabra PO
IgG	Policlonal de coelho anti Ig G de camundongo	Policlonal de cabra anti Ig total de camundongo adsorvido para Ig de coelho	Coelho anti IgG de cabra PO
Isotipos: IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgD, IgE, IgA	Monoclonal de rato antiisotipo de camundongo	Policlonal de coelho ou cabra anti Ig total de camundongo pré adsorvido para IgG ou IgM de rato, segundo o isotipo do monoclonal usado como 1º Ac	Rato anti IgG de coelho PO ou rato anti IgG de cabra PO adsorvido para Ig de camundongo

PO: peroxidase

¹ deve ser específico para Ig de camundongo, com um mínimo de reação cruzada para o 1º Ac

² deve ser específico para o 2º Ac, com um mínimo de reação cruzada para o 1º Ac e para Ig de camundongo

Procedimento

De um modo geral é necessário primeiro um ajuste do protocolo aos títulos dos Acs disponíveis, cumprindo-se sempre o seguinte conjunto de experimentos preliminares (padronização dos ensaios):

- curva de titulação do Ac conjugado à peroxidase frente a soro normal das várias espécies que serão usadas no ensaio (o 1º e o 2º Acs e o soro de camundongo). A melhor diluição é a que fornece menor leitura sobre o 1º Ac e sobre o soro de camundongo, e maior sobre o 2º Ac
- curva de sensibilização: diluições seriadas do 1º Ac com concentrações fixas dos demais reagentes nas etapas posteriores
- curva de detecção: diluições seriadas do 2º Ac com concentrações fixas dos demais reagentes nas etapas anteriores e posteriores
- curva de titulação das amostras de camundongo, com uma amostra sabidamente positiva e outra sabidamente negativa, para a escolha das melhores três diluições onde as diferenças de leitura de DO entre positivos e negativos possam ser máximas.

Uma vez estabelecidas as concentrações ideais para cada etapa, procede-se ao ELISA com a seqüência de etapas enumeradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Etapas seqüenciais no ELISA sanduíche

Etapas	Tampão	Volume (µl/poço)	Tempo	Reagente/diluição
Sensibilização (1ºAc)	TCO ₄	50	1-18 h	1/10.000 a 1/1.000.000
Bloqueio	TCO ₄	100	1- 2 h	BSA
Lavagem	PBS-T	Encher		
Soros	PBS	50	2 h	1/1.000 a 1/40.000 dependendo do isotipo
Lavagem	PBS-T	Encher		
Sanduíche (2º Ac)	PBS	50	1 h	Titulável (comumente 1/1000)
Lavagem	PBS-T	Encher		
Conjugado-PO	PBS	50	1 h	Titulável (comumente 1/1000)

As demais etapas de revelação da peroxidase (PO) seguem como na Tabela 2.

15.1.3 Dosagem de proteínas de fase aguda: SAP (ELISA de captura)

A detecção de proteínas de fase aguda no plasma de animais infectados é indicativa do início da resposta imune inata (ver Capítulo 4), e indicativas da ação de IL-6, IL-1 e TNF- α . Como não existem reagentes comerciais disponíveis para a maioria destas proteínas no modelo murino, descreveremos apenas um ELISA simples para a quantificação dos índices de variação de SAP (proteína amilóide P sérica), o principal reagente de fase aguda no camundongo, com a ressalva de que nem todas as linhagens de camundongos desenvolvem níveis semelhantes de aumento de SAP (ex.: C3H, Balb/C). A SAP apresenta-se em níveis indetectáveis nos animais normais e aumenta de 10 a 1.000 vezes após a primeira semana de infecção na linhagem C57BL/6, que é tipicamente boa respondedora para SAP. É bastante comum pesquisadores que trabalham com esta e outras proteínas de fase aguda cederem, de bom grado, soros produzidos experimentalmente em seus laboratórios para a montagem de sistemas de detecção e quantificação.

Material

- os mesmos reagentes usados para ELISA (Tabela 1)
- soro ou Ac purificado anti SAP (fonte comercial: Calbiochem; IgG de coelho anti SAP): titular previamente ante SAP purificada ou a plasma de camundongo C57BL/6 após sete a dez dias de infecção
- conjugado específico para revelar o anti SAP (cabra anti IgG de coelho) e com mínima reação cruzada com soro de camundongo

Procedimento

Nesse ELISA revestimos as placas com diferentes diluições do soro de camundongo a ser testado (em uma analogia com Western blot) e detectamos a presença da proteína.

Tabela 5 – Etapas para dosagem de SAP

Etapa	Tampão	Volume (μ l/poço)	Tempo	Diluição
Sensibilização (SAP no plasma em conc. desconhecida)	TCO ₄	50	1-18 h	1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400
Bloqueio	TCO ₄	100	1-2 h	Leite desnatado a 4%
Lavagem	PBS-T	Encher		
Revelação (Ac anti SAP)	PBS	50	2 h	Titulável (comumente 1/1000)
Lavagem	PBS-T	Encher		
Conjugado-PO	PBS	50	1 h	Titulável (comumente 1/1000)

PO: peroxidase

15.1.4 Dosagem de citocinas: INF- γ e TNF- α

A dosagem de citocinas no plasma ou soro pode ser hoje feita de rotina com *kits* comerciais para ELISA que fornecem resultados confiáveis e reprodutíveis, com base no princípio do ELISA de captura descrito no item 15.2.2. A diferença é que estes *kits* geralmente utilizam Acs monoclonais contra as citocinas-alvo (e portanto extremamente específicos) como 1^o e 2^o Acs, e constroem sempre uma curva padrão com a citocina recombinante em concentrações conhecidas. Além disso, se o 2^o Ac for biotilado ele pode ser obtido da mesma espécie do 1^o Ac, e a revelação pode ser feita pela incubação com estreptoavidina(EA)-peroxidase, o que minimiza muito a reação cruzada de fundo, posto que a EA não reage (ou apenas minimamente) com as imunoglobulinas usadas

para o sanduíche, nem com possíveis contaminantes no plasma testado. O uso de Acs monoclonais dos *kits* comerciais pode ser substituído pelos mesmos Acs, pois pode-se obter os respectivos hibridomas produtores seja comercialmente (ATCC ou outro banco comercial de células) ou por intermédio de cessão por pesquisadores da área, e usá-los para padronizar ensaios sob a forma de sobrenadantes ou de ascites.

As citocinas mais comumente monitoradas, que apresentam aumento na fase aguda em todos os modelos experimentais já testados são IFN- γ e TNF- α . Alguns ensaios de atividade funcional das citocinas também podem ser de interesse, mas não serão objeto desse manual, e recomenda-se a procura de literatura específica (*Current Protocols in Immunology*, 1991, ou *Immunology Methods Manual - A Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1997, ou *Methods in Cell Biology* vol. 49, 1995).

Os mesmos materiais e procedimentos descritos no item 15.2.2 são utilizados para a dosagem de IFN- γ e TNF- α com as diferenças dos Acs. A Tabela 6 sumariza alguns dos Acs usados para essa finalidade.

Tabela 6 – Anticorpos usados

Citocina	1º Anticorpo	2º Anticorpo	Curva padrão	Dil. do plasma
IFN- γ	R4-6A2 (rato anti IFN- γ de camundongos)	17.17.24 (rato anti IFN- γ de camundongos)	IFN- γ recombinante (0-20ng/ml)	1/2-1/10
TNF- α	MP6-XT22 (rato anti TNF- α de camundongos)	MP6-XT3 (rato anti TNF- α de camundongos)	TNF- α recombinante (0-20ng/ml)	1/2-1/10

15.2 Ensaios em Microplaca: Dosagem CK e CKMB

É bem conhecido que, em processos patológicos, danos tissulares são acompanhados por liberação de enzimas na corrente sanguínea e que a identificação de isoenzimas correspondentes revela a fonte de tecido específico que foi danificado, e portanto no qual o processo patológico está em curso. Uma série de estudos feitos por Teresa Mercado analisando bioquimicamente a expressão de diversas isoenzimas nos tecidos de camundongos infectados indicaram que aumentos substanciais de creatino fosfoquinase total (CK), bem como de suas isoformas típicas de músculo esquelético (CK-MM) e cardíaco (CK-MB) podem ser observadas. Adaptamos o método de dosagem laboratorial de CK e CKMB humanas para volumes menores disponíveis em análises individuais de camundongos e confirmamos que seu aumento pode ser indicativo de lesão tissular ativa. O protocolo que usamos atualmente é o seguinte:

Material

- amostras de plasma ou soro, mantidas congeladas a -20°C
- *kit* comercial para dosagem de CK-MB humana sérica (Merck)
- placas de microtitulação para diluição, fundo em U
- protocolo de distribuição das amostras na placa (em duplicata, e sem esquecer poços controles para PBS - branco)
- micropipetas monocanal e multicanal de 20 a 200 μ l
- papel de filtro no tamanho das placas embebido em água
- ponteiros para as micropipetas, em suportes adequados
- cubas para as soluções
- leitor espectrofotométrico de microplacas com filtro a 340 nm

Obs 1: é recomendável um sistema de leitura cinética das placas no leitor

Obs 2: os ensaios devem ser feitos em duplicatas

Procedimento

- preparar protocolo de aplicação dos plasmas na placa, com a cinética a ser estudada sempre em colunas verticais (não infectado/ dia x, dia 2x, dia 3x, etc.);
- preparar meio de incubação para revelação da enzima segundo as instruções do fabricante (mistura do tampão com os reagentes específicos);
- preparar programa de leitura seqüencial das placas no espectrofotômetro, a 340 nm a cada minuto, por 5 min;
- colocar 5 µl de plasma de cada amostra nos respectivos poços cobertura da placa com papel de filtro embebido em água para evitar o ressecamento até a aplicação do meio de incubação;
- aplicar 125 µl do meio de incubação com pipeta multicanal em uma única placa (não aplicar várias placas ao mesmo tempo);
- aguardar 3 min e ler seqüencialmente a DO a cada minuto, por 5 min;
- repetir a operação de aplicação do meio de incubação/leitura cinética para cada uma das outras placas previamente preparadas com os plasmas a serem testados;
- calcular em planilha apropriada a diferença de DO medida entre cada um dos sucessivos minutos ([5°-4°], [4°-3°], [3°-2°], [2°-1°]) de modo a ter quatro valores de diferença (ΔE) e poder calcular a média ($\Delta E/\text{min}$);
- calcular como padrão negativo a média de $\Delta E/\text{min}$ de diferentes amostras não infectadas;
- calcular um índice de variação entre os valores obtidos nas amostras infectadas, seja em relação ao nível individual do animal pré-infecção, ou então em relação ao valor médio obtido como padrão negativo.

15.3 Protocolos para Microplaca e Obtenção de Resultados

Todos os testes com microplacas precisam ser bem acompanhados com protocolos indicativos da localização de cada amostra na placa, bem como do protocolo usado no ensaio. Anexamos a seguir alguns exemplos de protocolos que podem ser copiados e adaptados.

A cada protocolo de trabalho corresponde uma leitura de DO ao espectrofotômetro, ou até a mais de uma, no caso de leituras a diferentes intervalos de tempo (ex. CK). É extremamente importante que planilhas de análises destes dados sejam bem preparadas, para que a média de triplicatas possa ser obtida, o cálculo de valor *cut-off* possa ser feito, bem como o cálculo dos índices de variação em relação ao valor padrão que se tomou. Este pode ser a média de valores normais, ou então o valor individual do animal antes da infecção. Essa escolha é do pesquisador e das condições de experimentação.

Alguns cuidados devem ser tomados:

- as amostras a serem estudadas em uma diluição pré-fixada (sem diluição seriada) devem ser avaliadas sempre em triplicatas (no mínimo em duplicatas); quando os soros forem analisados em diluição seriada, as duplicatas constituem um bom cuidado a tomar, mas podem ser dispensadas;
- o estudo cinético de amostras de um mesmo animal deve, sempre que possível, ser colocado na mesma coluna, ou em colunas colaterais;
- nunca deve-se esquecer de reservar numa placa espaço para o branco (PBS ao invés de soro), para um soro controle sabidamente positivo, e para três soros sabidamente negativos. Estes últimos permitirão calcular um limite de exclusão (*cut-off*) com seis a nove amostras no mínimo.

Apresentamos, a seguir, um exemplo de organização de planilha de cálculo e de análise dos níveis de IgG anti *T. cruzi* em animais infectados, no qual foram ensaiadas duas placas com cinco soros cada, numa cinética dos dias 0, 1, 8, 20 e 41 pós-infecção (dpi) para os grupos controle (não infectado) e infectado. Neste experimento o interesse era comparar a variação de IgG a cada dia com o valor obtido individualmente nos animais antes da

infecção. Por isso foi calculada a média e somados dois desvios aos resultados de cada animal no dia 0, e calculado o índice de variação de cada animal ao longo da infecção. Os animais não infectados foram analisados de modo semelhante, como controle interno do experimento.

Protocolos das placas

Placa 1	Grupo controle			
	1-2-3	4-5-6	7-8-9	10-11-12
A	cdg-1 0 dpi	cdg-2 0 dpi	cdg-3 0 dpi	cdg-4 0 dpi
B	cdg-1 1 dpi	cdg-2 1 dpi	cdg-3 1 dpi	cdg-4 1 dpi
C	cdg-1 8 dpi	cdg-2 8 dpi	cdg-3 8 dpi	cdg-4 8 dpi
D	cdg-1 20 dpi	cdg-2 20 dpi	cdg-3 20 dpi	cdg-4 20 dpi
E	cdg-1 41 dpi	cdg-2 41 dpi	cdg-3 41 dpi	cdg-4 41 dpi
F	cdg-5 0 dpi	cdg-5 20 dpi	---	oro + cont. placa
G	cdg-5 1 dpi	cdg-5 41 dpi	---	oro + cont. placa
H	cdg-5 8 dpi	---	---	PBS (branco)

Placa 2	Grupo infectado			
	1-2-3	4-5-6	7-8-9	10-11-12
A	cdg-1 0 dpi	cdg-2 0 dpi	cdg-3 0 dpi	cdg-4 0 dpi
B	cdg-1 1 dpi	cdg-2 1 dpi	cdg-3 1 dpi	cdg-4 1 dpi
C	cdg-1 8 dpi	cdg-2 8 dpi	cdg-3 8 dpi	cdg-4 8 dpi
D	cdg-1 20 dpi	cdg-2 20 dpi	cdg-3 20 dpi	cdg-4 20 dpi
E	cdg-1 41 dpi	cdg-2 41 dpi	cdg-3 41 dpi	cdg-4 41 dpi
F	cdg-5 0 dpi	cdg-5 20 dpi	---	oro + cont. placa
G	cdg-5 1 dpi	cdg-5 41 dpi	---	oro + cont. placa
H	cdg-5 8 dpi	---	---	PBS (branco)

Leituras obtidas no espectrofotômetro

Valor da densidade óptica (DO)												
Placa 1	Grupo controle											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,166	0,158	0,137	0,180	0,156	0,174	0,168	0,140	0,134	0,112	0,121	0,151
	0,248	0,239	0,243	0,205	0,195	0,200	0,147	0,151	0,137	0,149	0,141	0,205
	0,182	0,163	0,148	0,168	0,161	0,171	0,199	0,189	0,168	0,155	0,168	0,181
	0,180	0,175	0,188	0,229	0,191	0,214				0,145	0,177	0,147
	0,150	0,112	0,119	0,202	0,232	0,284	0,143	0,131	0,123	0,056	0,071	0,053
	0,072	0,066	0,078	0,117	0,109	0,095						
	0,081	0,074	0,073	0,061	0,060	0,063						
	0,110	0,107	0,101									
Placa 2	Grupo infectado											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	0,148	0,160	0,170	0,224	0,195	0,197	0,228	0,247	0,199	0,149	0,149	0,172
	0,222	0,220	0,247	0,276	0,287	0,266	0,094	0,086	0,088	0,105	0,095	0,105
	0,255	0,260	0,296	0,299	0,280	0,270	0,152	0,139	0,135	0,157	0,146	0,154
	0,779	0,802	0,838	0,508	0,523	0,517	0,769	0,662	0,737	0,640	0,528	0,595
	0,238	0,262	0,313	0,205	0,220	0,212				0,413	0,418	0,456
	0,222	0,204	0,208	0,555	0,644	0,587						
	0,129	0,114	0,143	0,279	0,284	0,276						
	0,220	0,203	0,185									

Cálculo do <i>cut-off</i> = 2x desvio padrão da média da DO de cada animal em 0 dpi											
Grupo controle											
med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff
0,154	0,012	0,178	0,170	0,010	0,190	0,147	0,015	0,177	0,128	0,017	0,161
0,243	0,004		0,200	0,004		0,145	0,006		0,165	0,028	
0,164	0,014		0,167	0,004		0,185	0,013		0,168	0,011	
0,181	0,005		0,211	0,016					0,156	0,015	
0,127	0,017		0,239	0,034		0,132	0,008		0,060	0,008	
0,072	0,005	0,082	0,107	0,009							
0,076	0,004		0,061	0,001							
0,106	0,004										

dpd = desvio padrão; coff = "cut off"

Cálculo do <i>cut-off</i> = 2x desvio padrão da média da DO de cada animal em 0 dpi											
Grupo infectado											
med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff
0,154	0,012	0,178	0,170	0,010	0,190	0,147	0,015	0,177	0,128	0,017	0,161
0,243	0,004		0,200	0,004		0,145	0,006		0,165	0,028	
0,164	0,014		0,167	0,004		0,185	0,013		0,168	0,011	
0,181	0,005		0,211	0,016					0,156	0,015	
0,127	0,017		0,239	0,034		0,132	0,008		0,060	0,008	
0,072	0,005	0,082	0,107	0,009							
0,076	0,004		0,061	0,001							
0,106	0,004										

Cálculo do índice de variação (IV): média de cada dia/ <i>cut off</i>											
Grupo controle											
IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t
0,863	Cont-1	0	0,893	Cont-2	0	0,833	Cont-3	0	0,793	Cont-4	0
1,366		1	1,050		1	0,819		1	1,023		1
0,923		8	0,875		8	1,047		8	1,041		8
1,016		20	1,110		20			20	0,969		20
0,713		41	1,257		41	0,748		41	0,372		41
0,880	Cont-5	0	1,308		20						
0,929		1	0,750		41						
1,296		8									
Grupo infectado											
IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t
0,899	Inf-1	0	0,886	Inf-2	0	0,851	Inf-3	0	0,878	Inf-4	0
1,295		1	1,192		1	0,338		1	0,570		1
1,525		8	1,221		8	0,538		8	0,854		8
4,547		20	2,226		20	2,736		20	3,295		20
1,528		41	0,916		41			41	2,405		41
0,932	Inf-5	0	2,625		20						
0,567		1	1,233		41						
0,894		8									

Planilha de resultados: Expressão em IV

Grupo	Animal	1 dpi	8 dpi	20 dpi	41 dpi
cont	cdg-1	1,366	0,923	1,016	0,713
cont	cdg-2	1,050	0,875	1,110	1,257
cont	cdg-3	0,819	1,047		0,748
cont	cdg-4	1,023	1,041	0,969	0,372
cont	cdg-5	0,929	1,296	1,308	0,750
inf	cdg-1	1,295	1,525	4,547	1,528
inf	cdg-2	1,192	1,221	2,226	0,916
inf	cdg-3	0,338	0,538	2,736	
inf	cdg-4	0,570	0,854	3,295	2,405
inf	cdg-5	0,567	0,894	2,625	1,233

A figura abaixo expressa graficamente estes resultados. A análise estatística (ver Capítulo 19) foi feita e indicou aumento significativo nos dias 20 e 40 pós-infecção.

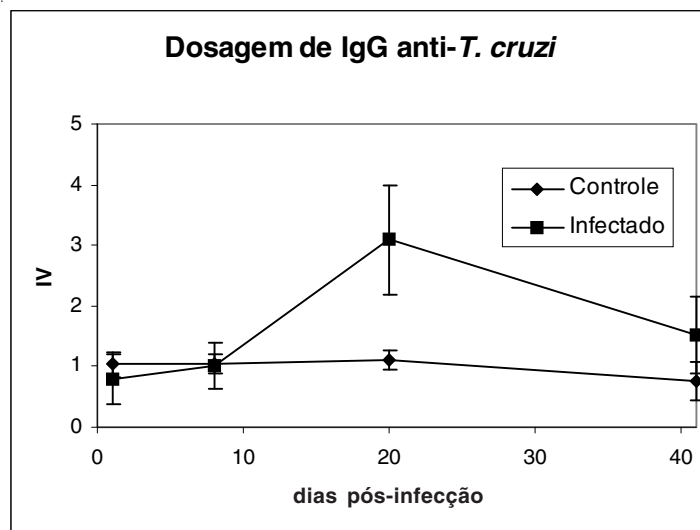


Figura 1 – Valores de índice de variação (IV) para IgG anti *Trypanosoma cruzi* para animais dos grupos controle e infectado

