

IMPORTÂNCIA DAS CITOQUINAS NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

PARTE II: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ANÁLISE

RESUMO

As citocinas são mediadores extremamente importantes no sistema imunológico humano, estando associadas a diversos processos inflamatórios, bem como ao tratamento de diversas doenças. Em muitos estudos, um exame completo para caracterizar inflamações requer a medida exata dos níveis de citocinas no sangue. Dessa forma, este trabalho apresenta uma revisão sobre a extração, purificação e análise das citocinas pela técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*), um protocolo também utilizado no diagnóstico de algumas doenças.

Palavras-chave: citocinas, importância, sistema imunológico, extração, purificação, análise

SUMMARY

Cytokines are extremely important mediators in immunological system, being associated to several inflammatory processes and used in the treatment of several diseases. In many investigation researches, thorough examination of inflammatory conditions requires accurate measurement of cytokine levels in blood. Thus, this work presents a review about the extraction, purification and analysis of the cytokines by ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*) technique, a protocol also used in diagnosis of some diseases.

Keywords: cytokines, importance, immunologic system, extraction, purification, analysis

INTRODUÇÃO

Citoquinas são um grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por praticamente todas as células, principalmente pelos monócitos, macrófagos e linfócitos. Trata-se de proteínas de baixo peso molecular e podem ser enquadradas em diversas categorias de acordo com suas funções: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento (TGF) (1).

O uso de citocinas no tratamento de diversas doenças como vários tipos de câncer, HIV, psoríase e gengivite crônica tem sido estudado. Os recentes estudos focam a maneira como as citocinas organizam a defesa do organismo, enviando sinais químicos entre as células (1,2).

Para que se possam estudar moléculas como as citocinas, faz-se necessário o uso de diversas técnicas,

Boutros Fouad Sarrouh,
Juan Daniel Rivaldi,
Bruno Chaboli Gambarato,
Diego Tresinari dos Santos e
Silvio Silvério da Silva*

Escola de Engenharia de Lorena-USP, Departamento de Biotecnologia

*Autor para correspondência:
Estrada Municipal de Campinho
Caixa Postal: 116
CEP: 12602-810. Lorena. SP
Fone: (12) 3159-5027
E-mail: bsarrouh@yahoo.es

de modo a promover a extração da proteína a partir do sangue, do tecido ou de outra célula, evitando que haja degradação da molécula e, em seguida, realizar a purificação, etapa esta que consiste na separação da citocina de interesse das demais porções do sangue. Por fim, a etapa de análise objetiva caracterizar a proteína obtida.

Tradicionalmente, as citocinas são analisadas por meio de técnicas de imunohistoquímica, que são técnicas baseadas na reação antígeno/anticorpo através de seção corada. Das técnicas conhecidas, o protocolo ELISA é o mais utilizado na análise de citocinas. Vale lembrar que o protocolo ELISA também é utilizado no diagnóstico de várias doenças infecciosas, uma vez que vários agentes patológicos induzem a produção de anticorpos por parte dos linfócitos B do sistema humoral humano (1,2).

EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS CITOQUINAS

A meia vida das citoquinas é curta, baixas concentrações do plasma e redundância dificulta todo o processo de isolamento e caracterização das citoquinas. As buscas para novas citoquinas são conduzidas freqüentemente no nível do DNA, identificando genes similares aos genes já conhecidos de citoquinas (2, 3, 4, 5).

Método de extração de DNA

Uma mostra de o sangue humana é coletada através de punção da veia marginal da orelha utilizando o sistema de coleta a vácuo, contendo anticoagulante. Após a coleta, o sangue deve ser homogeneizado lentamente, para evitar hemólise. Depois da homogeneização, que também tinha como propósito evitar a formação de coágulos, os frascos são acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e enviados ao Laboratório de Genética Molecular, onde já devidamente identificados, são mantidos a uma temperatura de 4°C por 72 horas (tempo suficiente para sedimentação da camada de leucócitos). Em seguida procedeu-se a extração de DNA, realizada segundo um protocolo da farmácia adaptado por Borges (2).

Devem ser tomados 500 ul de sangue na transição entre plasma e eritrócitos, após sedimentação. Inicialmente, o volume de sangue é colocado em um microtubo de centrífuga de 2 ml, então se adiciona o mesmo volume de tampão de lise não diluído (20 mM de Tris-HCl, 640 mM e sacarose, 10 mM de MgCl₂ e 4.00% de Triton X-100), agita-se lentamente e incuba-se em gelo por 30 minutos. Procedeu-se então uma primeira centrifugação a 4000 g por 1 minuto, seguida por duas lavagens com tampão de lise diluído duas vezes, intercaladas por alguns minutos de incubação no gelo (10 minutos). Após a obtenção de um precipitado livre de hemoglobinas, adiciona-se 200 ul de tampão (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 e 5 M de guanidina) para extração e incuba-se a 60°C até que o precipitado fosse totalmente ressuscitado, o que levava aproximadamente 30 minutos. Acrescenta-se, então, 100 ul do tampão de precipitação (150 mM de Tris-HCl, pH 7,5 e 1,225 M de Acetato de Amônio), agita-se suavemente por cerca de 5 minutos. Adicionou-se 300 ul de isopropanol gelado, agitando-se suavemente até precipitar o DNA. Centrifugou-se a 4000 g por 5-10 minutos, descarta-se o sobrenadante, proceda-se mais duas lavagens do precipitado de DNA (centrifugações a 4000 g, 1-2 minutos) com 500 ul de isopropanol 60.00% ou etanol 70.00%, seca-se o precipitado sob vácuo ou em estufa a 60°C e dilui-se em 300-500 ul de tampão TE (10 mM Tris- HCl e 1 mM de EDTA). São necessárias de 1-2 horas de incubação a 75°C para completa diluição do precipitado.

Análise de citoquinas

As citoquinas (ex: TNF - α , IL-10 e IFN - γ), analisados

usando a técnica "ELISA". Anticorpos capturados para todos os citoquinas foi revestido em PBS com um PH = 7.2 - 7.4. Todas as amostras foram diluídas 1:5 com uma solução de tampão. Todos os padrões e amostras devem ser funcionados nas duplicatas (3, 6, 7).

Descrição da técnica "ELISA"

Th1/Th2 ELISA do "eBioscience" contém quatro pares dos anticorpos que podem ser usados para discriminar os subconjuntos Th1/Th2 baseados em sua expressão de IFN - γ , de IL-2, de IL-4 e de IL-10 [7-9,11]. Este conjunto consiste em quantidades suficientes de reagentes para funcionar dois ensaios da placa de "96-poços ELISA" para cada um destas quatro citoquinas (10).

O conteúdo deste reagente de ELISA

1. Anticorpo da captação: o anticorpo pré-titulado, anticorpo purificado, clones XMG1.2, JES6-1A12, 11B11.
2. Anticorpo da detecção: JES5-16E3: o anticorpo pré-titulado, anticorpo biotin-conjugado, clones R4-6A2, JES6-5H4, BVD6-24G2, JES5-2A5.
3. O padrão: citoquina recombinante para gerar a curva padrão e mostras de calibração.
4. Tampão de revestimento: 10X concentrado.
5. Diluente de ensaio: 5X concentrado.
6. Detecção de enzimas: solução pré-titulado do avidin-HRP.
7. Solução do substrato: Tetrametilbenzidina (TMB).
8. Certificado de análise: instruções Lote-específicas para a diluição dos anticorpos e dos padrões
9. Placa de 96-Poços: "Corning Costar 9018" ou "NUNC Maxisorp" de fundo-liso

Outros materiais necessitados

- Tampão:
 - Tampão de lavagem
 - Tampão para parada de reação
- Pipetas
- Refrigerador
- Leitor da placa de "96-poços ELISA": Espectrofotômetro do Micro-prato.
- Lavagem da placa de ELISA: O frasco da lavagem

ELISA Tampão para Citoquinas

1X PBS

- 80.0 g NaCl
- 11.6 g Na₂HPO₄
- 2.0 g KH₂PO₄

2.0 g KCl
DI H₂O 10.0 L
pH 7.0

Tampão de lavagem

1 x PBS
0.05% Tween-20

Tampão para parada de reação

1M H₃PO₄ ou 2N H₂SO₄

Estabilidade da técnica ELISA

Os reagentes de ELISA são garantidos para executar por até 12 meses da data de recibo se armazenado e selado (10).

Procedimento experimental da técnica ELISA

1. Revestimento de 96-poços ELISA placa, do tipo Corning Costar 9018 ou de NUNC Maxisorp, com os 100 µl/poço dos anticorpos da captação no tampão de revestimento. Sele a placa e incube durante a noite em 4°C.
2. Aspire aos poços e lave 3 vezes com um tampão da lavagem de 300 µl/poço. Inverta a placa e borre-a no papel absorvente para remover todos os residuais do tampão.
3. Dilua uma porção do diluente do ensaio concentrado 5X com água deionizada (1/4 do diluente para ¾ de água. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
4. Aspire/lave como a etapa 2.
5. Adicione 100 µl/poço do padrão aos poços apropriados. Execute as diluições 2-fold de série dos padrões para fazer a curva padrão. Adicione 100 µl/poços de suas amostras aos poços apropriados. Sele a placa e incubar por uma hora a temperatura ambiente.
6. Aspire/lave como em etapa 2. Repete para um total de 5 lavagens.
7. Adicione 100 µl/poço do anticorpo da detecção diluído no diluente do ensaio do 1X concentrado. Sele a placa e incube por uma hora a temperatura ambiente.
8. Aspire/lave como a etapa 2. Repita para um total de 5 lavagens.
9. Adicione 100 µl/poço do avidin-HRP diluído no diluente do ensaio do 1X concentrado. Sele a placa e incube por meia hora a temperatura.
10. Aspire e lave como em etapa 2. Nesta etapa da lavagem, embeba poços no tampão da lavagem por 1 a 2 minutos antes do aspiração. Repita para um total de 7 lavagens.
11. Adicione 100 µl/poço da solução de substrato a cada poço. Incube a placa por 15 minutos a temperatura ambiente.

12. Adicione 50 µl/poço do tampão para parada de reação a cada poço.

13. Leia a placa em 450nm. E analise os dados.

CONCLUSÃO

O Protocolo ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*), técnica imunohistoquímica muito utilizada no diagnóstico de doenças como o HIV, é uma alternativa viável para a purificação e análise de citocinas, moléculas muito estudadas ultimamente devido ao seu potencial no tratamento de diversas patologias como câncer, HIV e outras.

Referências

1. NEMZEK, J. A.; SIDDIQQUI, J.; REMICK, D. G. *Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs*. **J. Immun. Method.**, 255, 149-157, 2001.
2. BORGES, M. *Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas de bovino de corte*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.
3. www.Citoquinas2\Cytokine ELISA Kits ANTIGENIX AMERICA Inc.htm. Cited in 01/09/2007
4. *Production and Quality Control of Cytokine Products derived by Biotechnological Processes*. Legislative basis Directive 75/318/EEC as amended. August 1990.
5. THOMSON, A. **The Cytokine Handbook**, 4th edn. Academic Press. 2003.
6. ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MYAJIMA, S.; ARIA, N.; YOKOTA, T. *Cytoquines: coordinators of immune and inflammatory responses*. **Annu Rev Biochem** 59, 783-836, 1990.
7. NATHAN, C.; SPORN, M. *Cytokines in context*. **Cell Bioll.** 113, 981-991, 1991.
8. STEPTOE, A.; WILLEMSSEN, G.; OWEN, N.; FLOWER, L.; & MOHAMED-ALI, V. *Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels*. **Clinical Sci.**, 101, 185-192, 2001.
9. MAES, M.; SONG, C.; LIN, A.; DE JONGH, R.; VAN GASTEL, A.; KENIS, G.; BOSMANS, E. *The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety*. **Clinical Microbiol Rev.**, 10, 313-318, 1998.
10. www.Citoquinas2\Th1 Th2 Cytokine ELISA Kit Mouse Th1-Th2.htm. Cited in 05/08/2007.
11. CURFS, J.A.H.J.; MÉIS, M.G.F.J.; HOOGKAMP-KORSTANJE, A.A. *A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers*. **Clinical Microbiol Rev.**, 742-780, 1997.

Confiança se conquista com o tempo.

⚙️ Centrífugas

A FANEM possui as mais tradicionais centrífugas de mesa com o maior número de aplicativos e grande variedade de acessórios. Capacidade para até 2.400 ml de carga, com e sem refrigeração. Controles microprocessados e motor de indução tipo "brushless". Sistemas de segurança, incluindo detecção automática de desequilíbrio. Estas são algumas das características da Força Centrífuga FANEM.



⚙️ Estufas

Produzidas com tecnologia e materiais avançados, apresentam características de construção robusta e controles microprocessados de alta precisão. A melhor tecnologia está ao seu alcance.



Conheça toda nossa linha de equipamentos para seu laboratório.



Central de vendas
11 6972-5700



comercial@fanem.com.br
www.fanem.com.br

