



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DETERMINAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE IgA SECRETORA EM
LEITE MATERNO**

Aluna: Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra
Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Recife, 2012

ANA KATARINA MORAES MONTEIRO BEZERRA

**DETERMINAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE IgA SECRETORA EM
LEITE MATERNO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE.

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

Recife, 2012

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

ANA KATARINA MORAES MONTEIRO BEZERRA

**DETERMINAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE IgA SECRETORA EM
LEITE MATERNO**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **ANA KATARINA MORAES MONTEIRO BEZERRA**

como:

Recife, __ de agosto de 2012

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Orientador - Membro interno

Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Membro externo

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo-Júnior
Membro externo

Elaine Barroso
CRB 1728

Bezerra, Ana Katarina Moraes Monteiro
Determinação quimiluminescente de IgA secretora em leite materno/
Ana Katarina Moraes Monteiro– Recife: O Autor, 2012.

63 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia,
2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Leite humano 2. Elisa (teste) 3. Luminescência I. Carvalho
Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Título

641.371

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 196

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para lutar e por me escutar em minhas orações, sempre me mostrando uma solução para os problemas que encontrei ao longo desta caminhada. Foi preciso muita fé para acreditar que ia dar certo.

Agradeço especialmente aos meus pais, Roberto e Jane, pelo amor que sempre dedicaram a mim, pela força e esperança que me deram em momentos difíceis. Vocês sempre me impulsionam, me dão coragem para lutar e não me deixam pensar em desistir. Ensinarão-me a importância dos estudos e do conhecimento para meu crescimento profissional e pessoal. Vocês são a luz do meu caminho. Amo vocês!

À minha irmã, Roberta, que tanto amo. Obrigada pela sua torcida, incentivo e pela alegria com as minhas vitórias. Obrigada pela ajuda na revisão estética da minha Dissertação.

Ao meu namorado, Júnior, pelo apoio, incentivo, paciência. É muito bom ter você ao meu lado, te amo!

Aos meus avôs, tios, primos e amigos que ficaram na torcida para que tudo desse certo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carvalho, pela confiança que depositou em mim e por me entusiasmar em momentos que eu não via mais uma solução. O senhor me passa confiança. Admiro sua sabedoria não só científica, mas também de vida. Cresci muito ao seu lado.

Ao Prof. MSc Fabrício Andrade, meu professor na graduação e meu orientador na Iniciação Científica. Você foi muito importante para mim não só na graduação, mas também no Mestrado, pois me apresentou ao Prof. Luiz Carvalho, me ajudou na escolha do tema da dissertação e na execução dos experimentos. Muito obrigada!

À Dra. Maria Laura pela ajuda na coleta das amostras de leite materno.

À Profa. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, pelas suas sugestões.

Agradeço também ao Sr. Otaviano Tavares da Costa, por sua colaboração técnica e à MSc Kilma Paz pela sua assistência técnica no HPLC. Às secretárias Adenilda e Eliete.

À Luiza Rayanna, pela grande contribuição na realização dos meus experimentos. Muito obrigada pela sua ajuda que foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Mariana Cabrera e Rosemary Moura pelo apoio no laboratório e nas dicas valiosas.

Agradeço a todos que fazem o IMOBIO por me ajudarem direta ou indiretamente.

Agradeço ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Roberto e Jane, à minha irmã,
Roberta, e ao meu namorado, Júnior.
Obrigada por sempre acreditarem em
mim!

RESUMO

O aumento na concentração de IgA Secretora em secreções externas é uma importante ferramenta de diagnóstico para infecções que acometem as mucosas. O uso de metodologia de imunoquimiluminescência para realizar tal diagnóstico permite uma maior sensibilidade que os métodos espectrofotométricos tradicionalmente utilizados. Neste trabalho, um ensaio Dot-imunoquimiluminescente (Dot-CLIA) foi proposto para a determinação de IgA Secretora. Os anticorpos anti-IgAS e anti-IgG-peroxidase foram previamente conjugados com éster de acridina (AE). Dot-ELISA e Dot-CLIA foram então realizadas aplicando amostras de IgAS em discos de membranas de nitrocelulose (0,45 μ m de diâmetro de poro) e foi medida a atividade da peroxidase e a quimiluminescência (expressa em unidade relativa de luz; URL), respectivamente. O complexo ternário formado por IgAS/anti- IgAS-AE/anti-IgG-peroxidase-AE e o controle (PBS em substituição a IgAS) forneceram valores de 302.255 ± 28.736 RLU e 8.247 ± 3.479 RLU, respectivamente. Dot-ELISA simultaneamente realizada forneceu cor marrom pelo complexo ternário e ausência de cor foi observada para o controle. A relação entre RLU *versus* quantidade de IgAS utilizando o método proposto mostrou uma curva hiperbólica. O leite materno sem lipídios e caseína purificado por HPLC apresentou três picos de proteína e os que correspondiam a IgAS e ao componente secretor livre apresentaram valores de cerca de 50.000 RLU e 30.000 RLU, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que o ensaio Dot-CLIA é capaz de avaliar quantitativamente e especificamente IgAS em fluidos biológicos.

Palavras chaves: IgA secretora; componente secretor; anti-IgA secretora; Dot-ELISA; imunoquimiluminescência; éster de acridina; membrana de nitrocelulose

ABSTRACT

The increase in the concentration of Secretory IgA in external secretions is an important diagnostic tool for infections that affect the mucous membranes. The use of chemiluminescent methodology to perform such a diagnosis enables a more sensitive than spectrophotometric methods traditionally used. In this work, a Dot-chemiluminescent immunoassay (Dot-CLIA) was proposed for the determination of Secretory IgA. The antibodies Anti-S-IgA and Anti-IgG-peroxidase were previously conjugated to acridinium ester (AE). Dot-ELISA and Dot-CLIA were then carried out spotting S-IgA on nitrocellulose membranes disks (6 mm diameter and pore diameter 0.45 μm) and measuring the peroxidase activity and chemiluminescence (expressed in relative light unit; RLU), respectively. The ternary complex formed by S-IgA/anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE and the control (PBS replacing S-IgA) yielded values of $302,255 \pm 28,736$ RLU and $8,247 \pm 3,479$ RLU, respectively. Dot-ELISA simultaneously carried out produced brown color by the ternary complex and no color was observed for the control. The relationship between RLU and S-IgA amount using the proposed method displayed a hyperbolic curve. The human milk without lipids and casein purified by HPLC presented three protein peaks and those corresponding to S-IgA and free secretory component showed values of about 50,000 RLU and 30,000 RLU, respectively. Therefore, one can conclude that Dot-CLIA is capable to evaluate specifically and quantitatively the S-IgA in biological fluids.

Key words: S-IgA; secretory component; anti-S-IgA; Dot-ELISA; chemiluminescence immunological assay; acridinium ester.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura 1: Resumo dos principais componentes nutricionais e imunológicos do leite humano de mães de Hong Kong no período pós-parto.....	17
Figura 2: Estrutura da molécula de anticorpo	19
Figura 3: Atuação da IgAS contra patógenos e toxinas do lúmen intestinal (A= pIgA é transportada para o lúmen intestinal; B= pIgA liga-se à camada de muco que cobre o epitélio intestinal; C= pIgA neutraliza os patógenos intestinais e suas toxinas)	21
Figura 4: Representação esquemática da Imunoglobulina A Secretora	22
Figura 5: Transcitose da IgAS	23
Figura 6: Diagramas de níveis energéticos. a. Reação térmica; b. Reação fotoquímica; c. Reação Quimiluminescente (R_0 = Reagente inicial, $\neq$ complexo ativado, R^* = Reagente excitado, P^* = Produto Excitado, P_0 = Produto no estado fundamental, Δ = Energia na forma de calor, $h\nu$ = Energia na forma de luz).....	27
Figura 7: 2,6-dimethyl-4-(N-succinimidyl-oxycarbonyl)phenyl 10-methylacridinium-9-carboxylate methosulphate (DMAE-NHS)	29
Figura 8: Mecanismo da reação de QL entre AE e H_2O_2 (I= AE; IV= Dioxetano instável; V= N-metilacridona)	30

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Figura 1: Anti-S-IgA conjugated to acridinium ester purification on Sephadex G-25.....	43
Figura 2: Anti-IgG-peroxidase conjugated to acridinium ester purification on Sephadex G-25.....	44
Figura 3: Relationship between chemiluminescence (RLU) and S-IgA amount.....	46
Figura 4: Chromatogram of human milk without lipids and casein.....	46

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Tabela 1: Dot-ELISA and Dot-Chemiluminescent assays of S-IgA.....45

Tabela 2: Dot-CLIA of fractions of the chromatogram.....47

LISTA DE ABREVIACÕES

AE	<i>Acridinium Ester</i> (Éster de Acridina)
BL	Bioluminescência
C_H	<i>Constant Heavy</i> (Constante pesada)
C_L	<i>Constant Light</i> (Constante leve)
dIgA	Imunoglobulina A dimérica
D1-D5	Domínio 1 – Domínio 5
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoassay</i> (Imunoenzimático)
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> (Fragmento de ligação ao antígeno)
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> (Fragmento cristalizável)
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido Linfóide Associado ao Intestino)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Adquirida)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
IEC	<i>Intestinal Epithelial Cells</i> (Células Epiteliais Intestinais)
IFD	Imunofluorescência Direta
Ig(s)	Imunoglobulina(s)
IgA	Imunoglobulina A
IgAS	Imunoglobulina A Secretora
IgG	Imunoglobulina G
kDa	<i>KiloDalton</i> (QuiloDálton)
LIA	<i>Luminescence immunoassay</i> (Imunoensaio luminescente)
LPS	Lipopolissacarídeo

MALT	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido Linfóide Associada à Mucosa)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pIgR	Receptor da polimunoglobulina
QL	Quimiluminescência
rELISA	ELISA recombinante
RLU	<i>Relative Light Units</i> (Unidade Relativa de Luz)
RN(s)	Recém-Nascido(s)
RPM	Rotações Por Minuto
SC	Componente Secretor
V_H	<i>Variable Heavy</i> (Variável pesada)
V_L	<i>Variable Light</i> (Variável leve)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Aleitamento materno.....	17
2.2 Imunoglobulinas (Igs).....	18
2.2.1 Imunoglobulina A (IgA).....	19
2.2.2 Imunoglobulina A Secretora (IgAS).....	20
2.3 Imunoensaios.....	25
2.4 Luminescência.....	26
2.4.1 Quimiluminescência.....	26
2.4.2 Éster de acridina e seus derivados	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos Específicos.....	39
5. ARTIGO: DOT-CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A	40
6. CONCLUSÕES.....	52
7. ANEXOS.....	53
Anexo 1: Autorização do Comitê de Ética para coleta do leite materno.....	54
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	56
Anexo 3: Normas da revista para submissão do artigo	58

1. INTRODUÇÃO

Dentre as biomoléculas imunoativas recebidas pela criança durante a amamentação e que fornecem proteção passiva ao recém-nascido (RN), ressalta-se a importância da Imunoglobulina A Secretora (IgAS) uma vez que atua impedindo a fixação de micro-organismos aos epitélios mucosos (HANSON *et al.*, 1984). O epitélio mucoso reveste uma área aproximadamente 200 vezes maior do que a pele e cerca de 90% dos micro-organismos causadores de infecções em humanos utilizam esta região como porta de entrada (BRANDTZAEG, 2003). Segundo NATHAVITHARANA *et al.* (1994), o anticorpo específico IgAS encontrado no leite humano reflete os enteropatógenos encontrados na comunidade, protegendo os RNs contra infecções gastrointestinais.

A IgAS é constituída por dois monômeros de Imunoglobulina A (IgA); é um dímero unido pela cadeia J e que, após sofrer transcitose, adquire o componente secretor, sendo então denominado IgA Secretora ou Secretória. Esta é a imunoglobulina presente em maior quantidade nas secreções externas, tais como no colostro e leite humano (UNDERDOWN & SCHIFF, 1986; KELSALL & STROBER, 1996). Possui a região da dobradiça glicosilada e rica em prolina; tal característica confere a esta imunoglobulina a capacidade de transitar no trato gastrointestinal do recém-nascido sem sofrer ataques proteolíticos (KELSALL & STROBER, 1996).

Apesar de ser considerada como primeira linha de defesa, a IgAS faz parte da imunidade adquirida e leva tempo para ser produzida; por conseguinte, a IgAS nas secreções externas atua como primeira barreira contra micro-organismos previamente encontrados ou que apresentem semelhança antigênica com os micro-organismos da microbiota normal (SHARON, 2000).

Ensaio recentes utilizaram métodos espectrofotométricos para determinação dos níveis de IgAS como ferramenta de diagnóstico para infecções em mucosas. Análises laboratoriais baseadas na metodologia de quimiluminescência têm sido desenvolvidas para dosagens que requerem uma alta sensibilidade (KRICKA, 2003), já que este método apresenta sensibilidade bem superior à encontrada nos métodos espectrofotométricos.

Vários compostos orgânicos exibem quimiluminescência (QL) em condições apropriadas. O éster de acridina (AE) é um deles e foi introduzido em imunoensaios a partir da necessidade de substituir os marcadores radioisotópicos que estavam se tornando pouco populares devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto

aos dejetos gerados (WEEKS *et al.*, 1983). Desde então o éster de acridina tem sido foco de pesquisas para ampliar suas aplicações nas mais diversas áreas de Biotecnologia (ADAMCZYK *et al.*, 2001).

Em nosso laboratório, demonstramos que biomoléculas conjugadas com éster de acridina validam o método quimiluminescente, permitindo uma maior precisão na identificação de determinados antígenos. Isto nos motivou a investigar e validar o mesmo método com anticorpo do leite materno, pois, atualmente, anticorpos estão sendo cada vez mais utilizados na rotina do diagnóstico de diversas doenças infecciosas.

A presença de IgAS em secreções externas ocorre quando entramos em contato com antígenos que têm as mucosas como sítio-alvo. Durante infecções que acometem as mucosas, os títulos desta imunoglobulina aumentam bastante, sendo este aumento um bom indicador de infecção. Este projeto se postula a detectar os níveis de IgAS total mediante quimiluminescência usando como marcador o éster de acridina. A literatura não registra determinação quimiluminescente de IgAS em leite materno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aleitamento materno

Durante a lactação existem três estágios bem definidos de maturação do leite: colostro, leite de transição e leite maduro. O colostro humano é a secreção produzida inicialmente pelas glândulas mamárias, nos cinco primeiros dias após o parto. É um fluido viscoso e de cor amarelada (VALDÉS *et al.*, 1997). A partir do 5º dia pós-parto forma-se o leite de transição, que tem maior fluidez e volume; sua cor varia progressivamente do branco cremoso ao branco azulado (LANG, 1999). No período de 10 a 15 dias após o parto, o leite de transição se transforma em leite maduro definitivo (LANG, 1999).

De acordo com YUEN *et al.* (2012), em sua análise sobre leite de mães de Hong Kong, foi observado diferenças constitucionais entre o colostro e o leite maduro materno, como mostra a figura abaixo. O colostro possui maior conteúdo protéico que o leite maduro e sua concentração de IgAS é 48% maior que a do leite maduro (YUEN *et al.* 2012)

Constituinte	Unidade	Colostro 1-5 dias	Leite Maduro > 30 dias
Conteúdo Protéico			
Proteína total	g/l	25,04 ± 11,34	10,06 ± 1,43
Caseína	g/l	6,81 ± 6,10	6,02 ± 2,07
Elementos Imunológicos			
Lactoferrina	mg/dl	128,03 ± 168,66	117,56 ± 261,95
IgAS	mg/dl	806,35 ± 792,58	545,94 ± 334,60
Lisozima	mg/dl	8,0 ± 7,34	11,34 ± 3,79

Figura 1: Resumo dos principais componentes nutricionais e imunológicos do leite humano de mães de Hong Kong no período pós-parto.

Adaptação de: YUEN *et al.*, 2012

Está clara a existência de circulação broncomamária e enteromamária, que assegura que qualquer patógeno que entre em contato com a mãe estimule a produção de anticorpos

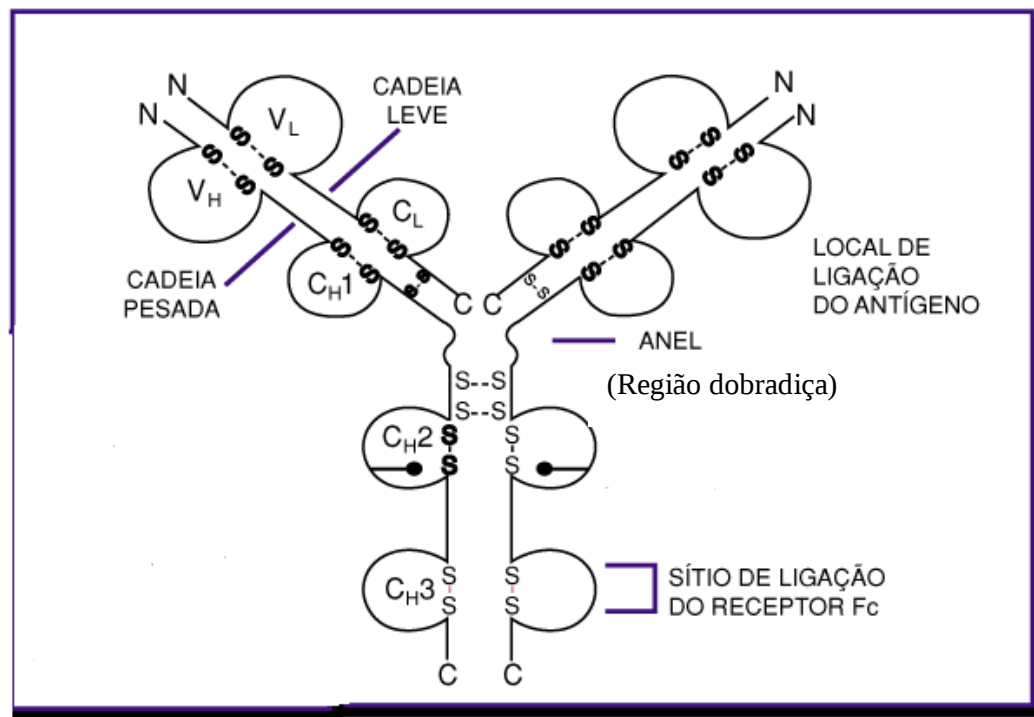
específicos nas glândulas mamárias, sendo estes encontrados no leite materno (AKRÉ, 1997). Quando a mãe se alimenta, linfócitos T e, principalmente, B, localizados nas placas de Peyer dos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) entram em contato com micro-organismos e antígenos alimentares (BRANDTZAEG *et al.*, 1999). As células linfóides da Placa de Peyer são drenadas pelos vasos linfáticos até os linfonodos mesentéricos, alcançam o fluxo linfático e chegam à circulação sanguínea via ducto torácico (ZAHA, 1986) até atingirem glândulas exócrinas, como as mamárias (HANSON *et al.*, 1984). Neste local ocorre produção abundante de IgAS que, por sua vez, será ingerida pelo RN no momento da amamentação através do leite materno; assim, a mãe confere proteção passiva ao RN contra patógenos aos quais está exposta (ESTEVES, 2007).

2.2 Imunoglobulinas (Igs)

Imunoglobulina (Ig) é o termo genérico que se refere a um grupo diversificado de moléculas encontradas no sangue e nos fluidos teciduais (DOAN *et al.*, 2006). Este termo deriva do fato de serem moléculas com função imunológica e de migrarem em um campo eletroforético na fração γ -globulina das proteínas séricas (PEAKMAN & VERGANI, 1999; DOAN *et al.*, 2006).

Possuem em sua estrutura básica quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias idênticas leves (L= *Light*) do tipo κ ou λ , de 25 kDa, e duas cadeias idênticas pesadas (H= *Heavy*) do tipo α , δ , ϵ , γ ou μ , de 50-75 kDa (DOAN *et al.*, 2006; GUILHERME, 2010; ALBERTS *et al.*, 1997; PEAKMAN & VERGANI, 1999). As pontes dissulfeto mantêm as cadeias leves e pesadas juntas (ligação intercadeia); estas ligações unem as cadeias pesadas na região dobradiça, que confere flexibilidade à imunoglobulina (DOAN *et al.*, 2006). Dentro das cadeias leves e pesadas há ligações dissulfeto intracadeia, formando os domínios (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

A forma simplificada de uma imunoglobulina é um Y, com dois sítios de ligação para antígenos idênticos, cada um em uma das extremidades dos braços do Y (ALBERTS *et al.*, 1997); esta região é chamada de Fab (*fragment antigen binding*) (PEAKMAN & VERGANI, 1999). A função efetora das imunoglobulinas é mediada pela cauda da molécula (ALBERTS *et al.*, 1997); esta região é chamada Fc (*fragment crystallisable*) (PEAKMAN & VERGANI, 1999).



Fonte: ABRAS *et al.*, 1994.

Figura 2: Estrutura da molécula de anticorpo

Adaptação de: ABRAS *et al.*, 1994 apud CECCON *et al.*, 1997

2.2.1 Imunoglobulina A (IgA)

HEREMANS *et al.* (1959) identificaram pela primeira vez a Imunoglobulina A (IgA) no soro. Quase dois terços da quantidade de anticorpos produzida diariamente pelo homem são de IgA (66 mg/kg), sintetizada pelas células B nas paredes dos tratos gastrointestinal e respiratório (ABBAS *et al.*, 2008; RÚPOLO *et al.*, 1998).

A principal função biológica da IgA é a proteção contra micro-organismos invasores como vírus e bactérias nas superfícies mucosas, inibindo o mecanismo de aderência desses às células epiteliais (RÚPOLO *et al.*, 1998). A IgA não fixa complemento, por isso pode atuar contra micro-organismos sem desencadear a cascata do processo inflamatório que danifica as superfícies epiteliais; apresenta meia-vida curta (aproximadamente 6 dias), por isso nem sempre protege contra reinfecção; promove diminuição da absorção de uma variedade de antígenos ou alérgenos, inalados ou ingeridos, que podem desencadear resposta imune (RÚPOLO *et al.*, 1998). É eficiente nos processos de aglutinação; a ligação do anticorpo ao micro-organismo afeta a sua estrutura e os impede de se ligar à célula (DOAN *et al.*, 2006).

IgA é a segunda classe de anticorpos mais prevalente no soro humano (ALMOGREN *et al.*, 2007), constituindo cerca de 15% a 20% do total das imunoglobulinas séricas (SHELDRAKE *et al.*, 1984). Nas secreções internas (humor aquoso, fluidos sinovial, pleural, peritoneal, amniótico, cerebrospinal), o conteúdo de imunoglobulinas é similar ao soro humano normal; nas secreções externas (lágrima, colostro, fluidos gastrointestinal e respiratório, secreções salivares parotídeas e submaxilares, secreção nasal, bile, urina) há uma alta concentração de IgA, equivalente à concentração de Imunoglobulina G (IgG) no soro (ZAHA-INOUE, 1985).

2.2.2 Imunoglobulina A Secretora (IgAS)

Embora existam níveis significativos de IgA no soro é consenso geral que a forma secretora desta imunoglobulina, sob o ponto de vista funcional, é mais importante (ROITT *et al.*, 2003). A maioria da IgA está presente em secreções na forma dimérica, onde exerce função biológica importante como parte do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) (BENJAMINI *et al.*, 2002).

Superfícies mucosas são constantemente expostas a antígenos estranhos e devem ser eficientemente protegidas para evitar uma possível invasão por patógenos (ALMOGREN *et al.*, 2009). A IgAS é uma das primeiras linhas de defesa das mucosas, onde exerce a sua função de neutralização e opsonização de antígenos (ALMOGREN *et al.*, 2009). Também atua prevenindo a fixação de micro-organismos às superfícies epiteliais (MESTECKY *et al.*, 1999).

Anticorpos IgAS em secreções mucosas contribuem para a homeostase imune por limitação do acesso de antígenos microbianos e ambientais para o interior do corpo, mantendo a integridade da barreira epitelial e moldando a composição da microbiota comensal (MACPHERSON *et al.*, 2008). Estas funções são particularmente importantes no trato intestinal, onde estão localizadas cerca de 100 trilhões de bactérias (JOHANSEN & KAETZEL, 2011). A predominância de IgAS em membranas secretoras leva à especulação de que sua principal função não deve ser a de destruir o antígeno, mas sim evitar o acesso deles ao sistema imunológico geral (STITES & TERR, 1992).

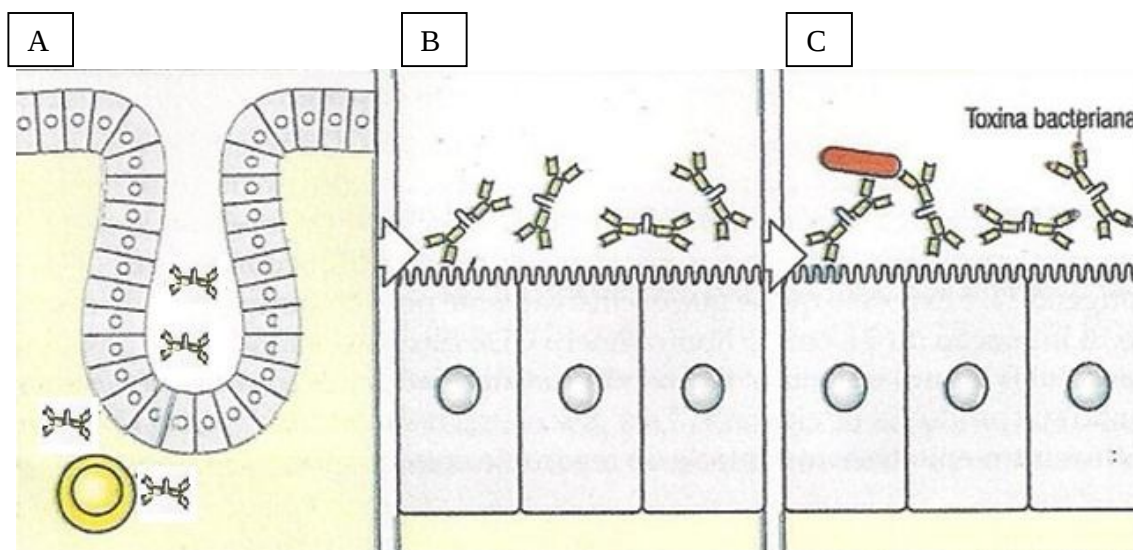


Figura 3: Atuação da IgAS contra patógenos e toxinas do lúmen intestinal (A= pIgA é transportada para o lúmen intestinal; B= pIgA liga-se à camada de muco que cobre o epitélio intestinal; C= pIgA neutraliza os patógenos intestinais e suas toxinas)

Adaptação de: JANEWAY *et al.*, 2007

A microbiota intestinal está envolvida no desenvolvimento do sistema imune intestinal e na produção de um repertório diversificado de IgAS (NEWBURG & WALKER, 2007). Em estudos com animais *germ-free*, MOREAU *et al.* (1978) e TALHAM *et al.* (1999) observaram uma produção de IgAS reduzida, que poderia alcançar valores normais dentro de algumas semanas após a recolonização intestinal (MATHIAS & CORTHÉSY, 2011).

A IgAS é produzida localmente por plasmócitos da lâmina própria na forma polimérica, que consiste em duas (ou às vezes três ou quatro) moléculas de IgA ligadas covalentemente por meio de sua porção Fc ao polipeptídeo cadeia J (ALMOGREN *et al.*, 2009). Ao passar através da célula epitelial, a IgAS liga-se a um receptor secretado, o componente secretor (SC), o que aumenta a sua resistência à digestão por enzimas proteolíticas e alterações de pH (CARBONARE & CARNEIRO-SAMPAIO, 2001). Tem peso molecular de 385-390 kDa e coeficiente de sedimentação 11S (DOAN *et al.*, 2006; ZAHA, 1986).

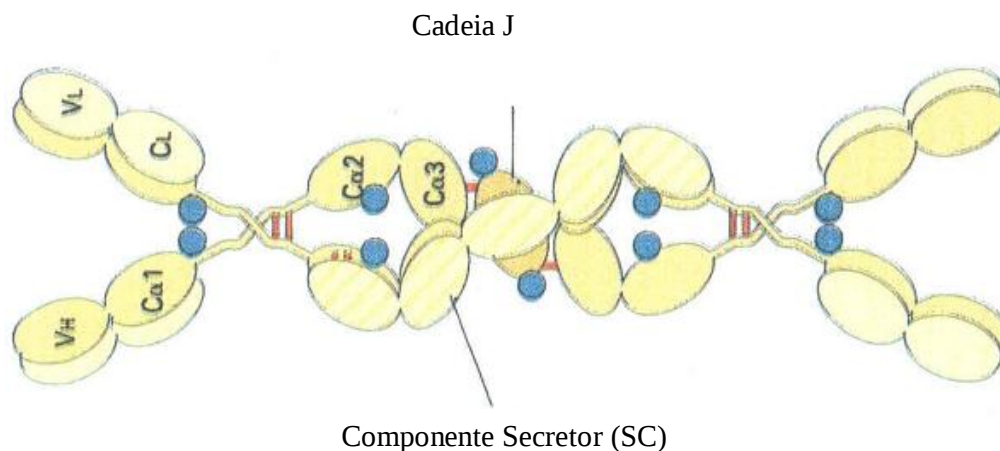


Figura 4: Representação esquemática da Imunoglobulina A Secretora

Adaptação de: ROITT *et al.*, 2003

A cadeia J é um pequeno polipeptídeo ácido de 15 kDa sintetizado por células que secretam imunoglobulinas poliméricas e está ligada covalentemente ao penúltimo resíduo de cisteína das cadeias α e μ (STITES & TERR, 1992).

O SC é uma cadeia polipeptídica de alto conteúdo de carboidratos sintetizado pelas células epiteliais localizadas próximas da mucosa onde ocorre a secreção (STITES & TERR, 1992). Possui mais carboidratos que a cadeia α , o que contribui para um maior conteúdo de carboidratos na IgAS do que na IgA sérica (STITES & TERR, 1992). Sua massa molecular é de 79,6 kDa e é composto por cinco tipos variáveis de domínios de imunoglobulina (D1-D5) com 100 a 110 resíduos cada (KAETZEL, 2005). A proteção contra o ataque de proteases presente nas secreções mucosas se dá porque o SC protege a região da dobradiça da IgAS (SHARON, 2000).

O SC está associado apenas à IgAS e é encontrado quase que exclusivamente nas secreções orgânicas, já a cadeia J está associada a todas as formas poliméricas de imunoglobulinas (STITES & TERR, 1992). SC pode ser encontrado ligado à IgAS por fortes interações não-covalentes ou livre nas secreções de indivíduos e pode estar presente mesmo naqueles que não possuem IgA detectável no soro ou nas secreções (STITES & TERR, 1992).

A IgAS é gerada através da cooperação entre dois tipos de células distintas em membranas mucosas: células plasmáticas na lâmina própria, que secretam IgA dimérica (dIgA), e as células epiteliais, que transportam a IgAS para o lúmen (JOHANSEN & KAETZEL, 2011). Esse processo de migração de dIgA através de células epiteliais intestinais polarizadas é chamado transcitose e é mediado pelo receptor de imunoglobulina polimérica

(pIgR), uma glicoproteína epitelial que capta a sua carga na superfície basolateral e a transporta através do processo de transcitose à face apical (JOHANSEN & KAETZEL, 2011).

Acredita-se que a cadeia J é reconhecida pela pIgR (SHARON, 2000), dando início à transcitose. Assim, a dIgA secretada é capturada pelo pIgR expresso nas células epiteliais intestinais na superfície basolateral (ASANO & KOMIYAMA, 2011). O complexo dIgA-pIgR é internalizado e transferido para superfície apical, onde a porção extracelular do pIgR é proteoliticamente clivada e liberada para o lúmen com a dIgA (ASANO & KOMIYAMA, 2011). Nesta clivagem, há liberação dos cinco domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina do pIgR, também conhecidos como componente secretor (SC), para dentro do lúmen em conjunto com a sua carga (dIgA), formando assim o complexo IgAS (JOHANSEN & KAETZEL, 2011). Na ausência de dIgA há transcitose constitutiva do pIgR, que é a fonte de SC livre em secreções mucosas (JOHANSEN & KAETZEL, 2011) (Figura 6).

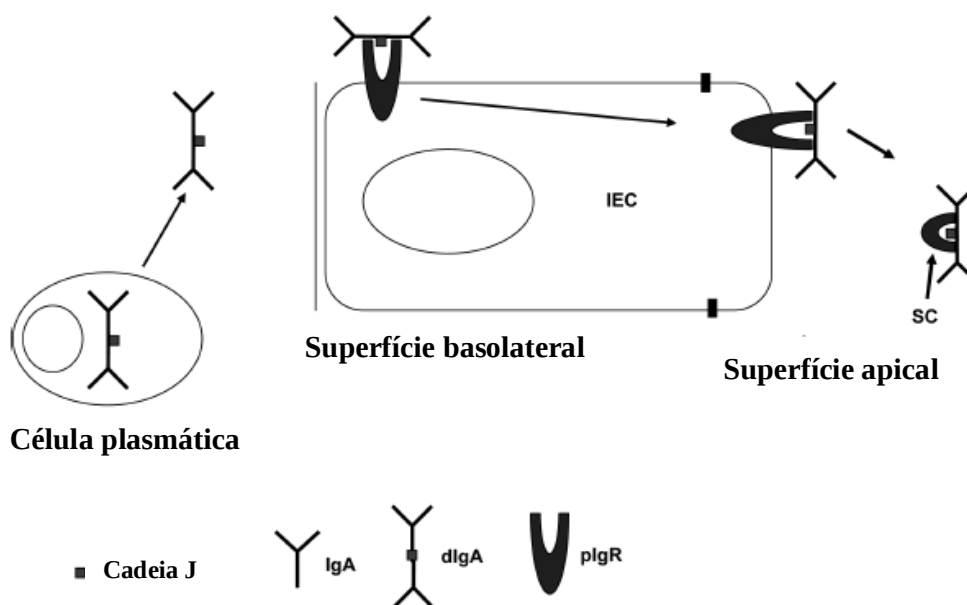


Figura 5: Transcitose da IgAS

Adaptação de: ASANO & KOMIYAMA, 2011

Em secreções e no soro, IgA humana existe como duas subclasses, IgA₁ e IgA₂ (ALMOGREN *et al.*, 2007). SC se liga às duas subclasses de IgAS, embora tenha sido mostrado que o SC liga-se covalentemente a IgAS₁, mas principalmente não covalentemente a IgAS₂ (ALMOGREN *et al.*, 2007). As duas formas isotípicas, IgA₁ e IgA₂, estão presentes

nos fluidos biológicos em várias proporções de acordo com a secreção (KERR, 1990). A subclasse monomérica IgA₁ perfaz cerca de 90% da IgA encontrada no soro; a forma dimérica da IgA₁ (IgA₁S) é encontrada predominantemente em secreções acima do diafragma, como leite, saliva, lágrima, secreções nasais e pulmonares (DOAN *et al.*, 2006). A subclasse IgA₂ perfaz aproximadamente 10% da IgA sérica; sua forma secretora, IgAS₂, corresponde à maioria da IgA encontrada no lúmen da porção inferior do sistema gastrointestinal (DOAN *et al.*, 2006). Em secreções como o colostro, que é a mais rica fonte de IgAS, a concentração de IgAS₁ e IgAS₂ é similar (ALMOGREN *et al.*, 2007).

O significado fisiológico das subclasses da IgAS permanece pouco claro, mas sabe-se que polissacarídeos, tais como LPS, induzem uma melhor resposta de IgAS₂ que IgAS₁ (BROWN & MESTECKY, 1985; MOLDOVEANU *et al.*, 1987). Em contraste, IgAS₁ é principalmente dirigida contra antígenos protéicos (LADJEVA *et al.*, 1989). A suscetibilidade à proteases também difere.

Poucas espécies produzem proteases capazes de degradar IgA, dentre elas estão agentes bacterianos patogênicos de superfícies mucosas; uma vez que outras espécies bacterianas relacionadas, mas não patogênicas, do mesmo gênero não produzem proteases de IgA, a produção destas enzimas pode ser associada com a virulência dos organismos (LOOMES *et al.*, 1990).

ALMOGREN *et al.* (2009), analisando através de SDS-PAGE o SC sob condições não-redutoras, observaram que SC foi libertado da IgAS₂ em contraste com IgAS₁, onde SC manteve-se ligado. Eles sugeriram então que SC liga-se de forma diferente às duas isoformas de IgAS e mostra diferente sensibilidade à clivagem proteolítica.

Pesquisas futuras sobre a função e regulação do pIgR e IgAS podem oferecer novas perspectivas sobre a prevenção e tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias, doenças que são originadas em superfícies mucosas (JOHANSEN & KAETZEL, 2011). Vários ensaios têm sido descritos para medir os níveis de subclasses de IgAS em secreções utilizando anticorpos monoclonais (RUSSELL *et al.*, 1986; MESTECKY *et al.*, 1996). Contudo estes ensaios são prejudicados pela necessidade de preparação de controles IgAS₁ e IgAS₂ e por variações na afinidade dos reagentes para a sua correspondente subclasse (DE FIJTER *et al.*, 1995). Além disso, anticorpos contra cadeias α humanas reagem diferentemente de acordo com o status de IgA polimérica (HOCINI *et al.*, 2000).

2.3 Imunoensaios

Um ensaio imunológico consiste, basicamente, na utilização de um anticorpo específico para a substância que se deseja identificar ligado em um marcador (molécula quimiluminescente, fluorescente, enzima, isótopo radioativo, etc.) que será responsável pela revelação do complexo antígeno-anticorpo, se este for formado (XIMENES, 2000)

Segundo GREGORY & ALLANSMITH (1986), a presença de antígenos em determinados sítios induz grande expressão clonal, que resulta em níveis elevados de anticorpos IgA no local e em outros sítios não expostos ao antígeno simultaneamente.

Em seus estudos com pacientes com candidíase POLONELLI *et al.* (1991) concluíram que a identificação de IgA na superfície de células de *Candida albicans* em pacientes com sinais clínicos de candidíase pode ser uma forte evidência de seu papel na proteção contra a doença, podendo ser utilizada, inclusive, como forma de diagnóstico.

GARWEG *et al.* (2000), estudando toxoplasmose ocular, observaram que a determinação de IgA específica no soro e humor aquoso contribui para o diagnóstico de doença ocular. Estudando a mesma doença, LYNCH *et al.* (2004), utilizando ELISA, observaram uma forte associação entre os níveis de IgAS em lágrima e o quadro clínico compatível com padrão ouro de toxoplasmose ocular. Fazendo comparação entre pacientes com uveíte toxoplásmica e pacientes saudáveis, obtiveram sensibilidade de 84% e especificidade de 78%.

Também utilizando ELISA, ESTEVES (2007) analisou quantitativamente a presença de IgAS anti-*Escherichia coli* enteropatogênica em colostro humano, comparando seus níveis em mães eutróficas e desnutridas, onde observou que a desnutrição materna não afeta a produção de IgAS.

MAZZOLI *et al.* (2007) avaliaram o papel do anticorpo IgAS anti-*Chlamydia trachomatis* em ejaculado total de pacientes afetados pela prostatite crônica / síndrome de dor pélvica crônica como potenciais marcadores da infecção por *C. trachomatis* na próstata, em comparação com controles saudáveis. IgAS anti-*C. trachomatis* foi determinada por IPAzyme Chlamydia IgG/IgA (Imunoperoxidase). Foi observada uma elevada produção de anticorpos específicos IgA anti-*C. trachomatis* nesses pacientes, com detecção de 69,2% dos pacientes que tiveram resultado positivo por PCR.

Em estudo semelhante, FRESSE *et al.* (2010), utilizando swab uretral em homens e cervical em mulheres, avaliaram o diagnóstico direto de *C. trachomatis* em uma população de alto risco usando cultura de células, imunofluorescência direta (IFD) e PCR. O anticorpo IgAS também foi avaliado usando ELISA com lipopolissacarídeo recombinante (rELISA). Concluíram que, combinando resultado positivo nos métodos diretos e/ou resultado positivo de anticorpos IgAS, tinham uma indicação de infecção atual por *C. trachomatis*. Resultado negativo nos testes diretos e no rELISA IgAS seria confirmatório de ausência de infecção.

A determinação dos níveis de IgAS em várias secreções humanas é de grande valia para o diagnóstico de diversas doenças, principalmente as que acometem as mucosas. A utilização de metodologia de elevada sensibilidade, como a quimiluminescência, pode aumentar a sensibilidade e a especificidade do método diagnóstico, tornando o resultado mais fidedigno.

2.4 Luminescência

Luminescência é definida como emissão de radiação eletromagnética em comprimentos de onda que vão do ultravioleta ao infravermelho no espectro eletromagnético (SANTOS *et al.*, 1993). Essa emissão ocorre quando uma molécula ou átomo excitado decai para seu estado fundamental (DODEIGNE *et al.*, 2000). A luminescência, a depender das formas de excitação, está subdividida em: quimiluminescência (reação química), bioluminescência (fenômeno biológico), termoluminescência (fenômeno térmico), eletroluminescência (bombardeamento de elétrons) e fotoluminescência (fluorescência e fosforescência) (BECK & KOSTER, 1990 *apud* SANTOS *et al.*, 1993; ATKINS, 2003). Dentre estas, a quimiluminescência (QL) e a bioluminescência (BL) têm grande importância analítica (SANTOS *et al.*, 1993).

2.4.1 Quimiluminescência

A quimiluminescência (QL) baseia-se na produção de radiação eletromagnética (ultravioleta, visível ou infravermelho) quando uma reação química produz uma molécula eletronicamente excitada (GARCÍA-CAMPAÑA *et al.*, 2003). Há conversão da exotermicidade da reação em energia de excitação eletrônica (CATALANI, 1996). A reação

de QL envolve a absorção, pelos reagentes, de energia suficiente para a geração de um complexo ativado, que se transforma em produto eletronicamente excitado (NERY & BAADER, 2001). Se a espécie excitada for emissiva, esta produzirá quimiluminescência diretamente, se não, pode ocorrer transferência de energia do estado excitado formado para uma molécula aceptora apropriada, resultando na emissão indireta de quimiluminescência (NERY & BAADER, 2001).

Então, em uma reação quimiluminescente ocorre o seguinte processo: o reagente no estado fundamental (R_0) adquire energia suficiente para originar o complexo ativado ($\ddagger$), o qual se transforma no produto eletronicamente excitado (P^*); ao retornar ao seu estado fundamental (P_0), dissipa o excesso de energia na forma de luz ($h\nu$) (ADAM, 1980; NERY & BAADER, 2001) (Figura 7c).

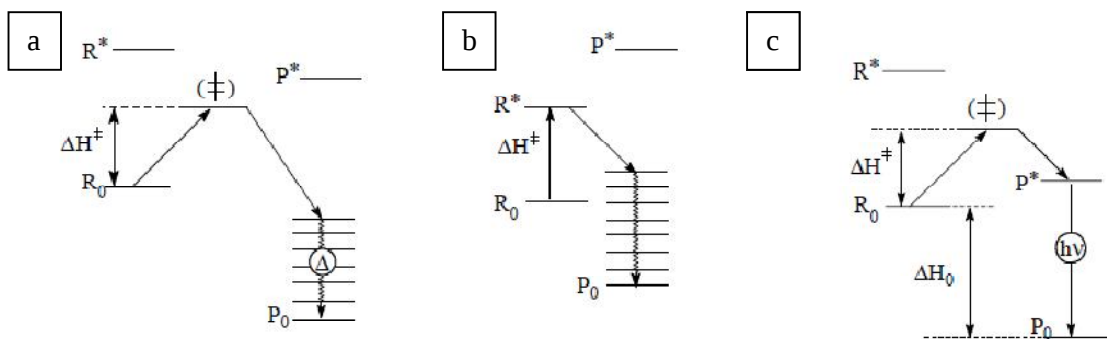


Figura 6: Diagramas de níveis energéticos. **a.** Reação térmica; **b.** Reação fotoquímica; **c.**

Reação Quimiluminescente (R_0 = Reagente inicial, $\ddagger$ complexo ativado, R^* = Reagente excitado, P^* = Produto Excitado, P_0 = Produto no estado fundamental, Δ = Energia na forma de calor, $h\nu$ = Energia na forma de luz)

Fonte: NERY & BAADER, 2001

O fenômeno da QL ocorre devido à quebra de ligações ricas em energia, tais como peróxidos, hidroperóxidos ou 1,2-dioxetanos, já existentes nas moléculas ou formadas a partir de rearranjos moleculares (intermediários) (SANTOS *et al.*, 1993). Esse processo pode ser ativado enzimaticamente ou quimicamente (SANTOS *et al.*, 1993).

As principais características das reações quimiluminescentes adequadas para aplicação analítica são os excelentes limites de detecção que podem ser alcançados e a simplicidade da instrumentação necessária para registrar o sinal analítico (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). Possuem ensaios rápidos, especificidade e, quando comparadas aos radioisótopos, possuem toxicidade inferior, custo operacional mais baixo, não agressão ao operador e ao meio

ambiente e estabilidade dos reagentes (FERREIRA & ROSSI, 2002; KRICKA, 2003; WHITEHEAD *et al.*, 1979). Além disso, é um sistema frio, uma vez que a energia na forma de luz é produzida diretamente de uma reação química, sem passar por um estágio intermediário envolvendo calor (CATALANI, 1996).

Substâncias luminescentes podem ser detectadas na faixa de fentomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol), com sensibilidade superior aos ensaios espectrofométricos (10^{-6} a 10^{-12} mol) e fluorimétricos (10^{-9} a 10^{-12} mol) (CAMPBELL *et al.*, 1985). O nível de detecção por QL pode chegar a zeptomoles (10^{-21} mol) (KRICKA, 2003).

A elevada sensibilidade de métodos analíticos quimiluminescentes está ligada a vários fatores, como ausência da necessidade de uma fonte de radiação, o que diminui ou elimina os espalhamentos de Raman e Rayleigh e o ruído associado com este tipo de componente, aumentando a razão sinal / ruído da medida (ROBARDS & WORSFOLD, 1992). A ausência de uma fonte de radiação externa para excitação diferencia a QL da fluorescência e permite que a implementação dessa técnica seja simplificada (LEITE *et al.*, 2004).

Análises laboratoriais baseadas em QL estão sendo desenvolvidas para dosagens que requerem uma alta sensibilidade e vários testes já estão disponíveis comercialmente, entre eles a avaliação da função tireoidiana, fertilidade, lesão do miocárdio, marcadores tumorais, monitoramento de drogas terapêuticas e doenças infecciosas como, por exemplo, hepatite e HIV (KRICKA, 2003).

Hormônios, drogas e outras substâncias presentes em baixo nível em fluidos orgânicos podem ser dosadas por imunoensaios baseados na luminescência (SANTOS *et al.*, 1993). Esses métodos empregam uma proteína de alta especificidade, como um anticorpo, ligado a um marcador quimiluminescente (SANTOS *et al.*, 1993). Reações quimiluminescentes também são úteis como reações de detecção de componentes de misturas separadas por técnicas como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

Vários compostos orgânicos exibem QL em condições apropriadas, entre eles está a lofina, lucigenina, pirogalol e luciferina (ROBARDS & WORSFOLD, 1992; ALBERTIN *et al.*, 1998). Merece destaque o luminol, isoluminol, éster de acridina e seus derivados (RODA *et al.*, 2000).

As primeiras substâncias quimiluminescentes utilizadas como marcadores foram o luminol e o isoluminol, porém eles apresentam desvantagens como a diminuição do quantum de luz quando acoplado às proteínas e o requerimento de um catalisador na reação, o que

aumenta o “background”, reduzindo a sensibilidade da técnica (WEEKS *et al.*, 1983; CAMPBELL *et al.*, 1985). Com maior sensibilidade, os marcadores com éster de acridina (AE) rapidamente os substitui (CAMPOS *et al.*, 2006)

2.4.2 Éster de acridina e seus derivados

Os derivados de acridina são moléculas que possuem um nitrogênio quaternário central e uma ramificação no carbono 9 (C-9), onde está inserido um radical éster fenil instável (WEEKS *et al.*, 1983).

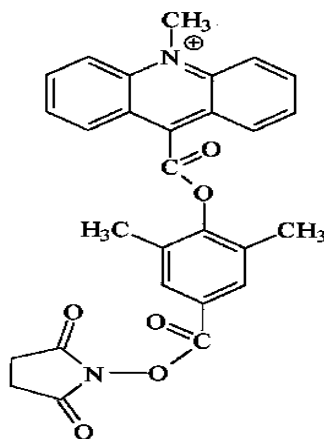


Figura 7: 2,6-dimethyl-4-(N-succinimidyl-oxy-carbonyl)phenyl 10-methylacridinium-9-carboxylate methosulphate (DMAE-NHS)

Fonte: Dodeigne *et al.* (2000)

O éster de acridina (AE) foi introduzido em imunoenaios a partir da necessidade de substituir os marcadores radioisotópicos que estavam se tornando pouco populares devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados (WEEKS *et al.*, 1983). Desde então o AE tem sido foco de pesquisas para ampliar suas aplicações nas mais diversas áreas da Biotecnologia (ADAMCZYK *et al.*, 2001). O luminol e isoluminol tornaram-se obsoletos pelas vantagens do AE, tais como inerente alta sensibilidade, simplicidade e facilidade de manuseio e eliminação, além de vida útil longa (CAMPBELL *et al.*, 1985). Os AEs apresentam rápida emissão de luz (completa em menos de 5 segundos) com química simples e seu pequeno tamanho permite protocolos de rotulagem

simples para proteínas e ácidos nucleicos (NATRAJAN *et al.*, 2010; NATRAJAN *et al.*, 2011).

De acordo com KING *et al.*, 2007 o éster de acridina é estável em soluções ácidas, mas é rapidamente hidrolisado em soluções básicas. Em presença do íon peróxido (HOO^-), AE forma um composto dioxetano instável, que decai produzindo N-metilacridona e luz (KING *et al.*, 2007) (Figura 9). Acredita-se que essa emissão de luz resulta da adição de íons hidroperóxido ao anel de acridina em C-9, seguido por clivagem da ligação éster fenólico e, finalmente, resultando na formação de acridona no estado excitado, que é a fração de saída da luz (NATRAJAN *et al.*, 2010).

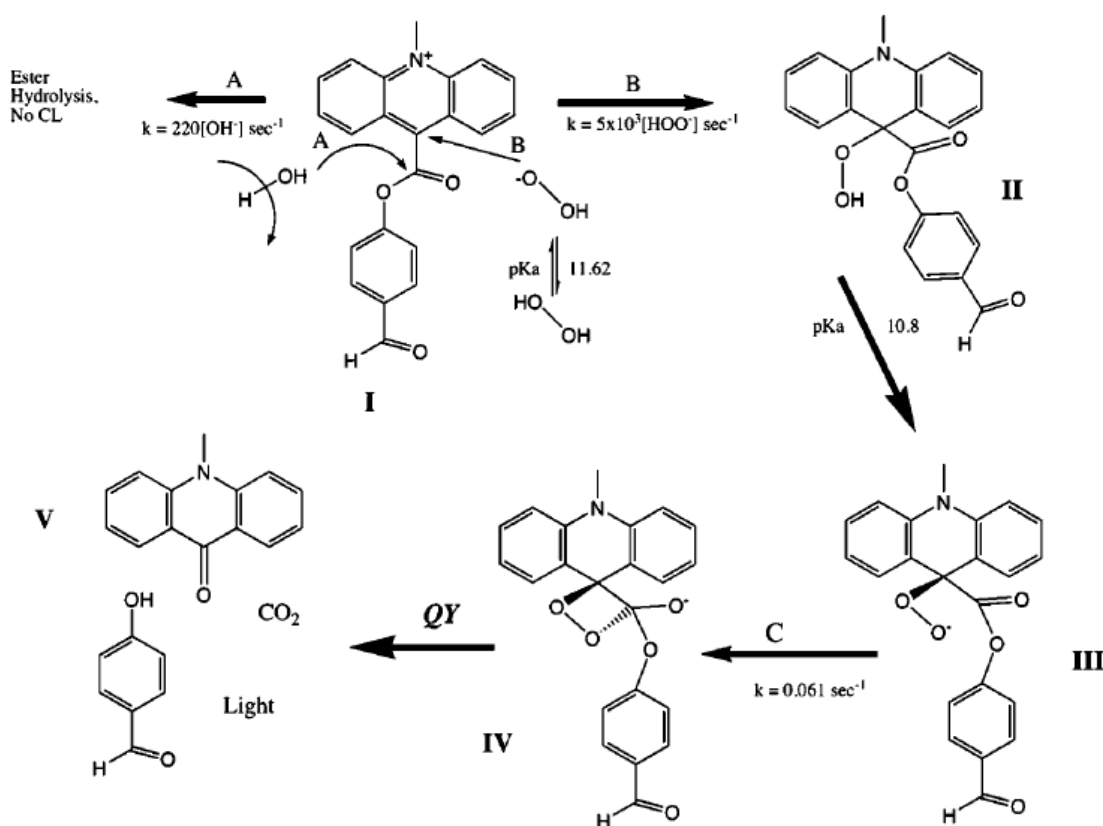


Figura 8: Mecanismo da reação de QL entre AE e H_2O_2 (I= AE; IV= Dioxetano instável; V= N-metilacridona)

Fonte: KING *et al.*, 2007

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.
- ADAM, W. Thermal generation of electronic excitation with hyper energetic molecules. **Pure & Appl. Chem.** v.52(12), p.2591-2608, 1980.
- ADAMCZYK, M.*et al.* Quantitative determination of non covalently bound acridinium in protein conjugates by liquid chromatograwophy/electrospray ion trap mass spectrometry. **RapidCommun. Mass Spectrom** v.15(9), p.670-4, 2001.
- AKRÊ, J. Alimentação Infantil: bases fisiológicas. IBFAN/Instituto de Saúde de São Paulo, 1994. (Trad. AnnaVolochko).
- ALBERTIN, R.*et al.* Quimioluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. **Quim Nova**. v.21(6), p.772-779, 1998.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre, Artmed, 1997.
- ALMOGREN, A. *et al.* Functional and structural characterisation of human colostrum free secretory component. **Mol Immunol**. v.46(7), p.1534-1541, 2009.
- ALMOGREN, A.; SENIOR, B.W.; KERR, M.A. A comparison of the binding site of secretory component to immunoglobulin A (IgA) in human colostrum S-IgA1 and S-IgA2. **Immunology** v.120, p.273–280, 2007.
- ASANO, M.; KOMIYAMA, K. Polymeric immunoglobulin receptor. **J Oral Sci.**v. 53(2), p. 147-156, 2011.
- ATKINS, P. W. & SHRIVER, D. F. **Química orgânica**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. Bookman Companhia, 2003. 816p.

- BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.
- BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine**. v.21(24), p. 3382-3388, 2003.
- BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD, E.S.; FARSTAD, I.N. Regional specialization in mucosal immune system: What happens in the microcompartments? **Immunol today**. v.20, p.141-151, 1999.
- BROWN, T.A.; MESTECKY, J. Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. **Infect Immun**. v. 49(2), p. 459–462, 1985.
- CAMPBELL, A.K.; HALLET, M.B.; WEEKS, I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. **Methods in Biochemical Analysis**. v.31, p.317-416, 1985.
- CAMPOS, L.M. *et al.* Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**. v.11(5), p.480-484, 2006.
- CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. **Composição do Leite Humano: aspectos imunológicos**. In: Rego J.D. Alimentação Materno. Rio de Janeiro: Atheneu 2001.
- CATALANI, L.H. **Quimiluminescência: Sistemas geradores, mecanismos e aplicações**. 1996. 151f. Tese de livre-docência - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CECCON, M.E.J. *et al.* Imunidade do feto e do recém-nascido. **Pediatria** (São Paulo), v.19(1), p. 9-23, 1997.
- .
- DE FIJTER, J.W.; VAN DEN WALL BAKE, A.W.; BRAAM, C.A.; VAN ES, L.A.; DAHA, M.R. Immunoglobulin A subclass measurement in serum and saliva: sensitivity of detection of dimeric IgA2 in ELISA depends on the antibody used. **J Immunol Methods**. v. 187(2), p. 221-232, 1995.

- DOAN, T.T.; MELVOLD, R.; WALTENBAUGH, C. **Imunologia médica essencial**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.
- DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. **Talanta**. v.51, p.415-439, 2000.
- ESTEVES, F.A.M. **Avaliação da IgA Secretora Total e Específica contra Escherichia coli enteropatogênica em Colostro de Mães Eutróficas e Desnutridas**. Recife, 2007. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 32 páginas, 2007.
- FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V. A Quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos de análise. **Quim Nova**, v.25, n.6, p.1003-1011, 2002.
- FRESSE, A.S.; SUEUR, J.M.; HAMDAD, F. Diagnosis and follow-up of genital chlamydial infection by direct methods and by detection of serum IgG, IgA and secretory IgA. **Indian J. Med. Microbiol.** v.28(4), p.326-331, 2010.
- GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. *et al.* Derivatization of biomolecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr B**, v. 793, p. 49–74, 2003.
- GARWEG, J.G.; JACQUIER, P.; BOEHNKE, M. Early aqueous humor analysis in patients with human ocular toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.996-1001, 2000.
- GREGORY, R.L.; ALLANSMITH, M.R. Naturally occurring IgA antibodies to ocular and oral microorganisms in tears saliva and colostrum: evidence for a common mucosal immune system and local immune response. **Exp Eye Res.** v.43(5), p.739-49, 1986.
- GUILHERME, G.R.B. **Caracterização e validação de anticorpo monoclonal murino anti-Linfócitos B humanos para uso em citometria de fluxo e imunoquímica**. Botucatu, 2010. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

- HANSON, L.A. *et al.* The immune response of the mammary gland and its significance for the neonate. **Ann. Allergy**, [S.L.]. v.53(6), p.576-582, 1984.
- HEREMANS, J.F.; HEREMANS, M.T.; SCHULTZE, H.E. Isolation and description of a few properties of the A Globulin of human serum. **Clin Chim Acta**. v.4 (96), 1959.
- HOCINI, H. *et al.* An ELISA method to measure total and specific human secretory IgA subclasses based on selective degradation by IgA1-protease. **J Immunol Methods**.v. 235(1-2), p. 53-60, 2000.
- JANEWAY Jr, C.A. *et al.* **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre, Artmed, 2007.
- JOHANSEN, F-E.; KAETZEL, C. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: New advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. **Mucosal Immunol**. v.4(6), p. 598–602, 2011.
- KAETZEL, C.S. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. **Immunol Rev**. v. 206, p.83-99, 2005.
- KELSALL B.L., STROBER W. Host defenses at mucosal defenses. In: **Clinical Immunology Principles and Practice**. Rich R. [Suppl. I]. Mosby, 1996.
- KERR, M.A.. The structure and function of human IgA. **Biochem J**. v. 271(2), p. 285–296, 1990.
- KING, D.W.*et al.* Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development and Optimization Using a Kinetic Model. **Anal. Chem**.v.79, p.4169-4176, 2007.
- KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta**, v.500, p.279–286, 2003.

- LADJEVA, I.; PETERMAN, J.H.; MESTECKY, J. IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. **Clin Exp Immunol.** v. 78(1), p. 85-90, 1989.
- LANG, S. **Noções básicas sobre aleitamento materno.** in: aleitamento do lactente: cuidados especiais. 1ed. São Paulo, Santos Livraria Editora. 1999.
- LEITE, O.D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F.R.P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Quim. Nova**, v. 27, p. 337-341, 2004.
- LOOMES, L.M; SENIOR, B.W.; KERR, M.A. A Proteolytic Enzyme Secreted by *Proteus mirabilis* degrades Immunoglobulins of the Immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2, and IgG Isotypes. **Infect. Immun.** v. 58(6), p. 1979-1985, 1990.
- LYNCH, M. I. *et al.* Lacrimal Secretory IgA in Active Posterior Uveitis Induced by *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 99, n. 8, p. 861-864, 2004.
- MACPHERSON, A.J. *et al.* P. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal Immunol.** v. 1(1), p.11–22, 2008.
- MATHIAS, A.; CORTHÉSY, B. Recognition of gram-positive intestinal bacteria by hybridoma- and colostrum-derived secretory immunoglobulin A is mediated by carbohydrates. **J Biol Chem.** v.286(19), p.17239-17247, 2011.
- MAZZOLI, S. *et al.* Interleukin 8 and anti-Chlamydia trachomatis mucosal IgA as urogenital immunologic markers in patients with C. trachomatis prostatic infection. **Eur. Urol.** v. 51, p.1385–1393, 2007.
- MESTECKY, J.*et al.* Evaluation of monoclonal antibodies with specificity for human IgA, IgA subclasses and allotypes and secretory component. Results of an IUIS/WHO collaborative study. **J Immunol Methods.** v. 193(2), p. 103-148, 1996.

- MESTECKY, J.; RUSSELL, M.W.; ELSON, C.O. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. **Gut**. v.44, p. 2-5, 1999.
- MOLDOVEANU, Z.*et al.* IgA subclass responses to lipopolysaccharide in humans. **Adv Exp Med Biol**. v. 216B, p. 1199-1205, 1987.
- MOREAU, M.C. *et al.* Increase in the Population of Duodenal Immunoglobulin A Plasmocytes in Axenic Mice Associated with Different Living or Dead Bacterial Strains of Intestinal Origin. **Infect Immun**. v. 21(2), p. 532-539, 1978.
- NATHAVITHARANA, K.A.; CATTY, D.; MCNEISH, A.S. IgA antibodies in human milk: epidemiological markers of previous infections? **Arch Dis Child** v. 71, p.192-197, 1994.
- NATRAJAN, A. *et al.* Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. **Anal. Biochem**. v.406, p.204-213, 2010.
- NATRAJAN, A.; SHARPE, D.; WEN, D. Effect of surfactants on the chemiluminescence of acridinium dimethylphenyl ester labels and their conjugates. **Org. Biomol. Chem**. v.9, p.5092-5103, 2011.
- NERY, A.L.P.; BAADER, W.J. Quimioluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na decomposição de 1,2-dioxetanos. **Quim Nova**, v.24(5), p.626-636, 2001.
- NEWBURG, D.S.; WALKER, W.A. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. **Pediatr Res**. v.61(1), p.2-8, 2007.
- PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
- POLONELLI, L. *et al.* Diagnostic potential of IgA coated Candida cells in mucous membrane candidiasis. **Mycopathologia**. v.116(2), p.105-112, 1991.

- ROBARDS, K.; WORSFOLD, P.J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta.**v.266 (2), p.147–173, 1992.
- RODA, A. *et al.* Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. **Fresenius J Analyt Chem**v. 366 (6-7), p. 752-759, 2000.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6 ed. Rio de Janeiro, Manole, 2003.
- RÚPOLO, B.S.; MIRA, J.G.S.; KANTOR JUNIOR, O. Deficiência de IgA. **J Pediatr** v. 74(6), p.433-440, 1998.
- RUSSELL, M.W. *et al.* Assay of human IgA subclass antibodies in serum and secretions by means of monoclonal antibodies. **J Immunol Methods**. v. 87(1), p. 87-93, 1986.
- SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Quimioluminescência e Bioluminescência. **Quim. Nova**, v.16, n.3, p. 200-209, 1993.
- SHARON, J. **Imunologia básica**.Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
- SHELDRAKE, R.F. *et al.* Selective transport of serum-derived IgA into mucosal secretions. **J Immunol**. v.132(1), p. 363-368, 1984.
- STITES, D.P.; TERR, A.I. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.
- TALHAM, G.L. *et al.* Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. **Infect Immun**. v. 67(4), p. 1992-2000, 1999.
- UNDERDOWN, B.J; SCHIFF, J.M. Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface. **Annu. Rev. Immunol**. v.4, p.389-417, 1986.
- VALDÉS, V.; PERÉZ SANCHEZ, A.; WILLIAMS, S.R. **Manejo clínico da lactação**. Rio de Janeiro, Revinter. 1997.

- WEEKS J. *et al.* Acridinium Esters as High-Specific-Activity Labels in Immunoassay. **Clin. Chem.** v.29 (8), p.1474-1479, 1983.
- WHITEHEAD, T.P. *et al.*; KRICKA, L.J.; CARTER, T.J.N.; THORPE, G.H.G. Analytical Luminescence: It's potential in the clinical laboratory. **Clin. Chem.**, v.25(9), p. 1531-1546, 1979.
- XIMENES, V.F. **Estudos de novos sistemas quimiluminescentes aplicados na determinação de atividade enzimática.** 2000. 191f. Tese. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H.; NOHTA, H. Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A.** v.950 (1-2), p.1-19, 2002.
- YUEN, J.W.M.; LOKE, A.Y.; GOHEL, M-D.I. Nutritional and immunological characteristics of fresh and refrigerated stored human milk in Hong Kong: A pilot study. **Clin Chim Acta** (2012).
- ZAHA, M.M. Purificação de IgA secretora (IgAS) de colostro humano e padronização de imunodifusão radial para obtenção de valores críticos mínimos de IgAS na saliva de crianças brasileiras de diversos grupos etários. **Rev Bras Anál Clin** v.3, p.67-86, 1986.
- ZAHA-INOUE, M.M. A Imunoglobulina A Secretora (IgAS). **Semina.** v.6(3), p.118-124, 1985.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estabelecer um método para detecção quimiluminescente de IgA secretora em fluidos biológicos.

4.2 Objetivos Específicos

- Conjugar o éster de acridina ao anticorpo anti-IgAS e anti-IgG-peroxidase;
- Desenvolver um método Dot-imunoquimiluminescente para detectar IgAS em fluidos biológicos
- Comparar os resultados obtidos através do método Dot-imunoquimiluminescente com aqueles obtidos através de Dot-ELISA
- Validar o método Dot-imunoquimiluminescente através da detecção de IgAS em leite materno

5. ARTIGO: DOT-CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Journal of Immunological Methods.

Fator de Impacto: 2.203

Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra, Fabrício Andrade Martins Esteves, Luiz Bezerra de Carvalho Junior.

Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)
Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

DOT-CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A.

Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra, Fabrício Andrade Martins Esteves and Luiz Bezerra de Carvalho Junior.

Abstract.

The increase in the concentration of Secretory IgA in external secretions is an important diagnostic tool for infections that affect the mucous membranes. The use of chemiluminescent methodology to perform such a diagnosis enables a more sensitive than spectrophotometric methods traditionally used. In this work, a Dot-chemiluminescent immunoassay (Dot-CLIA) was proposed for the determination of Secretory IgA. The antibodies Anti-S-IgA and Anti-IgG-peroxidase were previously conjugated to acridinium ester (AE). Dot-ELISA and Dot-CLIA were then carried out spotting S-IgA on nitrocellulose membranes disks and measuring the peroxidase activity and chemiluminescence (expressed in relative light unit; RLU), respectively. The ternary complex formed by S-IgA/anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE and the control (PBS replacing S-IgA) yielded values of $302,255 \pm 28,736$ RLU and $8,247 \pm 3,479$ RLU, respectively. Dot-ELISA simultaneously carried out produced brown color by the ternary complex and no color was observed for the control. The relationship between RLU and S-IgA amount using the proposed method displayed a hyperbolic curve. The human milk without lipids and casein purified by HPLC presented three protein peaks and those corresponding to S-IgA and free secretory component showed values of about 50,000 RLU and 30,000 RLU, respectively. Therefore, one can conclude that Dot-CLIA is capable to evaluate specifically and quantitatively the S-IgA in biological fluids, that human milk.

Abbreviations: AE: acridinium ester; S-IgA: secretory immunoglobulin A; Anti-S-IgA: antibody against secretory immunoglobulin A; Anti-IgG-peroxidase: antibody against immunoglobulin G conjugated to peroxidase; Anti-S-IgA-AE: antibody against secretory immunoglobulin A conjugated to acridinium ester; Anti-IgG-peroxidase-AE: antibody against immunoglobulin G conjugated to peroxidase and acridinium ester.

1. Introduction.

Secretory IgA (S-IgA) is the prevailing immunoglobulin on the mucous membranes of different tissues and plays an important role on the neonate mucosal membranes protection. It is composed of at least two monomeric IgA molecules, covalently linked through the J chain, and secretory component (Phalipon et al., 2002). While developing this immune system the breast-fed baby is provided with 0.25-0.5 grams per day of secretory IgA antibodies via the milk (Hanson and Soderstrom, 1981). Many procedures have been reported to determine S-IgA concentration in biological fluids. They include the classical enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (Shibata et al., 1978), lectin-based enzyme-linked immunosorbent assay (Cullina and Greally, 1993), two-dimensional electrophoresis followed by electroblotting and microsequencing (Murakami et al., 1998), an immunosorbent assay system integrated into a glass microchip (Sato et al., 2000) and so on.

Chemiluminescence, the generation of light via chemical reaction, has been used in clinical analysis routine and as a tool in clinical and biomedical research (Kricka, 2003). The method offers advantages in sensitivity and reagent stability, detection precise control, and low biohazard (Baeyens et al., 1989). Although the methods based on this phenomenon have been widely used for many immunoglobulin quantification to the best of our knowledge there is none reported for S-IgA. Here, it is described an attempt to establish a chemiluminescent method to quantify S-IgA.

2. Material and Methods.

Reagents.

IgA from human colostrum (abbreviated as S-IgA) and monoclonal anti-Human Secretory Component (mouse IgG1 isotype) (abbreviated as Anti-S-IgA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Peroxidase-conjugated rabbit anti-Mouse IgG (abbreviated as Anti-IgG-peroxidase) was obtained from Jackson ImmunoResearch, Inc. (Baltimore, USA). The acridinium ester 2,6-dimethyl-4-(N-succinimidyl-oxy-carbonyl)phenyl 10-methylacridinium-9-carboxylate methosulphate (DMAE-NHS) (Joss and Towbin, 1994) and abbreviated as AE was kindly donated by Dr. Howard H. Weetall.

Antibodies conjugations with acridinium ester.

AE was conjugated to anti-S-IgA and anti-IgG-peroxidase according to Weeks *et alii* (Weeks et al., 1986). Briefly, the antibodies (500 µL containing 2 mg of protein) were incubated with 15 µL of AE ester solution (0.2 mg diluted in 400 µL of N,N-dimethylformamide) for 1 h at 25 °C under mild stirring. The conjugates (anti-S-IgA-AE and

anti-IgG-peroxidase-AE) were applied to a column of Sephadex G-25 (10×1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1 mL) were collected and their protein contents (280 nm) and chemiluminescence were established.

S-IgA assay by Dot-ELISA.

Nitrocellulose paper discs (6 mm diameter and pore diameter 0.45 μ m) were previously cut using a paper punch and each disk was transferred with metal clamp to a well of the plate 96 wells and flat bottom. S-IgA (50 μ L containing 3.2 μ g of protein) diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.2, was spotted in the nitrocellulose paper disk and incubated for 1 h at 25°C; washed three times for 1 minute with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 137 mM NaCl (from now on abbreviated as PBS) containing 0.01% Tween; incubated with a 2% solution of skimmed milk Molico® (Nestlé Brasil Ltda.) prepared in PBS for 1 h and washed three times for 1 min with PBS-Tween. The blocked S-IgA-nitrocellulose paper disk preparation was incubated with the Anti-S-IgA antibody preparations at dilutions of 1:500 for 1 h followed by washing three times for 1 min with PBS-Tween. Anti-IgG-peroxidase was sequentially incubated for 1 h and washed three times for 1 min with PBS-Tween. Finally, the antigen-antibody nitrocellulose paper disk preparation was incubated to the chromogenic developer composed of 0.01 g of DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) dissolved in 1 mL of methanol; 20 ml of PBS and 5 μ L of H₂O₂ (30% v/v). The presence of the S-IgA was detected by the brown color produced by the DAB reduction under peroxidase catalysis.

S-IgA assay by Dot-chemiluminescent.

The chemiluminescent assay was carried out as above described for the Dot-ELISA assay except that the antibodies were conjugated to AE and the disks removed at the color development stage from the plate wells to Eppendorf containing 50 μ L PBS and the chemiluminescence established using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 s per sample. Duplicate measurements routinely exhibit precision rate lower than 5%. An experiment was carried out to evaluate the influence of the disk position (spot upside and downside) on the light detection.

HPLC purification of human milk S-IgA.

The fraction of human milk without lipids and casein was purified on HPLC (Akta Purifier Amersham Bioscience - Software Unicorn 4.11). The column used was Resource S GE Healthcare (cation exchange; 1 mL and particle size 15 μ m), the flow rate was set to

4ml/min and sample volume injected was 1 ml. The unbound material was removed by washing with 50mM sodium acetate/acetic acid buffer, pH 5.2. The collection of fractions started with 0% of 50mM sodium acetate/acetic acid buffer, pH 5.2, containing 0.3 M NaCl and finished with 100% of this buffer. All eluted fractions (1.5 mL) were collected and frozen at -20 ° C until analysis.

3. Results and Discussion.

Dot-ELISA is an extensively used immunological method in research as well as analytical/diagnostic laboratories (Hawkes et al., 1982; Joss and Towbin, 1994). It is a procedure based on the application of either antigen or antibody as a spot to a matrix such as a nitrocellulose filters and ELISA is carried out to detect the immobilized protein. On the hand, chemiluminescent probes have been replaced the enzyme in the dot approach that is called chemiluminescence immunoassay – CLIA (Wang et al., 2012). Therefore an attempt to replace ELISA by chemiluminescence in dot-immunological (Dot-CLIA) S-IgA determination could be feasible.

AE was successfully conjugated to the Anti-S-IgA according to the derivative purification by Sephadex G-25 chromatography (Figure 1). There was a coincident peak of protein (absorption at 280 nm) and chemiluminescence (RLU) at the 11th fraction and free acridinium ester was only collected after the 50th fraction (not shown). This result is according to previous results for other protein labeling as lectins concanavalin A (Con A) (Campos et al., 2006; Brustein et al., 2012) and peanut agglutinin (PNA) (Brustein et al., 2012). The Anti-S-IgA conjugated to acridinium ester (molecular weight *circa* of 150 kDa) was excluded in this filtration procedure and was eluted in the void volume of the Sephadex G-25 column (Figure 1). This conjugated antibody was used throughout this work and named as Anti-S-IgA-AE from now on.

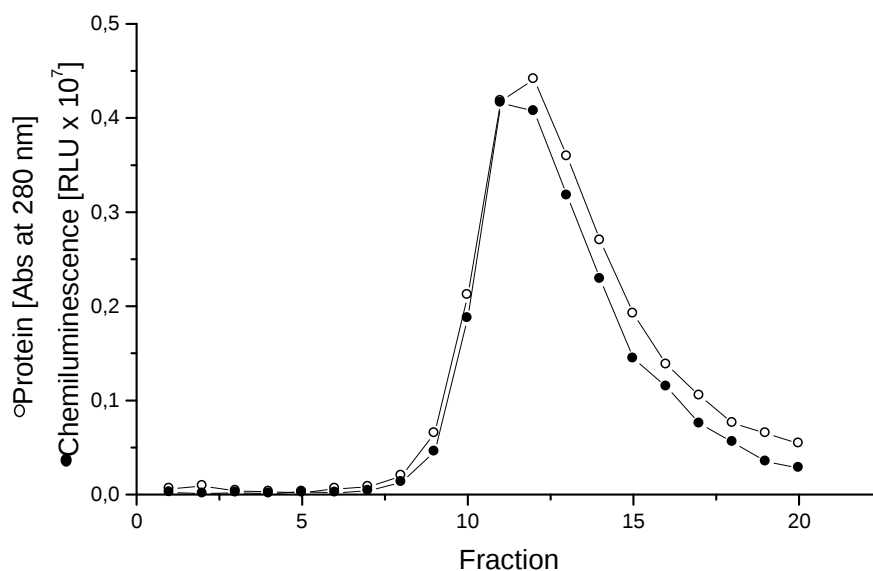


Figure 1 - ANTI-S-IgA CONJUGATED TO ACRIDINIUM ESTER PURIFICATION ON SEPHADEX G-25. Anti-S-IgA (500 μ L containing 2 mg of protein) was applied on a column (10 x 1 cm) of Sephadex G-25 and eluted with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, using a flow rate of 1 mL/min. Fractions of 1 mL were collected for protein (280 nm) and chemiluminescent (RLU) assays.

AE was also conjugated to the Anti-IgG conjugated to peroxidase (Anti-IgG-peroxidase) and identical chromatogram was produced by the derivative purification using Sephadex G-25 (Figure 2). This second conjugated antibody will be named as Anti-IgG-peroxidase-AE from now on.

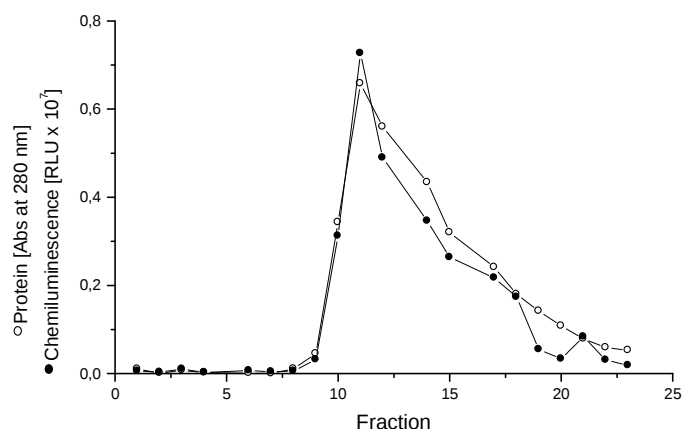


Figure 2 –ANTI-IgG-PEROXIDASE CONJUGATED TO ACRIDINIUM ESTER PURIFICATION ON SEPHADEX G-25. Anti-IgG-peroxidase-AE (500 μ L containing 2 mg of protein) was applied on a column (10 x 1 cm) of Sephadex G-25 and eluted with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 using a flow rate of 1 mL/min. Fractions of 1 mL were collected for protein (280 nm) and chemiluminescent (RLU) assays.

Table 1 compares the Dot-Elisa and Dot-chemiluminescent S-IgA assays using the Anti-S-IgA; Anti-S-IgA-AE; Anti-IgG-peroxidase and Anti-IgG-peroxidase-AE. Both procedures using S-IgA/Anti-S-IgA/anti-IgG-peroxidase complex detection showed a positive reaction and low RLU values (614 ± 53).

The use of anti-IgG-peroxidase conjugated to acridinium ester yielded also positive Dot-ELISA and higher RLU values ($122,483 \pm 3,986$). However, using both antibodies conjugated to AE (Anti-S-IgA-AE and anti-IgG-peroxidase-AE) the chemiluminescence was much higher ($302,255 \pm 28,736$) as well as positive result for the Dot-ELISA.

The S-IgA/Anti-S-IgA-AE complex showed higher RLU values ($45,806 \pm 14,243$) and Dot-ELISA was not carried out because there was no Anti-IgG-peroxidase.

The controls (PBS replacing the S-IgA) showed negative result and low chemiluminescence ($8,247 \pm 3,479$) using, respectively, anti-IgG-peroxidase and anti-IgG-peroxidase-AE.

Table 1 –DOT-ELISA AND DOT-CLIA OF S-IgA.

Antigen/antibody complexes	Dot-ELISA*	Dot-CLIA (RLU)
S-IgA/Anti-S-IgA/anti-IgG-peroxidase	Positive	614 ±53
S-IgA/Anti-S-IgA/anti-IgG-peroxidase-AE	Positive	122,483± 3,986
S-IgA/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE	Positive	302,255 +- 28,736
S-IgA/Anti-S-IgA-AE	Nd**	45,806 ± 14,243
PBS/ Anti-S-IgA/ anti-IgG-peroxidase	Negative	Nd**
PBS/ Anti-S-IgA/ anti-IgG-peroxidase-AE	Negative	8,247 ±3,479

*-Brown color development was considered as positive

** -ND – not determined.

These results showed that S-IgA could be detected by Dot-chemiluminescent using the Anti-S-IgA-AE only but the RLU (about 45,000) is too low compared with the total applied chemiluminescent antibody (570,910 RLU). Furthermore, the standard deviation was high, namely, 31% of the mean value. Surprisingly, when both employed antibodies were conjugated to AE (S-IgA/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE) the best result was found ($302,255 \pm 28,736$; standard deviation of 9.5%). It seems that there was a multiplying effect.

The use of only the Anti-IgG-peroxidase conjugated to AE in the ternary complex low RLU was also observed (about 122,000) compared to total value applied (450,578 RLU) and standard deviation of 41% of the mean value.

It is worthwhile to register that the disk position inside the Eppendorf during the chemiluminescence measuring did not alter the light detection. The disks spotted with Anti-IgG-peroxidase-AE (50 µL containing 0.5 µg of protein) introduced into the Eppendorf with the spots upside and downside yielded RLU values of 443,569 and 457,588, respectively.

Figure 3 displays the relationship (hyperbolic curve) between RLU and S-IgA amount using the proposed Dot-CLIA for S-IgA assay. A linear curve could be explored in the range below one µg of S-IgA (nanograms) provided higher amounts of Anti-S-IgA-AE and Anti-IgG-peroxidase-AE are used.

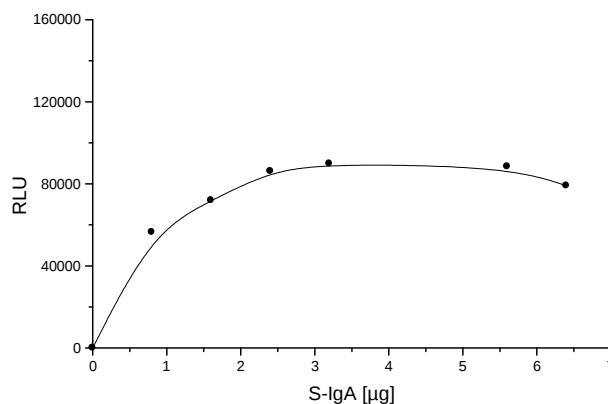


Figure 3 – RELATIONSHIP BETWEEN CHEMILUMINESCENCE (RLU) AND S-IgA AMOUNT. S-IgA (0.8 to 6.4 μ g of protein) was spotted on nitrocellulose membrane disks (6 mm diameter and pore diameter 0.45 μ m) and incubated subsequently with Anti-S-IgA-AE and anti-IgG-peroxidase-AE. Chemiluminescence was measured in luminometer Modulus Single Tube 9200-001.

The fraction of human milk without lipids and casein purified by HPLC is displayed in Figure 4. Three peaks of protein are shown: 1st) 1-4 fractions range; 2nd) 7-16 fractions range and 3rd) 17-20 fractions range. The Fractions 1 and 2 (1st peak; casein remaining?) did not emit light by using the Dot-CLIA for S-IgA assay whereas Fraction 10 (2nd peak) and Fractions 18 and 20 (3rd peak) presented RLU equal to 53,789; 21,543 and 44,538, respectively. Thus one can conclude that the HPLC purified S-IgA (2nd peak) and its free secretory component (3rd peak) and corroborated the proposed Dot-CLIA for S-IgA assay.

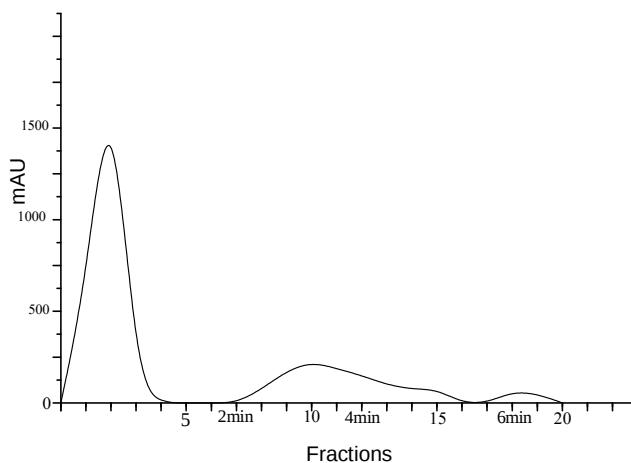


Figure 4 –CHROMATOGRAM OF HUMAN MILK WITHOUT LIPIDS AND CASEIN. Sample volume injected was 1 ml and flow rate was set to 4mL/min. The column used was Resource S GE Healthcare (cation exchange; particle size 15 μ m). The collection of fractions (1.5 mL) started with 0% of 50mM sodium acetate/acetic acid buffer, pH 5.2, containing 0.3 M NaCl and finished with 100% of this buffer.

Table 2 –DOT-CLIA OF FRACTIONS OF THE CHROMATOGRAM.

Antigen/antibody complexes	Dot-CLIA (RLU)
Fraction 1/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE	-
Fraction 2/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE	-
Fraction 10/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE	53,789
Fraction 18/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE	21,543
Fraction 20/Anti-S-IgA-AE/anti-IgG-peroxidase-AE	44,538

4. Conclusion.

This contribution proposes a Dot-chemiluminescent immunological assay (Dot-CLIA) for secretory IgA determination. Firstly, the antibodies Anti-S-IgA and Anti-IgG-peroxidase were successfully conjugated to acridinium ester. Afterwards, Dot-ELISA and Dot-CLIA were carried out showing that the S-IgA was recognized by both procedures (results expressed by brown color and high RLU values, respectively), whereas the controls (antigen replaced by buffer) yielded negative results. A hyperbolic curve was described the relationship between RLU versus S-IgA amount under the experimental conditions. Finally, S-IgA and its secretory component purified by HPLC were also recognized by this Dot-CLIA.

5. Acknowledgements.

This work was financially supported by CNPq and one of the authors (A.K.M.M.B.) was recipient of a CAPES scholarship. The authors are very grateful to Dr. M.E.C. Chaves and Mrs. Kilma Coelho Paz for their scientific contributions and technical assistance, respectively.

6. Reference List

1. Baeyens,W.R., Nakashima,K., Imai,K., Ling,B.L. and Tsukamoto,Y., 1989. Development of chemiluminescence reactions in biomedical analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 7, 407.

2. Brustein,V.P., Cavalcanti,C.L., de Melo-Junior,M.R., Correia,M.T., Beltrao,E.I. and Carvalho,L.B., Jr., 2012. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 268.
3. Campos,L.M., Cavalcanti,C.L., Lima-Filho,J.L., Carvalho,L.B. and Beltrao,E.I., 2006. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers* 11, 480.
4. Cullina,M.J. and Greally,J.F., 1993. A novel lectin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of IgA1 in serum and secretory IgA1 in secretions. *Clinica Chimica Acta* 216, 23.
5. Hanson,L.A. and Soderstrom,T., 1981. Human milk: Defense against infection. *Prog. Clin. Biol. Res.* 61, 147.
6. Hawkes,R., Niday,E. and Gordon,J., 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry* 119, 142.
7. Joss,U.R. and Towbin,H., 1994. Acridinium ester labelled cytokines: Receptor binding studies with human interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interferon-gamma. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 9, 21.
8. Kricka,L.J., 2003. Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta* 500, 279.
9. Murakami,K., Lagarde,M. and Yuki,Y., 1998. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 2521.

10. Phalipon,A., Cardona,A., Kraehenbuhl,J.P., Edelman,L., Sansonetti,P.J. and Corthqsy,B., 2002. Secretory Component: A New Role in Secretory IgA-Mediated Immune Exclusion In Vivo. *Immunity* 17, 107.

11. Sato,K., Tokeshi,M., Odake,T., Kimura,H., Ooi,T., Nakao,M. and Kitamori,T., 2000. Integration of an Immunosorbent Assay System:Analysis of Secretory Human Immunoglobulin A on Polystyrene Beads in a Microchip. *Analytical Chemistry* 72, 1144.

12. Shibata,R., Onoue,K. and Goya,N., 1978. A sensitive solid phase radioimmunoassay for secretory IgA: its application for the determination of urinary levels of secretory IgA in children and adults. *Microbiol. Immunol.* 22, 475.

13. Wang,S., Ge,L., Song,X., Yan,M., Ge,S., Yu,J. and Zeng,F., 2012. Simple and covalent fabrication of a paper device and its application in sensitive chemiluminescence immunoassay. *Analyst* 137, 3821.

14. Weeks,I., Sturgess,M., Brown,R.C. and Stuart Woodhead,J., 1986. [31] Immunoassays using acridinium esters. In: A.D.Marlene (Ed.) *Methods in Enzymology - Bioluminescence and Chemiluminescence Part B.* [Academic Press, pp. 366-87.

6. CONCLUSÕES

- Os anticorpos Anti-IgAS e Anti-IgG-peroxidase foram conjugados com sucesso ao éster de acridina
- IgAS foi detectada pelas metodologias de Dot-ELISA e Dot-CLIA
- O controle (PBS em substituição a IgAS) obteve resultado negativo em ambas as técnicas
- Uma curva hiperbólica foi descrita para a relação entre o valor de RLU *versus* a quantidade de IgAS
- IgAS e o componente secretor livre, purificados por HPLC, também foram reconhecidos por Dot-CLIA.
- O Dot-CLIA mostrou-se uma técnica promissora para detecção de IgAS em amostras biológicas

7. ANEXOS

ANEXO 1: Autorização do Comitê de Ética para coleta do leite materno

ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO 3: Normas da revista para submissão do artigo

Anexo 1: Autorização do Comitê de Ética para coleta do leite materno



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 451/2011 - CEP/CCS

Recife, 29 de julho de 2011

Registro do SISNEP FR – 416201

CAAE – 0117.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 145/11

Título: Determinação quimiluminescente de IgA secretora em leite humano.

Pesquisador Responsável: Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 29 de julho de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
 Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
 Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
 Mestranda Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra
 Pós-Graduação em Ciências Biológicas - CCB/UFPE

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Determinação Quimiluminescente de IgA Secretora em Leite Humano.

Pesquisador Responsável: Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra.

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas / Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami

Telefones para contato: (81) 2126-8484 / (81) 2126-8485

Nome da voluntária: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

A Sr^a está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa Determinação Quimiluminescente de IgA Secretora em Leite Humano, de responsabilidade dos pesquisadores Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra (Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (na condição de orientador)

1.0 Objetivo e descrição do estudo

Este trabalho visa estabelecer um protocolo para detecção quimiluminescente de IgA secretora em leite humano. Para isso, serão coletados 10ml de leite maduro de puérperas atendidas pelo Setor de Obstétrica do Hospital das Clínicas da UFPE. Essa amostra será analisada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

2.0 Duração do estudo

Este trabalho se desenvolverá no período de 1 (um) ano a partir da data de aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.0 Riscos e Benefícios

A manipulação da mama da paciente durante a coleta do leite pode gerar algum tipo de desconforto para a mesma. Este ocasional inconveniente, porém, será minimizado uma vez que a coleta será realizada por pessoal técnico devidamente capacitado e do sexo feminino do setor de obstetrícia do Hospital das Clínicas da UFPE.

A realização deste trabalho permitirá o desenvolvimento de um método específico e sensível para detecção quimiluminescente de IgA secretora em leite humano, anticorpo produzido pela mãe e que conferirá proteção à mucosa do recém-nascido.

4.0 Confidencialidade

Será garantido o sigilo de todas as informações referentes à paciente que voluntariamente concordar em participar deste projeto de pesquisa. Para tal, a paciente receberá uma numeração de ingresso no estudo e seu nome não será citado em nenhum momento.

5.0 Participação voluntária

A amostra de leite será obtida de puérpera que concordar em participar voluntariamente deste estudo após assinar este termo de consentimento. Em linguagem clara e simples, os objetivos, riscos e benefícios deste estudo serão apresentados à paciente durante a consulta com o (a) profissional médico (a) responsável pelo setor de obstetrícia.

A qualquer momento a paciente poderá retirar-se do estudo.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Assinatura da voluntária

Assinatura do pesquisador

Assinatura da 1ª. testemunha

Assinatura da 2ª. testemunha

Data: ____/____/____

Para maiores informações, entrar em contato:

Ana Katarina Moraes Monteiro Bezerra

Av. Marcionilo Francisco da Silva nº315 apto. 301 - Maurício de Nassau Caruaru-PE

CEP: 55016-620 Telefone: (81) 9633-2751

Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia s/n 1º andar – Cidade Universitária Recife-PE

CEP: 50740-600 Telefone: (81) 2126-8588

Anexo 3: Normas da revista para submissão do artigo

Journal of Immunological Methods

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements:  [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:  <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported

databases.

DNA sequences and GenBank Accession numbers

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner":

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228** , a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the ***printed article***, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the ***electronic copy***, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using

superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable

color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (⇒ <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (⇒ <http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ⇒ <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These

will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.