

15167532480
INIS-BR--3486



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**PRODUÇÃO DE DUPLO ANTICORPO PARA
RADIOIMUNOENSAIO**

(ANTISSORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO)

SANDRA ROSA DA SILVA

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear.

Orientadora: Dra. Vânia Caira Borghi

São Paulo

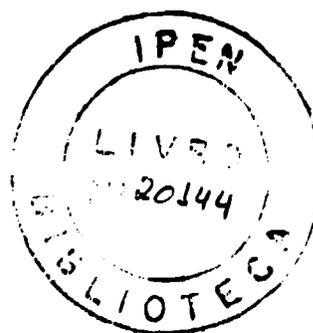
1993

**PRODUÇÃO DE DUPLO ANTICORPO PARA
RADIOIMUNOENSAIO
(ANTI-SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO)**

SANDRA ROSA DA SILVA

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear.

Orientadora: Dra. Vânia Caira Borghi



1993

**DISSERTAÇÃO REALIZADA NOS LABORATÓRIOS DO
DO INSTITUTO DE PESQUISAS ENEGÉTICAS E
NUCLEARES E NO LABORATÓRIO DE NUTRIÇÃO
HUMANA E DOENÇAS METABÓLICAS DA FACULDADE
DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.**

Aos meus pais.

Aos meus irmãos.

Ao Lázaro

À Dra. Vânia Caira Borghi, pelo constante apoio e estímulo na orientação que tornou possível a realização desta dissertação, meu especial agradecimento.

SINCEROS AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Spero Penha Morato, pela oportunidade.

Ao Dr. Bernardo Leo Wajchenberg, pelo apoio e auxílio.

Aos Drs. Enrico Lippiortolani e Sérgio Diniz Garcia da Faculdade de Medicina Veterinária da USP pelo tratamento dos ovinos.

À MSc. Rosa Maria Piatti do Instituto Biológico e ao Dr. Paulo Leser da Escola Paulista de Medicina, pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Mario Hirata, pela doação do soro humano padronizado.

À Dra. Maria Siqueira, pela doação do soro de carneiro anti-soro total de coelho.

Ao Dr. Carlos Henrique Mesquita, pelo tratamento estatístico.

Ao Isac de Castro, pela ajuda no emprego de programas computacionais de estatística e pela impressão desta dissertação.

Às colegas:

Lin Hui Lin

Maria Helena Bellini Marumo

Martha do Nascimento,

pelo auxílio, estímulo e companherismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo, pela doação dos ovinos.

Ao Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas, pelo alojamento e manutenção dos animais.

À Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pelos exames laboratoriais e internação dos ovinos.

À Coordenadoria de Processamento de Material Radioativo do IPEN, pelo auxílio na liofilização dos antissoros.

Ao laboratório de Pesquisa Básica da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo auxílio.

Ao "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" (E.U.A.), pela doação dos reagentes biológicos para o RIE de hTSH.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado concedida (processo nº 405-557/86).

À todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

ABREVIATURAS

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

NIDDKD - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

RSL - Radioassay System Laboratories.

IB - Instituto Butantan.

IMT - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

IZSA - Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo.

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RIE - Radioimunoensaio.

FOB - Free on Board.

EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Ag - Antígeno.

Ac - Anticorpo.

cpm - Contagem por minuto.

AB - Albumina bovina.

CV - Coeficiente de variação.

mg - 10^{-3} gramas.

ug - 10^{-6} gramas.

uCi - $3,7 \times 10^4$ desintegrações por segundo.

mCi - milicurrie.

Bq - Bequerel. Uma desintegração por segundo.

ul - Microlitro. 10^{-6} litros.

ml - Mililitro. 10^{-3} litros.

IgG - Imunoglobulina G.

PEG - Polietilino-glicol.

hTSH - Tireotrofina humana.

ACF - Adjuvante completo de Freund.

SCN - Soro de coelho normal.

CT - Corante traçador.

Kd - Coeficiente de distribuição.

DP - Desvio Padrão.

**PRODUÇÃO DE DUPLO ANTICORPO PARA RADIOIMUNOENSAIO
(ANTI-SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO)**

SANARA ROSA DA SILVA

RESUMO

Desde 1960 o radioimunoensaio (RIE) é uma das principais ferramentas empregadas nos laboratórios de endocrinologia, sendo nos dias de hoje aplicado em diversas áreas da investigação biomédica e em análises clínicas. Uma boa técnica de separação do RIE é essencial para desenvolver ensaios precisos e o método de separação pelo duplo anticorpo é um dos mais amplamente empregados, satisfazendo a maioria dos critérios exigidos para o RIE. Entretanto, seu custo elevado é sua principal desvantagem, o que implica muitas vezes no emprego de técnicas menos onerosas, mas não tão eficientes. Os duplos anticorpos existentes no mercado são importados por um preço bastante elevado, da ordem de US\$ 1750,00 FOB cada 500 ml.

Neste trabalho foi produzido em carneiros um segundo anticorpo genuinamente nacional, contra a IgG de coelho, para ser empregado em radioimunoensaios nos quais o primeiro anticorpo é gerado em coelhos. Para esta produção, inicialmente, a IgG do soro de coelho foi isolada e purificada pela precipitação com sulfato de sódio, seguida de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose.

Foram obtidos 850 mg de IgG altamente pura, suficientes para a imunização de centenas de carneiros para a produção do duplo anticorpo para RIE.

Quatro carneiros foram imunizados com 500 ug da IgG de

coelho purificada, emulsificada em Adjuvante Completo de Freund e administrada em sítios múltiplos, subcutâneos. Essas injeções foram repetidas com intervalo de 20 dias. Foram colhidas pequenas amostras de sangue (40 ml) pela veia jugular, 10 dias após cada injeção, para a avaliação do título dos antissoros. A cada quatro imunizações, foram realizadas, pela mesma via, sangrias maiores, sendo obtidos em cada uma aproximadamente 500 ml de soro por animal. Após cada uma dessas sangrias, os animais foram submetidos a períodos de descanso, antes de serem novamente imunizados.

Os antissoros foram avaliados na separação do RIE de tireotrofina humana, padronizado nos laboratórios do IPEN a partir dos reagentes fornecidos pelo NIDDKD, E.U.A. Essas avaliações referiram-se as determinações de seu título e da concentração ideal de IgG carreadora, ao estudo de sua cinética de precipitação e a confirmação da inexistência de reação cruzada com a IgG humana, em comparação com um antissoro de referência, produzido em cabras pela Radioassay System Laboratories (RSL), E.U.A.

Foram produzidos a partir dos quatro ovinos cerca de 3,6 l de antissoro (soro de carneiro anti-IgG de coelho), que apresentaram títulos e características de precipitação muito similares àquelas exibidas pelo produto comercial importado, apresentando até, títulos mais elevados. Após análise das condições ideais de armazenamento desses antissoros, eles foram mantidos a -40°C , em frascos com 20 ml, tanto na forma só congelada como também liofilizada, perfazendo um total de 180 frascos. Cumpre salientar que cada frasco de 100 ml do antissoro da RSL, custa cerca de US\$ 420,00 FOB.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que criou-se experiência suficiente para a produção deste reagente biológico do RIE, que poderá ser efetuada integralmente no país, em maior escala e a custo muito reduzido.

**PRODUCTION OF DOUBLE ANTIBODY FOR RADIOIMMUNOASSAY
(SHEEP ANTI-RABBIT IgG ANTISERUM)**

SANDRA ROSA DA SILVA

ABSTRACT

Since the late 1960's radioimmunoassay (RIA) has become a major tool in endocrine laboratories, being now-a-days applied to many diverse areas in biomedical investigation and clinical diagnosis. A good RIA separation technique is essential to develop precise assays and the double antibody separation method is one of the most widely employed, satisfying the majority of the criteria required by the RIA. However, its high cost is its main disadvantage, which leads to employ less expansive techniques, that are not so efficient. The double antibody available in the market is imported for an expensive price of the order of US\$ 1750.00 FOB each 500 ml.

It was produced in this work a second antibody (sheep anti-rabbit IgG antiserum) to be used in RIAs in which the first antibody is raised in rabbits. For this production, initially the IgG was isolated from rabbit serum and purified by sodium sulphate precipitation followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The result was 850 mg of highly purified IgG, enough for the immunization of hundreds sheep for the production of the double antibody for RIA.

Four sheep were immunized with 500 ug of purified rabbit IgG, emulsified in Freund Complete Adjuvant and administered

by multisite subcutaneous injections. These injections were repeated at 20-days intervals and blood samples (40 ml) were taken from the jugular vein 10 days after the boosts for the evaluation of the antisera title. After each four boosts a greath bleeding was done by the same route. Approximately 500 ml of serum were obtained in each bleeding per animal. After these bleedings, the animals were subjected to a rest period before being reimmunized. The antisera were evaluated by the human thyrotrophin RIA developed at IPEN laboratories employing reagents provided by NIDDKD, USA. These evaluations referred to the determination of the antisera title and of the ideal concentration of carrier IgG, to the study of the kinetic of precipitation and to the confirmation of the inexistent cross-reactivity with human IgG, in comparison with a reference antiserum of known precipitation characteristics supplied by the Radioassay System Laboratories (RSL), USA.

Approximately 3,6 l of antiserum (sheep anti-rabbit IgG serum) were produced from the four sheep, which presented title and precipitation characteristics very similar to those exhibited by the imported commercial product, even presenting higher titles. After the analysis of their ideal storage conditions the antisera were kept at -40°C in 20 vials, frozen or lyophilized ones, resulting in a total of 180 vials. It should be emphasized that each 100 ml vial of the RSL antiserum costs approximately US\$ 420.00 FOB.

The results obtained in this work indicated that it was created enough experience for the production of this biological reagent for RIA, that could be done integrally in the country in greater scale, and at a very reduced cost.

INDICE

1. Introdução	1
2. Materiais	12
2.1. Materiais e equipamentos	12
2.2. Reagentes biológicos	17
2.3. Produtos químicos	18
2.4. Soluções	20
2.4.1. Soluções empregadas na obtenção da IgG de coelhos.	20
2.4.2. Soluções empregadas na imunoeletroforese e na imunodifusão	21
2.4.3 Soluções empregadas na eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	22
2.4.4. Soluções empregadas na radioiodação do hTSH	24
2.4.5. Solução empregada na purificação do hTSH radioiodado	25
2.4.6. Soluções empregadas no RIE de hTSH	25
2.4.7. Soluções empregadas na caracterização dos antissoros produzidos	25
3. Métodos	27
3.1. Obtenção da IgG de coelhos	27
3.1.1. Análise do soro	27
3.1.2. Precipitação das imunoglobulinas séricas	28
3.1.3. Purificação da IgG	29
3.1.4. Determinação da concentração protéica	32
3.1.5. Avaliação da IgG	32
3.1.5.1. Imunoeletroforese	33
3.1.5.2. EGPA	34

3.2. Obtenção do soro de carneiro anti-IgG de coelhos	36
3.2.1. Animais	36
3.2.2. Esquema de imunização	41
3.3. Avaliação dos antissoros de carneiro anti-IgG de coelhos.	45
3.3.1. Determinação do título dos antissoros	45
3.3.1.1. Radioimunoensaio do hTSH	45
3.3.1.1.1. Preparo do traçador	47
3.3.1.1.1.1. Técnica de ioda- ção do hTSH	48
3.3.1.1.1.2. Purificação do hTSH radioiodado (¹²⁵ I-hTSH)	51
3.3.1.1.1.3. Cálculo da ativi- dade específica do traçador	52
3.3.1.1.2. Determinação da ótima dilui- ção do primeiro anticorpo	54
3.3.1.2. Imunodifusão pelo método de Ouchterlony..	55
3.3.2. Determinação da ligação inespecífica do RIE	56
3.3.3. Determinação da concentração ideal de IgG carreadora	57
3.3.4. Estudo da cinética de precipitação	58
3.3.5. Reação cruzada com a IgG humana	61
3.3.6. Determinação das condições ideais de armazenamen- to dos antissoros produzidos	61

4. Resultados	66
4.1. Obtenção da IgG de coelhos	66
4.2. Obtenção do soro de carneiro anti-IgG de coelho	72
4.3. Radioimunoensaio do hTSH	72
4.3.1. Preparo do traçador	72
4.3.1.1. Radioiodação e purificação do hTSH	72
4.3.1.2. Determinação da ótima diluição do primeiro anticorpo	78
4.3.1.3. Determinação do título do segundo antissoro	78
4.3.1.4. Imunodifusão em gel de agar	91
4.4. Determinação da ligação inespecífica do RIE	91
4.5. Determinação da concentração ideal de IgG carreadora	91
4.6. Análise da cinética de precipitação	101
4.7. Reação cruzada com a IgG humana	124
4.8. Armazenamento dos antissoros produzidos	124
5. Discussão	133
5.1. Obtenção da IgG de coelhos	133
5.2. Obtenção do soro de carneiro anti-IgG de coelho	136
5.2.1. Animais	136
5.2.2. Esquema de imunização	138
5.2.3. Radioimunoensaio do hTSH	140
5.2.4. Avaliação dos antissoros de carneiro anti-IgG de coelho	141
6. Conclusões	145
7. Referências bibliográficas	147

1- INTRODUÇÃO

Os traçadores radioativos são amplamente empregados em medicina nuclear *in vivo* ou *in vitro*. As técnicas que empregam radioisótopos *in vitro* são muito importantes em análises clínicas as quais são utilizadas para a detecção de substâncias existentes em microquantidades no organismo, tais como hormônios, vírus, drogas, vitaminas, antígenos tumorais e outras (10).

As bases desses ensaios foram enunciadas por Berson e Yalow a partir de 1957 (7) e culminaram com o desenvolvimento de um radioimunoensaio (RIE) para a determinação de insulina no plasma humano em 1959 (81). A importância desse método reside, de um lado, em permitir a dosagem de pequenas quantidades de determinada substância, da ordem de até nano e picogramas, na presença de elevadas concentrações de muitas outras, como ocorre na corrente sanguínea e nos extratos. Por outro lado, a determinação qualitativa das substâncias é altamente específica, decorrente do caráter imunológico da reação.

Portanto, as características principais do RIE, sua sensibilidade, especificidade e precisão elevadas, aliadas a sua praticabilidade para ensaiar convenientemente grande número de amostras biológicas permitiram seu rápido desenvolvimento e seu amplo emprego nos últimos 30 anos.

Com a evolução dos imunoensaios, outros métodos baseados nos princípios do RIE foram desenvolvidos, visando aumentar sua sensibilidade e praticabilidade, tais como os ensaios imunorradiométricos (IRMA) (2, 55), enzimaensaio (EIA) (28, 29, 72) e fluorimunoensaio (FIA) (22, 52, 67, 77).

Segundo estimativa realizada no final da década de 80, nos países em desenvolvimento, cerca de 500 hospitais, universidades e

laboratórios de análises clínicas realizavam RIEs em alguma proporção (63).

Nos laboratórios clínicos nacionais, com raras exceções, a execução do RIE ainda depende da importação de seus reagentes biológicos, quer seja a granel ou na forma de conjuntos diagnósticos ("Kits"). Isto implica num ônus adicional para o próprio paciente ou mesmo para as instituições governamentais que fornecem subsídios para a realização desses exames.

O princípio do RIE baseia-se na competição entre determinado antígeno marcado isotopicamente (traçador) e o mesmo antígeno não marcado (padrão ou desconhecido) pelos sítios de ligação de seus anticorpos específicos, formando um complexo antígeno-anticorpo (Figura 1).

Como no sistema de RIE as quantidades de traçador e de anticorpo são mantidas constantes, constroem-se curvas de calibração adicionando-se ao sistema quantidades variáveis e conhecidas de antígeno padrão. Conseqüentemente, a proporção de complexo radioativo formado (antígeno marcado-anticorpo) é inversamente proporcional à quantidade de antígeno não marcado.

Dessa forma, a concentração de um determinado antígeno é determinada em amostras de extratos ou fluidos biológicos (soro, plasma, urina, etc.) pela leitura direta na curva de calibração, obtida pela incubação simultânea das amostras e dos padrões com o traçador e o anticorpo específico. Compara-se portanto, o efeito inibitório do antígeno presente na amostra ensaiada na ligação do traçador ao anticorpo específico, com o mesmo efeito inibitório dos padrões conhecidos.

Os elementos essenciais para a realização de um RIE consistem, portanto, no preparo do traçador e das soluções padrão, na

obtenção do antissoro específico e na escolha de técnicas adequadas para, após o término da reação, separar as frações livre e ligada ao anticorpo (10, 32).

A separação é seguida pela determinação da radioatividade de uma ou de ambas frações em contador de cintilação adequado. A partir das contagens obtidas constroem-se graficamente a curva dose x resposta onde são lidos os valores da concentração das amostras ensaiadas pela comparação de sua radioatividade com a dos padrões de concentração conhecida.

Há várias formas de se traçar a curva padrão, uma delas é a partir dos valores calculados das frações ligadas, em porcentual, plotados contra as concentrações do padrão, conforme exemplificado na Figura 2.

A maioria dos RIEs são similares na etapa inicial de incubação do anticorpo com o antígeno marcado radioisotopicamente e com o antígeno padrão ou com a amostra desconhecida. Entretanto, eles diferem no método utilizado na etapa final para a separação do antígeno ligado ao anticorpo daquele livre, que é a principal fonte de imprecisão do RIE (43, 65, 70).

A seleção cuidadosa e a otimização da técnica de separação são essenciais para o desenvolvimento de um ensaio preciso. Na escolha da técnica a ser utilizada deve-se levar em consideração os critérios de eficiência, praticabilidade e aplicação geral.

A técnica de separação escolhida deve separar completamente as frações ligada e livre. Uma fração livre pode comportar-se como ligada e dessa forma apresentar uma ligação aparente na ausência do anticorpo, denominada ligação inespecífica (branco do ensaio). Isto pode ser devido a apreensão do antígeno livre na fração completada, a adsorção do antígeno livre no tubo de ensaio, a impureza do

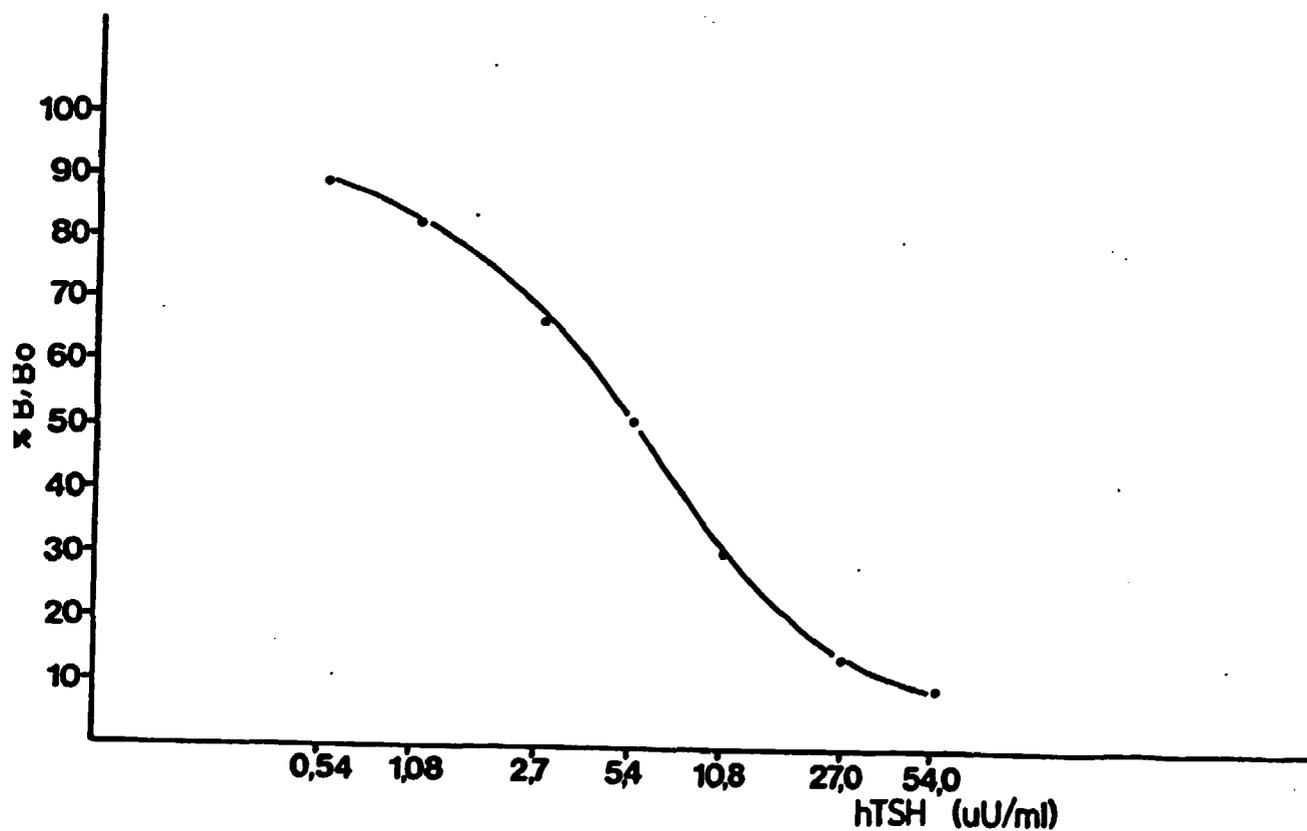


Figura 2 - Curva dose x resposta para a determinação de hormônio tireotrófico humano (hTSH) por radioimunoensaio: deslocamento do traçador (hTSH-¹²⁵I) ligado ao anticorpo por concentrações crescentes do hTSH humano.

traçador ou a separação incompleta dessas duas frações durante a centrifugação ou decantação.

Da mesma forma, a fração ligada pode comportar-se como livre devido a separação incompleta, a impurezas do traçador ou a interferência da técnica de separação na reação antígeno-anticorpo.

Erros de classificação devidos a essas causas comprometem a precisão e a sensibilidade do ensaio. Qualquer diferença sistemática na classificação das frações ligada e livre entre os padrões também irá aumentar a imprecisão do ensaio (70).

Portanto, a técnica de separação ideal deve ser simples, rápida, reprodutível, de baixo custo e empregar reagentes e equipamentos de uso geral em laboratório, devendo ser aplicada a diferentes volumes de reação, a ensaios de muitas amostras e principalmente a ensaios de uma grande gama de antígenos. Além disso, essa técnica não deve ser afetada pelo plasma ou soro e não deverá interferir com a reação de ligação primária, o que poderia ocasionar alterações na precisão e sensibilidade do ensaio (65).

As técnicas de separação exploram diferenças de massa molecular, carga, adsorção ou propriedades de solubilidade das duas frações; precipitam especificamente o anticorpo e conseqüentemente a fração ligada ou a isolubilizam empregando anticorpos acoplados à matrizes sólidas (10).

Nenhuma técnica é universalmente aplicável a todos os RIEs, devendo-se selecionar pela experimentação aquela que melhor se adapta a cada substância e a cada circunstância.

Dentre as técnicas atualmente disponíveis, as mais utilizadas são o duplo anticorpo e os sistemas em fase sólida.

O método de separação de RIEs pelo duplo anticorpo foi desenvolvido no início da década de 60, em resposta a necessidade de

se obter um procedimento para quantificar hormônios protéicos, o qual permitiria realizar um grande número de determinações com precisão e sensibilidade elevadas.

Esse método se baseia no fato do primeiro anticorpo dispor de sítios de ligação disponíveis para um segundo anticorpo, que é espécie específico. No RIE o complexo antígeno-anticorpo e o antígeno livre são separados, adicionando-se um segundo anticorpo dirigido contra a imunoglobulina da espécie em que foi produzido o primeiro anticorpo. Forma-se então um imunocomplexo que pode ser facilmente precipitado por centrifugação (56, 76), (Figura 3).

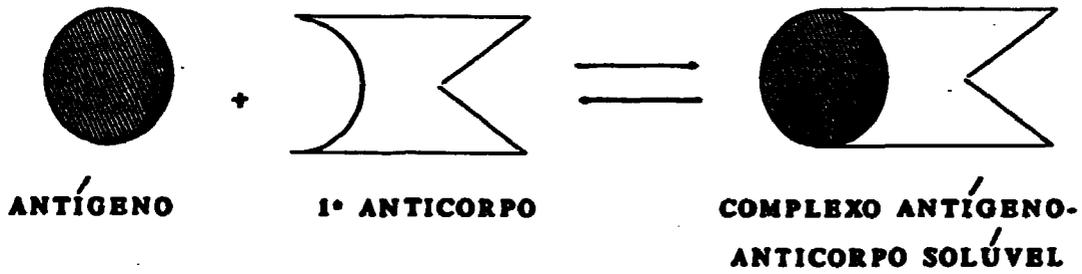
Portanto, o duplo anticorpo é empregado para separar as frações livre e ligada dos RIEs precipitando especificamente a fração ligada (65).

O primeiro trabalho cujos autores empregaram o duplo anticorpo para a separação das frações livre e ligada do RIE foi o de Utiger e cols. (79) em 1962 no ensaio de GH. Esses autores se basearam nos resultados obtidos por Skom e Talmage (74) que demonstraram, em 1958, que a ^{131}I -insulina se ligaria ao anticorpo anti-insulina presente no soro de pacientes diabéticos que recebiam insulina exógena e que este complexo radioativo poderia ser precipitado *in vitro* quantitativamente por um anticorpo anti-gama globulina humana.

Desde então, muitos autores têm produzido o segundo anticorpo para ser empregado em RIEs de hormônios (15, 18, 19, 34, 57, 79), imunoglobulinas (25) e vírus (36).

O antissoro precipitante, ou segundo anticorpo, é usualmente obtido em animais de grande porte (muas, ovinos ou caprinos), contra a imunoglobulina G (IgG) purificada proveniente da mesma espécie animal que gerou o primeiro anticorpo. Desta maneira, o mesmo segundo anticorpo pode ser empregado em ensaios que envolvam

REAÇÃO DO PRIMEIRO ANTICORPO



REAÇÃO DO SEGUNDO ANTICORPO

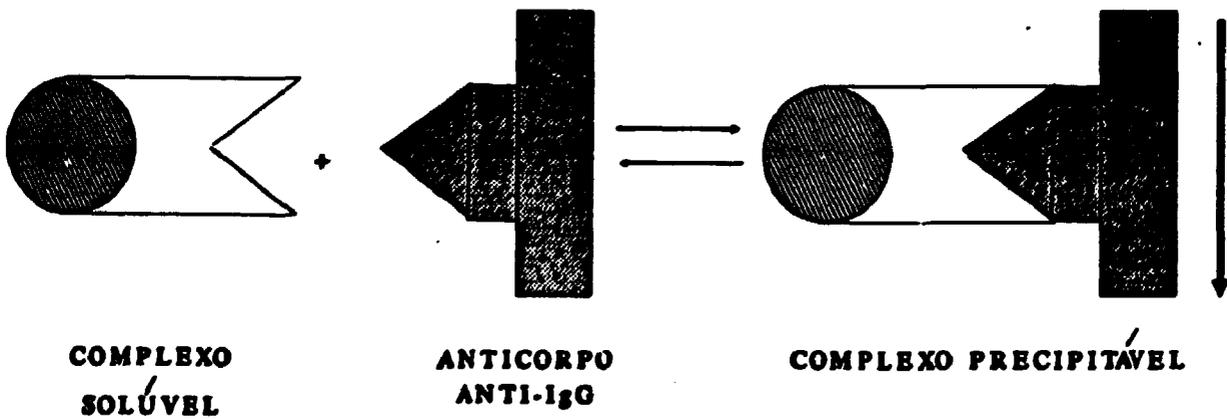


Figura 3 - Esquema demonstrando as bases teóricas do método de separação pelo duplo anticorpo.

diversos antígenos, sempre que os respectivos anticorpos tenham sido obtidos em animais da mesma espécie.

A separação pelo duplo anticorpo tem a grande vantagem de separar completamente a fração ligada da livre sem alterar o equilíbrio da reação inicial antígeno-anticorpo, apresentando ligação inespecífica baixa, pois ele requer somente o uso de um único componente que é uma outra imunoglobulina. Além de poder ser utilizado em diferentes ensaios, o duplo anticorpo pode ser aplicado a diferentes volumes de incubação e a grande número de amostras satisfazendo a maioria dos critérios de eficiência, praticabilidade e aplicação geral (54, 65).

A separação não é afetada por variações normais no teor protéico das amostras biológicas, mas pode ser sensível a interferências dos complementos do soro ou plasma.

A otimização do emprego do duplo anticorpo implica na titulação de um segundo anticorpo e requer a inclusão de agentes quelantes no ensaio para inativar os complementos que possam inibir a reação de precipitação decorrente do segundo anticorpo (16, 54).

A desvantagem principal da técnica do duplo anticorpo é o seu custo elevado (Tabela 1) o que muitas vezes conduz ao emprego de reagentes menos onerosos, mas que não são tão eficientes para a separação dos RIEs.

Além disso, o tempo de incubação para a completa precipitação da fração ligada do ensaio também é uma de suas desvantagens, mas que pode ser minimizado com a associação de um agente precipitante, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG) (38).

Pode-se concluir pelo supra exposto que a obtenção do segundo anticorpo para o RIE em nosso meio é bastante desejável, visto que os segundos anticorpos existentes no mercado serem em sua grande maioria importados por um preço bastante elevado (Tabela 1).

**Tabela 1 - Fornecedores do duplo anticorpo para radioimunoensaio e
seus respectivos preços**

FORNECEDORES	TIPO DE IMUNESSORO	Nº DO CATÁLOGO	PREÇO (US\$)	QUANTIDADE	DATA DE COTAÇÃO
ICN Biomedicals, Inc. Diagnostics Division. Carson, CA, U.S.A.	Cabra anti-IgG de coelho	07-166607	1750.00	500 ml	1991
	Cabra anti-IgG de cobaia	07-166617	2700.00	500 ml	1991
Sigma Chemical Company St. Louis, MO, U.S.A.	Cabra anti-IgG de coelho	R 0881	287.95	5000 tubos	1993
	Burro anti-IgG de cabra	B 8267	287.95	5000 tubos	1993
Calbiochem San Diego, U.S.A.	Cabra anti-IgG de coelho	539845	500.00	10.000 tubos	1989
	Cabra anti-IgG de cobaia	345881	120.00	25 ml	1989
	Coelho anti-IgG de cabra	539884	250.00	25 ml	1992
Pei Freez Biologicals Arkansas, U.S.A.	Cabra anti-IgG de cobaia	12890-2CC	40.00	20 ml	1992

O presente trabalho tem por objetivo a produção local de um segundo anticorpo anti-IgG de coelho, visando sua aplicação nos RIEs de diferentes antígenos em que os primeiros anticorpos tenham sido gerados nessa mesma espécie animal.

Portanto, este trabalho tem por finalidade a obtenção da IgG de coelhos e a produção do soro imune em carneiros; a avaliação das características de precipitação do antissoro produzido, em comparação com um produto comercial de qualidade comprovada e a determinação das condições ideais de armazenamento do referido antissoro.

2. MATERIAIS

2.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com placa aquecedora, modelo 258, marca Fanem, São Paulo.
- Agitador mecânico do tipo "vortex", modelo 251, marca Fanem, São Paulo.
- Autoclave, modelo 39.211, marca Lutz Ferrando, São Paulo.
- Autoclave, modelo 103, marca Soc. Fabbe, São Paulo.
- Balança analítica, modelo H20T, com precisão de 0,01 mg, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Balança semi-analítica, modelo P1000N, com precisão de 0,1 g, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Banho termostaticado, modelo 111, marca Fanem, São Paulo.
- Banho termostaticado, modelo 102-5, marca Fanem, São Paulo.
- Bomba peristáltica, modelo 59-4698-01-AB, marca Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Bomba peristáltica, modelo 4912A, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Bomba peristáltica, modelo BP-100, marca Incibrás, São Paulo.
- Capilares de vidro 25 ul, marca Clay Adams, New Jersey, E.U.A.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, marca Sorvall, Conecticut, E.U.A.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Spin VI, marca Incibrás, São Paulo.

- Centrífuga refrigerada automática, modelo PR-2IEC, marca International Equipament Company, Massachusetts, E.U.A.
- Centrífuga de mesa, modelo H, marca International Equipament Company, Massachusetts, E.U.A.
- Coletor de frações automático, modelo Ultrorac 7000, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Coletor de frações automático, modelo Frac-100, marca Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Coletor de frações automático, modelo Frac-200, marca Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Coluna cromatográfica de vidro de 1,0 x 7,0 cm, construída nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Coluna cromatográfica de vidro de 2,5 x 25,0 cm, construída nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Coluna cromatográfica de vidro de 2,5 x 45,0 cm, construída nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Contador gama, tipo poço com cristal de NaI (Tl), modelo 4000, marca Beckman, Califórnia, E.U.A.
- Contador gama, tipo poço com cristal de NaI (Tl), modelo ANSR Gamma Counter, marca Abbott, Chicago, E.U.A.
- Contador gama, tipo poço com cristal de NaI (Tl), modelo 1275, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Cuba para EGPA em disco de acrílico, marca Técnica Permatrom, São Paulo.
- Cuba para imunoeletroforese de acrílico, marca Técnica Permatrom, São Paulo.
- Espectrofotômetro, modelo PMQ II, marca Carl Zeiss, Oberkochen, República Federal da Alemanha.
- Equipo para coleta de sangue, marca "IBAS-CBO" Indústrias Cirúrgicas e Ópticas S.A., São Paulo.

- Equipó para coleta de sangue Recalvet, Boehringer & Cia. Ltda., São Paulo.
- Estufa, modelo 315 SE, marca Fanem, São Paulo.
- Estufa retilínea, modelo 315/5, marca Fanem, São Paulo.
- Estufa, modelo 119, marca Soc. Fabbe, São Paulo.
- Filtro com poros de 0,22 um de diâmetro, marca Millipore, Massachusetts, E.U.A.
- Membrana adesiva "Parafilm", marca American National Can, Greenwich, Inglaterra.
- Freezer de baixa temperatura (-20°C), marca Prosdócimo, São Paulo.
- Freezer de baixa temperatura (-40°C), marca Metalfrio, São Paulo.
- Freezer de ultra baixa temperatura (-80°C), marca Interfrigo, São Paulo.
- Fonte de alta tensão de 0 a 500 volts, marca Técnica Permatron, São Paulo.
- Fonte de alta tensão, modelo GPS 200/400, marca Pharmacia Uppsala, Suécia.
- Fluxo laminar, modelo HLFS-12, marca Veco, São Paulo.
- Frasco de sangria de 250 e 500 ml, marca Frascolex, São Paulo.
- Frasco de penicilina de 50 ml, marca Frascolex, São Paulo.
- Impressora, modelo Emilia PC, marca Itautec, São Paulo.
- Impressora, modelo Laser Jet III, marca Hewlett Packard, Minneapolis, E.U.A.
- Lâminas para microscopia de 25 x 75 cm de dimensões, marca Perfecta, São Paulo.
- Lâmpada fluorescente de 15 W, marca Philips, São Paulo.

- Liofilizador, modelo ST200K MK II, marca Edwards, West Sussex, Inglaterra.
- Membrana de ultrafiltração, Diaflo PM 30, marca Amicon, Massachusetts, E.U.A.
- Microcomputador, modelo I-7000 PCxtII, marca Itautec, São Paulo.
- Microcomputador, modelo AT-286, marca Samsung, Minneapolis, E.U.A.
- Micropipetas de 10 ul, marca Dade, Flórida, E.U.A.
- Peagômetro, modelo B 374, marca Micronal, São Paulo.
- Pipetas automáticas de vários volumes, marca Oxford, Foster City, E.U.A.
- Pipetas automáticas reguláveis de vários volumes, marca Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Pipetas automáticas reguláveis de vários volumes, marca Gilson, França.
- Pipetas tipo Pasteur, construídas nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil.
- Pipetas sorológicas e volumétricas de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Provetas de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Refrigeradores, marcas Prosdócimo, Consul e Metalfrio, São Paulo.
- Repipetador automático, marca Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Seringas descartáveis de 1 ml com agulha (25 x 8), marca Ibras - CBO, São Paulo.
- Seringas descartáveis de 20 ml com agulha (25 x 8), marca Ibras - CBO, São Paulo.
- Seringas de 10 ul, marca Hamilton, Reno, E.U.A.

- Suporte para filtros, marca Millipore, Massachussets, E.U.A.
- Tubos cilíndricos de vidro de 5 x 110 mm, construídos nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Tubos de ensaio com fundo cônico de 10 x 70 mm, marca Vidrolabor, São Paulo.
- Tubos de ensaio de 10 x 75 mm, marca Vidrolabor, São Paulo.
- Tubos de ensaio de polipropileno, 12 x 75 mm, marca Emtel, São Paulo.

2.2. REAGENTES BIOLÓGICOS

- Adjuvante completo de Freund, Difco Laboratories, Detroit, E.U.A.
- Adjuvante completo de Freund, preparado pela Dra. Etsuko Ikeda de Carvalho no IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Albumina bovina (AB) fração V em pó, Sigma Chemical Company (nº A-8022), St. Louis, E.U.A.
- Albumina bovina fração V Ria Grade em pó, Sigma Chemical Company (nº A-7888), St. Louis, E.U.A.
- Anticorpo anti-hTSH: NIDDKD-anti-hTSH-3 (AFP-C611818), produzido em coelhos e obtido por doação do National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDKD), E.U.A.
- Gama globulina humana, Behringwerke AG (nº 0308-J), Marburg, Alemanha e distribuída pela Hoechst do Brasil, Rio de Janeiro.
- hTSH empregado para radioiodação: NIDDKD-hTSH-I6 e NIDDKD-hTSH-I7 (AFP 8770-B), obtidos por doação do NIDDKD, E.U.A.
- Segundo anticorpo produzido em cabras, anti-gama globulina de coelho, por Radioassay System Laboratories -RSL- (Lote 2R2 MBC) e distribuído por ICN Biomedicals, Inc., California, E.U.A.
- Soro de carneiro anti-soro total de coelho, obtido por doação da Dra. Maria Siqueira, Instituto Biológico, São Paulo.
- Mistura de soro humano de referência, estabelecida no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP e obtida por doação do Dr. Mario Hirata.

2.3. PRODUTOS QUÍMICOS

- Ácido tricloroacético, Merck, São Paulo.
- Acetato de sódio, Merck, São Paulo.
- Ácido acético glacial, Quimis, São Paulo.
- Ácido clorídrico, P.A., Merck, São Paulo.
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), P.A. Carlo Erba, São Paulo.
- Acrilamida 97%, Bio Rad, California, E.U.A.
- Agar Noble, Difco Laboratories, Detroit, E.U.A.
- Amido Schwartz 10B, Merck, São Paulo.
- Azida sódica, Merck, São Paulo.
- Azul brilhante coomassie R250, Merck, São Paulo.
- Azul de bromofenol, Merck, São Paulo.
- Azul dextran 2000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Bicarbonato de sódio, P.A., Carlo Erba, São Paulo.
- Cloramina T, P.A., Merck, São Paulo.
- Cloramina T, P.A., Sigma Chemicals Company, St. Louis, E.U.A..
- Cloreto de sódio, P.A., Grupo Química, Rio de Janeiro.
- Cloreto de sódio, P.A., Merck, São Paulo.
- DEAE-celulose, Whatman, Maidstone, Inglaterra.
- Fosfato de potássio monobásico e dibásico, P.A., Merck, São Paulo.
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico, P.A., Merck, São Paulo.
- Glicina, P.A., Merck, São Paulo.
- Hidróxido de sódio, P.A., Carlo Erba, São Paulo.
- Iodato de sódio, P.A., Merck, São Paulo.

- Metabissulfito de sódio, P.A., Merck, São Paulo.
- Na¹²⁵I em hidróxido de sódio 0,1 N, New England Nuclear, Boston, E.U.A..
- Na¹²⁵I em hidróxido de sódio 0,1 N, Du Pont, Massachusetts, E.U.A.
- Na¹²⁵I em hidróxido de sódio 0,1 N, Amersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra.
- N,N'-metileno-bis-acrilamida (Bis-acrilamida), P.A., Bio Rad, California, E.U.A..
- N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), P.A. Bio Rad, California, E.U.A..
- Riboflavina, Roche, São Paulo.
- Sacarose em cristais, P.A., Merck, São Paulo.
- Sephadex G-100, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Sephadex G-50 médio, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Sulfato de cobre, Merck, São Paulo.
- Sulfato de sódio, Baker Analyzed' Reagent, New Jersey, E.U.A.
- Tartarato de sódio e potássio, Merck, São Paulo.
- Thimerosal, Queel, São Paulo.
- Thimerosal, Sigma Chemicals Company, St. Louis, E.U.A..
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS), P.A., Merck, São Paulo

2.4. SOLUÇÕES -

2.4.1. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA OBTENÇÃO DA IGG DE COELHOS:

- Solução de hidróxido de sódio a 10%: 30 g em 300 ml de água destilada.

- Reativo de Biureto:

Sulfato de cobre pentahidratado.....	1,50	g
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado..	6,00	g
Solução de hidróxido de sódio à 10%.....	300,00	ml
Água destilada q.s.p.....	1,00	l

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0:

Fosfato de potássio monobásico.....	13,62	g
Hidróxido de sódio.....	4,00	g
Água destilada q.s.p.....	1,00	l

- Tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 8,0:

Fosfato de potássio monobásico.....	0,1443	g
Fosfato de potássio dibásico.....	3,2999	g
Água destilada q.s.p.....	1,0000	l

- Sulfato de sódio a 18%: 18 g em 100 ml de água destilada.

- Solução fisiológica: 9 g de cloreto de sódio em 1 l de água destilada.

2.4.2. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA IMUNOELETROFORESE E NA IMUNODIFUSÃO

- Solução de ácido clorídrico 1 M: 9 ml do concentrado em 100 ml de água destilada.
- Solução fisiológica a 0,9%: 9 g de cloreto de sódio em 1 l de água destilada
- Tampão TRIS-acetato 0,113 M, pH 8,6:
TRIS.....6,075 g
Acetado de sódio trihidratado.....6,804 g
Ácido clorídrico 1 M.....13,000 ml
Água destilada q.s.p.....1,000 l
- Solução de agar a 1%: 1 g de agar purificado em 100 ml de água destilada.
- Tampão TRIS-acetato 0,06 M, pH 8,6: 600 ml de tampão TRIS-acetato 0,113 M, pH 8,6 em 1 l de água destilada.
- Solução de agar a 3%: 3 g de agar purificado em 100 ml de tampão TRIS-acetato 0,06 M, pH 8,6.
- Solução de agar a 3% em solução fisiológica: 3 g de agar purificado em 100 ml de solução fisiológica.

- Solução corante:

Amido Schwartz 10B.....2,00 g
Ácido acético glacial.....50,00 ml
Água destilada q.s.p.....500,00 ml

- Solução descorante: 50 ml de ácido acético glacial em
1 l de água destilada.

2.4.3. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA:

- Ácido clorídrico 1 N: 9 ml do concentrado para 100 ml
de água destilada.

- Solução A, pH 8,9:

TRIS.....36,60 g
TEMED.....0,23 ml
Ácido clorídrico 1 N.....48,00 ml
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução C:

Acrilamida.....28,00 g
Bis-acrilamida.....0,74 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução E:

Riboflavina.....4,00 g
Água destilada.....100,00 ml

- Solução F:

Sacarose.....20,00 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução para polimerização (poliacrilamida a 7%):

Solução A.....1,00 ml
Solução C.....2,00 ml
Solução E.....1,00 ml
Água destilada.....4,00 ml

- Tampão TRIS-glicina 0,4 M, pH 8,3:

TRIS.....6,00 g
Glicina.....28,80 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml
Diluído 10 vezes em água destilada imediatamente
antes do uso.

- Solução de azul de bromofenol: 0,1 mg em 100 ml de
água destilada.

- TCA a 12,5%: 12,5 g em 100 ml de água destilada.

- Solução de "coomassie blue" a 0,2%:

"Coomassie blue" 0,20 g
Etanol45,00 ml
Ácido acético glacial10,00 ml
Água destilada q.s.p.45,00 ml

- Solução de "coomassie blue" a 0,05%: 10 ml da solução de "coomassie blue" a 0,2% em 30 ml de ácido acético a 7%.
- Solução descorante (ácido acético glacial a 7%): 7 ml de ácido acético glacial em 100 ml de água.

2.4.4. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA RADIOIODAÇÃO DO HTSH:

- Fosfo-salina (tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,6, NaCl 0,15 M e thimerosal 0,01%):

Fosfato de sódio monobásico hidratado.....	0,18	g
Fosfato de sódio dibásico dihidratado.....	1,55	g
Cloreto de sódio.....	8,50	g
Thimerosal.....	0,10	g
Água destilada q.s.p.....	1,00	l
- Tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4:

Fosfato de sódio monobásico monohidratado....	12,97	g
Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado...	145,07	g
Água destilada q.s.p.....	1,00	l
- Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4:

Preparado a partir do tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4 diluído 10 vezes em água destilada.

**2.4.5. SOLUÇÃO EMPREGADA NA PURIFICAÇÃO DO hTSH RADIOIODADO
(cromatografia em Sephadex G-100):**

- Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 (conforme preparado para radioiodação), contendo 0,1% de AB e 0,02% de azida sódica:

AB.....	1,00	g
Azida sódica.....	0,20	g
Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 q.s.p..	1,00	l

2.4.6. SOLUÇÕES EMPREGADAS NO RIE DE hTSH:

- Fosfo-salina conforme preparada para radioiodação.

- Solução de EDTA 0,1 M:

EDTA.....	18,61	g
Fosfo-salina.....	500,00	ml

- Fosfo-salina-EDTA (tampão de ensaio):

EDTA 0,1 M.....	10,00	ml
Fosfo-salina q.s.p.....	100,00	ml

Adicionado 1,00 ml de SCN à solução imediatamente antes do uso.

**2.4.7. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DOS ANTISSOROS
PRODUZIDOS:**

- Tampão de ensaio com SCN na diluição de 1:100:

Item 2.4.6.

- Tampão de ensaio com SCN na diluição de 1:200:
EDTA 0,1 M.....10,00 ml
Fosfo-salina q.s.p.....100,00 ml
Adicionando 0,50 ml de SCN à solução imediatamente
antes do uso.

- Tampão de ensaio com SCN na diluição de 1:300:
EDTA 0,1 M.....10,00 ml
Fosfo-salina q.s.p.....100,00 ml
Adicionando 0,34 ml de SCN à solução imediatamente
antes do uso.

- Tampão de ensaio com SCN na diluição de 1:400:
EDTA 0,1 M.....10,00 ml
Fosfo-salina q.s.p.....100,00 ml
Adicionando 0,25 ml de SCN à solução imediatamente
antes do uso.

- Tampão de ensaio com SCN na diluição de 1:500:
EDTA 0,1 M.....10,00 ml
Fosfo-salina q.s.p.....100,00 ml
Adicionando 0,20 ml de SCN à solução imediatamente
antes do uso.

3 - MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DA IGG DE COELHOS

3.1.1. ANÁLISE DO SORO

Utilizou-se soro de coelhos Nova Zelândia adultos, obtido por sangria via punção cardíaca de animais provenientes dos biotérios do IPEN-CNEN/SP, Instituto Butantan (IB) e Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT).

A normalidade do soro empregado foi confirmada pela determinação da concentração de proteínas totais do soro procedente das várias sangrias, pelo método de Gornall e cols. (33). Para tanto, utilizou-se uma mistura de soro humano estabelecida como padrão, com concentração de 8,0 g/l.

O princípio do método baseia-se na capacidade das proteínas reagirem com íons cúpricos em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de proteína existente na amostra, detectável a 555 nm (reação do Biureto).

A reação foi realizada em tubos de ensaio de vidro, com dimensões de 10 mm x 75 mm, marcados com A (amostra), P (padrão) e B (branco), onde pipetou-se respectivamente, 50 ul de soro (A), 50 ul do padrão (P) e 50 ul de água destilada (B). Em seguida, foram adicionados a cada um dos tubos 3,0 ml do reativo de Biureto e as amostras foram homogeneizadas por inversões repetidas do tubo de ensaio, vedando-se as extremidades com membrana adesiva do tipo "Parafilm". Após um tempo mínimo de 15 minutos à temperatura ambiente, efetuaram-se as leituras espectrofotométricas a 555 nm, ajustando-se o zero do aparelho com o branco.

A concentração de proteínas totais, presente nas amostras, foi obtida pela seguinte equação:

$$\frac{A}{P} \times C = \text{gramas de proteínas totais em 100 ml de soro.}$$

onde:

A = Absorbância da amostra

P = Absorbância do padrão

C = Concentração do padrão (g%)

3.1.2. PRECIPITAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS

As frações globulínicas foram separadas a partir de 800 ml de soro pela precipitação com sulfato de sódio (21). Realizou-se uma primeira precipitação com sulfato de sódio a 18%, permanecendo esta solução a temperatura ambiente por 20 horas e por mais duas horas a 37°C. A seguir, a solução foi submetida à centrifugação a 650 G durante 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante reservado e o precipitado reconstituído com 320 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0.

Foi realizada uma segunda precipitação com sulfato de sódio a 12%, sendo novamente o precipitado separado e reservado um segundo sobrenadante. Este precipitado foi então reconstituído com 160 ml do mesmo tampão fosfato de potássio e centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi reservado e o sobrenadante foi reprecipitado juntamente com os demais, com sulfato de sódio a 12% e centrifugado.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, juntamente com aquele reservado anteriormente, foi dialisado contra o mesmo tampão fosfato de potássio.

Após nova diálise contra tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 8,0, concentrou-se o material por meio de membrana Diaflo PM 30 em sistema de ultrafiltração Amicon.

3.1.3. PURIFICAÇÃO DA IgG

Após a precipitação das globulinas séricas, a fração correspondente a IgG foi então purificada por cromatografia de troca iônica em dietil-aminoetil (DEAE) celulose (30).

Realizou-se uma cromatografia prévia, a partir de uma pequena amostra do material (0,5 g), a fim de se avaliar o emprego de um lote de DEAE-celulose, armazenado por quase 20 anos nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP.

Para tanto, adicionou-se à DEAE-celulose tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0 sob agitação, até a mistura resultante (celulose e tampão) atingir o pH 8,0. Após a retirada das partículas finas com ajuda de bomba de vácuo, a celulose foi lavada com tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 8,0 e em seguida empacotada em coluna de vidro de dimensões de 7,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro, mantida sob refrigeração a 4°C.

A coluna foi equilibrada com cerca de 500 ml do mesmo tampão fosfato de potássio, empregando-se fluxo de 45 ml/h. A amostra foi eluída nesse mesmo tampão de equilíbrio da coluna, empregando-se fluxo de 60 ml/h, sendo coletadas frações de 1,7 ml cada.

A cromatografia foi acompanhada pela quantificação da concentração protéica das frações através de leitura espectrofotométrica.

ca no feixe de luz de 280 nm. O final da eluição foi determinado pela diminuição da absorbância até aproximadamente o mesmo valor do branco (tampão de eluição).

Confirmada a adequação do uso dessa celulose, realizou-se a purificação do restante do material empregando-se uma coluna de maiores dimensões, 25,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro e coletando-se, nas mesmas condições descritas anteriormente, frações de 4 ml cada.

As frações relativas ao pico protéico foram reunidas e reprecipitadas com sulfato de sódio a 18%, permanecendo esta solução por 24 horas a 37°C, antes do precipitado ser separado por centrifugação a 650 G, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A fim de se remover as impurezas que ainda pudessem estar presentes, o precipitado foi lavado três vezes consecutivas com uma solução de sulfato de sódio a 18% em água destilada, sendo cada lavagem sucedida por centrifugação nas mesmas condições. O material assim obtido foi inicialmente dialisado contra água destilada para a retirada do sulfato e a seguir contra solução fisiológica.

As soluções de IgG, resultantes das duas purificações, foram reunidas e concentradas em membrana de diálise envolvido por Sephadex G-50 seco, a 4°C. Foram realizadas diversas trocas do Sephadex ao longo de 24 horas.

Depois de devidamente concentrada, a solução final de IgG foi esterilizada, sob fluxo laminar, com filtro de poros de 0,22 μ de diâmetro. Ainda sob fluxo laminar, ela foi dividida em alíquotas, sendo armazenada em ampolas estéreis inicialmente a -20°C por 6 meses, que foram depois transferidas para -80°C.

A Figura 4 apresenta um diagrama dos procedimentos empregados no isolamento e purificação da IgG de coelho.

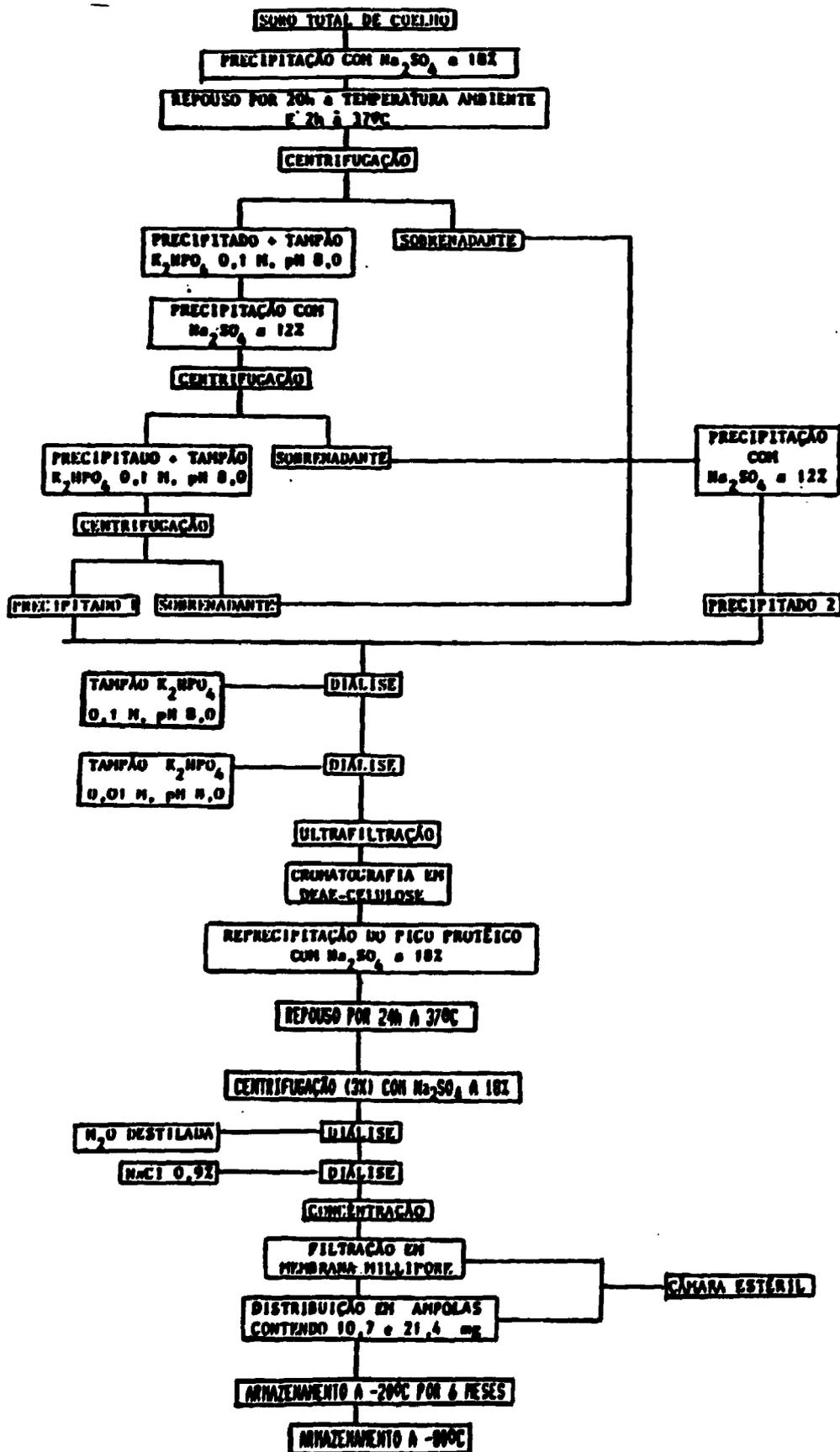


Figura 4 - Representação diagramática do isolamento e purificação da IgG de coelho.

3.1.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÊICA

A concentração protéica foi avaliada pelo método do Biureto (33) durante as diferentes etapas de purificação.

Para a reação do Biureto adicionaram-se 0,95 ml de água destilada e 1,50 ml de reativo de Biureto aos tubos de ensaio de vidro, com dimensões de 10 x 75 mm, que continham 0,05 ml da amostra. Após agitação por inversão, os tubos foram mantidos a 37°C por 30 minutos. Em seguida, determinou-se a densidade óptica a 555 nm, ajustando-se o zero do aparelho com o branco (1,00 ml de água destilada) acrescido do reativo de Biureto (1,5 ml).

A concentração das proteínas totais na amostra, foi calculada empregando-se o seguinte fator:

0,07 D.O. 0,625 ug de proteína em 0,05 ml da amostra

onde:

D.O. = Densidade óptica no comprimento de onda a 555 nm.

3.1.5. AVALIAÇÃO DA IgG

A IgG de coelhos assim obtida foi avaliada quanto à sua pureza pela imunoeletroforese frente ao soro de carneiro anti-soro total de coelho (41). A pureza da IgG também foi verificada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 7% desenvolvida de acordo com o método de Davis (20).

3.1.5.1. IMUNOELETROFORESE

Inicialmente, lâminas de microscopia de 25 x 75 mm de dimensões, foram recobertas com 1 ml de agar a 1% em água destilada e secas em estufa a 180°C. Após a secagem, 3 ml de agar a 3% em tampão TRIS-acetato 0,06 M, pH 8,6 foram distribuídos sobre as lâminas já revestidas, sendo mantidas a 4°C por alguns segundos. Em seguida, foi feita uma canaleta na região mediana da lâmina, com 1 mm de largura e 65 mm de comprimento e dois orifícios de 1 mm de diâmetro cada, posicionados no centro da lâmina. Esses orifícios foram dispostos a uma distância de 4 mm da canaleta de forma que a mesma ficasse entre os dois. O gel dos orifícios e da canaleta foi retirado com o auxílio de pipeta Pasteur acoplada a bomba de vácuo.

Com o auxílio de capilares aplicou-se a IgG purificada no orifício superior e preencheu-se o orifício inferior com soro de coelho normal.

As lâminas foram então colocadas na cuba de imunoelektroforese e a corrida eletroforética foi desenvolvida em o tampão TRIS-acetato 0,113 M, pH 8,6, com corrente elétrica de 6 mA por lâmina a temperatura ambiente por 90 minutos. A seguir as lâminas foram retiradas da cuba e aplicado na canaleta, por meio de capilares, o soro de carneiro anti-soro total de coelho.

Essas lâminas permaneceram em câmara úmida a 4°C por 48 horas e após esse período elas foram lavadas cerca de 10 vezes com solução salina e por mais 10 vezes com água destilada. Em seguida, elas foram embrulhadas em papel-filtro úmido e levadas para estufa a 180°C até secagem do papel. Essa operação de secagem em papel-filtro foi repetida e a seguir as lâminas foram levadas para a estufa sem papel, onde permaneceram até a secagem completa do gel.

Depois do gel estar seco, as lâminas foram coradas com solução a base de amido Schwartz (negro) por 10 minutos e descoradas com ácido acético glacial a 5%.

3.1.5.2. EGPA

Utilizaram-se tubos cilíndricos de vidro de 5 mm de diâmetro interno por 110 mm de comprimento, vedando-se uma das extremidades com membrana adesiva do tipo "Parafilm". Os tubos foram dispostos em estante apropriada, de forma a serem mantidos na posição vertical.

A solução de polimerização (poliacrilamida a 7%), foi transferida com pipeta automática para os tubos, mantendo-se uma altura uniforme de aproximadamente 9 cm em todos eles. Para evitar a formação de menisco na extremidade superior dos géis, adicionaram-se sobre a solução cerca de 100 ul de água destilada; de forma a assegurar obtenção de bandas perfeitamente horizontais na separação eletroforética.

A seguir, os tubos foram expostos a cerca de 7 cm de uma lâmpada fluorescente de 15 Watts durante 45 minutos a 4°C, para permitir a polimerização do gel. Finda sua polimerização, a água destilada foi retirada com a ajuda de papel absorvente e as amostras foram aplicadas por meio de pipetas automáticas.

Adicionaram-se cerca de 30 ul da solução F para aumentar a densidade das amostras e evitar sua mistura com o tampão de corrida antes do início da eletroforese. Acrescentaram-se também 10 ul da solução de azul de bromofenol para indicar o final da corrida (corante traçador-CT). As amostras resultantes foram então homogeneizadas por inversões repetidas do tubo cilíndrico de vidro, vedando a outra extremidade com "Parafilm".

Após a retirada do "Parafilm" de ambas as extremidades, os tubos foram posicionados verticalmente na cuba eletroforética e completou-se o espaço acima das amostras de cada tubo com tampão TRIS-glicina 0,4 M, pH 8,3. Esse mesmo tampão foi empregado para a corrida eletroforética.

A corrida foi efetuada com corrente anódica de 2 mA por gel a 4°C, sendo interrompida quando a banda do CT chegou até cerca de 3 cm da extremidade inferior do gel.

Finda a eletroforese, os géis foram removidos dos tubos de vidro através de injeção de água contínua, empregando-se seringa plástica com agulha de aço inoxidável, de modo a asprender toda a superfície do gel do tubo.

Em seguida, os géis foram colocados em TCA à 12,5% por 30 minutos para a precipitação das proteínas, corados com "coomassie blue" a 0,05% e descorados com ácido acético glacial a 7%.

3.2. OBTENÇÃO DO SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO

3.2.1. ANIMAIS

Para a produção do soro imuno contra a IgG de coelho foram utilizados quatro ovinos deslanados, cordeiros, machos, provenientes do Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo (IZSA-SP). Esses ovinos permaneceram alojados no Biotério de animais de grande porte do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) (Tabela 2). A Figura 5 apresenta a fotografia de um desses animais, antes de se iniciar sua imunização.

Após um período de adaptação de 15 dias, coletaram-se amostras de sangue e de fezes dos ovinos para a realização de exames hematológico e parasitológico de fezes, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP, a fim de se verificar o estado geral de saúde dos animais. Na Tabela 3 são exibidos os resultados desses exames.

Dois animais (146 e 163), cujos exames acusaram resultados positivos para nematóide (1050 ovos de *Strongyloidea sp* por grama de fezes) e protozoário (2950 oocistos de *Coccidia*) foram tratados com vermífugo à base de sulfa e de albendazole. O albendazole é uma droga pertencente ao grupo dos benzimidazoles, caracterizada por apresentar alto índice terapêutico como um agente anti-helmíntico polivalente (3). Durante o tratamento, o animal 146 também apresentou problemas nas vias aéreas superiores, sendo medicado com antibiótico. Esses dois animais só foram submetidos à experimentação após terem se recuperado plenamente, o que foi confirmado por meio de exames clínicos e laboratoriais.

A Tabela 4 exhibe os resultados das dosagens de proteínas

Tabela 2 - Identificação e procedência dos ovinos empregados na produção do segundo anticorpo.

Nome	Nº	Raça	Procedência
Cacau	146	Morada Nova	Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga do IZSA/SP
Cacto	163	Morada Nova	Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga do IZSA/SP
Dado	249	Santa Inês	Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura do IZSA/SP
Debilitado	285	Santa Inês	Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura do IZSA/SP



Figura 5 - Fotografia do ovino 163.

Tabela 3 - Resultados dos exames hematológico (proteínas totais, albumina e hemograma) e parasitológico de fezes dos ovinos.

Animal nº	146	163	249	285
Exames				
PROTEÍNAS TOTAIS (g%)	5,8	5,0	5,8	5,8
ALBUMINA (g%)	2,6	2,3	2,7	3,2
SÉRIE VERMELHA:				
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	9,1	9,4	8,9	9,2
Hematócrito (%)	33	33	31	34
Hemoglobina (g%)	11,4	10,9	10,7	11,5
VCM (u ³)	36,3	35,1	34,8	37,0
HCM (yy)	12,5	11,6	12,0	12,5
CHCM (%)	34,5	33,1	34,5	33,8
SÉRIE LEUCOCITÁRIA:				
Leucócitos x 10 ³ /mm ³	9,1	4,3	5,9	6,0
Neutrófilos:				
segmentados (%)	62	34	39	54
Eosinófilos (%)	5	1	1	1
Linfócitos (%)	33	57	54	43
Monócitos (%)	0	8	6	2
<i>Coccidia</i> (nº de oocisto)	2950	250	50	800
<i>Strongyloidea</i> sp (ovos/g)	660	1050	100	100

VCM = Volume corpuscular médio.

HCM = Hemoglobina corpuscular média.

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 4 - Resultados dos exames hematológico (proteínas totais e albumina) e parasitológico de fezes dos ovinos, após tratamento das verminoses.

Animais	146	163	249	285
Exames				
PROTEÍNAS TOTAIS (g%)	6,3	5,9	5,8	5,8
ALBUMINA (g%)	3,0	2,6	2,7	3,2
<i>Coccidia</i> (nº de oocistos)	0	0	0	0
<i>Strongyloidea sp</i> (ovos/g)	0	0	100	100

totais e albumina dos quatro animais, cujos valores são compatíveis com o padrão de normalidade para ovinos descrito na literatura (66). Nessa tabela são também exibidos os resultados dos exames parasitológico de fezes desses animais em que se observa a ausência de oocistos de *Coccidia* e a diminuição significativa de ovos de *Strongyloidea sp.*

3.2.2. ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Os antissoros anti-IgG de coelho foram obtidos nos ovinos, empregando-se a técnica de imunização baseada em injeções múltiplas descrita por Vatukaitis e cols. (80). Os animais foram injetados subcutaneamente com dois ml de uma emulsão formada por volumes iguais de solução fisiológica contendo 500 ug da IgG de coelho e de Adjuvante de Freund Completo (AFC), distribuídos em 20 pontos da região paraesternal, rica em gânglios linfáticos. A cada 20 dias essas injeções foram repetidas, sempre próximas aos sítios em que foi realizada a imunização primária.

Dez dias após cada injeção de reforço colheram-se amostras de sangue de 40 ml pela veia jugular dos animais, para avaliação do título dos antissoros.

Sangrias de volumes maiores foram efetuadas pela mesma via a cada quatro injeções de reforço, compreendendo cerca de 1,5 l em duas colheitas espaçadas de três dias. Essas colheitas foram realizadas em condições estéreis, com o auxílio de frascos à vácuo de 500 ml e equipos para colheita de sangue. O sangue colhido foi mantido por duas horas em banho a 37°C e a seguir permaneceu a temperatura ambiente até a completa retração do coágulo. O soro foi separado sob fluxo laminar, após centrifugação do sangue a 775 G durante 10 minu-

tos a 4°C em frascos estéreis. Os antissoros obtidos foram armazenados em frascos estéreis a -40°C.

Após cada uma dessas sangrias de grandes volumes, antes de serem reimunizados, os animais permaneceram em descanso durante 70 dias na primeira vez e por 140 dias na segunda.

Logo após a sangria que sucedeu a quinta injeção de reforço, o ovino 146 apresentou um cálculo uretral. Esse cálculo foi extraído por meio de intervenção cirúrgica com remoção do apêndice vermiforme, no Hospital Veterinário da FMVZUSP. Conseqüentemente, durante o período em que esteve enfermo este animal não recebeu aquela que corresponderia à sexta injeção de reforço.

Depois de completamente recuperado é que foi submetido novamente à experimentação. Entretanto, após a sangria que sucedeu a nona injeção de reforço, ele apresentou recidiva de urolitíase. Desta feita, devido a sua localização, o cálculo urinário necessitou ser removido por uma segunda intervenção cirúrgica, uretrocistotomia e castração do animal. Por causa da seqüela do próprio procedimento cirúrgico, este ovino deixou de ser experimentado.

Durante o segundo período de descanso, o ovino 285 também apresentou urolitíase, porém, com ruptura de bexiga e coleção de urina a nível de subcutâneo na porção ventral do abdômen e membros pélvicos. Por indicação do médico veterinário o animal foi sacrificado, ocasião em que foram colhidos 1,5 l de sangue da veia jugular.

Nesse mesmo período, o ovino 249 veio subitamente a óbito, não sendo possível colher seu sangue e nem realizar a autópsia para a determinação da causa morte. Devido esse incidente, foram repetidos os exames hematológico e parasitológico de fezes nos ovinos remanescentes, cujos resultados, dentro do padrão de normalidade para a espécie (Tabela 5), indicaram não haver nenhum processo infeccioso

Tabela 5 - Resultados dos exames hematológico (hemograma) e parasitológico de fezes dos ovinos 146 e 163.

Animal nº	146	163
Exames		
SÉRIE VERMELHA:		
Hemácias x 10 ⁶ /mm ³	11,9	13,3
Hematócrito (%)	34,0	45,0
Hemoglobina (g%)	12,0	16,2
VCM (u ³)	28,6	33,8
HCM (yy)	10,1	12,2
CHCM (%)	35,0	36,0
SÉRIE LEUCOCITÁRIA:		
Leucócitos x 10 ³ /mm ³	5,2	5,1
Neutrófilos:		
segmentados (%)	38,0	72,0
bastonetes (%)	0	1,0
Eosinófilos (%)	8,0	5,0
Basófilos (%)	1,0	0
Linfócitos (%)	50,0	19,0
Monócitos (%)	3,0	3,0
<i>Coccidia</i> (nº de oocisto)	0	0
<i>Strongyloidea sp</i> (ovos/g)	0	0

VCM = Volume corpuscular médio.

HCM = Hemoglobina corpuscular média.

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

e contagioso e nem parasitário que pudesse ter sido transmitido pelo ovino 249.

Até o aparecimento do primeiro cálculo no ovino 146, todos os animais estavam sendo alimentados exclusivamente com ração. Como o excesso de carboidratos da ração poderia ter desencadeado este problema, passou-se a oferecer capim juntamente com a ração. A partir do segundo período de descanso o capim constituiu a única fonte de alimento dos animais. Quando o capim não era disponível acrescentava-se cloreto de amônia à ração (200 mg/Kg do animal), a fim de acidificar a urina para impedir a formação de cristais.

3.3. AVALIAÇÃO DOS ANTISSOROS DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO

Os antissoros obtidos nos carneiros contra a IgG de coelho foram sempre avaliados em comparação com um segundo anticorpo para RIE de qualidade conhecida, produzido em cabras pela Radioassay Systems Laboratories (RSL), EUA. Essas avaliações referem-se a determinação de seu título, da concentração ideal de IgG carreadora, estudo da cinética de precipitação e confirmação da inexistência de reação cruzada com a IgG humana.

3.3.1. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DOS ANTISSOROS

O título dos antissoros provenientes das diferentes sangrias foi determinado em comparação com aquele da RSL num sistema de RIE de tireotrofina humana (hTSH), conforme descrito adiante no item 3.3.1.1.

O título dos antissoros produzidos pelo ovino 285 também foi estimado pela imunodifusão, segundo o método de Ouchterlony (62), relatado adiante no item 3.3.1.2. Calculou-se a correlação linear entre esses valores quando estimados por uma ou outra técnica, a fim de confirmar o paralelismo entre esses resultados.

3.3.1.1. RADIOIMUNOENSAIO DO hTSH

O RIE, desenvolvido por Borghi e Bartolini (12) a partir do emprego de polietilenoglicol para a separação do ensaio, foi adaptado para o método do duplo anticorpo, seguindo as especificações do uso do anticorpo da RSL.

Para tanto, adicionou-se 1% de soro de coelho normal no tampão de ensaio, correspondendo a uma quantidade de IgG carreadora de 0,016% (48), acima daquela mínima recomendada pela RSL de 0,005%. Empregou-se 0,1 ml do segundo anticorpo e incubação por 90 minutos a temperatura ambiente, sendo o tempo mínimo de incubação recomendado pela RSL de 1 hora a essa mesma temperatura.

Empregaram-se na realização do RIE os reagentes biológicos fornecidos pelo NIDDKD especificados no item 2.2.

A fim de determinar o título dos antissoros provenientes das diversas sangrias dos animais, realizou-se o RIE de hTSH incubando-se por 24 horas a 4°C: 0,1 ml de tampão de ensaio, 0,1 ml do primeiro anticorpo na diluição que liga aproximadamente 50% do antígeno marcado (item 3.3.1.1.2.) e 0,1 ml do traçador (item 3.3.1.1.1.). O traçador foi empregado na diluição estabelecida para obter atividade em torno de 10.000 cpm por tubo, quando da determinação da ótima diluição do primeiro anticorpo.

As amostras foram incubadas em quadruplicata, em tubos de polipropileno, para cada uma das diluições do segundo anticorpo. Também foram incubadas as amostras referentes a ligação inespecífica, nas quais o primeiro anticorpo foi substituído por igual volume do tampão de ensaio.

A separação foi efetuada adicionando-se o segundo anticorpo nas seguintes diluições, realizadas no mesmo tampão de ensaio: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. As amostras foram incubadas por mais 90 minutos a temperatura ambiente e após a adição de 2 ml de água destilada, elas foram homogeneizadas em "vórtex" e centrifugada a 4°C, durante 15 minutos a 1200 G. Os sobrenadantes foram descartados, vertendo-se os tubos, e as atividades foram determinadas em contador de radiação gama.

Os resultados do ensaio foram estimados a partir dos dados obtidos na determinação da radioatividade das amostras presentes nos tubos de polipropileno, antes (contagem - média de 10 amostras) e após a precipitação das frações ligadas ao segundo anticorpo.

Determinou-se, portanto, a percentagem de ligação do traçador (^{125}I -hTSH) ao seu anticorpo específico (anti-hTSH), precipitado pela técnica do duplo anticorpo, para cada replicata das diferentes amostras com referência a contagem total (B/T), segundo a relação abaixo:

$$\% \text{ de ligação} = \frac{\text{cpm após a precipitação}}{\text{cpm antes da precipitação}} \times 100$$

Foram calculados a média e o desvio padrão (DP) dos valores das ligações de cada amostra, aceitando-se valores de replicatas compreendidos entre dois DP. Esses valores foram corrigidos pela subtração daqueles referentes a ligação inespecífica.

As curvas de título foram traçadas em papel milimetrado, relacionando as percentagens de ligação com as respectivas diluições do segundo anticorpo. A partir dessas curvas estabeleceu-se o título dos antissoros, que forneceu uma precipitação máxima da fração ligada do ensaio, numa região de platô (ligação antígeno marcado-primeiro anticorpo em torno de 50%).

3.3.1.1.1. PREPARO DO TRAÇADOR

O traçador foi preparado a partir do hTSH-I6 e hTSH-I7 altamente purificados, fornecidos pelo NIDDKD na forma liofilizada para serem utilizados com esta finalidade. Estas preparações apresen-

tavam respectivamente potência radioimunológica de 6,6 UI/mg e 6,7 UI/mg para o hTSH-I6 e hTSH-I7, com relação ao padrão internacional estabelecido pela Organização Mundial de Saúde em 1969 (WHO hTSH INT. STD. 68/38).

As contaminações, determinadas por RIE, foram 29 IU/mg (hTSH-I6) e 163 IU/mg (hTSH-I7) para o FSH e 500 IU/mg (hTSH-I6) e 238 IU/mg (hTSH-I7) para o LH (42).

3.3.1.1.1.1. TÉCNICA DE IODAÇÃO DO hTSH

O hTSH foi iodado pelo método de Hunter e Greenwood (44), modificado no que diz respeito a concentração dos reagentes, empregando-se ^{125}I na forma de iodeto de sódio, livre de carreador e de agentes redutores.

As radioiodações foram realizadas em capela e a temperatura ambiente, observando-se as devidas precauções na manipulação do material radioativo.

A um tubo de ensaio de vidro, com fundo cônico, de dimensões de 12 x 75 mm, que continha 40 ul de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4, adicionaram-se sucessivamente:

- a - hTSH: 10 ul da solução de concentração de 0,5 mg/ml.
- b - Na^{125}I : 29,6 MBq¹ (800 uCi²) em volume variável de acordo com a atividade específica de cada partida.
- c - Cloramina T: 10 ul da solução de concentração de 5 mg/ml.
- d - Metabissulfito de sódio: 20 ul da solução de concentração de 10 mg/ml.

1 - MBq = mega Becquerel = 10^6 desintegrações por segundo.

2 - uCi = micro Currie = $3,7 \times 10^4$ desintegrações por segundo.

f - Azul -dextran: 1 ml da solução de concentração de 2 mg/ml.

e - Iodeto de potássio: 200 ul da solução de concentração de 1 mg/ml.

O hTSH foi dissolvido em solução fosfo-salina, enquanto que os reagentes dos itens c e d foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 e aqueles dos últimos itens foram dissolvidos nesse mesmo tampão, contendo 0,1% de AB e 0,02% de azida sódica.

Essas soluções foram adicionadas sob agitação moderada e contínua com o auxílio de um microímã e sobre agitador magnético. O tempo transcorrido entre a adição do agente oxidante (cloramina T) e o agente redutor (metabissulfito de sódio) foi de 30 segundos.

Finda a reação, foram retiradas três alíquotas de 10 ul cada, a fim de se estimar a atividade total da marcação, procedendo-se a seguir a purificação do restante da mistura de reação.

Essas alíquotas foram diluídas 100 vezes no tampão de eluição da purificação. De cada uma delas foram retiradas em duplicata outras alíquotas de 10 ul que tiveram suas atividades determinadas, juntamente com as respectivas ponteiras.

O tubo de marcação e as ponteiras, usados para retirada das alíquotas e para aplicação da amostra à coluna de purificação, também tiveram suas atividades determinadas a fim de se estimar a recuperação da purificação.

A porcentagem dessa recuperação (RP) foi obtida pela fórmula seguinte:

$$\%RP = \frac{T}{A} \times 100$$

onde:

T = Somatória das contagens de todas as frações coletadas na purificação, multiplicadas pelos respectivos fatores de diluição. Esses fatores são obtidos pela relação entre o volume total de cada fração (em torno de 2 ml) e o volume da alíquota estimada (0,01 ml), (item 3.3.1.1.1.2.).

A = Atividade aplicada à coluna, expressa em cpm, calculada pela seguinte fórmula:

$$A = A' \times V_A/V_T - D$$

onde:

V_A = Volume da mistura de reação aplicado à coluna.

V_T = Volume total da mistura de marcação.

D = Somatória das contagens do tubo de marcação e das ponteiros, utilizadas para retirada das três alíquotas e para aplicação da amostra à coluna.

A' = Atividade total da marcação, expressa em cpm; calculada pela seguinte fórmula:

$$A' = C \times 100 \times V_T/V_R + P \times 100$$

na qual:

C = Contagem média das três alíquotas de 10 ul (diluídas 100 vezes), estimadas em duplicata.

V_T = Volume total da mistura de reação.

V_R = Volume das alíquotas retiradas da mistura de reação (10 ul).

P = Somatória das contagens das ponteiros, utilizadas para retirada das alíquotas diluídas, que apresentaram um valor maior do que 10% do valor de \bar{C} .

3.3.1.1.1.2. PURIFICAÇÃO DO hTSH RADIOIODADO (^{125}I -hTSH)

A purificação do ^{125}I -hTSH foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100 (71).

O gel previamente intumescido com água destilada durante aproximadamente 6 horas a 90°C , foi lavado várias vezes com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 e em seguida empacotado em coluna de vidro de dimensões de 45 cm de altura e 2 cm de diâmetro, mantida sob refrigeração a 4°C .

A coluna foi lavada com o mesmo tampão fosfato de sódio contendo 0,1% de AB e 0,02% de azida sódica (tampão de eluição), em quantidade correspondente a cerca de duas vezes o seu volume.

A mistura da reação foi aplicada à coluna, lavando-se duas vezes o tubo de marcação com o tampão de eluição (0,4 ml por vez).

Coletaram-se 120 frações de 2 ml cada, sob fluxo de 12 ml/h em sistema refrigerado a 4°C , a fim de se prevenir a desnaturação da molécula protéica pela temperatura.

Retirou-se de cada fração uma alíquota de 10 ul. Essas alíquotas, colocadas individualmente em cones de papel alumínio, tiveram sua radioatividade determinada em contador gama. A eficiência dos contadores, determinada pela técnica descrita por Horrocks (39), foi de aproximadamente 80% com excessão do contador da Abbot que apresentava eficiência de 65% estabelecida pelo seu fabricante (1).

A partir das contagens obtidas traçou-se o cromatograma da purificação em escala linear, relacionando-se a radioatividade, expressa em cpm, com o número da fração.

Procedeu-se, a seguir, a identificação dos picos revelados no cromatograma, excetuando-se aquele do ^{125}I livre, que por ter menor massa é a última substância a ser eluída da coluna de purificação.

Esses picos tiveram os valores de seus coeficientes de distribuição (Kd) determinados através da fórmula seguinte (71):

$$Kd = \frac{Vr - Vo}{Vt - Vo}$$

onde:

Vr = Volume de retenção, correspondente ao volume de eluente que carrega as moléculas da substância examinada através da coluna,

Vo = Volume intersticial, medido pelo volume de eluição do azul dextran,

Vt = Volume total da fase móvel, medido pelo volume de eluição do ^{125}I .

As frações correspondentes ao pico do hTSH radioiodado, reconhecido pelo seu Kd, foram reunidas, separadas em alíquotas de 0,5 ml. Elas foram estocadas a -20°C para serem empregadas como traçador, por um período de até 90 dias.

Todos os traçadores foram diluídos em tampão fosfo-salina, imediatamente antes de seu emprego, a fim de se obter 10.000 cpm em cada 100 ul.

3.3.1.1.1.3. CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DO TRAÇADOR

A atividade específica (AE) do ^{125}I -hTSH, expressa em Bq/ug, foi estimada a partir do rendimento da marcação (27), empregando-se a fórmula seguinte:

$$AE = \frac{A^* \times R}{M \times 100}$$

onde:

M = Massa do hormônio radioiodado (5 ug).

A* = Atividade do ^{125}I efetivamente utilizada, calculada a partir da atividade total da marcação (conforme descrita anteriormente no item 3.3.1.1.1.1.), expressa em cpm e transformada em uCi, considerando:

- A eficiência do contador gama, dada pela relação cpm/dpm (desintegração por minuto).
- A equivalência entre 37 KBq (1 uCi) e 2.220.000 dpm.

R = Rendimento percentual da marcação, calculado pela fórmula seguinte:

$$\%R = \frac{H^*}{T} \times 100$$

na qual:

H* = Somatória das contagens das frações correspondentes ao pico do ^{125}I -hTSH.

T = Somatória das contagens de todas as frações coletadas.

3.3.1.1.2. DETERMINAÇÃO DA ÓTIMA DILUIÇÃO DO PRIMEIRO ANTICORPO

Empregou-se o antissoro anti-hTSH - 3 fornecido pelo NIDDKD que apresentava as percentagens de reação cruzada especificadas abaixo, com os seguintes hormônios hipofisários (42):

hTSH.....	100,0000
h beta LPH.....	1,5935
hFSH.....	1,0271
hPRL.....	0,6337
hLH.....	0,5918
hGH.....	0,0332
Vasopressina.....	0,0039
hACTH.....	0,0021

Cada frasco recebido, contendo 1 ml de antissoro com título de 1:200 (diluído em solução fosfo-salina contendo 2% de SNC), era rediluído 10 vezes nessa mesma solução e separado em alíquotas de 500 ul, mantidas a -20°C.

O título ideal do antissoro anti-hTSH empregado nos ensaios foi aquele que permitiu uma ligação específica de 50% do traçador na ausência de hTSH "frio" (10).

Esse título foi determinado para cada traçador incubando-se durante 24 horas a 4°C, 0,1 ml do tampão de ensaio (item 2.4.6.) com 0,1 ml do ^{125}I -hTSH (com atividade fixa em torno de 10.000 cpm) e 0,1 ml do antissoro nas seguintes diluições: 1:20.000, 1:200.000, 1:400.000, 1:800.000, 1:1.600.000 e 1:3.200.000.

Tanto as diluições do traçador quanto aquelas do primeiro

anticorpo foram realizadas no mesmo tampão de ensaio. Foram também incubadas amostras que estimaram a ligação inespecífica, substituindo-se o volume do antissoro pelo mesmo volume de tampão de ensaio.

Os ensaios foram realizados em quadruplicata em tubos de polipropileno. Os traçadores livres foram separados daqueles ligados ao anticorpo empregando-se o método de separação por imunoprecipitação com o segundo anticorpo comercial importado, produzido por RSL.

A separação foi feita adicionando-se 0,1 ml de segundo anticorpo na diluição recomendada pelo fabricante de 1:5 e incubando-se por mais 90 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as frações livre e ligada ao anticorpo foram separadas e a porcentagem de ligação das amostras estimada como descrito no item 3.3.1.1.

A partir dos resultados obtidos, traçou-se a curva de título do antissoro em papel semi-log, relacionando-se os valores da porcentagem de ligação com aqueles da diluição do antissoro. Determinou-se, pela leitura direta na curva, a diluição do antissoro que forneceu 50% de ligação com o traçador.

3.3.1.2. IMUNODIFUSÃO PELO MÉTODO DE OUCHTERLONY

A imunodifusão (62) foi empregada para determinar o título dos antissoros em comparação com a técnica de RIE. Essa análise comparativa foi realizada com o antissoro obtido do ovino 285 nas oito sangrias a que foi submetido.

Para a realização da imunodifusão, oito lâminas de microscopia com dimensões de 25 cm x 75 cm, foram inicialmente revestidas com 1 ml de agar a 1% em água e secas em estufa a 180°C. Após a secagem, 3 ml de agar a 2% em solução fisiológica foram distribuídos sobre as lâminas, sendo então mantidas por alguns segundos no conge-

lador. Em seguida, com o auxílio de um molde, foram cavadas duas rosetas no gel, sobre uma mesma lâmina. Cada uma delas era formada por seis orifícios, de 2 mm de diâmetro, dispostos isometricamente a uma distância de 1 cm de um orifício central, de igual dimensão.

O antígeno (IgG de coelho purificada) foi colocado no orifício central de ambas rosetas, na concentração de 0,5 mg/ml, enquanto que o antissoro foi distribuído nos orifícios periféricos nas diluições seriadas de 1:1 a 1:32 na roseta da esquerda e diluído a 1:64 a 1:256 naquela da direita.

As lâminas permaneceram a 4°C por 48 horas em câmara úmida, após o que foram lavadas 10 vezes com solução fisiológica e por mais 10 vezes com água destilada. Em seguida, elas foram secas, coradas e descoradas conforme descrito anteriormente no item 3.1.5.1.

Após a descoloração, as bandas contendo os complexos imunes puderam ser evidenciadas. Foram estimados os títulos correspondentes a maior diluição, que apresentou uma linha de precipitação uniforme.

Em cada uma das lâminas avaliou-se o título do antissoro obtido numa das oito sangrias do ovino 285.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA DO RIE

Os valores das ligações inespecíficas fornecidas pelos anticorpos produzidos neste trabalho, foram comparados com aquelas do anticorpo comercial.

Para tanto, as amostras foram incubadas em quadruplicatas em sete ensaios diferentes, realizados com traçadores distintos. O valor médio para cada antissoro foi calculado, bem como o seu desvio padrão, permitindo a determinação dos coeficientes de variação.

Os valores médios encontrados foram comparados um a um com

o valor médio obtido do anticorpo comercial, empregando o teste t de Student para observações não pareadas (23).

3.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE IGG CARREADORA

Os antissoros provenientes das duas colheitas de uma mesma sangria de grande volume, que apresentaram títulos semelhantes, foram reunidos antes de se determinar a concentração ideal de IgG carreadora.

A fim de se estabelecer as condições ótimas de precipitação dos antissoros provenientes das sangrias de grandes volumes, eles foram empregados na separação do RIE de hTSH na presença de concentrações diferentes da IgG carreadora no tampão de ensaio. Esse estudo foi realizado em comparação com o antissoros da RSL.

Para tanto, o RIE foi realizado conforme descrito anteriormente no item 3.3.1.1., empregando-se, porém, todos os reagentes diluídos em solução fosfo-salina contendo EDTA 0,1 M, na presença de SCN nas diluições seguintes: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500.

Como sempre, foram incubadas amostras referentes a ligação inespecífica para cada uma das diluições do segundo anticorpo.

A separação da fração ligada foi realizada conforme descrito no item 3.3.1.1., sendo as diluições dos antissoros também efetuadas com o tampão de ensaio contendo SCN, nas concentrações diferentes.

Os cálculos foram efetuados como descrito no item 3.3.1.1. e as curvas de título foram traçadas relacionando-se os valores de percentagem de ligação com as diluições do segundo anticorpo, combinadas com cada uma das diluições do SCN.

Foram estabelecidos os títulos do segundo anticorpo e as

diluições do soro carreador que forneceram uma precipitação máxima da fração ligada do ensaio, numa região de platô.

Os antissoros provenientes de sangrias distintas de um mesmo animal, que apresentaram características de precipitação similares, foram reunidos antes de se realizar o estudo da cinética de precipitação.

3.3.4. ESTUDO DA CINÉTICA DE PRECIPITAÇÃO

Nesse estudo, os antissoros foram empregados na diluição e na presença de concentração de SCN estabelecidas previamente (Tabela 13).

Para tanto, procedeu-se ao RIE de hTSH como descrito anteriormente no item 3.3.1.1., sendo as amostras incubadas em triplicata. Após um período de incubação do primeiro anticorpo com o traçador de 24 horas a 4°C adicionou-se 0,1 ml do segundo anticorpo. Os antissoros precipitantes foram então incubados por períodos diferentes que variou de 15 minutos até 6 horas em diferentes temperaturas: quatro, 20 e 37°C. Foram também incubadas amostras relativas as ligações inespecíficas, para cada período e temperatura de incubação do segundo anticorpo.

O antissoro da RSL foi empregado comparativamente na diluição de 1:5 e na presença de 1% de SCN, seguindo-se as especificações de seu fabricante (64). Os cálculos foram efetuados como mencionado no item 3.3.1.1.

Para a construção da curva da cinética da reação ajustaram-se, para cada temperatura, os valores da percentagem de ligação (B/T) versus o tempo de reação, utilizando-se um programa computacional para análise compartimental e cinética (53), empregando-se o seguinte modelo analítico:

$$Y(t) = Y_0(e^{-k_{1,0}t} - e^{-k_{2,0}t}) \quad [1]$$

onde:

$$Y = B/T$$

$k_{1,0}$ - Parâmetro que está relacionado com a constante de dissociação do complexo.

$k_{2,0}$ - Parâmetro que está relacionado com a constante de associação da reação.

Y_0 - Parâmetro de intersecção com o eixo das ordenadas da função [1] para $t = 0$.

t - Tempo decorrido em minutos.

$Y(t)$ - Valor da função no tempo t .

A partir dos resultados calculados de $Y(t)$ foram traçadas as funções teóricas da cinética de precipitação, empregando-se o programa Harvard Graphics (35).

A função [1] atinge o valor de ligação máxima ($Y_{0,max}$) no tempo " t_{max} ". Esse valor é determinado quando a derivada da função [1] for igual a zero, isto é:

$$\frac{dY(t)}{dt} = Y_0(k_{1,0} e^{-k_{1,0}t_{max}} - k_{2,0} e^{-k_{2,0}t_{max}}) = 0, \quad [2]$$

onde t_{max} é estimado empregando-se a equação seguinte obtida da expressão [2]:

$$t_{max} = \frac{\log_e(k_{1,0}/k_{2,0})}{(k_{1,0} - k_{2,0})} \quad [3]$$

Substituindo-se t_{\max} na função [1], obtem-se o valor de $Y_{0\max}$ teórico.

O grau de incerteza do $Y_{0\max}$ teórico foi determinado pela expressão seguinte:

$$sY_{\max} = Y_{\max} \frac{sY_0}{Y_0} + \frac{t_{\max}^2 [e^{-2k_{1,0} t_{\max}} sk_{1,0}^2 + e^{-2k_{2,0} t_{\max}} sk_{2,0}^2]}{(e^{-k_{1,0} t_{\max}} - e^{-k_{2,0} t_{\max}})^2} \quad [4]$$

Os valores de $Y_{0\max}$ foram considerados similares quando não mostraram diferenças significativas ao nível de $p < 0,05$, utilizando-se o teste t de Student (23):

$$t = \frac{Y_{0\max}(\theta_1) - Y_{0\max}(\theta_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n_1 + n_2}}}$$

onde:

$Y_{0\max}(\theta_1)$ e $Y_{0\max}(\theta_2)$ - valores de B/T teóricos para $t = t_{\max}$ referente a temperatura θ de incubação;

s_1 e s_2 - respectivos desvios padrão fornecidos pela expressão [4];

n_1 e n_2 - número de amostras, no presente trabalho $n_1 = n_2 = 3$.

A fim de se verificar a similaridade entre as curvas de um mesmo antissor obtidas para as diferentes temperaturas, as médias dos pontos experimentais (tempo versus porcentagem de ligação) foram submetidas à análises de variância e ao teste Tukey (75). Foram consideradas curvas similares aquelas que não mostraram diferenças significativas ao nível de $p < 0,05$, em nenhum dos oito pontos experimentais.

Os valores médios das ligações inespecíficas fornecidos por cada um dos antissoros produzidos e aquele comercial incubados nas diferentes temperaturas (quatro, 20 e 37°C), foram comparados entre si, empregando-se o teste t de Student para observações não pareadas (23).

3.3.5. REAÇÃO CRUZADA COM A IGG HUMANA

A inexistência de reação cruzada dos antissoros precipitantes com a IgG humana foi confirmada pelo método de imunodifusão em gel de agar pelo método de Oucheterlony (62), como descrito anteriormente no item 3.3.1.2. Entretanto, para este teste, foi moldada apenas uma roseta contendo quatro orifícios periféricos e um central.

Os antissoros foram submetidos a diluição seriada de 1:1 a 1:8 em fosfo-salina contendo EDTA 0,1 M e SCN, na diluição previamente estabelecida para cada antissoros (item 3.3.3.), e colocados nos orifícios periféricos.

Empregou-se como antígeno a gama globulina humana comercial, na mesma concentração do soro humano normal (20 mg/ml), diluída em solução fisiológica a 0,9%, com a qual foi preenchido o orifício central.

3.3.6. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE ARMAZENAMENTO DOS ANTISSOROS PRODUZIDOS

A fim de se determinar a melhor forma de armazenamento dos antissoros produzidos realizou-se inicialmente uma análise com o antissoros submetido a três tratamentos: congelamento lento, por permanência durante 24 h em congelador a -20°C , congelamento rápido, por imersão em nitrogênio líquido (N_2) a -190°C e congelamento em N_2 seguido de liofilização.

Para essa análise empregou-se uma mistura dos antissoros provenientes da 5ª sangria dos quatro ovinos, a qual foi distribuída em frascos de vidro com capacidade para 30 ml, em volume de 20 ml por frasco.

Após a reconstituição com água destilada do antissoro liofilizado, essas três amostras do antissoro foram empregadas na diluição de 1:2 na separação do RIE, conforme descrito no item 3.3.1.1. A fim de se verificar se a forma de estocagem do segundo anticorpo poderia interferir na separação das frações livre e ligada do ensaio, realizaram-se 19 estimativas da percentagem de ligação (B/T) para cada amostra. Foram também incubadas as amostras que estimaram a ligação inespecífica, substituindo-se o volume do primeiro anticorpo pelo mesmo volume do tampão de ensaio.

Após a separação, os valores médios de B/T foram comparados empregando-se o teste t de Student para observações pareadas (23).

Avaliou-se a seguir o procedimento de liofilização do antissoro, o qual foi realizado em condições distintas: variando-se o volume da amostra a ser liofilizada e a capacidade do frasco de vidro empregado na liofilização, bem como a forma de congelamento da amostra (lenta ou rápida) antecedente à sua liofilização.

Nessa análise empregaram-se misturas dos antissoros provenientes das sangrias teste dos animais, que foram reunidos aleatoriamente.

Esses antissoros foram distribuídos em frascos com capacidade para 25 e 30 ml, em volumes de 10, 15, e 20 ml, sendo liofilizados após congelamento lento a -20°C ou rápido a -190°C , conforme especificado na Tabela 6. Cada análise foi efetuada com uma mistura de soro diferente, porém a mesma mistura era sempre avaliada antes e após a liofilização.

Após a liofilização, os antissoros foram reconstituídos com água destilada para o seu volume inicial e comparados com antissoro de igual procedência, que foi submetido a mesma forma de congelamento, porém não liofilizado.

Tabela 6 - Condições de liofilização empregadas no estudo do armazenamento dos antissoros produzidos.

AMOSTRA	CAPACIDADE TOTAL DO FRASCO (ML)	VOLUME DA AMOSTRA (ML)	TEMPERATURA DE CONGELAMENTO (°C)
A	25	10	- 20
B	30	10	-190
C	25	15	-190
D	30	15	- 20
E	25	20	- 20
F	30	20	-190

Essa avaliação foi realizada em curva de titulação do antissoro, para a separação do RIE conforme descrito no item 3.3.1.1.

Verificou-se a existência de similaridade entre as curvas fornecidas pelos mesmos antissoros não liofilizados e liofilizados, realizando-se um ajuste prévio dos pares de pontos ($\%$ de ligação versus recíproco do título) ao modelo analítico seguinte:

$$\% \text{ de ligação} = Y_{\max} \left(1 - e^{-\alpha \frac{1}{d}} \right) \quad [5]$$

onde:

$$Y = B/T$$

Y_{\max} é a porcentagem de ligação máxima teórica,

α é um parâmetro exponencial, proporcional à afinidade do antissoro,

d é a diluição do antissoro.

Os parâmetros α e Y_{\max} foram estimados pelo método não linear dos mínimos quadrados (9, 24).

As funções experimentais resultantes foram consideradas similares quando ambos os parâmetros α e Y_{\max} não apresentaram diferenças significativas ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste t de Student (23), dado pela fórmula seguinte:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

com GL = $n_1 + n_2 - 4$, onde:

os índices 1 e 2 referem-se, respectivamente, aos dados dos parâmetros α e Y_{\max} ,

n é o número de pontos experimentais de cada curva de título,

X representa o valor estimado por regressão dos parâmetros, α ou Y_{\max} contidos na expressão [5],

s^2 representa a variância assintótica (24) dos referidos parâmetros,

GL figura como sigla dos graus de liberdade.

4 - RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DA IgG DE COELHOS

A concentração média de proteínas totais determinada nas amostras de soro dos coelhos foi de $6,94 \pm 0,63$ g%, variando de 6,2 a 8,2 g%, cujos valores individuais estão representados na Tabela 7.

A Tabela 8 apresenta os valores de proteínas totais e respectivos rendimentos percentuais obtidos na purificação da IgG de coelho.

A Figura 6 exhibe os perfis cromatográficos das purificações de IgG em DEAE celulose, realizadas a partir de 0,5 g (purificação prévia) e das 3,0 g restantes de proteína. As frações que foram reunidas, correspondem aos picos protéicos obtidos nessas duas cromatografias.

Ao final de todo o procedimento de isolamento e purificação da IgG de coelho, obteve-se 0,85 g de IgG pura, que correspondeu a um rendimento final de 1,54% (Tabela 8).

A Figura 7 apresenta o resultado da imunoeletroforese da IgG, obtida nas duas purificações, frente ao soro de carneiro anti-soro total de coelho.

Na Figura 8 está exibido o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% da IgG obtida nas duas purificações.

As 850 mg de IgG em solução, resultantes dessas duas purificações, foram distribuídas em ampolas estéreis contendo 10,7 e 21,4 mg cada. Elas foram mantidas inicialmente por seis meses a -20°C e em seguida foram transferidas para um congelador de ultra baixa temperatura (-80°C).

Tabela 7 - Concentração de proteínas totais das amostras séricas dos coelhos obtidas nas diferentes sangrias.

Amostra (nº)	Procedência dos animais	Volume (ml)	Proteínas totais (g%)
1	IMT	30	6,6
2	IPEN-CNEN/SP	22	7,8
3	IPEN-CNEN/SP	20	8,2
4	IMT	20	7,5
5	IB	170	6,7
6	IB, IMT	280	7,1
7	IB	160	6,7
8	IMT, IPEN-CNEN/SP	40	6,2
9	IPEN-CNEN/SP	20	6,6
10	IMT	20	6,3
11	IPEN-CNEN/SP	10	6,4
12	IPEN-CNEN/SP	10	7,2
Total = 802			Média = 6,94 Desvio = ± 0,63 Padrão

As amostras de números 6 e 8 referem-se a mistura de soros de animais provenientes de diferentes instituições.

Tabela 8 - Purificação de IgG de coelho. Valores de proteínas totais avaliadas pelo método do Biureto e respectivos rendimentos percentuais.

Etapas de Purificação	Proteínas Totais (g)	Rendimento (%)
Soro total	55,20	100
Precipitação com sulfato de sódio	3,50	6,34
Cromatografia em DEAE-celulose	0,20 1,30	2,71
Reprecipitação com sulfato de sódio	0,11 0,86	1,75
Concentração final	0,85	1,54

Os valores das proteínas totais determinados após as etapas de cromatografia em DEAE-celulose e reprecipitação com sulfato de sódio, referem-se a purificação prévia (indicados acima) e a purificação do restante do material (indicados abaixo). Os rendimentos estimados nessas etapas referem-se à somatória dos valores das proteínas totais, obtidos nas duas purificações.

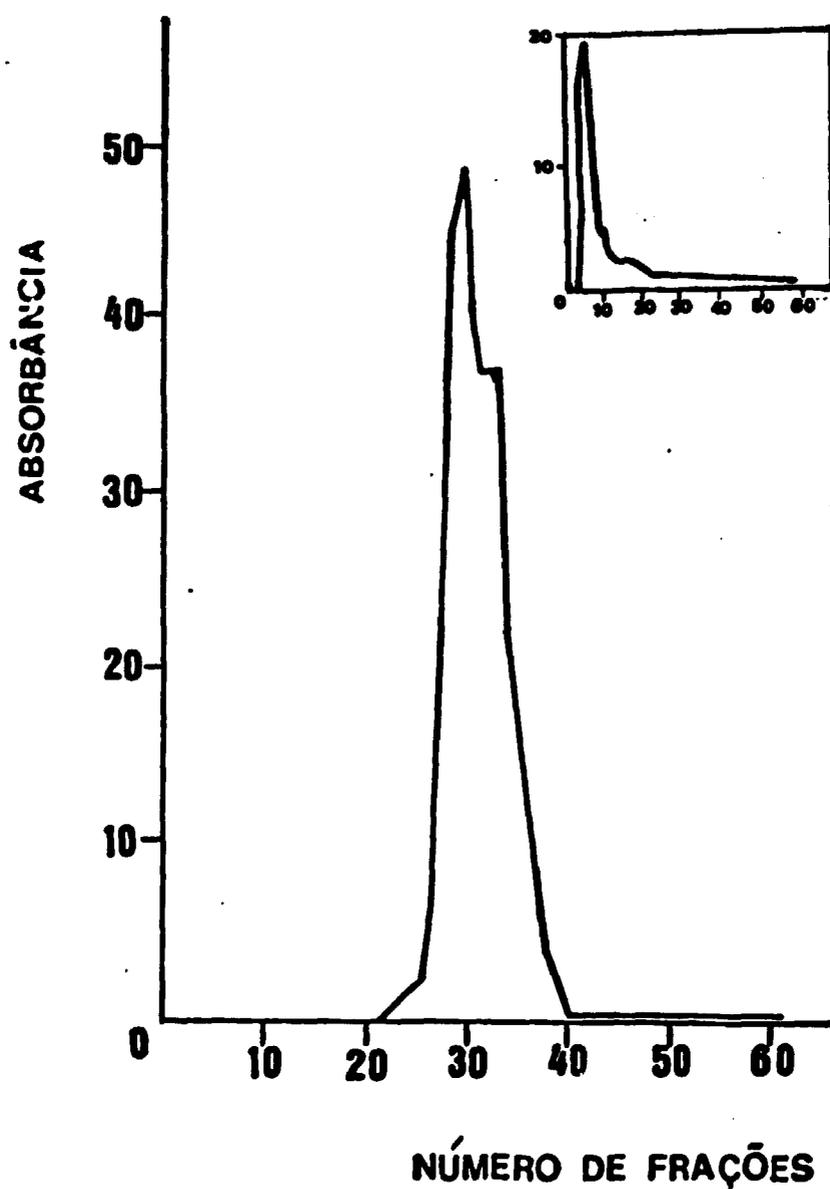


Figura 6 - Perfis cromatográficos das purificações em DEAE-celulose das proteínas séricas precipitadas com sulfato de sódio. O painel interno refere-se ao perfil obtido na purificação preliminar e o externo representa o perfil obtido na purificação do restante do material.

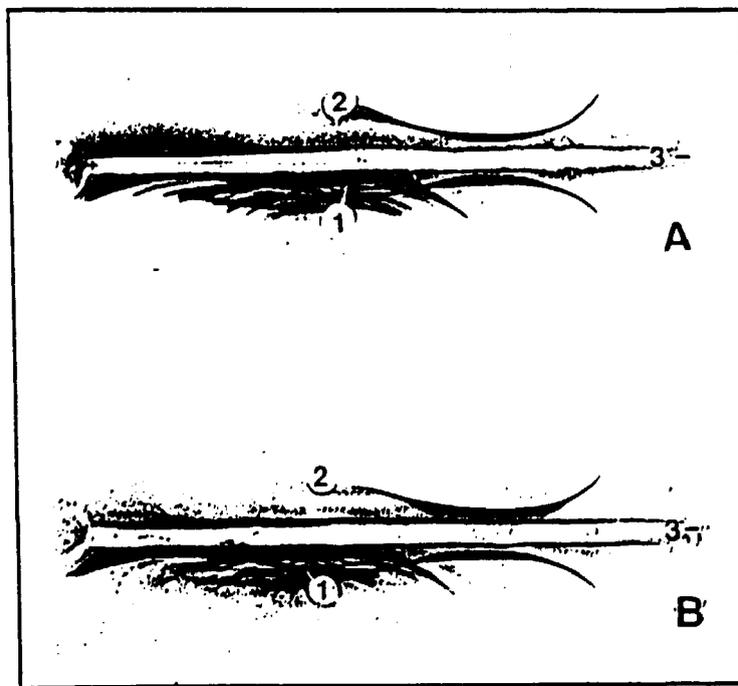


Figura 7 - Padrão imunoelectroforético das purificações de IgG obtidas nas cromatografias em DEAE-celulose. Preparações obtidas nas purificações preliminar (A) e do restante do material (B): (1) soro total de coelho; (2) pico eluído em DEAE-celulose; (3) soro de carneiro anti-soro total de coelho.

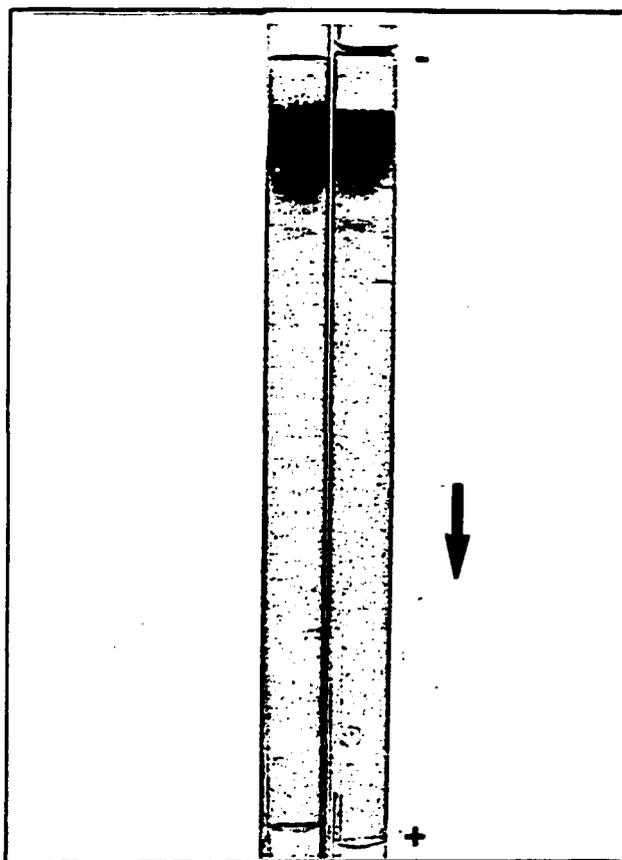


Figura 8 -- Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida das purificações de IgG em DEAE-celulose. O gel da esquerda se refere a purificação preliminar e o da direita a purificação do restante do material. A seta indica o sentido de migração eletroforética.

4.2. OBTENÇÃO DO SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO

A Figura 9 apresenta uma fotografia da região paraesternal do ovino 249, onde pode-se observar a formação de grânulos (reação de Arthus) nos locais de injeção do imunógeno, visualizada nos quatro animais poucos dias após a imunização primária.

A Figura 10 apresenta a evolução dos títulos dos antissoros dos ovinos durante o período em que foram imunizados com a IgG de coelho. Esses valores foram determinados a partir das curvas de título construídas para a separação do RIE de hTSH, exibidas adiante no item 4.3.1.3.

4.3. RADIOIMUNOENSAIO DO hTSH

4.3.1. PREPARO DO TRAÇADOR

4.3.1.1. RADIOIODAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO hTSH

Os valores da atividade do Na^{125}I efetivamente empregada em oito radioiodações, seus respectivos rendimentos e recuperações, bem como da atividade específica de cada traçador estão indicados na Tabela 9.

A Figura 11 exhibe um perfil cromatográfico típico da purificação do ^{125}I -hTSH em gel de Sephadex G-100, referente a radioiodação de número 7.

A Tabela 10 apresenta os valores de Kd referentes ao pico do hTSH marcado. Os valores desse pico variaram de 0,274 a 0,328 (média \pm DP = 0,303 \pm 0,019).



Figura 9 - Fotografia da região paraesternal do ovino 249 dez dias após a 3ª injeção de reforço.

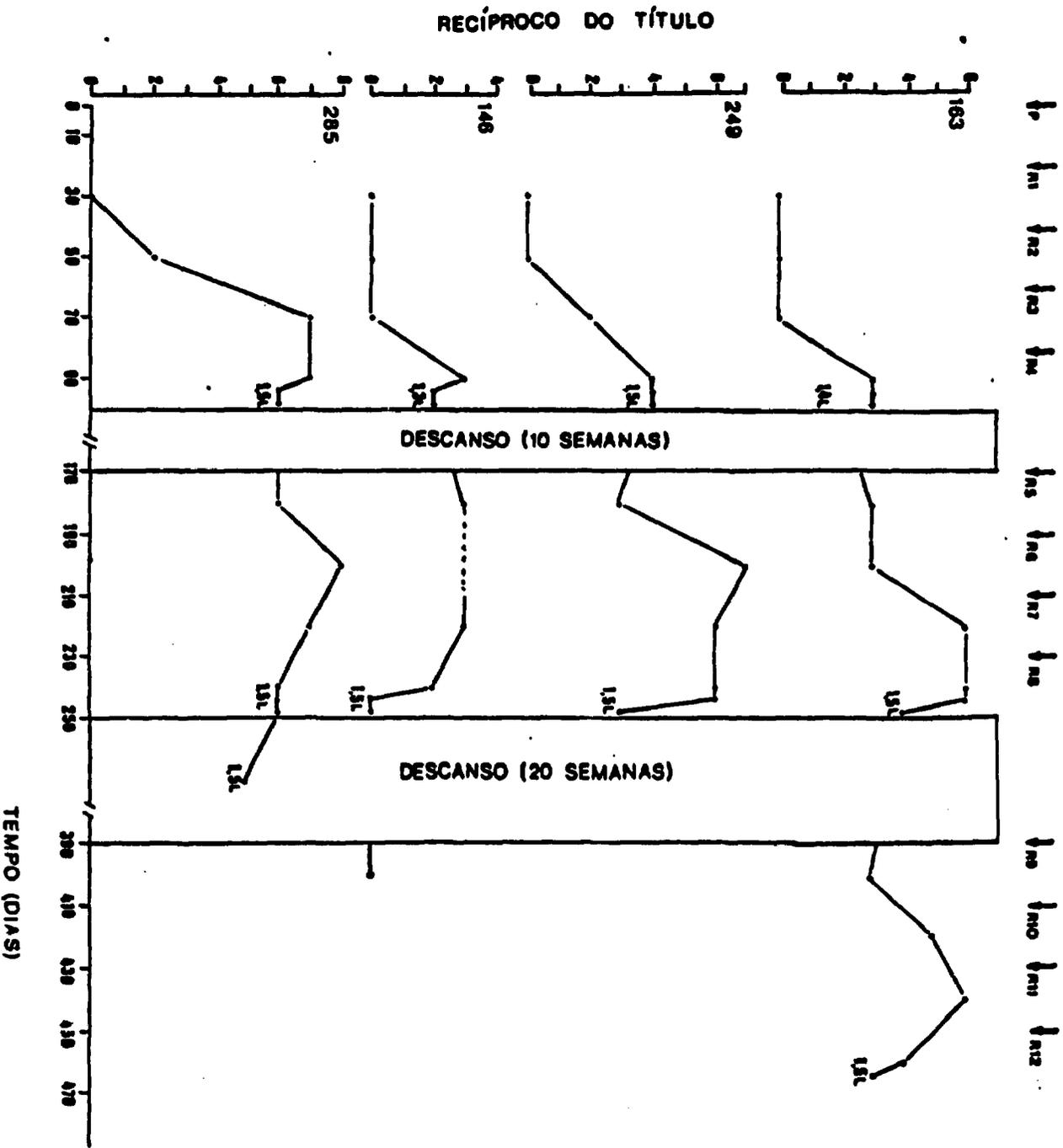


Figura 10 - Evolução dos títulos dos antissoros dos ovinos em função do tempo em que foram submetidos a imunização, intervalo de tempo em que foram submetidos a imunização, intercalada por períodos de descanso. As setas indicam o período das injeções primária (P) e de reforço (R₁ a R₁₂). São indicados na figura os volumes de sangue colhidos dos animais. A linha tracejada indica o período em que o ovino 146 esteve enfermo.

Tabela 9 - Resultados obtidos nas diversas radioiodações realizadas com o hTSH-NIDDKD.

Radioiodação (nº)	¹²⁵ I empregado na iodação (MBq ¹)	Rendimento (%)	Recuperação (%)	Atividade específica (MBq ¹ /ug)
1	37,93	37,64	99,31	2,84
2	26,48	21,06	96,00	1,11
3	49,80	18,43	103,00	1,83
4	19,52	25,79	93,21	1,01
5	30,80	31,17	98,71	1,92
6	25,46	28,11	112,89	1,43
7	25,75	52,11	119,36	2,68
8	29,98	22,94	105,93	1,37
Média =	30,71	29,65	103,55	1,77
DP = ±	8,75	± 10,90	± 8,85	± 0,64
CV =	28,48 %	36,77 %	8,55%	36,14 %

¹ MBq = 30,07 uCi

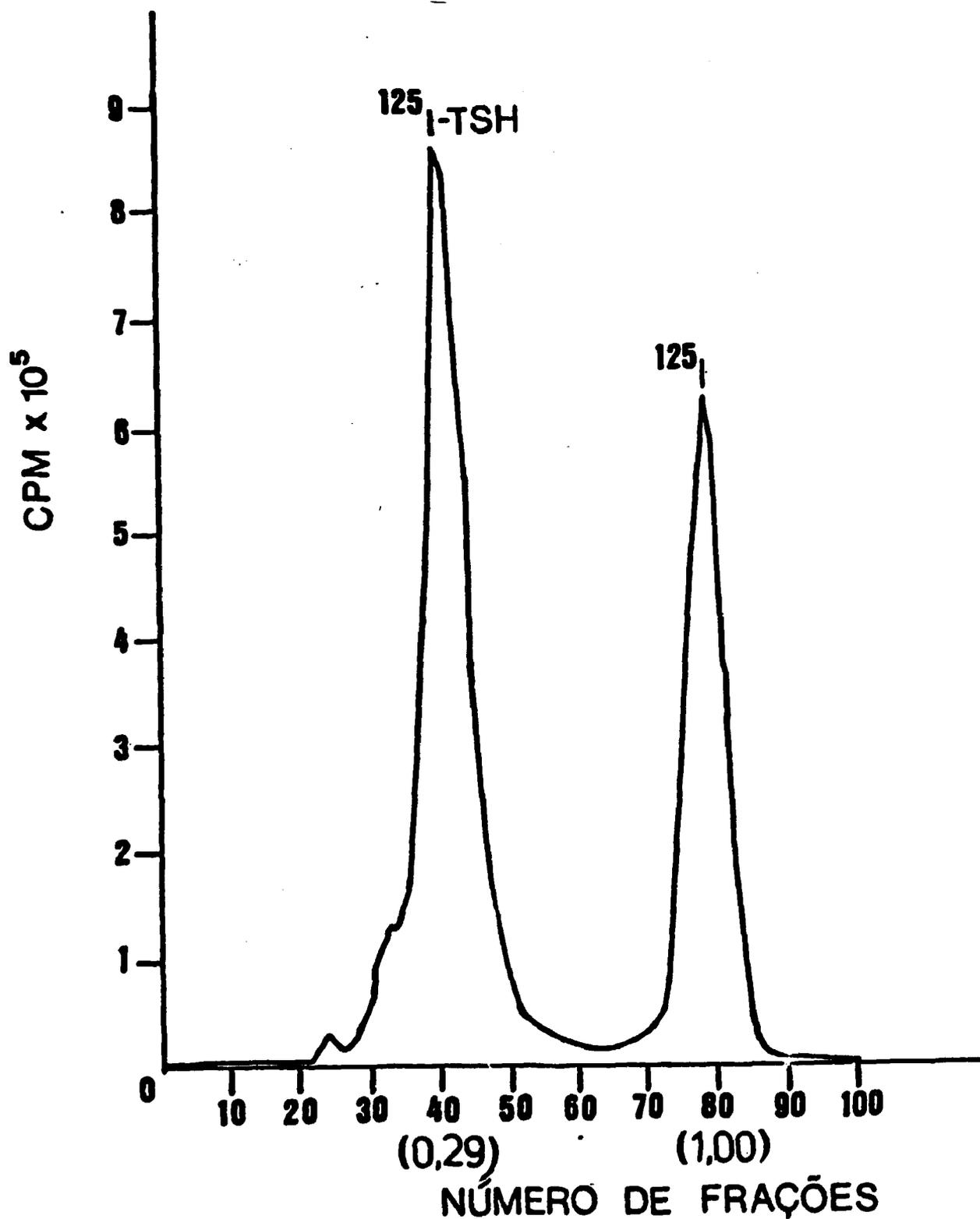


Figura 11 - Cromatograma da purificação do $^{125}\text{I-hTSH}$ em Sephadex G-100, referente à 7ª radioiodação. Os valores de K_d de cada pico são indicados entre parênteses.

Tabela 10 - Valores de Kd referentes ao pico de hTSH marcado com ^{125}I revelados nos cromatogramas das diferentes radioiodações.

RADIOIODAÇÃO (Nº)	Kd 125I - hTSH
1	0,297
2	0,327
3	0,274
4	0,291
5	0,296
6	0,316
7	0,296
8	0,328
Média =	0,303
DP =	±0,019
CV =	6,22%

4.3.1.2. DETERMINAÇÃO DA ÓTIMA DILUIÇÃO DO PRIMEIRO ANTICORPO

Na Figura 12 pode-se observar a curva de ótima diluição do antissoro anti-hTSH - 3 realizada com o traçador nº 7. Nessas condições, a diluição que forneceu ligação específica de 50% com o ^{125}I -hTSH foi a de 1:330.000. Os títulos obtidos com os diferentes traçadores preparados neste trabalho estão apresentados na Tabela 11.

4.3.1.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO SEGUNDO ANTISSORO

As respectivas curvas de título dos antissoros anti-IgG de coelho estão representadas nas Figuras 13 a 16 em comparação com aquela do antissoro importado da RSL.

Os títulos dos antissoros produzidos pelos ovinos 146 e 163 somente puderam ser estimados após a 4ª injeção de reforço (Figura 10). Nessa ocasião, o animal 285 já apresentava antissoro com título de 1:7, enquanto que o título do antissoro do animal 249 era 1:4 e dos demais era 1:3 (146 e 163).

Esses títulos aumentaram após as imunizações que sucederam os períodos de repouso dos animais, atingindo valores de 1:6 para o animal 163 após o 7º e o 11º reforços e de 1:7 e 1:8 para os animais 249 e 285, respectivamente, após o 6º reforço. Entretanto, o animal 146 manteve seu título de 1:3 e após o 8º reforço seu título caiu para 1:2, provavelmente devido a intervenção cirúrgica a que foi submetido.

Quando comparados com o antissoro de referência RSL, observa-se que o antissoro do animal 146 apresentou curva de título semelhante logo após a 4ª injeção de reforço (Figura 13), enquanto que os antissoros dos animais 249 e 163 exibiram essa similaridade so-

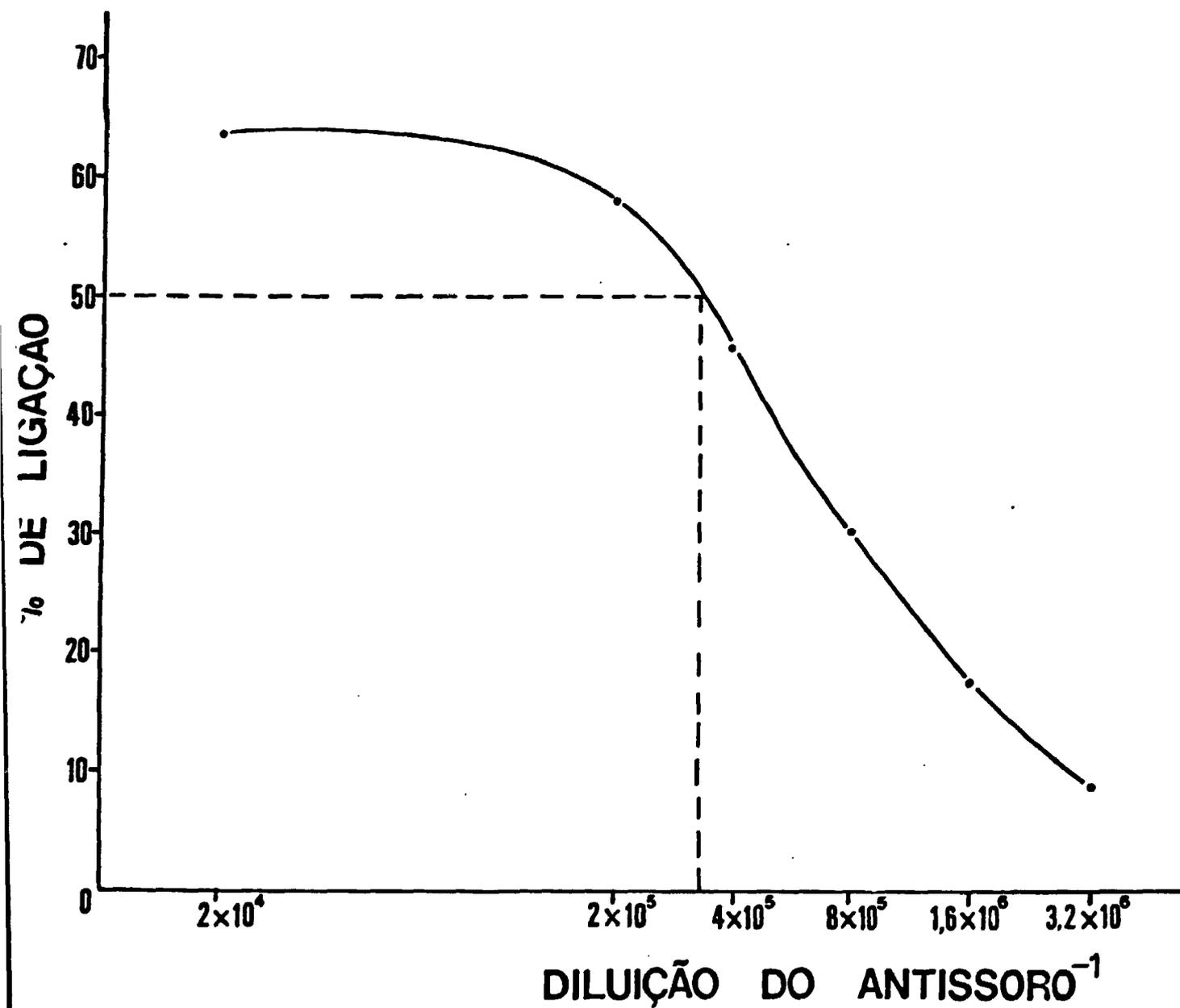


Figura 12 - Curva da determinação da diluição ótima do antissoro anti-hTSH - 3 realizada com traçador proveniente da radioiodação de nº 7.

Tabela 11 - Título do antissoro anti-hTSH - 3 determinado para os diferentes traçadores.

Traçador (nº)	Título do antissoro
1	1:380.000
2	1:250.000
3	1:240.000
4	1:330.000
5	1:290.000
6	1:330.000
7	1:330.000
8	1:370.000

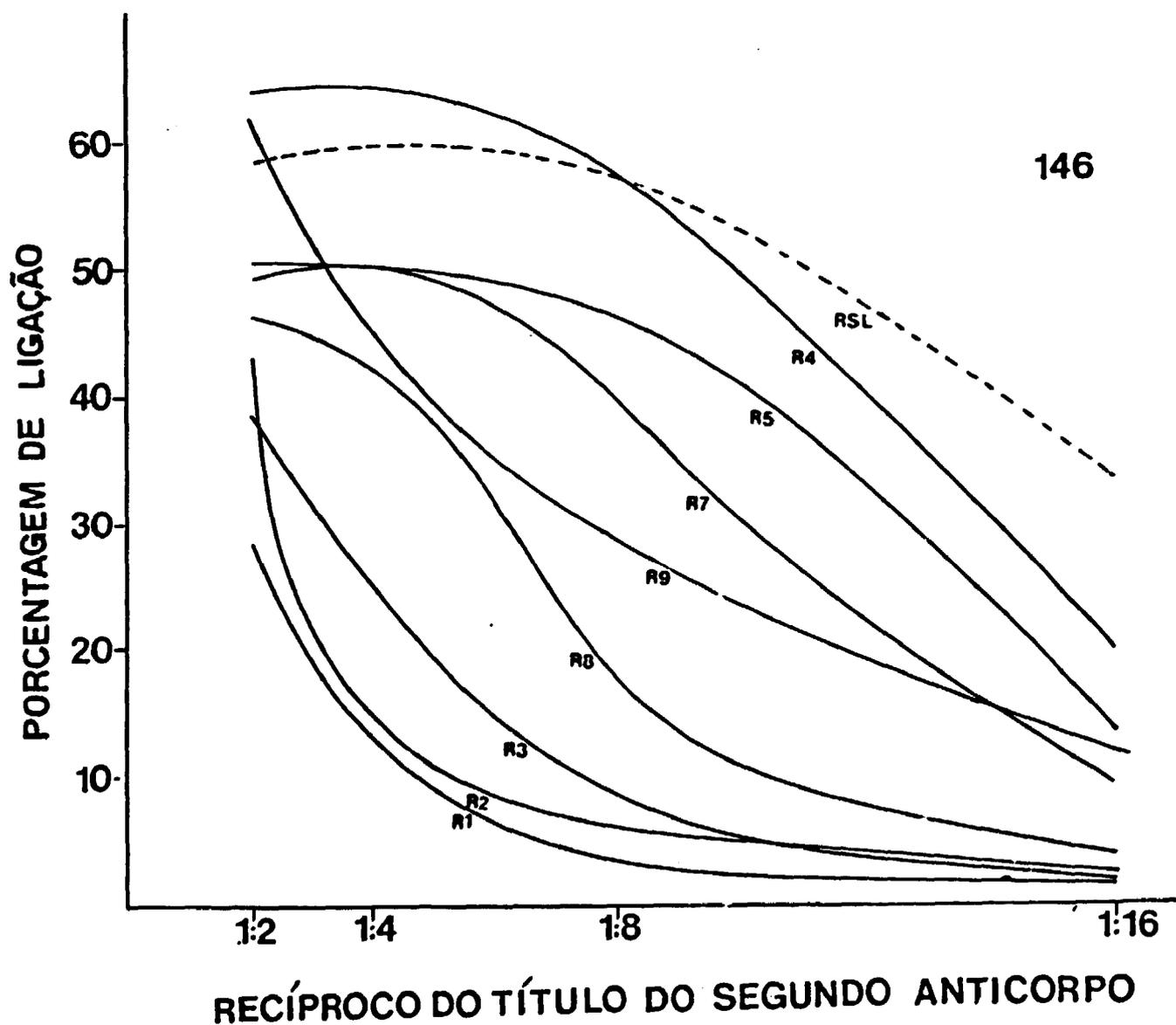


Figura 13 - Curvas de título dos antissoros do ovino 146 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissoro de referência RSL em linha tracejada.

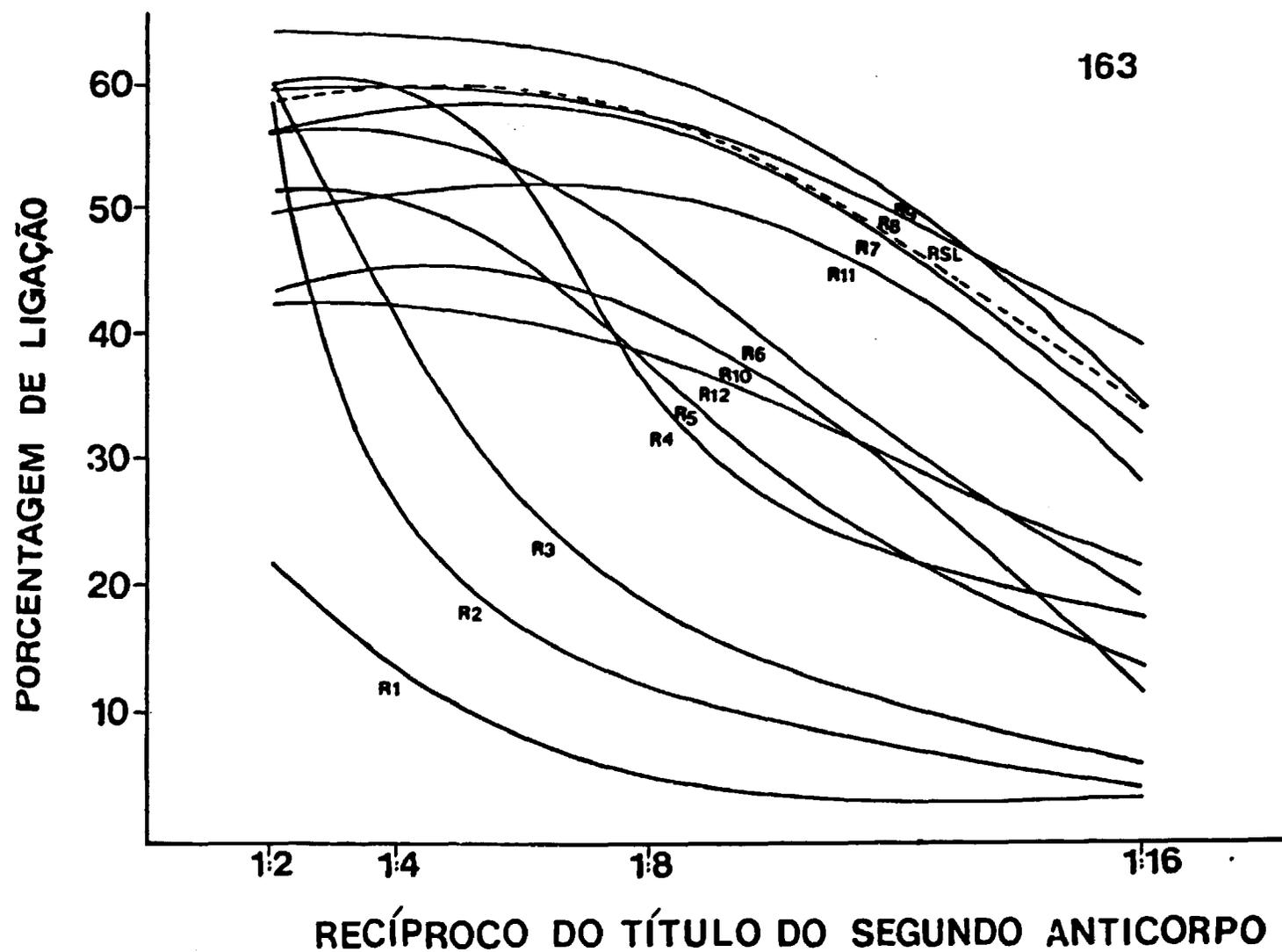


Figura 14 - Curvas de título dos antissoros do ovino 163 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissor de referência RSL em linha tracejada.

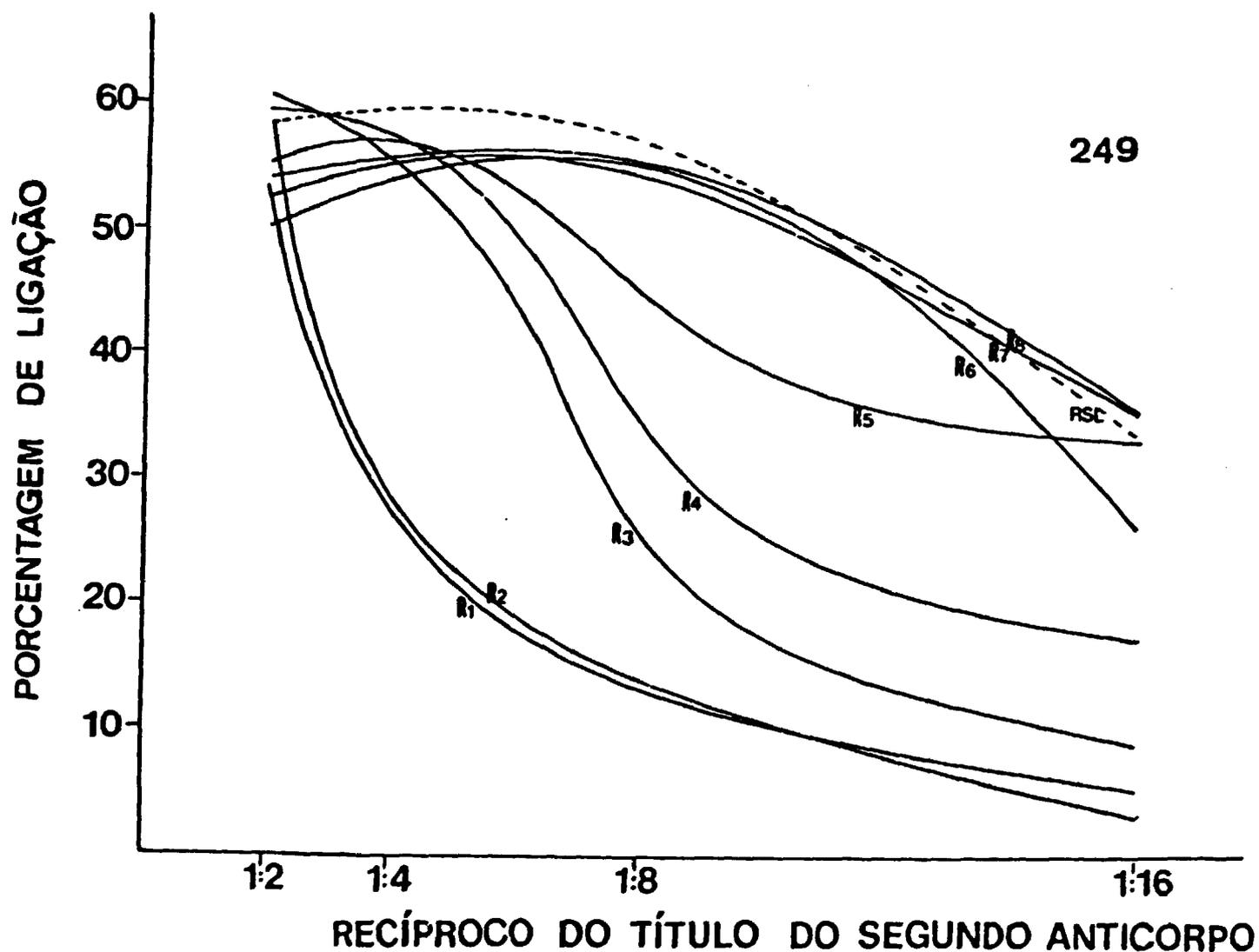


Figura 15 - Curvas de título dos antísseros do ovino 249 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissor de referência, RSL, em linha tracejada.

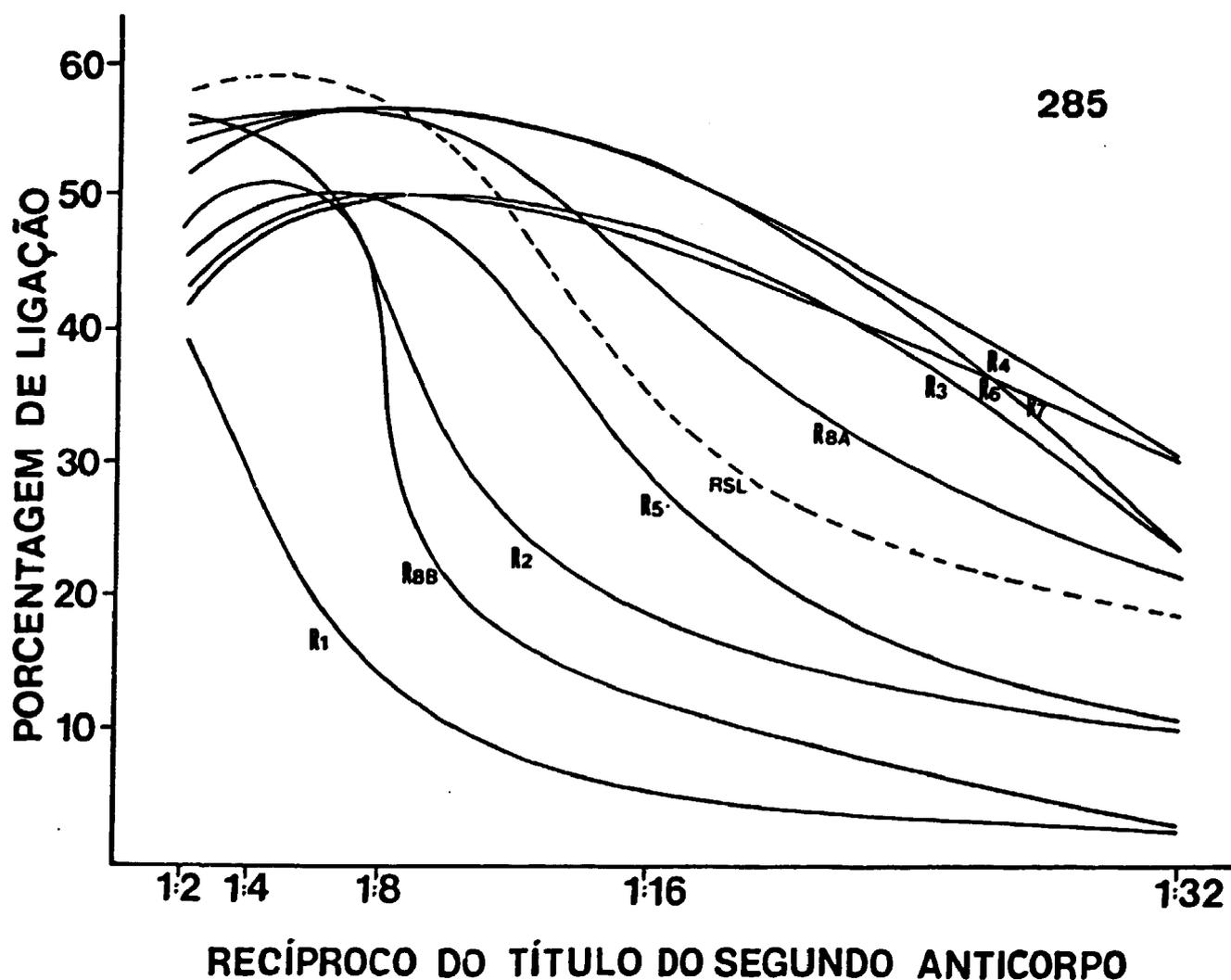


Figura 16 - Curvas de título dos antissoros do ovino 285 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissoro de referência, RSL, em linha tracejada. A curva representada pelo número R8B refere-se a sangria realizada durante o segundo período de descanso, quando o ovino veio a óbito.

mente após o 7º reforço (Figuras 15 e 14 respectivamente). O animal 285 (Figura 16), que induziu mais precocemente a formação dos anticorpos, logo após o 2º reforço, revelou a partir do reforço seguinte títulos até mais elevados do que aquele recomendado pelo antissoro da RSL, de 1:5 (64). Entretanto, observando-se as Figuras 13 e 16 pode-se constatar a acentuada queda ocorrida no título dos antissoros desses animais quando adoeceram (curva 19 do animal 146) e até vieram a óbito (curva 18B do animal 285).

As curvas de título dos antissoros obtidos nas sangrias de grandes volumes, realizadas após as 4º, 8º e 12º injeções de reforço, que corresponderam as duas colheitas espaçadas de três dias, podem ser visualizadas nas Figuras 17 a 20. Nessas colheitas foram obtidos um total de 3,6 l de antissoro, distribuídos em 180 frascos contendo 20 ml cada.

Pela análise da Figura 10 pode-se observar que os antissoros dos animais 163 e 249, nas últimas sangrias de grandes volumes, apresentaram títulos diferentes naquelas colheitas espaçadas de três dias, conforme exibido na Tabela 12.

Portanto, esses antissoros provenientes dos animais 163 e 249 foram avaliados separadamente quanto as suas características de precipitação, enquanto que os demais, que apresentaram o mesmo título, foram reunidos antes de serem submetidos a esta análise.

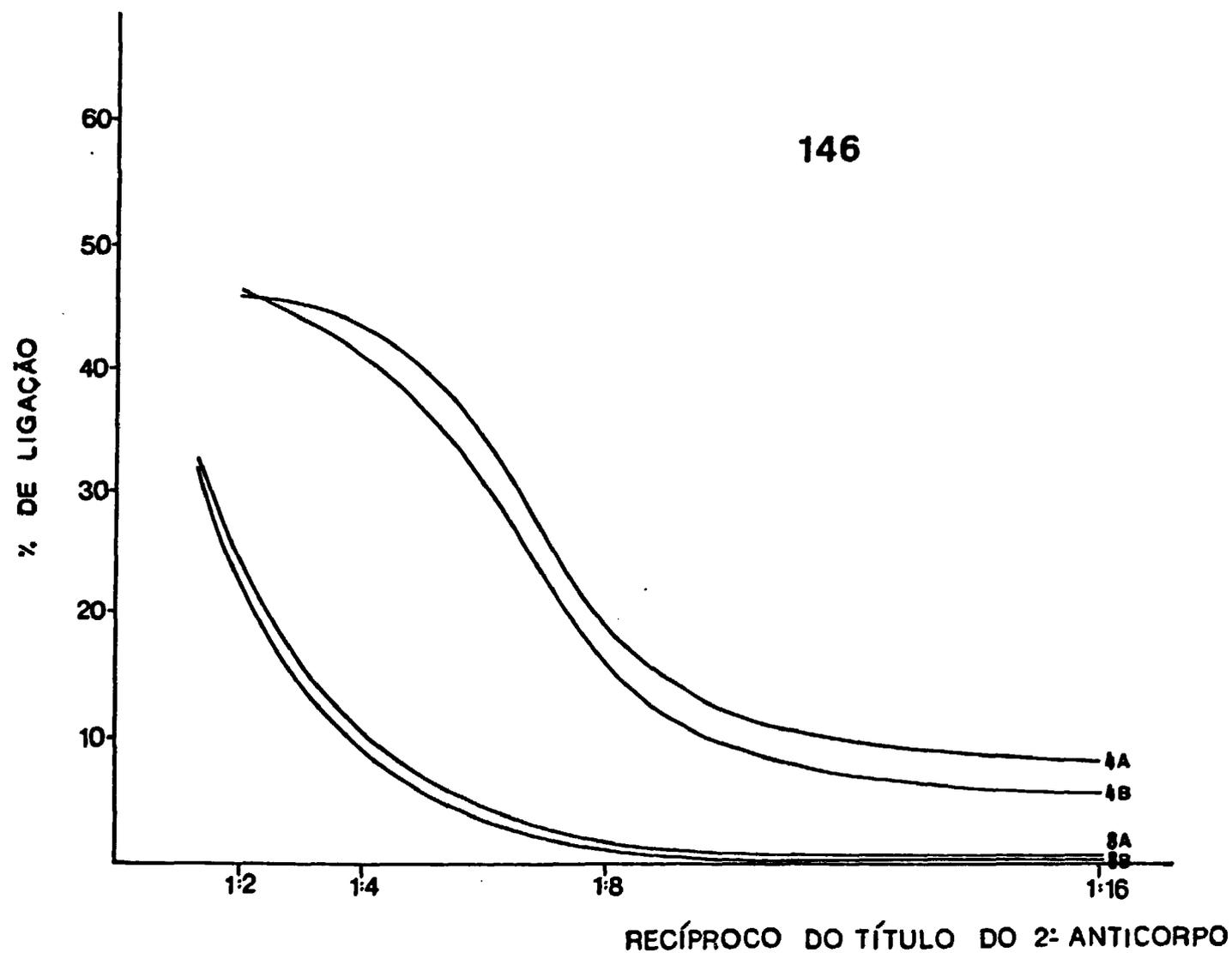


Figura 17 - Curvas de títulos do antissoro do ovino 146 obtidos nas sangrias de grandes volumes (4ª e 8ª), realizadas em duas colheitas espaçadas de três dias. Os índices A e B referem-se as 1ª e 2ª colheitas, respectivamente.

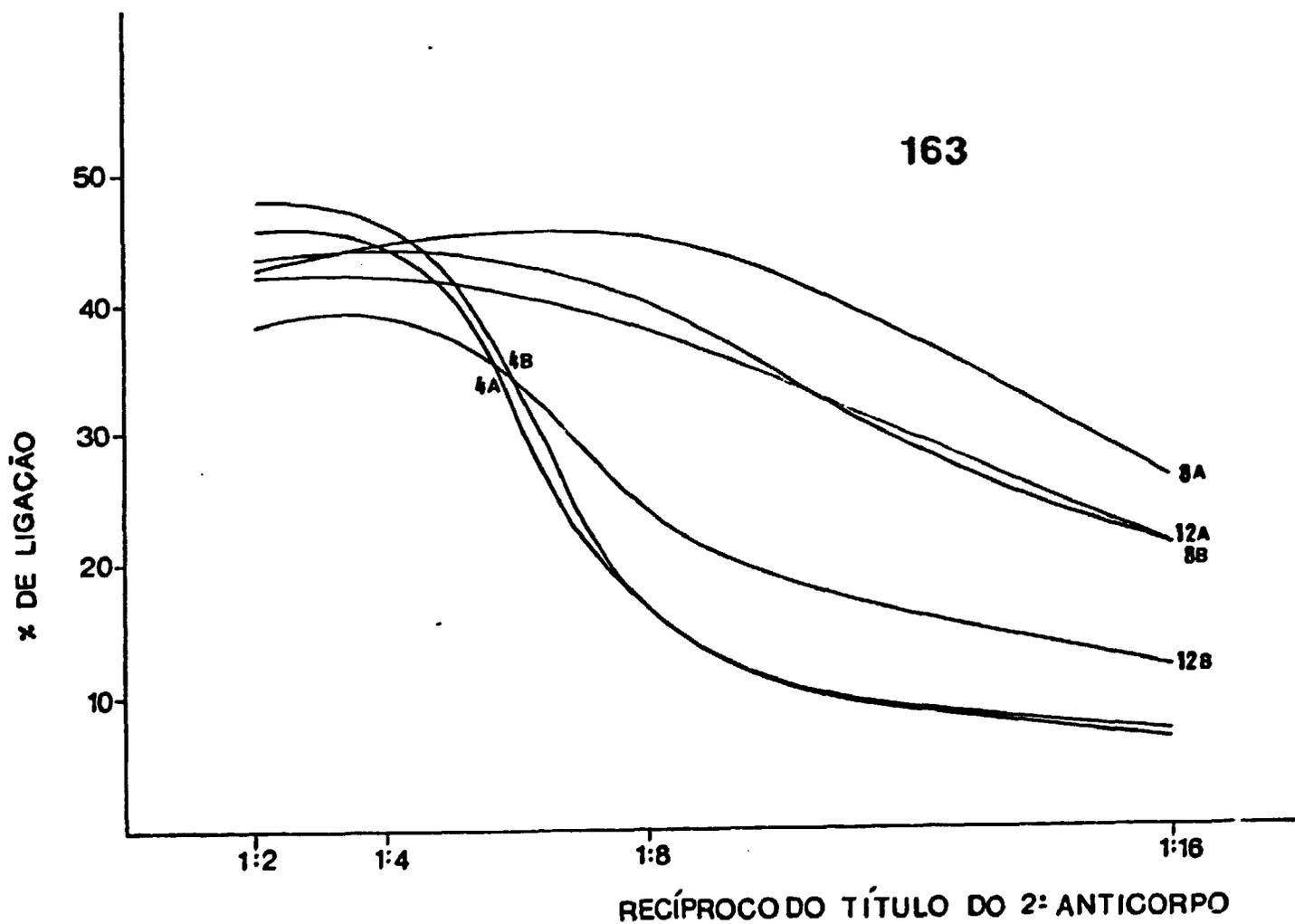


Figura 18 - Curvas de título dos antissoros do ovino 163 obtidos nas sangrias de grandes volumes (4^ª, 8^ª e 12^ª), realizadas em duas colheitas espaçadas de três dias. Os índices A e B referem-se as 1^ª e 2^ª colheitas, respectivamente.

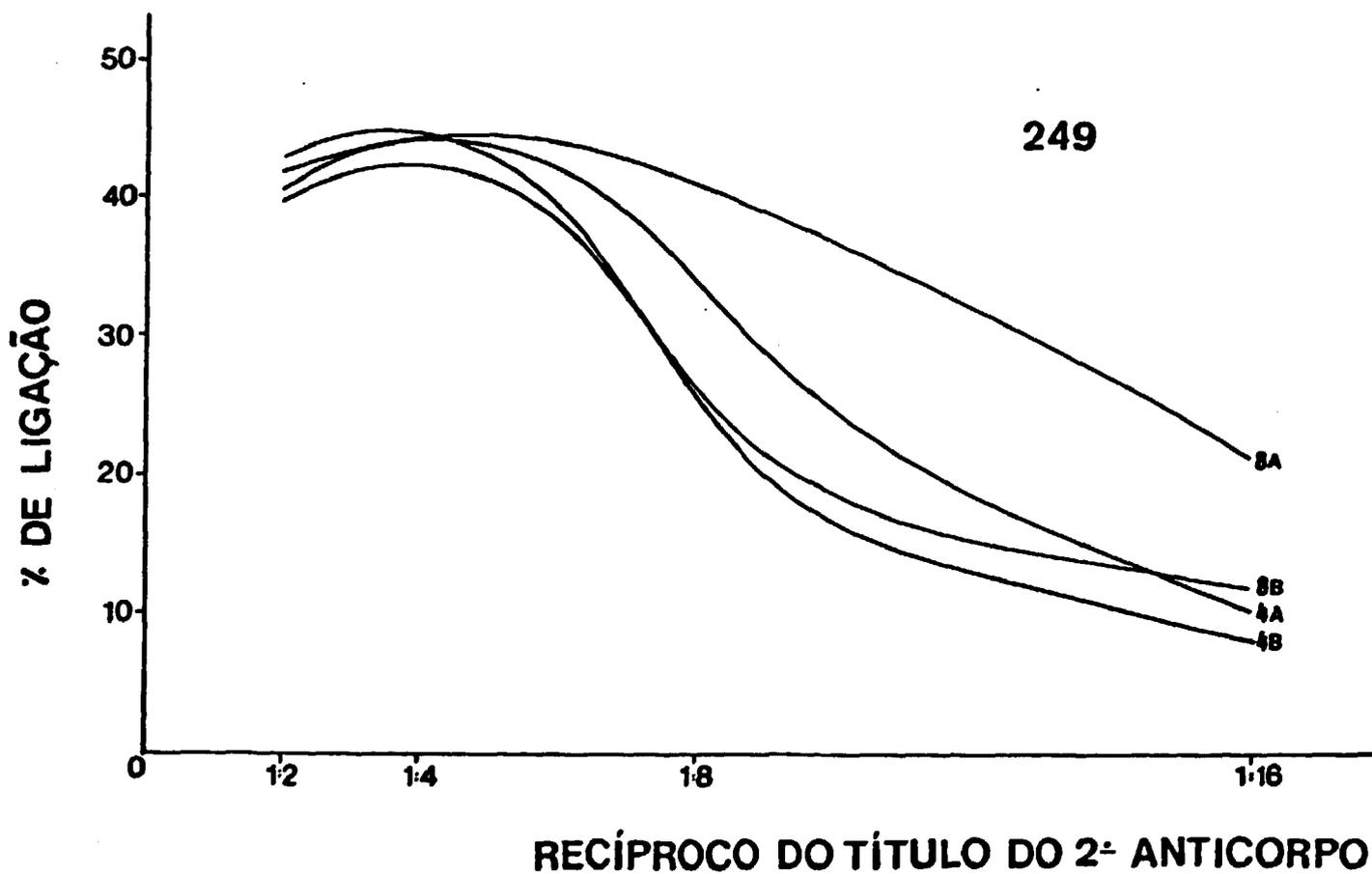


Figura 19 - Curvas de título dos antissoros do ovino 249 obtidos nas sangrias de grandes volumes (4ª e 8ª), realizadas em duas colheitas espaçadas de três dias. Os índices A e B referem-se as 1ª e 2ª colheitas, respectivamente.

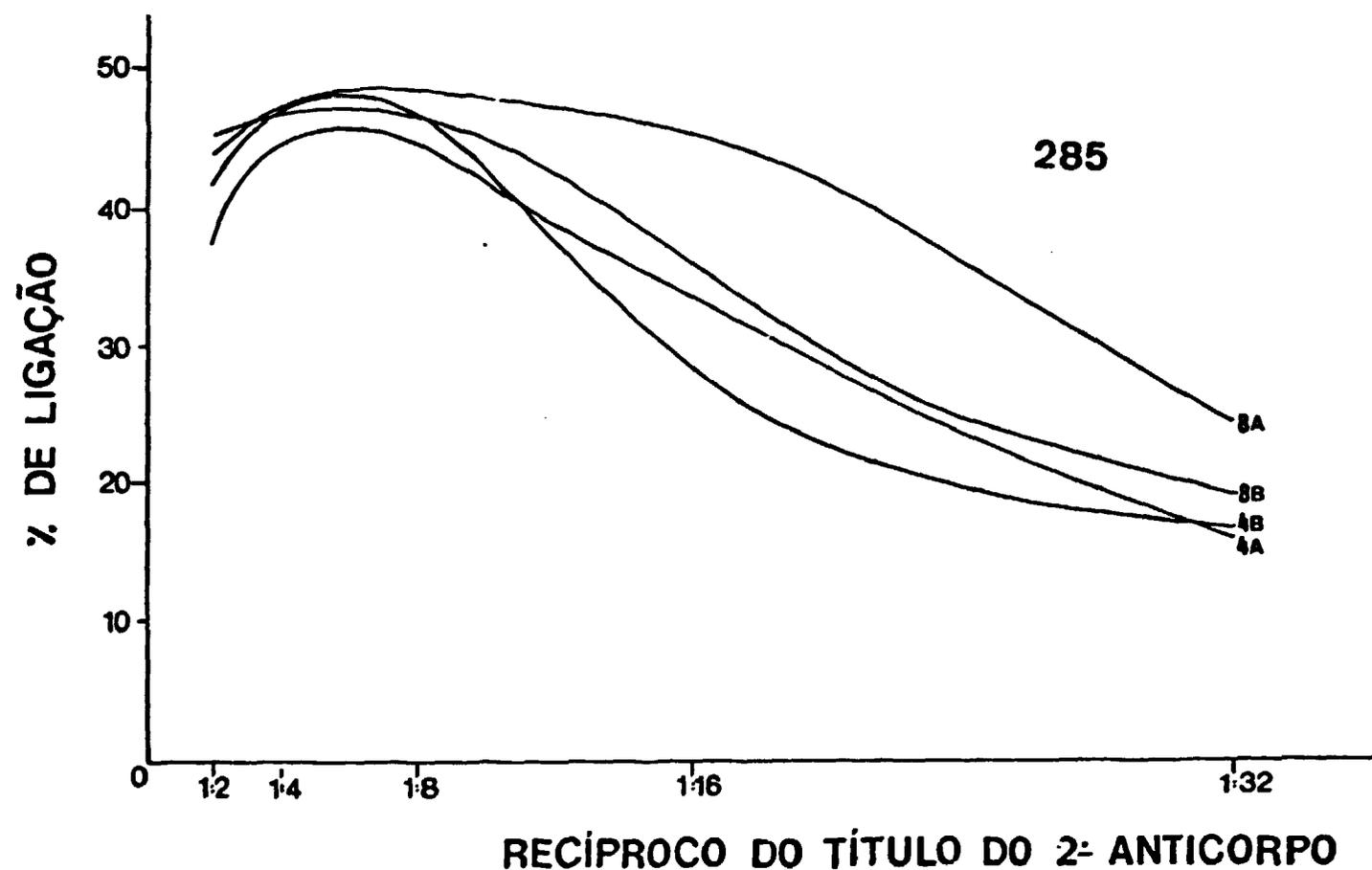


Figura 20 - Curvas de título dos antissoros do ovino 285 obtidos nas sangrias de grandes volumes (4ª e 8ª), realizadas em duas colheitas espaçadas de três dias. Os índices A e B referem-se as 1ª e 2ª colheitas, respectivamente.

Tabela 12 - Título dos antissoros obtidos nas duas colheitas espaçadas de três dias, das sangrias de grandes volumes.

ANTISSORO	SANGRIA	COLHEITA	TÍTULO
146	4º	1º	1:2
	4º	2º	1:2
	8º	1º	0
	8º	2º	0
163	4º	1º	1:3
	4º	2º	1:3
	8º	1º	1:6
	8º	2º	1:4
	12º	1º	1:4
	12º	2º	1:3
249	4º	1º	1:4
	4º	2º	1:4
	8º	1º	1:6
	8º	2º	1:3
285	4º	1º	1:6
	4º	2º	1:6
	8º	1º	1:6
	8º	2º	1:6

4.3.1.4. IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAR

Os títulos dos antissoros produzidos pelo animal 285, determinados pela imunodifusão podem ser visualizados na Figura 21.

A Tabela 13 apresenta os valores dos títulos desses antissoros quando determinados pelas duas técnicas, RIE e imunodifusão. O coeficiente de correlação determinado entre os valores obtidos pelo RIE e aqueles obtidos pela imunodifusão foi de 0,920, sendo significativo para $p \leq 0,01$ (Figura 22).

4.4. DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA DO RIE

Na Tabela 14 são expostos os resultados das ligações inespecíficas fornecidas pelos segundos anticorpos em sete ensaios distintos, realizados com diferentes traçadores.

Os valores médios não diferiram significativamente quando se compararam os antissoros produzidos neste trabalho, com aquele comercial da RSL.

4.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE IGG CARREADORA

As Figuras 23 a 26 exibem as curvas de título dos antissoros produzidos neste trabalho, construídas na presença de concentrações diferentes de soro carreador não imune (SCN), enquanto que a Figura 27 exhibe as mesmas curvas obtidas com o antissoro comercial da RSL.

Os antissoros produzidos pelo animal 146 (Figura 23) apresentaram características de precipitação similares entre as sangrias de grandes volumes, podendo ser reunidas formando um único lote de

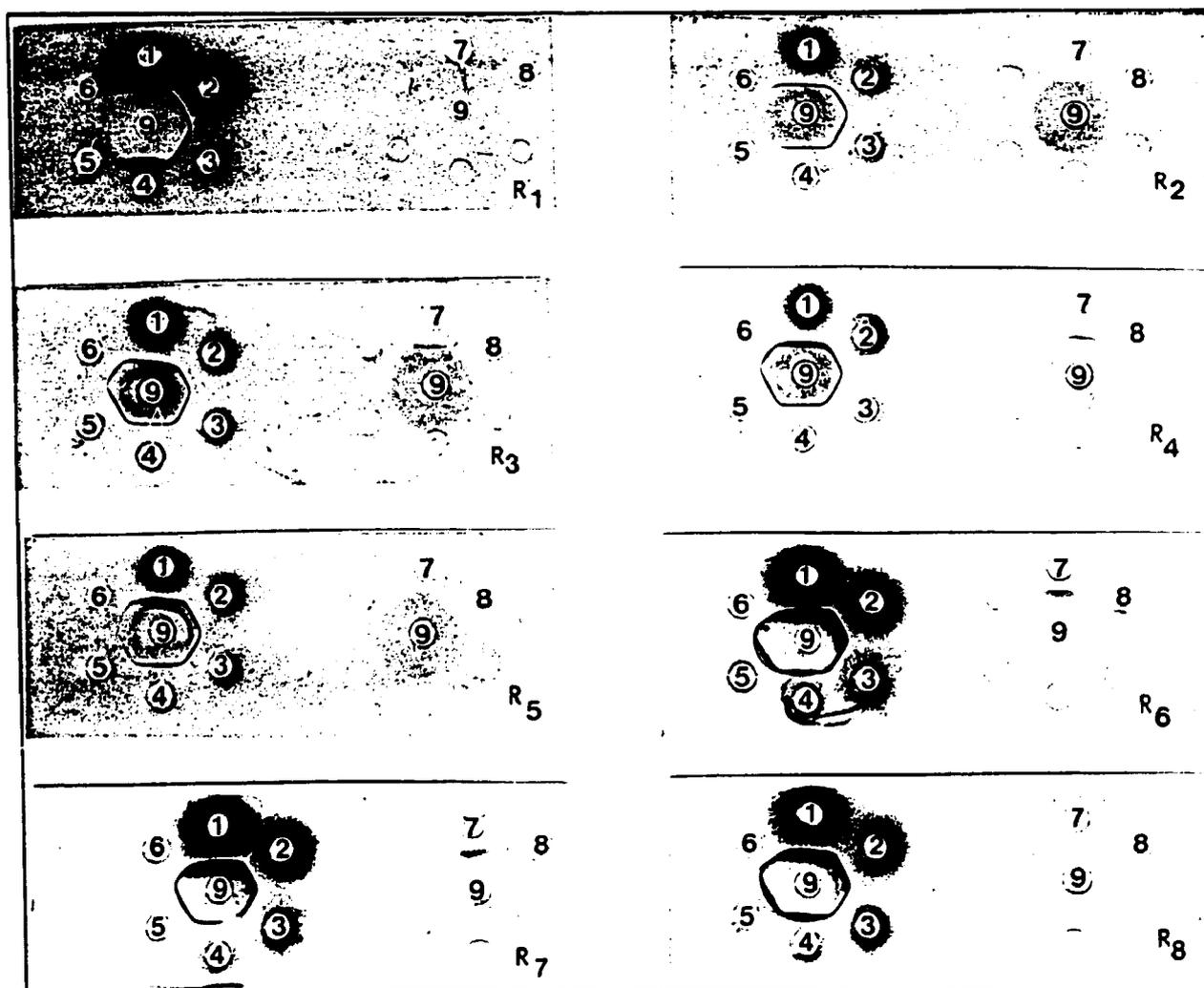


Figura 21 - Imunodifusão dos antissoros do ovino 285, obtidos nas oito sangrias realizadas após cada injeção de reforço (de R₁ a R₈, respectivamente).

- (1) Antissoro na diluição 1:1;
- (2) Antissoro na diluição 1:2;
- (3) Antissoro na diluição 1:4;
- (4) Antissoro na diluição 1:8;
- (5) Antissoro na diluição 1:16;
- (6) Antissoro na diluição 1:32;
- (7) Antissoro na diluição 1:64;
- (8) Antissoro na diluição 1:128;
- (9) IgG de coelho na concentração de 0,5 mg/ml.

Tabela 13 - Comparação dos títulos dos antissoros produzidos pelo ovino 285, determinados pelas técnicas de RIE e imunodifusão.

Título		
Sangria	Radioimunoensaio	Imunodifusão
1ª	0	1:4
2ª	1:2	1:8
3ª	1:7	1:32
4ª	1:7	1:32
5ª	1:6	1:16
6ª	1:8	1:32
7ª	1:7	1:32
8ª	1:6	1:32

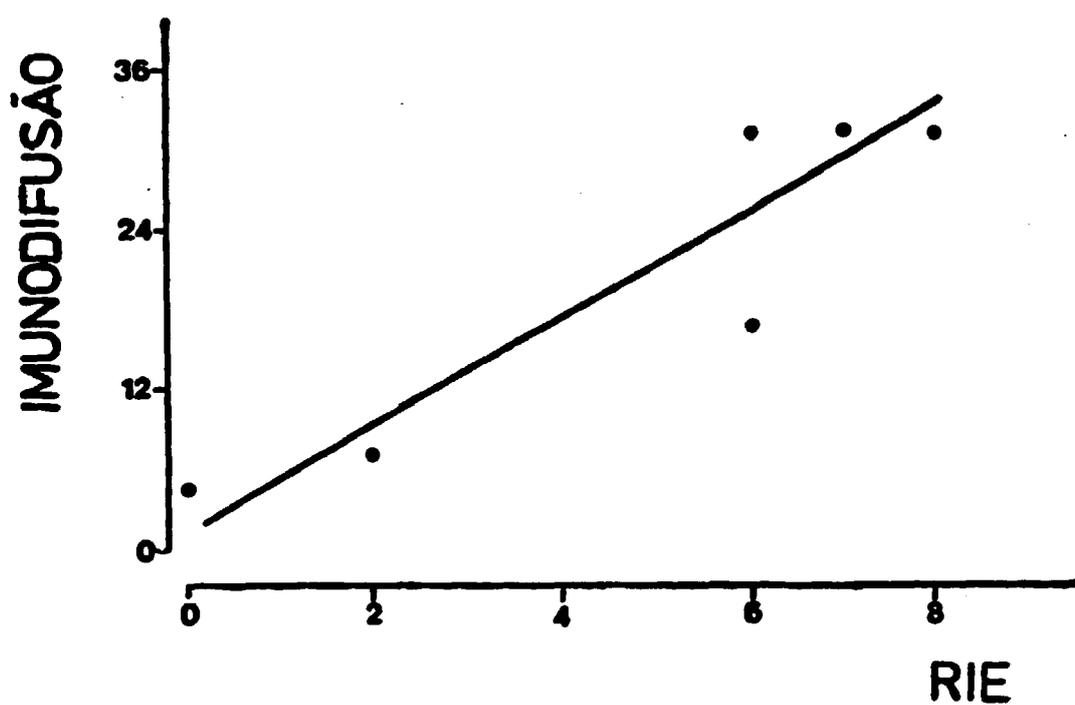


Figura 22 - Estudo da correlação linear dos títulos dos antissoros do ovino 285, determinados pelo RIE e pela imunodifusão. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação $Y = 3,96X + 2,19$.

Tabela 14 - Valores das ligações inespecíficas obtidas em vários RIEs de HTSH separados pelos segundos anticorpos produzidos no IPEN-CNEN/SP (146, 163, 249 e 285) e comercial (RSL).

ANTISSOROS				

RSL	146	163	249	285

3,73±0,33	1,75±0,08	4,27±0,54	3,66±0,60	2,70±0,34
5,28±0,21	3,44±0,43	2,23±0,07	4,96±0,47	3,13±0,23
3,39±0,44	4,22±0,43	3,27±0,35	3,39±0,30	3,46±0,58
2,95±0,09	4,12±0,15	3,55±0,49	2,98±0,36	3,20±0,13
3,12±0,15	4,14±0,17	3,27±0,37	2,92±0,18	4,03±0,98
2,82±0,25	3,49±0,11	2,83±0,12	2,71±0,10	4,04±0,65
2,57±0,14	3,38±0,21	3,40±0,21	3,11±0,38	2,71±0,47

Média	3,41	3,50	3,26	3,39
DP	±0,91	±0,86	±0,63	±0,76
CV	26,64%	24,41%	19,28%	22,43%

RSL versus	146	163	249	285
P	NS	NS	NS	NS

NS - diferença não significativa ao nível de $P \leq 0,05$.

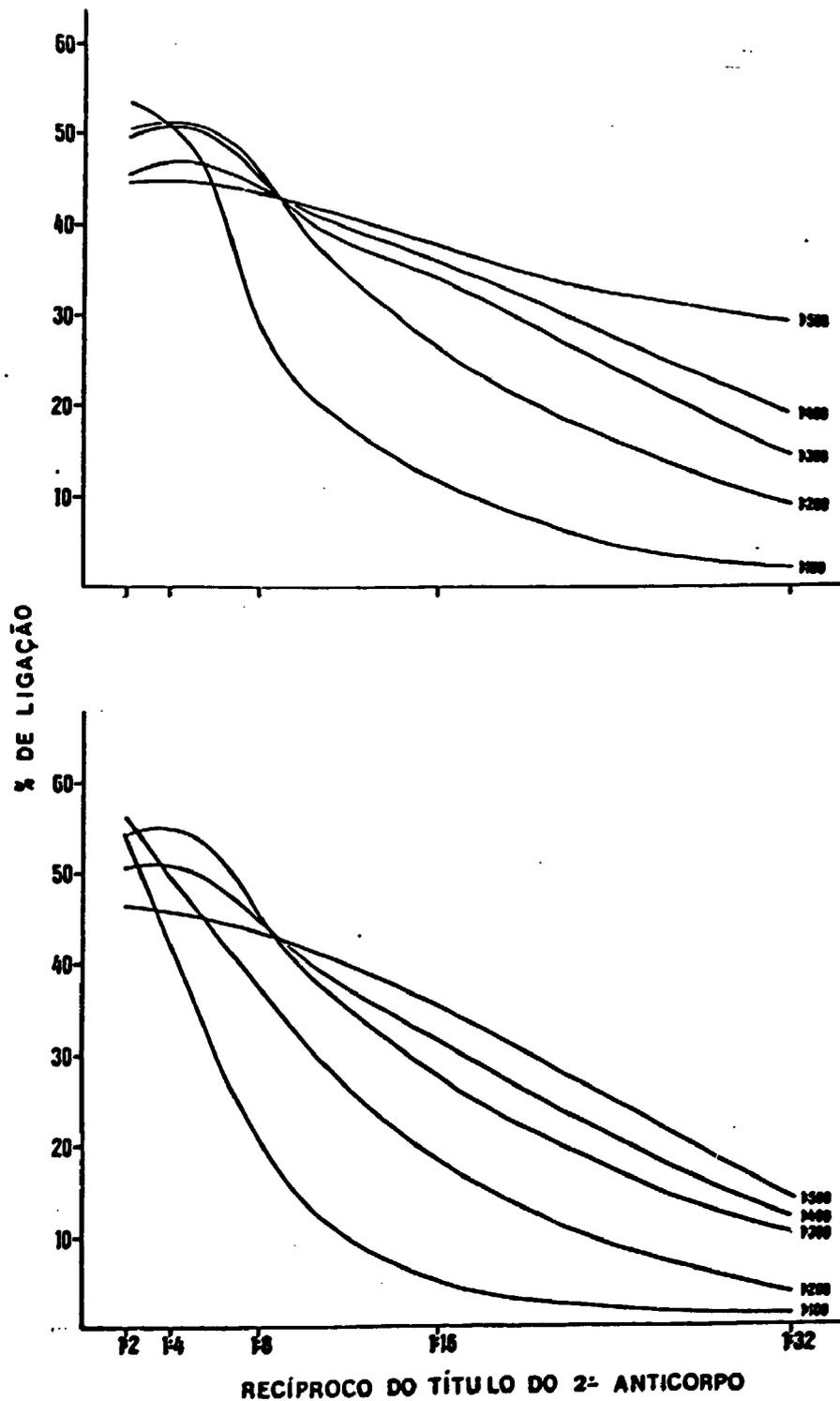


Figura 23 - Curvas de título dos antíseros produzidos pelo ovino 146, construídas na presença de várias diluições do SCN: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500. O gráfico acima refere-se a mistura das duas colheitas da primeira sangria de grandes volumes e o aquele abaixo refere-se a mistura das duas colheitas da segunda sangria de grandes volumes.

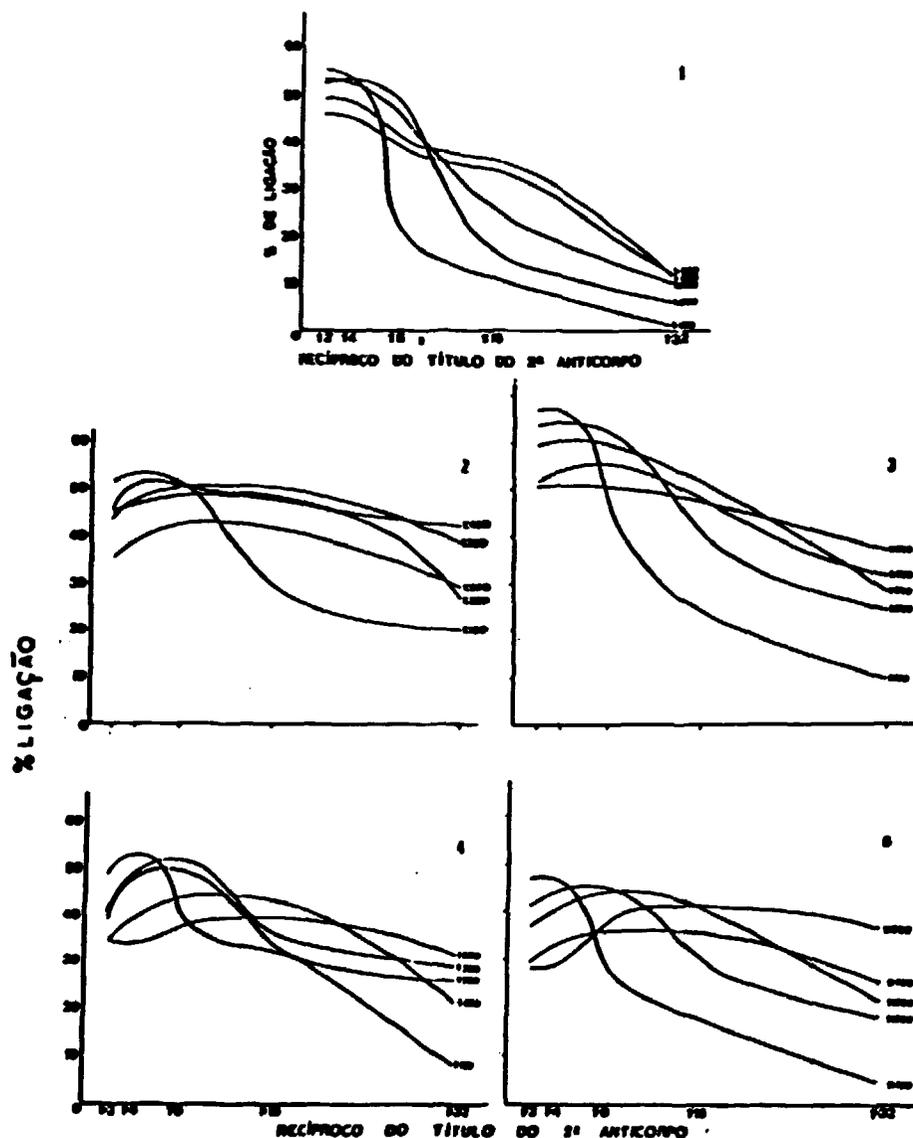


Figura 24 - Curvas de título dos antissoros produzidos pelo ovino 163, construídas na presença de várias diluições do SCN: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500.

- (1) Antissoro obtido na mistura das duas colheitas da primeira sangria de grandes volumes.
- (2) Antissoro obtido na primeira colheita da segunda sangria de grandes volumes.
- (3) Antissoro obtido na segunda colheita da segunda sangria de grandes volumes.
- (4) Antissoro obtido na primeira colheita da terceira sangria de grandes volumes.
- (5) Antissoro obtido na segunda colheita da terceira sangria de grandes volumes.

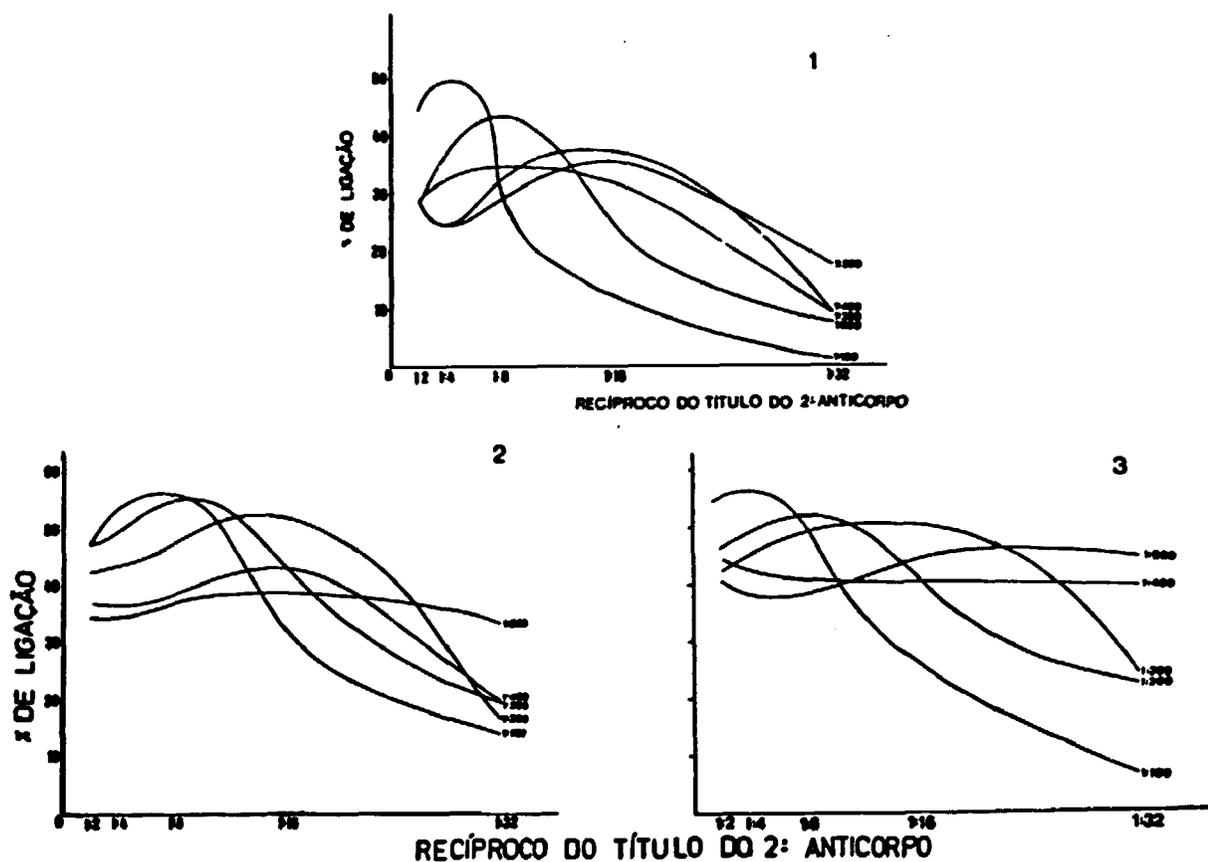


Figura 25 - Curvas de título dos antissoros produzidos pelo ovino 249, construídas na presença de várias diluições do SCN: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500.

- (1) Antissoro obtido na mistura das duas colheitas da primeira sangria de grandes volumes.
- (2) Antissoro obtido na primeira colheita da segunda sangria de grandes volumes.
- (3) Antissoro obtido na segunda colheita da segunda sangria de grandes volumes.

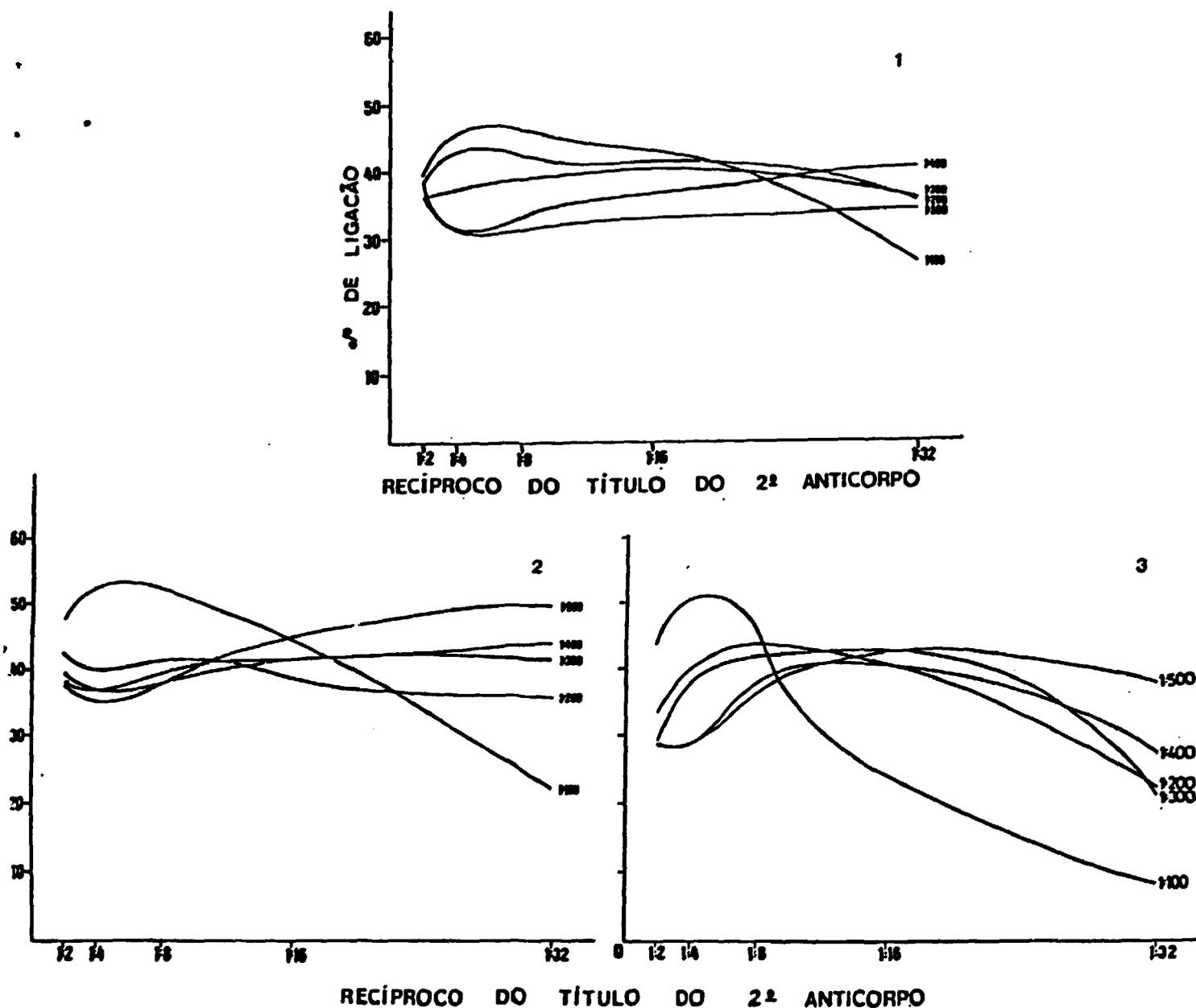


Figura 26 - Curvas de título dos antíseros produzidos pelo ovino 285, construídas na presença de várias diluições do SCN: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500.

- (1) Antissoro obtido na mistura das duas colheitas da primeira sangria de grandes volumes.
- (2) Antissoro obtido na mistura das duas colheitas da segunda sangria de grandes volumes.
- (3) Antissoro obtido após o obito do animal.

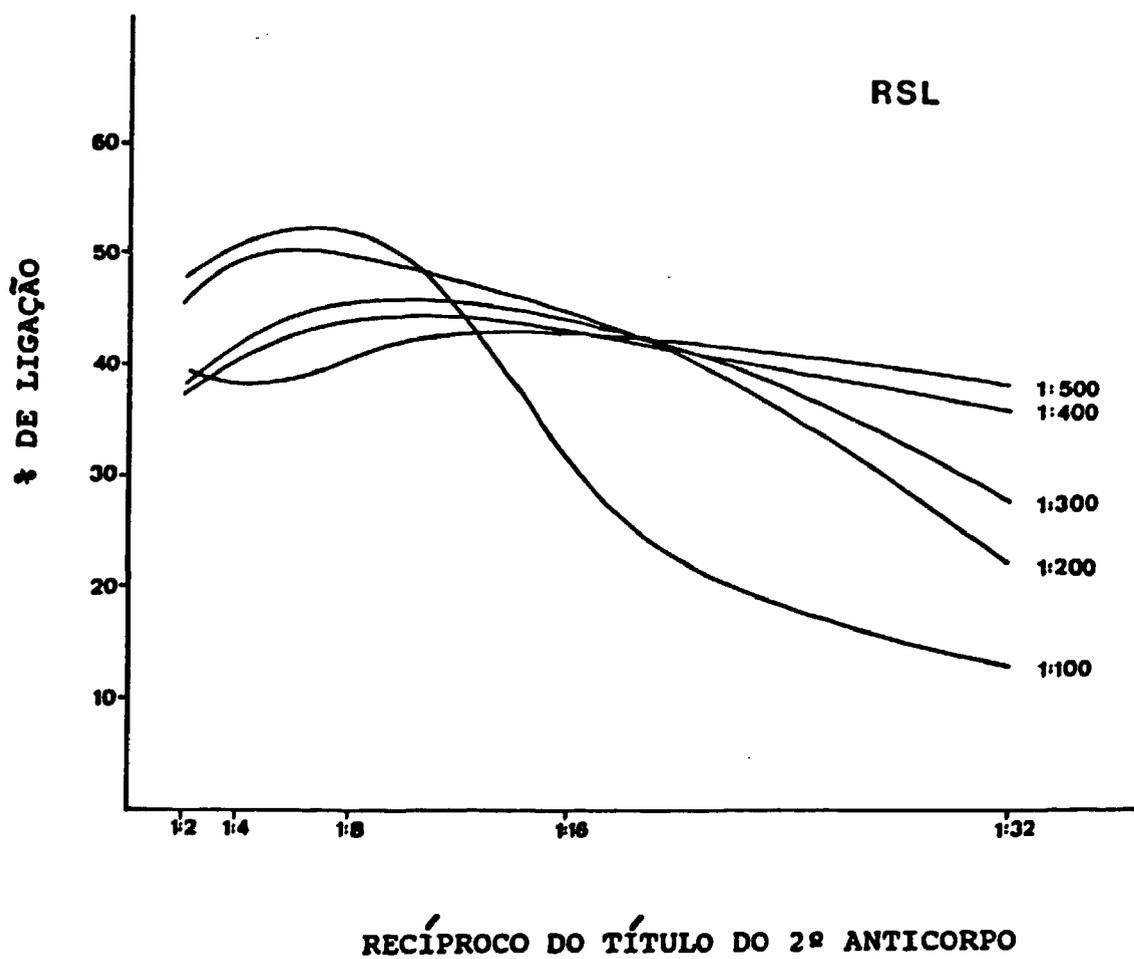


Figura 27 - Curvas de título do antissoro RSL, construídas na presença de várias diluições do SCN: 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 e 1:500.

antissoros. Essa similaridade também foi observada nos antissoros obtidos nas duas sangrias iniciais de grandes volumes do ovino 285 (Figura 26), que também foram reunidos.

Os antissoros produzidos pelos demais ovinos não puderam ser reunidos pois apresentaram características de precipitação diferente, mesmo aquelas provenientes de duas colheitas espaçadas de apenas três dias, realizadas na mesma sangria (Figura 24 e 25).

A Tabela 15 apresenta os valores da diluição do soro carreador não imune que permitiram a precipitação máxima dos antissoros e os títulos correspondentes. São também indicados os valores resultantes da concentração de IgG no SCN diluído. Pela análise desta tabela observa-se que a maioria dos antissoros apresentaram títulos mais altos na presença de concentrações maiores de SCN (1:100) com exceção dos antissoros 146 e 163 que demonstraram títulos mais altos com concentrações de SCN menores (1:300 e 1:200, respectivamente).

Aqueles antissoros de um mesmo animal, provenientes de diferentes sangrias que apresentaram as mesmas características de precipitação foram então reunidos.

A denominação atribuída aos antissoros após a determinação de suas características de precipitação estão indicadas na Tabela 16.

4.6. ANÁLISE DA CINÉTICA DE PRECIPITAÇÃO

As Figuras 28 a 31 apresentam os resultados do estudo da cinética de precipitação, realizados em diferentes temperaturas, dos antissoros produzidos neste trabalho. A Figura 32 exhibe os resultados obtidos com o antissoros comercial da RSL.

Pela análise dessas figuras da cinética de precipitação

Tabela 15 - Resultados obtidos na determinação da concentração ideal de IgG carreadora. São indicados na tabela o título dos antissoros e a diluição do SCN que forneceram a precipitação máxima do ensaio, bem como a concentração correspondente de IgG no SCN.

Animal	Antissoro		SCN	
	Sangria	Título	Diluição	IgG (†)
146	1	1:4	1:300	0,048
	2	1:4	1:300	0,048
163	1	1:4	1:200	0,032
	2 _A	1:5	1:100	0,016
	2 _B	1:3	1:100	0,016
	3 _A	1:4	1:100	0,016
	3 _B	1:3	1:100	0,016
249	1	1:4	1:100	0,016
	2 _A	1:7	1:100	0,016
	2 _B	1:4	1:100	0,016
285	1	1:6	1:100	0,016
	2	1:6	1:100	0,016
	3	1:5	1:100	0,016
RSL		1:5	1:100	0,016

1, 2 e 3 - referem-se as primeira, segunda e terceira sangrias de grandes volumes, respectivamente.

A e B - referem-se as duas coletas de grandes volumes espaçadas de tres dias.

Tabela 16 - Denominação atribuída aos antíssoros após a determinação de suas características de precipitação.

Animal	Sangria	Código do antíssoro
146	1 e 2 (*)	146
163	1	163
163	2A	163(1)
163	2B	163(2)
163	3A	163(3)
163	3B	163(4)
249	1 e 2B (*)	249
249	2A	249(1)
285	1 e 2A (*)	285
285	2B	285(1)

(*) Antíssoros reunidos com características de precipitação similares.

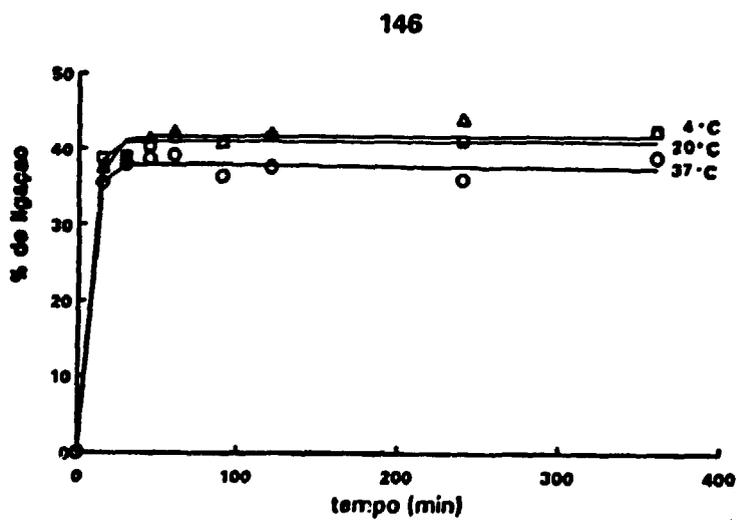


Figura 28 - Efeito da temperatura na precipitação da reação ligada do RIE, realizada com o antissoro 146 (título de 1:4 e SCN a 1:300). São representados na figura os valores experimentais para: 4°C (□—□), 20°C (Δ—Δ) e 37°C (○—○).

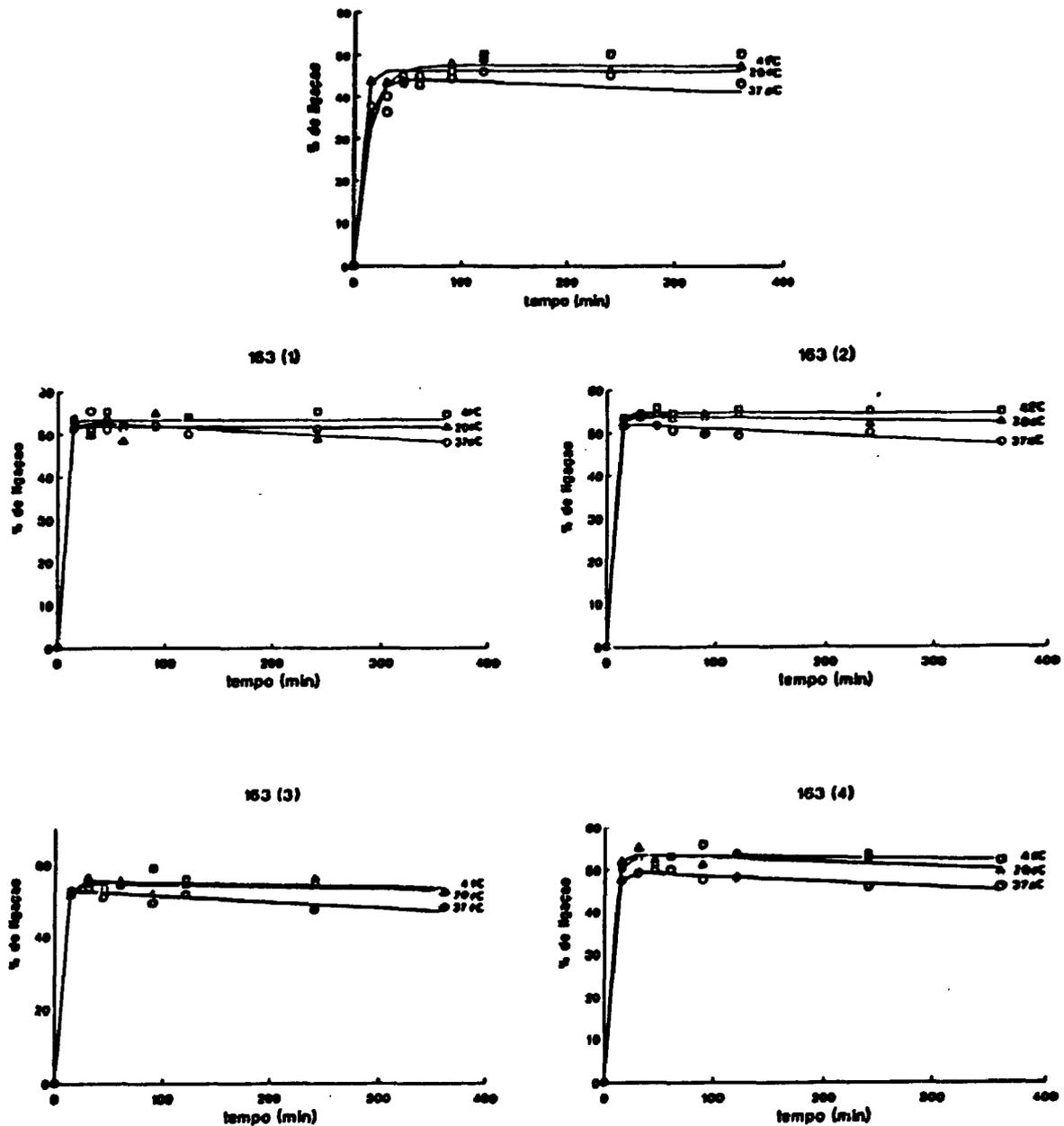


Figura 9 - Efeito da temperatura na precipitação da fração ligada do RIE realizada com o antissoro 163 (título de 1:4 e SCN a 1:200), 163(1) (título de 1:5 e SCN a 1:100), 163(2) (título de 1:3 e SCN a 1:100), 163(3) (título de 1:4 e SCN a 1:100) e 163(4) (título de 1:3 e SCN a 1:100). São representados na figura os valores experimentais para: 4°C (□—□), 20°C (△—△) e 37°C (○—○).

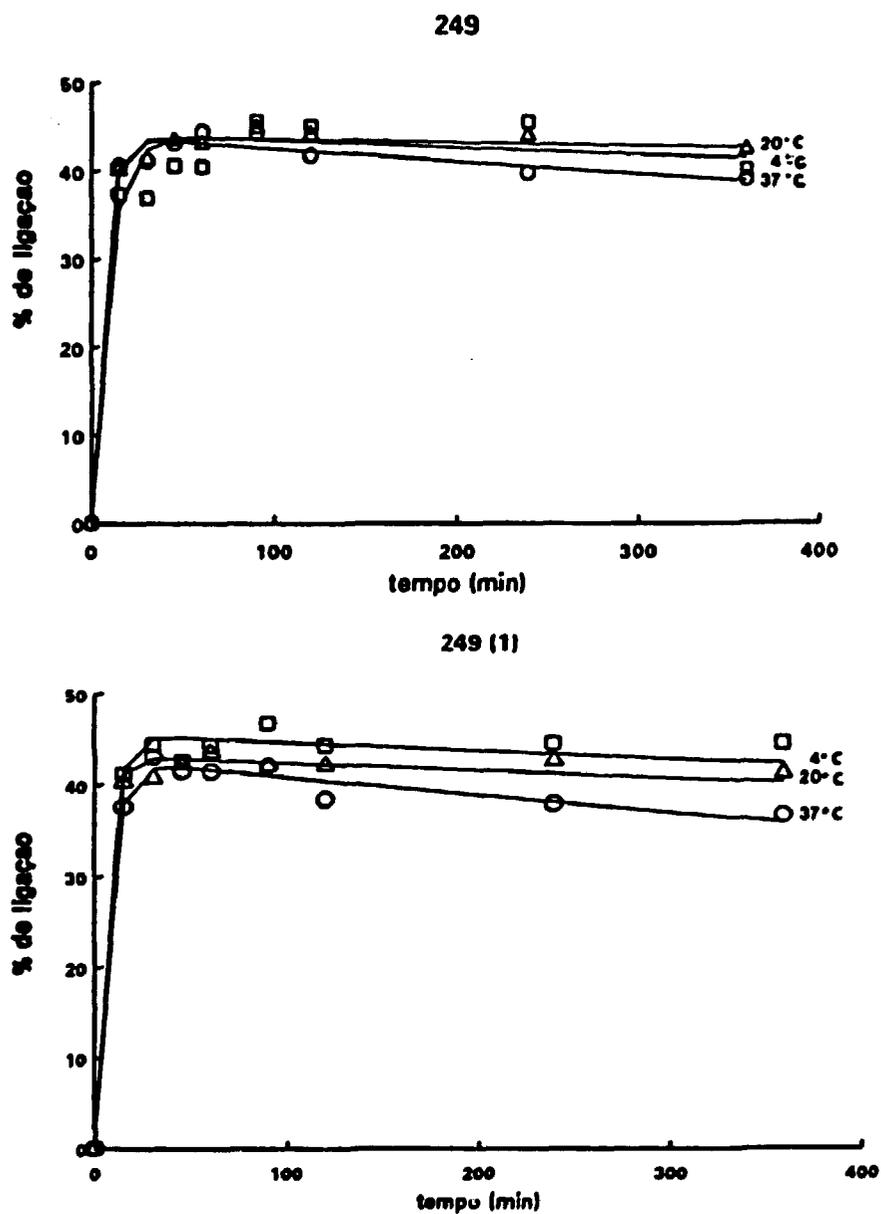


Figura 30 - Efeito da temperatura na precipitação da fração ligada do RIE, realizada com o antissoro 249 (título de 1:4 e SCN a 1:100) e 249(1) (título de 1:7 e SCN a 1:100). São representados na figura os valores experimentais para: 4°C (□—□), 20°C (Δ—Δ) e 37°C (O—O).

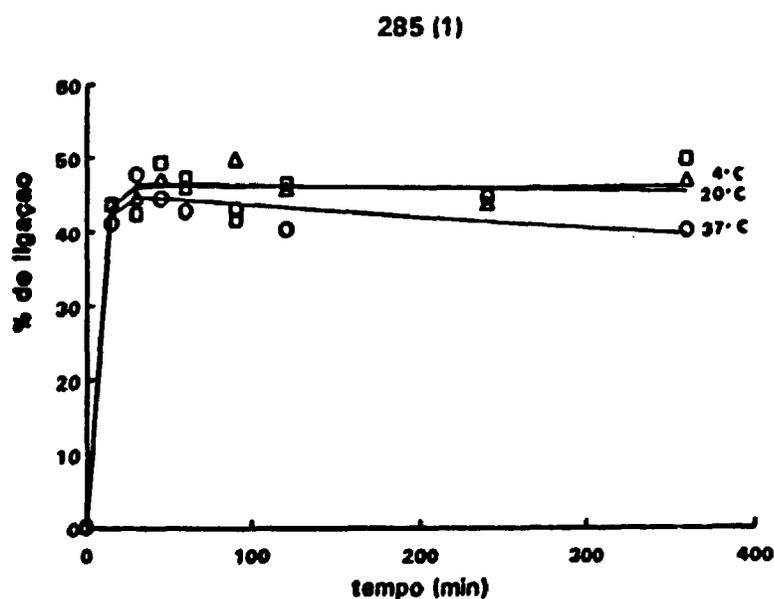
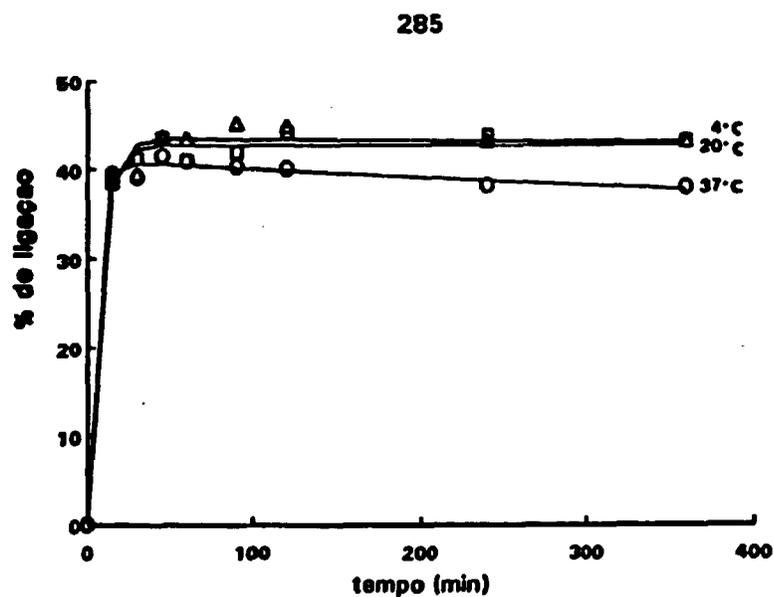


Figura 31 - Efeito da temperatura na precipitação da fração ligada do RIE, realizada com o antissoro 285 (título de 1:6 e SCN a 1:100) e 285(1) (título de 1:5 e SCN a 1:100). São representados na figura os valores experimentais para: 4°C (□—□), 20°C (Δ—Δ) e 37°C (○—○).

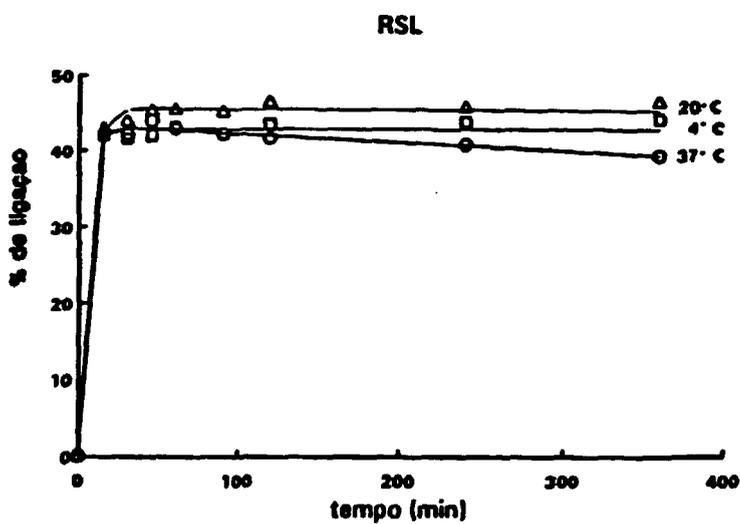


Figura 32 - Efeito da temperatura na precipitação da fração ligada do EIE, realizada com o antissoro RSL (título de 1:5 e SCN a 1:100). São representados na figura os valores experimentais para: 4°C (□—□), 20°C (Δ—Δ) e 37°C (○—○).

(Figuras 28 a 32) observa-se que todos os antissoros apresentaram uma taxa de precipitação praticamente inalterada com o aumento da temperatura de quatro para 20°C, enquanto que essa taxa diminuiu quando a temperatura aumentou para 37°C. Esse comportamento também foi observado com o antissoro da RSL (Figura 32).

A Tabela 17 apresenta os valores de $k_{1,0}$ e $k_{2,0}$ obtidos no ajuste dos pontos de B/T versus tempo, bem como do tempo onde ocorre a ligação máxima e da ligação máxima teórica calculada.

Quando os valores da capacidade de ligação máxima teórica foram submetidos ao teste t de Student, não foi observada diferença significativa a nível de $p \leq 0,05$ entre as três temperaturas analisadas (quatro, 20 e 37°C) (Tabela 18).

Os resultados da análise de variância dos pares de pontos das curvas da cinética de reação de todos os antissoros (percentagem de ligação versus tempo) estão exibidos nas tabelas 19 a 29. Pela análise desses resultados observa-se que todos os antissoros apresentaram curvas diferentes, quando foram comparadas as temperaturas de quatro com 20°C, quatro com 37°C e de 20 com 37°C, com exceção do antissoro 249 que não apresentou diferença significativa entre quatro e 20°C.

A tabela 30 apresenta o resultado comparativo dos valores das ligações inespecíficas obtidos quando todos os segundos anticorpos foram incubados a quatro, 20 e 37°C.

Tabela 17 - Valores de $k_{1,0}$ e $k_{2,0}$ obtidos no ajuste dos pontos das curvas da cinética da reação. São também indicados na tabela os valores do tempo onde ocorre a precipitação máxima (t_{max}) e da porcentagem de ligação máxima teórica ($Y_{o,max}$) \pm desvio padrão ($sY_{o,max}$).

Antissoro	Temperatura (°C)	$k_{1,0}$ (min. ⁻¹)	$k_{2,0}$ (min. ⁻¹)	t_{max} (min.)	$Y_{o,max} \pm sY_{o,max}$ (%)
146	4	$8,30 \times 10^{-6}$	0,17	59,2	41,1 \pm 3,5
	20	0	0,13	240*	41,7 \pm 3,7
	37	$4,08 \times 10^{-5}$	0,17	49,9	37,9 \pm 3,4
163	4	0	0,07	240*	47,0 \pm 6,5
	20	$1,40 \times 10^{-6}$	0,17	55,6	46,1 \pm 4,1
	37	$2,06 \times 10^{-4}$	0,09	61,6	43,7 \pm 4,5
163(1)	4	0	1,11	45*	53,4 \pm 4,9
	20	$1,87 \times 10^{-5}$	0,72	14,6	51,8 \pm 5,2
	37	$2,55 \times 10^{-4}$	0,22	30,5	52,7 \pm 5,0
163(2)	4	$1,56 \times 10^{-5}$	0,23	42,2	54,8 \pm 4,7
	20	$8,52 \times 10^{-5}$	0,26	31,0	53,9 \pm 4,8
	37	$2,51 \times 10^{-4}$	0,29	24,1	52,0 \pm 4,8
163(3)	4	$9,60 \times 10^{-5}$	0,18	42,1	55,1 \pm 5,0
	20	$9,21 \times 10^{-5}$	0,18	42,2	54,7 \pm 4,9
	37	$3,04 \times 10^{-4}$	0,56	13,4	52,7 \pm 5,0
163(4)	4	$6,53 \times 10^{-5}$	0,16	47,5	53,5 \pm 4,7
	20	$1,91 \times 10^{-4}$	0,21	33,3	53,6 \pm 4,8
	37	$2,58 \times 10^{-4}$	0,18	35,6	49,3 \pm 4,5
249	4	$1,65 \times 10^{-4}$	0,10	63,7	43,5 \pm 4,2
	20	$8,40 \times 10^{-5}$	0,14	51,9	43,7 \pm 4,0
	37	$3,18 \times 10^{-4}$	0,15	40,6	43,2 \pm 4,0
249(1)	4	$1,82 \times 10^{-4}$	0,15	43,9	45,2 \pm 4,1
	20	$1,72 \times 10^{-4}$	0,19	36,6	42,8 \pm 3,4
	37	$4,42 \times 10^{-4}$	0,13	42,7	42,0 \pm 4,2
285	4	$5,80 \times 10^{-6}$	0,13	74,1	42,8 \pm 3,8
	20	$2,70 \times 10^{-5}$	0,13	66,0	43,5 \pm 3,9
	37	$2,13 \times 10^{-4}$	0,20	34,2	40,7 \pm 3,7
285(1)	4	0	0,17	360*	46,1 \pm 4,2
	20	$6,82 \times 10^{-5}$	0,16	48,7	46,5 \pm 4,2
	37	$3,31 \times 10^{-4}$	0,16	37,5	44,7 \pm 4,2
RSL	4	$1,60 \times 10^{-5}$	0,22	42,2	43,0 \pm 3,7
	20	$2,72 \times 10^{-5}$	0,17	51,5	45,6 \pm 4,6
	37	$2,58 \times 10^{-4}$	0,23	29,7	43,1 \pm 3,9

Obs. - Foram empregados os valores de t_{max} experimentais (*) quando o parâmetro $K_{1,0}$ apresentou valor igual a zero, não sendo possível o cálculo matemático do valor de t_{max} teórico.

Tabela 18 - Resultados da análise estatística dos valores da percentagem de ligação máxima teórica dos antissoros, determinados a temperatura de quatro, 20 e 37°C.

Temperatura (°C)	Antissoro										
	146	163	163(1)	163(2)	163(3)	163(4)	249	249(1)	285	285(1)	ISL
	(Y _{max} ± sY _{max})										
4	41,0±3,5	47,0±6,5	53,0±4,7	54,8±4,7	55,1±5,0	53,5±4,7	43,5±4,2	45,2±4,1	42,0±3,8	46,1±4,2	43,0±3,7
20	41,7±3,7	46,1±4,1	51,0±5,2	53,9±4,8	54,7±4,9	53,6±4,8	43,7±4,0	42,8±3,4	43,5±3,9	46,5±4,2	45,6±4,6
37	37,9±3,4	43,7±4,5	52,7±5,0	52,0±4,8	52,7±5,6	49,3±4,5	43,2±4,0	42,0±4,2	40,7±3,7	44,7±4,2	43,1±3,9
4 versus 20	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4 versus 37	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20 versus 37	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS - diferença não significativa ao nível de $P \leq 0,05$.

Tabela 19 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro 148.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	38,70 \pm 1,38	38,94 \pm 1,12	40,43 \pm 0,56	41,52 \pm 0,72	40,89 \pm 0,15	44,57 \pm 0,83	41,12 \pm 0,52	42,46 \pm 0,36
20	37,50 \pm 1,43	38,36 \pm 0,47	41,31 \pm 0,70	42,18 \pm 0,74	40,70 \pm 0,31	41,87 \pm 0,91	43,91 \pm 1,03	42,28 \pm 0,09
37	35,56 \pm 0,97	38,02 \pm 1,69	38,64 \pm 0,26	39,18 \pm 0,12	36,41 \pm 0,76	37,57 \pm 0,40	35,94 \pm 0,78	38,92 \pm 2,50
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 20 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro 183.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	35,16 \pm 3,97	40,99 \pm 2,50	44,65 \pm 0,26	42,77 \pm 1,75	45,88 \pm 1,03	49,77 \pm 0,97	50,08 \pm 1,81	50,06 \pm 1,35
20	43,67 \pm 4,39	43,22 \pm 3,31	43,68 \pm 1,83	45,51 \pm 1,56	47,57 \pm 0,14	48,81 \pm 1,72	46,42 \pm 0,41	47,21 \pm 1,34
37	37,02 \pm 1,92	36,24 \pm 2,85	43,19 \pm 1,18	44,72 \pm 0,22	44,25 \pm 0,84	45,55 \pm 1,08	42,06 \pm 0,20	43,05 \pm 0,84
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS	< 0,05	< 0,05

NS - Não significativo para $p < 0,05$.

Tabela 21 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas da cinética da reação do antissoro 1B3(1).

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
Porcentagem de ligação (M \pm DP)								
4	53,54 \pm 2,78	50,85 \pm 0,88	55,34 \pm 1,43	52,14 \pm 0,78	51,73 \pm 0,50	53,96 \pm 0,54	55,26 \pm 2,09	54,51 \pm 1,48
20	53,04 \pm 0,68	49,81 \pm 1,13	53,78 \pm 2,65	48,42 \pm 5,16	54,93 \pm 1,71	53,62 \pm 0,77	48,93 \pm 2,40	51,47 \pm 1,43
37	51,41 \pm 0,06	55,53 \pm 1,66	51,19 \pm 2,20	51,37 \pm 0,29	52,13 \pm 0,54	50,00 \pm 0,45	51,26 \pm 0,15	47,93 \pm 0,99
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05	NS	NS	NS	< 0,05	NS	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05	NS	NS	NS	< 0,05	NS	NS

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 22 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas da cinética da reação do antissoro 103(2).

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	53,58 \pm 1,08	54,16 \pm 0,57	55,79 \pm 1,18	54,65 \pm 0,55	53,71 \pm 0,62	55,32 \pm 0,93	54,90 \pm 0,45	54,67 \pm 1,28
20	53,35 \pm 0,85	53,46 \pm 0,71	54,50 \pm 0,20	53,28 \pm 0,67	54,55 \pm 1,41	54,23 \pm 0,62	51,90 \pm 0,53	52,35 \pm 0,58
37	51,78 \pm 1,92	54,65 \pm 0,82	51,79 \pm 0,81	50,52 \pm 0,73	49,84 \pm 1,71	49,34 \pm 0,60	50,00 \pm 1,30	47,59 \pm 2,12
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	< 0,05	< 0,05	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS	< 0,05

NS - Não significativo para $p < 0,05$.

Tabela 23 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro 183(3).

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	52,63 \pm 0,45	54,57 \pm 1,27	52,55 \pm 1,56	54,10 \pm 3,63	58,87 \pm 0,32	55,74 \pm 0,49	54,84 \pm 1,05	51,96 \pm 0,83
20	51,87 \pm 1,88	56,27 \pm 1,13	53,80 \pm 0,64	55,39 \pm 0,92	51,93 \pm 0,56	54,19 \pm 0,73	55,93 \pm 1,31	52,00 \pm 0,51
37	52,70 \pm 2,12	52,79 \pm 0,81	50,95 \pm 0,48	54,01 \pm 1,08	49,30 \pm 1,60	51,65 \pm 0,47	47,30 \pm 0,77	47,89 \pm 0,76
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS	NS	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 24 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro 183(4).

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	50,21 \pm 0,21	52,87 \pm 0,59	51,35 \pm 0,85	53,09 \pm 0,69	55,78 \pm 0,28	53,56 \pm 0,62	53,64 \pm 0,85	52,05 \pm 0,55
20	52,05 \pm 0,16	55,25 \pm 1,07	52,40 \pm 0,68	53,04 \pm 0,76	51,14 \pm 0,13	53,75 \pm 1,08	52,63 \pm 0,51	49,32 \pm 2,70
37	47,35 \pm 4,57	49,20 \pm 2,38	49,76 \pm 0,87	50,05 \pm 0,86	47,61 \pm 0,69	47,97 \pm 1,50	45,74 \pm 2,20	45,76 \pm 0,33
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS	NS	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 25 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas da cinética da reação do antissoro 249.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
Porcentagem de ligação (M \pm DP)								
4	37,28 \pm 1,06	36,87 \pm 3,56	40,54 \pm 2,00	40,44 \pm 0,68	45,57 \pm 1,56	44,99 \pm 0,65	45,45 \pm 1,39	44,01 \pm 1,25
20	40,14 \pm 1,47	41,33 \pm 0,76	43,48 \pm 0,60	39,34 \pm 0,37	44,94 \pm 1,61	44,17 \pm 1,57	40,81 \pm 0,68	42,31 \pm 0,30
37	40,53 \pm 0,51	41,05 \pm 1,45	37,37 \pm 5,71	44,38 \pm 0,73	44,30 \pm 0,89	41,78 \pm 1,55	39,72 \pm 1,01	38,92 \pm 0,41
4 VERSUS 20								
P	NS							
4 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05						
20 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05						

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 28 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro 249(1).

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	41,21 \pm 1,14	44,34 \pm 1,00	42,62 \pm 0,27	44,26 \pm 0,72	46,75 \pm 0,64	44,29 \pm 2,49	44,53 \pm 0,69	44,51 \pm 2,36
20	40,38 \pm 1,73	40,83 \pm 1,42	42,30 \pm 0,40	43,65 \pm 1,43	42,13 \pm 1,09	42,21 \pm 3,74	42,72 \pm 0,42	41,28 \pm 0,93
37	37,62 \pm 2,27	43,04 \pm 0,59	41,55 \pm 0,20	41,52 \pm 0,97	42,11 \pm 0,52	38,55 \pm 1,34	38,28 \pm 1,12	36,66 \pm 0,83
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS	NS	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05	< 0,05	NS	< 0,05	NS	< 0,05	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS

NS - Não significativo para $p < 0,05$.

Tabela 27 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética de reação do antissoro 285.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	38,49 \pm 3,00	41,22 \pm 1,51	43,54 \pm 0,62	41,01 \pm 0,91	41,96 \pm 0,58	44,20 \pm 0,74	43,81 \pm 0,74	43,15 \pm 1,45
20	39,17 \pm 1,09	39,38 \pm 1,14	43,57 \pm 0,78	43,24 \pm 0,56	45,10 \pm 0,84	44,76 \pm 0,41	43,15 \pm 0,31	43,21 \pm 1,03
37	39,49 \pm 2,32	39,15 \pm 1,16	41,56 \pm 0,63	40,91 \pm 0,77	40,38 \pm 0,45	40,08 \pm 0,68	38,23 \pm 0,75	37,96 \pm 0,77
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS	NS	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	NS
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 28 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro 285(1).

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	43,82 \pm 1,50	42,48 \pm 1,50	49,45 \pm 0,57	47,25 \pm 2,11	41,67 \pm 2,05	46,49 \pm 0,54	45,35 \pm 1,07	49,80 \pm 0,96
20	43,54 \pm 0,40	44,56 \pm 0,74	46,90 \pm 1,22	45,94 \pm 0,81	49,69 \pm 0,65	45,70 \pm 1,20	43,70 \pm 0,28	46,82 \pm 0,86
37	41,19 \pm 2,40	47,72 \pm 0,87	44,58 \pm 1,33	42,87 \pm 0,49	43,16 \pm 0,99	40,35 \pm 0,34	44,38 \pm 1,23	40,22 \pm 0,56
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	NS	NS	< 0,05
4 VERSUS 37								
P	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS	< 0,05	NS	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	NS	< 0,05

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 29 - Resultado da análise de variância dos pares de pontos (tempo versus porcentagem de ligação (média \pm DP)) das curvas de cinética da reação do antissoro RSL.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)							
	15	30	45	60	90	120	240	360
	Porcentagem de ligação (M \pm DP)							
4	41,99 \pm 0,59	41,63 \pm 0,62	42,03 \pm 1,16	43,18 \pm 0,52	42,33 \pm 1,06	43,63 \pm 1,46	43,83 \pm 1,43	44,16 \pm 1,27
20	43,03 \pm 2,32	44,00 \pm 2,35	45,30 \pm 0,36	45,49 \pm 0,98	45,19 \pm 0,95	46,44 \pm 0,21	45,68 \pm 0,81	46,32 \pm 1,39
37	42,39 \pm 0,78	42,19 \pm 1,13	44,02 \pm 0,75	43,02 \pm 0,47	42,32 \pm 0,35	41,76 \pm 0,46	40,80 \pm 0,60	39,29 \pm 1,12
4 VERSUS 20								
P	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS	NS
4 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05
20 VERSUS 37								
P	NS	NS	NS	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

NS - Não significativo para $p \leq 0,05$.

Tabela 30 - Valores médios das lições inespecíficas obtidos no estudo de cinética de precipitação dos antisseros produzidos e comercial (RSL).

Antissoro	Temperatura (°C)			P		
	4°C	20°C	37°C	4 x 20	4 x 37	20 x 37
148	8,08±0,83	8,84±0,88	5,80±0,45	< 0,05	< 0,05	< 0,05
183	4,77±0,84	4,43±0,37	3,98±0,55	NS	< 0,05	NS
183(1)	3,47±0,17	3,20±0,25	3,48±0,52	NS	NS	NS
183(2)	3,58±0,15	3,48±0,17	3,36±0,23	NS	NS	NS
183(3)	3,87±0,40	3,44±0,34	3,26±0,33	NS	NS	NS
183(4)	3,83±0,31	3,47±0,27	3,39±0,36	NS	NS	NS
248	4,81±0,35	4,38±0,81	5,07±0,82	NS	NS	NS
248(1)	5,13±0,21	5,11±0,15	5,14±0,55	NS	NS	NS
285	4,00±0,37	3,58±0,21	4,05±0,33	< 0,05	NS	< 0,05
285(1)	4,23±0,34	4,07±0,35	3,87±0,42	NS	NS	NS
RSL	4,08±0,18	4,52±0,57	4,31±0,58	NS	NS	NS

NS - Diferença não significativa ao nível de $P < 0,05$.

4.7. REAÇÃO CRUZADA COM A IGG HUMANA

A Figura 33 exibe o resultado obtido na imunodifusão, onde nenhuma linha de precipitação foi observada, indicando não haver reação cruzada entre a IgG humana e os antissoros produzidos e nem entre a IgG humana e aquele comercial.

4.8. ARMAZENAMENTO DOS ANTISSOROS PRODUZIDOS

Na Tabela 31 são expostos os valores das percentagens de ligação fornecidos pelos antissoros submetidos ao congelamento lento ou rápido, este último seguido de liofilização.

Seus valores médios diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) entre os antissoros avaliados antes e após a liofilização, indicando que este procedimento pode diminuir o título do antissoro. Os valores médios das percentagens de ligação dos antissoros congelados a -20°C e a -190°C não diferiram significativamente, sugerindo que as duas formas de congelamento, lento ou mais rápido podem ser empregadas.

A Figura 34 exibe as curvas de título das diferentes amostras dos antissoros que foram liofilizados, em comparação com aquelas dos mesmos antissoros não liofilizados.

Na Tabela 32 são expostos os resultados do ajuste dos pares de pontos das curvas de título desses antissoros liofilizados e não liofilizados, cujos valores de α e Y_{\max} não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$), indicando que qualquer uma das formas de estocagem analisada pode ser empregada.

Na Figura 35 pode-se observar as curvas de título dos antissoros 146 e 285 liofilizados, em comparação com os mesmos antissoros não liofilizados.

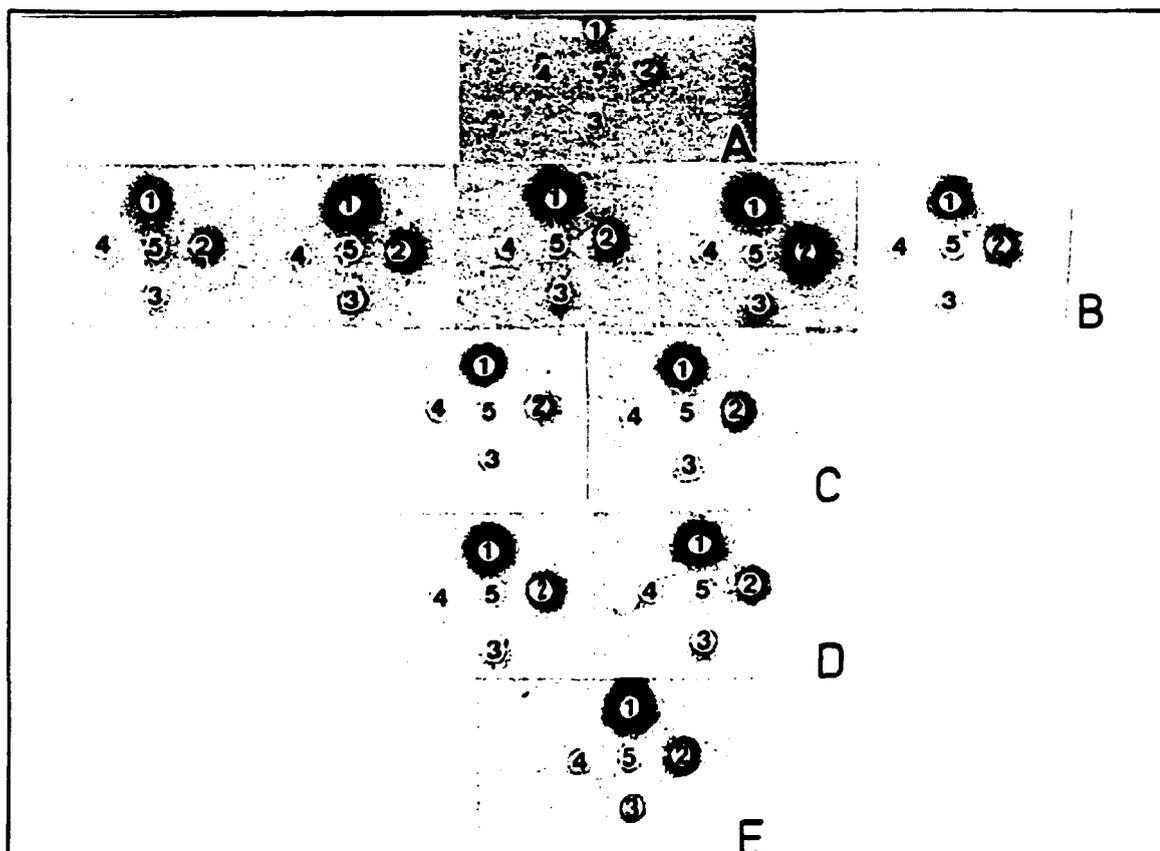


Figura 33 - Imunodifusão realizada com a IgG humana e os soros imunes anti-IgG de coelho: (A) antissoro 146, (B) da esquerda para a direita, antissoro 163, 163(1), 163(2), 163(3) e 163(4), (C) antissoro 249 e 249(1), (D) antissoro 285 e 285(1) e (E) antissoro RSL.

(1) antissoro diluído 1:1;

(2) antissoro diluído 1:2;

(3) antissoro diluído 1:4;

(4) antissoro diluído 1:8;

(5) IgG humana na concentração de 20 mg/ml.

Tabela 31 - Valores das percentagens de ligação máxima (B/T) obtidos no RIE de hTSH separado pelo antissoro submetido a três formas de tratamento:

- 1 - congelado a -20°C e não liofilizado.
- 2 - congelado a -190°C e não liofilizado.
- 3 - congelado a -190°C e liofilizado.

AMOSTRAS			

	1	2	3

	49,46	49,40	48,65
	52,47	52,18	49,25
	49,91	50,56	49,34
	53,53	49,84	49,59
	50,63	49,83	45,50
	53,33	50,94	49,49
	50,65	40,41	49,42
	51,22	51,11	47,92
	49,70	51,98	47,07
	52,19	49,68	49,17
	52,07	49,75	49,44
	52,59	51,08	48,65
	50,56	51,07	47,29
	51,90	49,20	49,80
	51,41	51,23	48,27
	50,68	50,49	49,80
	50,03	50,88	48,36
	49,32	54,26	47,67
	49,88	50,45	47,51

MÉDIA	51,133	50,702	48,536
DP	± 1,303	± 1,213	± 1,451

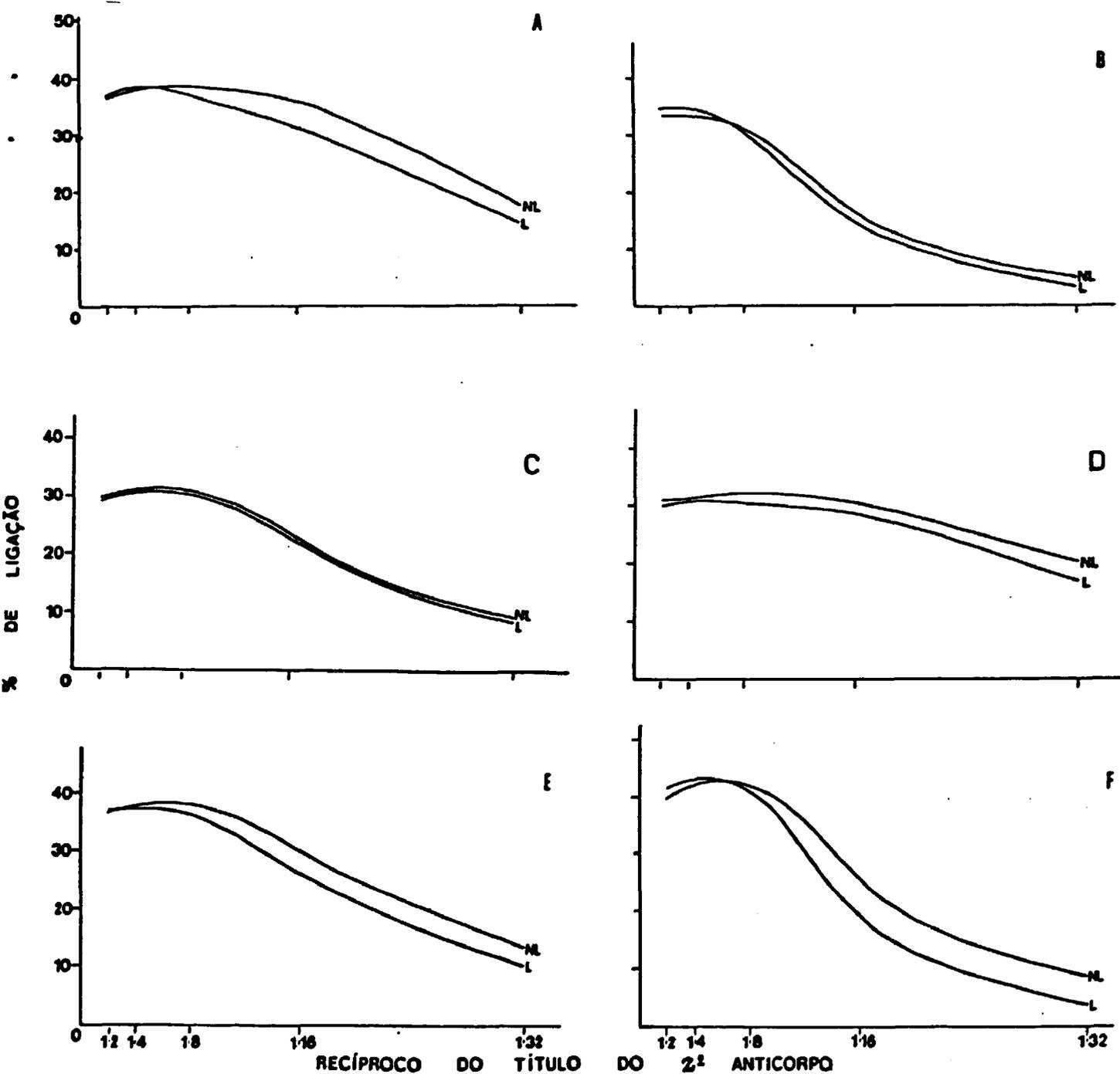


Figura 34 - Curvas de título fornecidas pelas várias amostras de antissoro (A a F) que foram liofilizadas (L) ou não (NL), após congelamento a -20°C ou a -190°C em volumes crescentes (de cima para baixo), em frascos de 25 ml (à esquerda), ou de 30 ml (à direita), conforme especificado na tabela 6.

Tabela 32 - Valores de α e Y_{\max} obtidos no ajuste dos pontos das curvas dos antissoros (A a F) não liofilizados e liofilizados. São também indicados na tabela os resultados da análise estatística desses valores.

AMOSTRA	NÃO LIOFILIZADO		LIOFILIZADO		P
	α (AFINIDADE)	Y_{\max} (B/T)	α (AFINIDADE)	Y_{\max} (B/T)	
A	27,02±6,86	38,72±2,43	21,34±4,39	38,51±2,17	NS
B	10,93±3,49	35,47±3,91	9,09±2,88	37,46±4,34	NS
C	35,93±4,79	31,69±0,89	29,88±4,93	30,94±1,20	NS
D	18,16±4,92	31,43±2,48	17,13±4,81	30,79±4,81	NS
E	19,65±4,40	38,65±2,45	16,26±3,55	38,32±2,53	NS
F	14,47±4,67	42,76±4,34	10,55±4,49	44,84±6,65	NS

NS - Não significativo para $P \leq 0,05$.

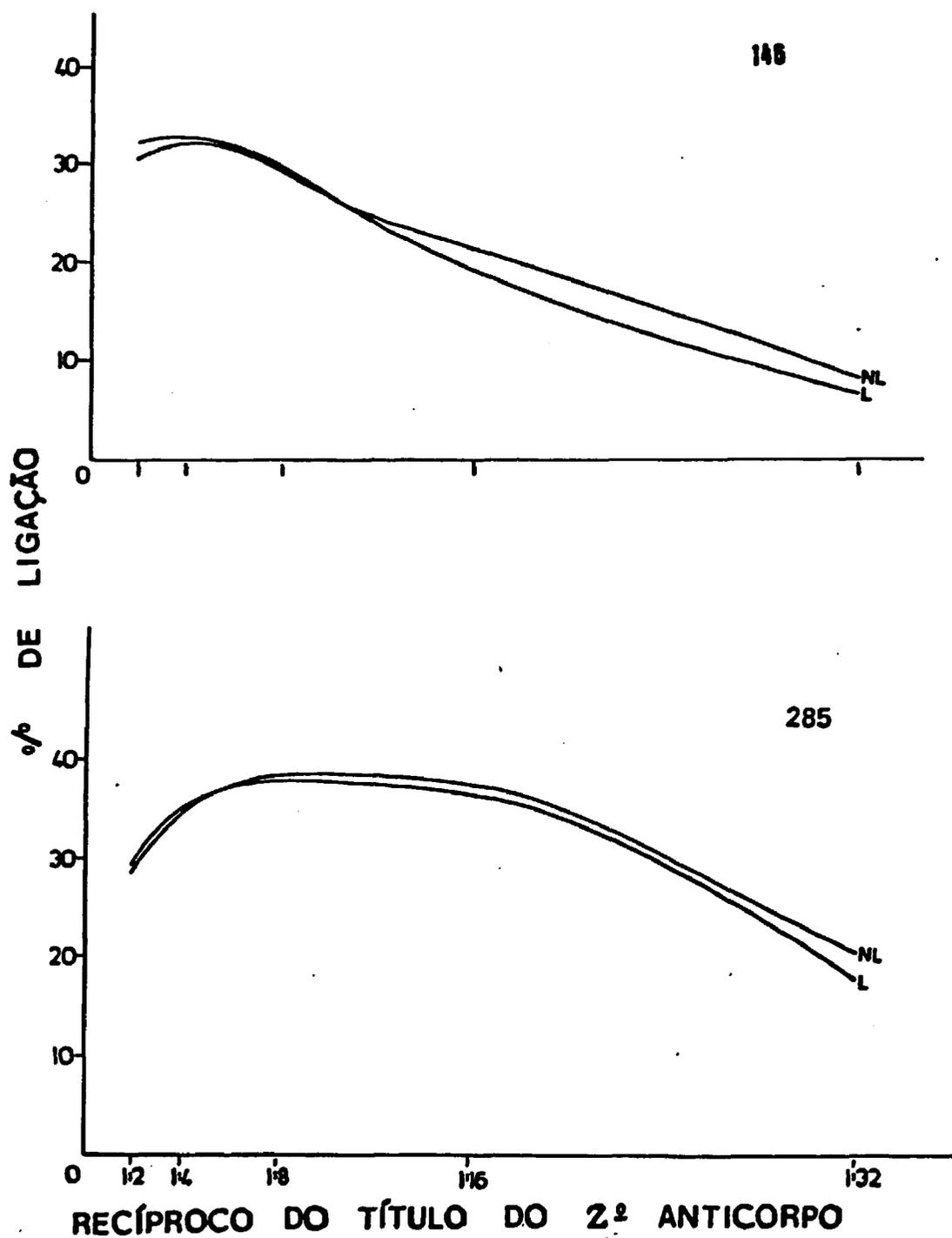


Figura 35 - Curvas de título dos antissoros 146 e 285, que foram armazenados tanto na forma liofilizada (L) como não liofilizada (NL).

A Tabela 33 apresenta os valores dos parâmetros determinados pelo ajuste dessas curvas e o resultado do tratamento estatístico desses valores.

Pelos resultados obtidos nesse estudo da armazenagem dos antissoros observou-se não haver diferença significativa entre as formas liofilizada e não liofilizada, bem como entre as formas de congelamento lento e rápido.

Em seguida a essas análises, todos os antissoros produzidos foram acondicionados em volume de 20 ml, em frascos com capacidade de 30 ml e congelados rapidamente a -190°C .

Aqueles lotes de antissoros de menor volume (163, 249 e 285(1)) foram mantidos nessa forma, sendo armazenados em congelador a -40°C . Parte daqueles antissoros de maior volume (146 e 285) foi liofilizada, antes de ser mantida nas mesmas condições.

A Figura 36 apresenta a fotografia dos frascos de antissoros armazenados na formas liofilizada e congelada.

Tabela 33 - Valores de α e Y_{\max} obtidos no ajuste dos pontos das curvas de título dos antissoros 146 e 285, não liofilizados e liofilizados. São também indicados na tabela os resultados da análise estatística desses valores.

ANTISSORO	NÃO LIOFILIZADO		LIOFILIZADO		P
	α (AFINIDADE)	Y_{\max} (B/T)	α (AFINIDADE)	Y_{\max} (B/T)	
146	15,31±3,13	32,34±2,05	12,52±3,04	33,47±2,68	NS
285	30,02±18,46	34,68±3,45	32,87±14,77	34,89±3,51	NS

NS - Não significativo para $P \leq 0,05$.

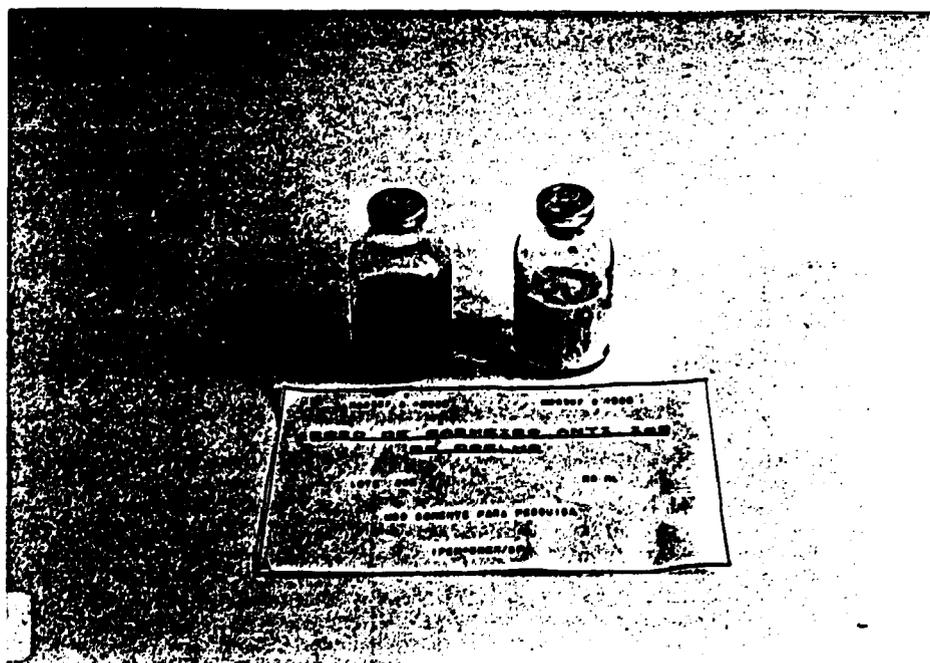


Figura 36 - Fotografia dos frascos dos antissoros produzidos, armazenados na forma congelada (à esquerda) e liofilizada (à direita).

5 - DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DA IGG DE COELHOS

As imunoglobulinas são proteínas séricas secretadas por linfócitos ativados e constituem um grupo de moléculas heterogêneas em termos de carga, massa e atividade biológica. Essas proteínas representam as globulinas mais básicas do soro. Elas possuem mobilidade eletroforética lenta e sua solubilidade, aliada ao seu ponto isoelétrico relativamente alto, servem de base para a maioria das técnicas de separação das imunoglobulinas (21).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para sua purificação, dependendo do objetivo e do grau de pureza desejados. Vários métodos são usualmente empregados, compreendendo o fracionamento com etanol, a precipitação com concentração elevada de sais neutros, a formação de complexos protéicos insolúveis, a formação de complexos antígeno-anticorpo (21) e a separação pela adição de ácidos graxos (78). Os métodos não específicos, baseados nas propriedades físico-químicas dessas proteínas, são os mais utilizados devido a sua praticidade.

O procedimento de precipitação com sais neutros apresenta algumas vantagens sobre os demais, com exceção da separação pela adição de ácidos graxos, pois além desta técnica ser bastante simples, o risco de denaturação das imunoglobulinas é pequeno (21).

No presente trabalho, empregou-se o método de precipitação com sulfato de sódio seguida de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, pelo fato de seus reagentes estarem disponíveis nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP e pela experiência bem sucedida de trabalho anterior realizado nesses laboratórios (11).

Para o isolamento da IgG empregou-se uma mistura de soro de

coelhos, cuja normalidade foi comprovada pela determinação da concentração de proteínas totais nas diferentes amostras de soro. Esses valores, com concentração média de $6,94 \pm 0,63$ g% (Tabela 7), apresentaram-se compatíveis com o padrão de normalidade para coelhos descrito na literatura (48), com intervalo de 6,00 a 8,30 g%.

A mistura de soro de coelhos empregada (802 ml) forneceu 55,2 g de proteínas totais. Após precipitação do soro com sulfato de sódio obtiveram 3,5 g de proteínas, correspondendo a um rendimento de apenas 6,34% (Tabela 8). Este valor poderia ser explicado pelo tipo de sal neutro utilizado na precipitação, visto que Higuchi e cols. (36), empregando sulfato de amônio, obtiveram rendimento da ordem de 30%.

Outro fator que pode ter contribuído para este rendimento baixo foi a cristalização do sal observada durante as centrifugações realizadas a 4°C, provavelmente devido ao fato deste sal ser menos solúvel a baixas temperaturas (21, 40). A obtenção de rendimento da ordem de 25% em purificação anterior (dados não publicados), quando as centrifugações foram realizadas a temperatura ambiente (11), corrobora essa suspeita.

Após a purificação em DEAE-celulose (Figura 6), as frações que foram reunidas, correspondentes aos picos protéicos obtidos nas duas cromatografias, prévia e posterior, apresentaram respectivamente 0,2 e 1,3 g de IgG, fornecendo valores de recuperação similares; 40 e 43% respectivamente. Entretanto, Higuchi e cols. (36) obtiveram nessa mesma cromatografia recuperação duas vezes maior (83%). Obteve-se, portanto, nas duas purificações uma quantia total de 1,5 g de IgG, que correspondeu a um rendimento de 2,71% (Tabela 8).

Após a reprecipitação com sulfato de sódio, a recuperação

obtida foi novamente muito muito próxima para as duas purificações; 55 e 66% para as purificações previa e ulterior, respectivamente. Nessa etapa obteve-se nas duas purificações um total de 0,97 g de proteína, correspondendo a um rendimento de 1,75% (Tabela 8).

Durante a concentração final da solução de IgG resultante das duas purificações, ocorreu uma pequena perda de material, obtendo-se 0,85 g de proteína em 80 ml de solução, que correspondeu a um rendimento final apreciável, de 1,54%. Relatos da literatura que empregam procedimentos relacionados, referem-se a rendimentos finais que vão de 0,42 a 10,0% a partir do soro total (36, 37, 60, 78).

Com a finalidade de avaliar a pureza da IgG isolada, realizou-se uma análise imunoeletroforética do material obtido. Essa técnica é amplamente empregada e na sua forma mais simples, consiste de uma separação eletroforética seguida de uma imunodifusão.

A imunoeletroforese da IgG obtida nas duas purificações apresentou padrão similar, revelando, frente ao soro de carneiro anti-soro total de coelho, uma única linha de precipitação com mobilidade eletroforética de IgG, indicando serem preparações de pureza elevada (Figura 7).

Em purificação de IgG de coelho realizada anteriormente nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP, empregando-se a mesma metodologia, obteve-se uma preparação igualmente pura (11).

O resultado da EGPA a 7% da IgG obtida nas duas purificações revelou uma banda principal (Figura 8), confirmando sua pureza. Higuchi e cols. (36) obtiveram resultados similares desenvolvendo a EGPA a 12,5%.

As 850 mg de IgG resultantes no final do processo de purificação foram mantidas em solução congelada. Inicialmente, elas

foram armazenadas durante 6 meses a -20°C , sendo posteriormente transferidas para um congelador a -80°C .

Evitou-se a estocagem da IgG na forma liofilizada, pois a liofilização usualmente causa alguma agregação quando a IgG é reconstituída (46).

5.2. OBTENÇÃO DO SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COELHO

5.2.1. ANIMAIS

Diz-se frequentemente que a produção de antissoros é mais uma arte do que ciência (45) e vários métodos têm sido empregados na tentativa de se obter antissoros adequados. Entretanto, numerosos fatores podem influenciar o provável sucesso dessa produção, desde a imunogenicidade do antígeno e a espécie animal imunizada até o emprego ou não de adjuvantes.

A escolha da espécie animal para a produção de um segundo anticorpo para RIE é determinada por dois fatores:

- Como o primeiro anticorpo do RIE é gerado em cobaias, coelhos, cabras ou carneiros, para a produção do segundo anticorpo são necessários animais de outras espécies.

- Esses antissoros precipitantes possuem normalmente títulos baixos, requerendo diluições menores do que 1:50, o que implica na necessidade de se obter grandes volumes de antissoro e conseqüentemente, no emprego de animais de porte médio ou grande. Portanto, são empregados usualmente para tal finalidade animais como burros, carneiros, e cabras (15, 16, 19, 25, 36, 47, 59, 61, 79).

Dessa forma alguns autores produziram segundo anticorpo para RIE em carneiros e cabras contra a IgG de coelho (15, 16, 19,

36, 47, 59, 61, 79), enquanto que outros prepararam esses anticorpos em burros contra a IgG de carneiro ou de coelho (19, 25).

Entretanto, outros autores que produziram o primeiro anticorpo para RIE em cobaias prepararam o antissoro precipitante em coelhos (18, 34, 57, 58).

Para que um animal apresente uma boa resposta imunológica contra um determinado antígeno é fundamental que ele seja mantido em um alojamento adequado, evitando o risco de contaminações durante o procedimento experimental. Qualquer contaminação ambiental pode ocasionar a perda da especificidade e um decréscimo no título de seus antissoros.

Além disso, os animais devem apresentar estado de saúde normal, sem quaisquer alterações no quadro sanguíneo ou parasitoses, que podem influenciar a obtenção dos anticorpos.

Isto pode ser comprovado pela análise da Figura 10, onde se verifica que os animais que foram submetidos ao tratamento de parasitas intestinais antes de serem imunizados (146 e 163), apresentaram uma resposta mais tardia na indução de anticorpos (após a 4ª injeção de reforço).

Observa-se nessa mesma figura que o ovino 146 também apresentou uma queda no título de seu antissoro após a intervenção cirúrgica a que foi submetido para a extração do cálculo uretral (após a 8ª injeção de reforço), embora o exame das proteínas totais e o hemograma tenham se apresentado normais.

5.2.2. ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

O esquema de imunização também é muito importante na produção de antissoros adequados. Escolheu-se o método de imunização que emprega doses pequenas do imunógeno, inoculado em sítios múltiplos, devido a correlação inversa que existe entre a dose do antígeno e a afinidade do anticorpo produzido.

Além disso, pequenas doses de imunógeno são desejadas para se obter antissoros com títulos elevados. Esse efeito foi reportado por Vaitukaitis e cols. (80) em 1971 quando produziram antissoros para hormônios peptídicos e esteróidicos com títulos altos, ministrando doses pequenas do imunógeno, emulsificado em adjuvante de Freund, em 30 à 50 sítios intradérmicos de coelhos.

Chapaman e cols. (19) e Kakabakos e cols. (47) também se referem a produção de antissoros precipitantes para RIE empregando doses pequenas de imunógeno, 100 ug e 500 ug, respectivamente. Eles inocularam a IgG de coelho em sítios múltiplos intramusculares ou subcutâneos de burros (19) e em cinco sítios, sendo um intraperitoneal, dois na região do maxilar e dois na região inguinal de carneiros (47).

Entretanto, outros autores empregaram quantidades maiores do imunógeno (IgG de coelho) na produção desses antissoros em carneiros: dois miligramas administrados na região paraesternal na imunização primária e seis mg nas imunizações de reforço (11), 6,5 mg inoculados na cauda do animal (36) e ainda 1,5 mg inoculados em quatro sítios intramusculares (59).

Outro fator que aumenta a resposta do sistema imunitário na produção de antissoros é o emprego de AFC, o qual contém bacilos da tuberculose mortos, e quando injetado juntamente com o imunógeno

potencia a resposta do organismo contra ele. Esse aumento da resposta pelo sistema imune é devido as seguintes formas de atuação do AFC (45):

- a) Retarda a absorção do antígeno no local da injeção, evitando desse modo a rápida degradação do imunógeno pelas enzimas proteolíticas circulantes;
- b) Facilita a fagocitose do imunógeno pelos macrófagos, que é uma etapa inicial essencial para produção de anticorpos;
- c) Origina a formação local de lesão granulomatosa, que pode agir como foco de formação de anticorpos;
- d) Causa estímulo tanto local quanto geral do sistema retículoendotelial, com multiplicação de macrófagos e de células linfóides imunologicamente ativas.

Enquanto muitos autores empregaram o AFC apenas na imunização primária (18, 19, 34, 59, 61), Kakabakos e cols. (47) o utilizaram em todas as imunizações de carneiros para a produção de antissoro anti-IgG de coelho, realizando injeções mensais. Portanto, devido as suas características, empregou-se nesse trabalho o AFC em todas as imunizações.

Uma pausa na imunização após as sangrias maiores é favorável para a reabilitação dos animais, principalmente daqueles que são imunizados por períodos longos. Para alguns animais essa pausa acentua o título enquanto que em outros não altera o título do antissoro que está sendo produzido. Esse efeito já havia sido verificado por Chapman e colaboradores (19) em jumentos imunizados com IgG de coelho, após permanecerem algumas semanas em repouso depois da sangria de volumes maiores.

Entretanto neste trabalho, os títulos dos antissoros produzidos não sofreram muitas alterações após os dois períodos de descanso aos quais os animais foram submetidos (Figura 10).

5.2.3. RADIOIMUNOENSAIO DO hTSH

Empregou-se neste trabalho o RIE do TSH visando a avaliação dos diferentes antissoros anti-IgG de coelho produzidos nos quatro ovinos, em comparação com o produto comercial de qualidade conhecida, por ser um ensaio que se utiliza de antissoro anti-hTSH de coelho e por ter sido amplamente empregado nos estudos conduzidos nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP (4, 11, 13, 14, 31, 51).

O hTSH foi radioiodado pelo método clássico da oxidação pela Cloramina T pois além de ser universalmente utilizado, seus procedimentos são simples e rápidos.

A purificação do ^{125}I -hTSH em cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 foi eficiente para separar o traçador dos possíveis agregados de peso molecular elevado e do ^{125}I livre, resultando em traçadores de pureza adequada. Além disso, tal purificação possibilitou a determinação do rendimento das radioiodações e da atividade específica dos traçadores (Tabela 9).

Os valores de coeficiente de distribuição (K_d) obtidos neste trabalho mostraram-se compatíveis com aqueles obtidos em trabalhos realizados anteriormente nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP (50, 68). Esses resultados indicam a adequação desse critério escolhido para identificar o pico correspondente ao ^{125}I -hTSH puro.

Embora dados da literatura (31, 42, 50) refiram-se ao armazenamento do ^{125}I -hTSH por aproximadamente 60 dias para uso no RIE, empregou-se neste trabalho, o ^{125}I -hTSH por um período de até 90 dias.

Com os traçadores obtidos neste trabalho, determinou-se a ótima diluição do primeiro anticorpo, empregado no RIE para a ava-

liação dos segundos anticorpos produzidos nos carneiros, em comparação com aquele importado.

3.2.4. AVALIAÇÃO DOS ANTÍSSOROS DE CARNEIRO ANTI-IGG DE COELHO

Pelos resultados obtidos na produção dos duplos anticorpos, observa-se que os animais desenvolveram antíssoros com títulos diferentes após as diversas injeções de reforço. Esse efeito depende da própria resposta imune do animal, sendo independente ao esquema de imunização.

Observa-se também, que em algumas das sangrias maiores os antíssoros tiveram seus títulos diminuídos, não sendo possível detectar qual a causa deste efeito aleatório. Inclusive, o antíssoro obtido na segunda sangria de grandes volumes do ovino 146, perdeu completamente o seu título, provavelmente devido a urolitíase causada pela alimentação exclusiva com ração.

Analisando-se os resultados comparativos da determinação dos títulos dos antíssoros pela imunodifusão e pelo RIE observa-se que o título desses antíssoros, usualmente determinado pelo RIE, também pode ser determinado pela intensidade da linha de precipitação formada entre o antígeno e o anticorpo.

Portanto, a evolução do título dos antíssoros poderia ser acompanhada pela imunodifusão, enquanto que o RIE seria empregado na determinação do título definitivo dos antíssoros obtidos nas sangrias maiores.

A grande vantagem de se empregar a imunodifusão seria a praticidade do método. Além disso, esse método descrito há 30 anos (62), é amplamente utilizado, pois permite a comparação simultânea de muitos sistemas antígeno-anticorpo, em uma mesma análise.

Foram obtidos neste trabalho, -imuno-soros precipitantes do RIE que apresentaram títulos superiores a um antissoro preparado anteriormente nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP (11) e até mesmo superiores ao do antissoro de referência da RSL (64).

Pela análise dos resultados obtidos nas características de precipitação dos duplos anticorpos, observa-se que a maioria dos antissoros apresentou títulos mais altos na presença de concentrações maiores de SCN (diluição de 1:100), tal como ocorreu com o antissoro de referência da RSL. Altas concentrações de soro carreador não imune são preferíveis para manter um platô de precipitação seguro, visto que uma maior massa de precipitado auxilia na separação das frações livre e ligada (69).

Outros autores empregando o mesmo método de separação para o RIE citam diluições de SCN que vão desde 1:100 até 1:400 (5, 18, 54, 56, 57, 58, 76).

Os resultados do estudo da cinética de precipitação dos antissoros produzidos sugerem que eles podem ser empregados na separação de RIEs, necessitando de um tempo mínimo de incubação de uma hora, independentemente da temperatura, quer seja quatro, 20 ou 37°C.

Resultados similares foram encontrados com o antissoro RSL, que conforme recomendado pelo seu fabricante (64), apresentou a precipitação máxima quando incubado por aproximadamente uma hora (45 minutos) à temperatura ambiente.

Embora a análise de variância dos pares de pontos das curvas da cinética de reação de todos os antissoros, tenham apresentado curvas diferentes para as três temperaturas estudadas, sugere-se que a temperatura ideal de incubação desses antissoros no RIE seria de 20°C. Além disso, essa temperatura de incubação é condizente com aquela especificada pela RSL (64), ou seja, à temperatura ambiente.

A diminuição da capacidade de ligação observada quando os antissoros foram incubados sob temperatura mais alta, 37°C (Tabela 17), deve ser devida a dissociação do complexo antígeno-primeiro anticorpo, efeito esse também observado por outros autores (8, 57). Entretanto, os antissoros de burros anti-IgG de carneiro e de cabra, produzidos por Chapman e cols. (19) apresentaram no RIE uma precipitação maior com o aumento da temperatura de quatro para 37°C, atingindo porém, a precipitação máxima somente após 2,5 horas de incubação.

Quando compararam-se os valores médios das ligações inespecíficas obtidos no estudo da cinética de precipitação, observou-se não haver diferença significativa entre as temperaturas de quatro 20 e 37°C, para a maioria dos antissoros, incluindo aquele comercial. Entretanto, observou-se diferença significativa entre as três temperaturas para o antissoros 146, entre as temperaturas de quatro e 37°C para o antissoros 163 e entre as temperaturas de quatro e 20°C e 20 e 37°C para o antissoros 285.

Os resultados obtidos na determinação da reação cruzada com a IgG humana indicam que, embora as moléculas de IgG de vertebrados apresentem pequenas variações entre si (17) não houve reação dos duplos anticorpos produzidos neste trabalho com a IgG humana. Isso sugere que esses antissoros podem ser empregados na separação de RIEs sem haver ligação inespecífica com a IgG presente no soro humano.

A partir dos resultados obtidos no estudo do armazenamento dos antissoros eles foram mantidos tanto liofilizados como apenas congelados, porém sendo congelados rapidamente. Relatos da literatura mencionam que o congelamento rápido é preferível para manter o antissoros inalterado e que a estocagem na forma liofilizada é ideal

para preservar sua integridade por períodos longos (49). Além disso, a estocagem na forma liofilizada é preferível para o transporte desse tipo de material biológico.

Embora nos países desenvolvidos os métodos radioimunológicos já tenham sido substituídos por métodos não isotópicos, nos países em desenvolvimento como o Brasil, o RIE ainda é utilizado e é esperado, nesses países em desenvolvimento, que ele tenha uma vida longa (63).

O método de separação do RIE pelo duplo anticorpo é muito empregado devido ao fato dele se ligar especificamente ao primeiro anticorpo, apresentando ligação inespecífica baixa. Tanto os anticorpos produzidos neste trabalho como aquele importado apresentaram ligação inespecífica da ordem de 3%. Além disso, em estudos recentes foram obtidos resultados similares e até mais precisos e sensíveis pela separação do RIE com o duplo anticorpo assistido pelo PEG, em comparação com primeiros anticorpos em fase sólida magnetizável (4, 26).

O duplo anticorpo produzido neste trabalho além de poder ser empregado com PEG, já foi acoplado à partículas magnéticas e utilizado na separação do RIE de hTSH com ótimos resultados (4).

Assim como o Brasil, outros países em desenvolvimento como o Uruguai e ainda países subdesenvolvidos como Cuba e Bolívia, também têm produzido o segundo anticorpo localmente a fim de substituir as importações (6, 18, 73).

A produção em maior escala deste segundo anticorpo, genuinamente nacional, pelos laboratórios do IPEN-CNEN/SP seria perfeitamente ezequível, necessitando apenas da ampliação do Biotério da Instituição, com instalação de um local para alojamento e manuseio de animais de porte médio.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 1 - Foi possível reproduzir um procedimento eficiente para a purificação da IgG de coelho baseado na precipitação com sal neutro, seguida de cromatografia de troca iônica.
- 2 - A IgG assim purificada apresentou grau de pureza elevado e foi muito adequada para a indução de anticorpos específicos.
- 3 - Obteve-se IgG purificada em quantidade suficiente para a imunização de centenas de carneiros a serem utilizados na produção de um segundo anticorpo para radioimunoensaio.
- 4 - A IgG obtida foi acondicionada apropriadamente, de forma a permitir sua utilização na obtenção de anticorpos por um período longo.
- 5 - Os ovinos procedentes do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura de São Paulo, bem como o protocolo de imunização empregado, mostraram-se muito apropriados para a produção de imuno-soro contra a IgG de coelho.
- 6 - A alimentação à base de verde é fundamental para a preservação da saúde dos ovinos, devendo-se evitar o fornecimento exclusivo de ração.
- 7 - Pelo menos quatro injeções de reforço foram necessárias para produzir boa resposta nos animais.

- 8 - Os imuno-soros dos carneiros apresentaram características de precipitação similares aquelas exibidas pelo anticorpo importado (RSL), revelando até títulos superiores, sendo portanto tão adequados quanto o anticorpo comercial para serem empregados na separação do RIE.

 - 9 - Os antissoros foram armazenados apropriadamente, de forma a permitir seu emprego por um período longo e seu eventual transporte.

 - 10 - Criou-se experiência suficiente para a produção deste reagente biológico do RIE, que poderá ser efetuada integralmente no país, em maior escala.
-

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABBOTT LABORATORIES, Diagnostics Division. Operator's Manual, ANSR Gamma Counter, Chicago, Diagnostics Division, 1981, p.5.
- 2 - ADDISON, G.M. & HALES, C.N. The immunoradiometric assay. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1971. p. 447-61.
- 3 - AGAPEJEV, S.; MEIRA, D.A.; BARRAVIERA, B.; MACHADO M.; PEREIRA, P.C.M.; MENDES, R.P.; KEMEGASAWA, A; CURI, P.R. Neurocysticercosis: treatment with albendazole and dextrochloropheniramine. In: ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Science and Technology: 4th Japan-Brazil symposium on... held in São Paulo, 06-10 August, 1984. São Paulo, 1984. v.2, p. 224-9.
- 4 - ARAÚJO, E.A. Separação de radioimunoensaios em fase magnética, com partículas preparadas no IPEN e sua comparação com as metodologias convencionais. São Paulo, 1981 (Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 5 - ARRANZ, C. & GONZÁLEZ, R. Utilizacion de un metodo rapido para la separacion de la hormona libre y unida en el radioimunoensayo de insulina. Rev. Cubana Invest. Biomed. 7(3):150-6, 1988.

- 6 - BALTER, H.; ROBLES, A.; AZNAREZ, A.; SOUTO, B.; LANZZERI, S. MARTÍNEZ, E.; BARCÍA, S.; OLIVER, P.; GIAMBRUNO, G.; JIMÉNEZ, J.; TOUYÁ, E. TSH Neonatal: Estudio comparativo de RIA e IRMA. Rev. Esp. Med. Nucl., 11(1):79, 1992.
 - 7 - BERSON, S.E. & YALOW, R.S. Kinetics of reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest., 36: 873-4, 1957.
 - 8 - BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest., 38:1996-2016, 1959.
 - 9 - BEVINGTON, P.R. Data reduction and error analysis for the physical sciences. Berkeley, Ca., Macgraw Hill. 1969. p. 204-42.
 - 10 - BORGHI, V.C. Dosagens hormonais *in vitro* com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. Cienc. Cult., 35 (10):1456-66, 1982.
 - 11 - BORGHI, V.C. Contribuição ao conhecimento das alterações do eixo hipotálamo-hipófise-tireóideo na hipoproteïnemia experimental em ratos Wistar Albinos (*Rattus norvegicus albinus*). São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).
-

- 12 - BORGHI, V.C. & BARTOLINI, P. Desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos: In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e metabologia: Anais do 17 Congresso de ... realizado em Olinda, 7 - 12 de setembro, 1986. Recife, 1986. p.59.
- 13 - BORGHI, V.C.; BOJARCZUK, C.; NICOLAU, W.; PIERONI, R.R. Montagem e padronização do método de radioimunoensaio para a dosagem de tireotrofina humana (TSH) de ratos. Cienc. Cult., 26:301, 1974.
- 14 - BORGHI, V.C. & LIN, L.H. Application of a human thyrotropin purified from hypophyses at INPEN-CNEN/SP in the preparation of the radioimmunoassay tracer: [¹²⁵I] hTSH. In: ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Science and technology: VI Japan-Brazil Symposium on... held in São Paulo, 08-13 August, 1988. São Paulo, 1988, v. IV, p. 69-81.
- 15 - BROWN, T.R.; BAGCHI, N.; HO, T.T.S.; MACK, R.E. Pre-precipitated and solid-phase second antibody compared in radioimmunoassays. Clin. Chem., 26(3): 503-7, 1980.
- 16 - BURR, I.M.; GRANT, D.B.; SIZONENKO, P.C.; KAPLAN, S.L.; GRUMBACH, M.M. Some critical factors in double antibody radioimmunoassay systems utilizing sheep anti-rabbit precipitating sera for measurement of human serum LH, FSH and HGH. J. Clin. Endocr., 29: 948-56, 1969.

- 17 - CAMARGO, E.P. & LOPES, J.D. Anticorpos monoclonais. Cienc. Cult. 35(8):1062-74, 1983.
- 18 - CALZADO, M.C.A.; SUÁREZ, R.G.; ALVAREZ, R.R. Produccion de anticuerpo anticurriel en conejos para su uso como anticuerpo precipitante en el radioinmunoensayo. Rev. Cubana. Invest. Biomed., 6(1): 89-94, 1987.
- 19 - CHAPMAN, R.S.; MUNRO, A.C.; TEMPLETON, J.G.; FATORI, D. Production of second antibody for radioimmunoassay. In: HUNTER, W. M.; CORRIE, J.E.T., eds. Immunoassay for clinical chemistry. London, Churchill Livingstone, p. 456-68, 1983.
- 20 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis - II method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 404-27, 1964.
- 21 - DEUTSH, H.F. Preparation of immunoglobulin concentrates. In: WILLIAMS C.A. & CHASE M.W. eds. Methods in immunology and immunochemistry. New York, N.Y., Academic, 1970. v.1, p. 315-21.
- 22 - DIAMANDIS, E.P.; MORTON, C.R.; REICHSTEIN, E.; KHOSRAVI, M.J. Multiple fluorescence labeling with europium chelators. Application to time-resolved fluoroimmunoassays. Anal. Chem., 61:48-53, 1989.
- 23 - DIXON, W.J. & MASSEY Jr, F.J. Introduction to statistical analysis. 3 ed. New York, McGraw - Hill, 1966.
-

- 24 - DRAPER, N.R. & SMITH, H. Applied regression analysis. New York, N.Y., John Wiley, 1966. 40 .7 p.
- 25 - DUNNETTE, S.L. & GLEICH, G.J. Double-antibody radioimmunoassay for IgE. Methods in enzymology, 73:634-45, 1981.
- 26 - EDWARDS, R.; HOPE, H.J.; SUPRAROP, P. Preparation of magnetizable solid phase antibodies and use in bulk matched reagent assays. Comparison of results with established methods. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures: perspectives in developing countries. Proceedings of an international symposium on ... held in Vienna, 26-30 August, 1991. Vienna, 1992. p. 177-85.
- 27 - ENGLEBIENNE, P. & SLEGGERS, G. Estimation of the specific activity of radioiodinated gonadotrophins: comparison of three methods. J. Immunol. Methods, 56: 135-40, 1983.
- 28 - ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay: II quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. Biochem. Biophys. Acta., 251:427-34, 1971.
- 29 - ENGVALL, E. & PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa: III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol., 109:129-35, 1972.
-

- 30 - FAHEY, J.L. Chromatographic separation of immunoglobulins.
In: WILLIAMS, C.A.; CHASE, M.W. eds. Methods in immunology and immunochemistry. New York, N.Y., Academic, 1970. v.1, p. 321-32.
- 31 - GIMBO, E.K.; RIBELA, M.T.C.P.; BORGHI, V.C.; SCHWARZ, I.; DIAS, L.E.M.; ARAÚJO, E.A.; BARTOLINI, P. Small-scale extraction and radioiodination of human hormones for the substitution of imported radioimmunoassay reagents. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. Energia Nuclear: Anais do II Congresso Geral de ... realizado no Rio de Janeiro, 24-29 de abril de 1988. Rio de Janeiro, 1988. v. 3. p. 170-9.
- 32 - GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: review of basic principles. Semin. Nucl. Med., 5(2): 125-52, 1975.
- 33 - GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 77(1): 751-66, 1949.
- 34 - HALES, C.N. & RANDLE, P.J. Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. Biochem. J. 88: 137-46, 1963.
- 35 - HARVARD GRAPHICS (HG). Software Publishing Corp. Version 2.30., 1990.

- 36 - HIGUCHI, T.; OGATA, H.; VEIGA, S.S.; NOGUEIRA, Z.M.; FELIPPE, J.M.M.S. Purification of rabbit IgG, obtention of sheep antirabbit IgG and their use in radioimmunoassay of avian leukosis virus-p 15. Rev. Microbiol., 19(1): 82-8, 1988.
- 37 - HIGUCHI, T.; SOUZA, J.M.M.; NOGUEIRA, Z.M.; OGATA, H. Perspectives on avian and bovine leukemia virus immunological studies. In: ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Science and technology: 4th Japan-Brazil symposium on... held in São Paulo, 06-10 August, 1984. São Paulo, 1984. v.2, p.76-86.
- 38 - HORN, H.; BERGER, S.; BAR-ILAN, A.; JONAS, Z. Polyethylene glycol and second antibody in radioimmunoassay of human choriogonadotropin. Clin. Chem., 26(5):666-7, 1980.
- 39 - HORROCKS, D.L. Standardizing ¹²⁵I sources and determining ¹²⁵I counting efficiencies of well type gamma counting systems. Clin. Chem. 21:370-5, 1975.
- 40 - HUDSON, L. & HAY, F.C. Isolation and structure of immunoglobulins. In: PRACTICAL immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1976. p. 152-91.
- 41 - HUDSON, L. & HAY, F.C. Immunoelctroforetic analysis. In: PRACTICAL immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1976. p. 116-22.

- 42 - HUMAN THYROID STIMULATING HORMONE RADIOIMMUNOASSAY. Pituitary Hormones and Antisera Center, Maryland. (Technical report 209. - Specification sheet).
- 43 - HUNTER, W.M. & GANGULI, P.C. The separation of antibody bound from antigen. In: K.E. KIRKHAM; W.M. HUNTER eds., Radioimmunoassay methods, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971, p. 243-57.
- 44 - Hunter, W.M. & Greenwood, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194: 495-6, 1962.
- 45 - HURN, B.A.L. & LANDON J. Antisera for radioimmunoassay. In: KIRKHAM, K.E & W.M. HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971, p. 121-68.
- 46 - JOHNSTONE, A. & THORPE, R. Purification of immunoglobulins, constituent chains and fragments. In: IMMUNOCHEMISTRY in practice. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987. p. 48-55.
- 47 - KAKABAKOS, S.E.; EVANGELATOS, G.P.; ITHAKISSIOS, D.S. Immunoabsorption of IgG onto second antibody covalently attached to amino-dylark beads for radioimmunoassay. Clin. Chem. 36(3), 497-500, 1990.
-

- 48 - KRAUS, A.L.; WEISBROTH, S.H.; FLATT, R.E.; BREWER, N. Biology and diseases of rabbits. In: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEW, F.M. eds. Laboratory animal medicine. New York, N.Y., Academic. 1984, p. 206-40.
- 49 - LANDON, J. Storage of antisera. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. eds., Radioimmunoassay methods. Edinburger, Churchill Livingstone, 1971, p. 189-93.
- 50 - LIN, L.H. Padronização do radioimunoensaio de tireotrofina humana e sua aplicação à purificação do hormônio para o preparo de reagentes do ensaio. São Paulo, 1991. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 51 - LIN, H.; ARENSTEIN, I.R.; BORGHI, V.C. Hormônio tireotrófico humano hipofisário: isolamento e aplicação no radioimunoensaio. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. Energia Nuclear: Anais do 3º Congresso Geral de ... realizado no Rio de Janeiro, 22-27 de Abril, 1990. Rio de Janeiro, 1990. caderno 12. p. 57-66.
- 52 - LOVGREN, T.; HEMMILA, I.; PETERSSON, K.; ESKOLA, J.V.; BERTOFT, E. Determination of hormone by time resolved fluoroimmunoassay. Talanta, 31:909-16, 1984.
- 53 - MESQUITA, C.H. Modelo para determinação da absorção de substâncias radioativas. Aplicação em radiiodosimetria e nutrição. São Paulo, 1991. (Tese de doutoramento, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
-

- 54 - MIDGLEY, A.R. Jr. & HEPBURN, M.R. Use of the double-antibody method to separate antibody bound from free ligand in radioimmunoassay. In: VUNAKIS, H.V.; LANGONE, J.J. Methods in Enzymology, New York, N.Y., Academic, vol. 70, 1980. p. 266-74.
- 55 - MILES, L.E. & HALES, C.N. The preparation and properties of purified ^{125}I -labelled antibodies to insulin. Biochem. J. 108:611-8, 1968.
- 56 - MORGAN, C.R. & LAZAROW, A. Immunoassay of insulin using a two-antibody system. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 3:29-32, 1962.
- 57 - MORGAN, C.R. & LAZAROW, A. Immunoassay of insulin: two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rat. Diabetes, 12(2):115-26, 1963.
- 58 - MORGAN, C.R.; SORENSON, R.L.; LAZAROW, A. Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. Diabetes, 13(6):579-84, 1964.
- 59 - NUSTAD, K.; UGELSTAD, J.; BERGE, A.; ELLINGSEN, T.; SCHMID, R.; JOHANSEN, L.; BORMER, O. Use of monosized polymer particles in immunoassays. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine. Proceedings of a symposium on... held in Vienna, 21-25 June, 1982. Vienna, 1982. p. 45-55.
-

- 60 - OGATA, H. & HIGUCHI, T. Obtenção de anti-IgG de coelho - Determinação do sistema precipitante do radioimunoensaio. Cienc. Cult. 369(7): 694, 1984.
- 61 - OGATA, H. & HIGUCHI, T. Obtention os sheep anti-rabbit IgG: Precipitating system of radioimmunoassay. In: ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Science and technology: 4th Japan-Brazil symposium on... held in São Paulo, 06-10 August, 1984. São Paulo, 1984. v.2, p.75.
- 62 - OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy 5 : 1-78, 1958.
- 63 - PYASENA, R.D.; AIREY, P.L.; GANATRA, R.D.; NOTAL, M. Radio-immunoasay for human health in developing countries. International At. Energy Agency Bull., 1: 5-9, 1988.
- 64 - RADIOASSAY SYSTEMS LABORATORIES, INC. RSL 2nd antibody. Carson, Ca., sd. (Catalog number 1930 - lot 2R2M86).
- 65 - RATCLIFFE, J.G. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull., 30:32-7, 1974.
- 66 - REICHMANN, C.E. Contribuição ao estudo do quadro leucocitário sanguíneo de ovinos (*Ovis aries*, L.) normais, criados no estado de São Paulo. Influências de fatores raciais e etários. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo) apud BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J.
-

Coords. Patologia clínica veterinária. São Paulo, Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. (Apostila de curso). p. 65.

- 67 - REICHSTEIN, E.; SHAMI, Y.; RAMJEEISINGH, M.; DIAMANDIS, E.P.
Laser-excited time-resolved solid phase fluoroimmunoassays with the new europium chelate 4,7-bis-chloro sulfophenyl - 1,10-phenanthroline - 2,9-dicarboxylic acid as label. Anal. Chem.; 60:1069-74, 1988.
- 68 - RIBELA, M.T.C.P. & BARTOLINI, P. Stokes radius determination of Radioiodinated Polypeptide Hormones by gel filtration. Anal. Biochem., 174:693-697, 1988.
- 69 - ROBLES, A.M.; GARCIA, B.A.; LORIENTE, J.M.G.; TEDESCO, G.; ARBENOIZ, J.M.; PÉREZ, A.; TOUYA, E. Optimizacion de la etapa de separacion por doble anticuerpo en radioinmunoanálisis. In: WORLD FEDERATION OF NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY. IV World Congress. Resumos do congresso de... realizado em Buenos Aires, 2-7 Novembro, 1986. Buenos Aires, 1986. p. 144.
- 70 - RODBARD, D. Quality control for RIA: recomendations for a minimal program. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay methods and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium... realizado em Berlin, 31 outubro - 4 novembro, 1977. Viena, 1978. v. II. p.21-38.
-

- 71 - ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por-exclusão. In: COLLINS, C.H. & BRAGA, G.L. eds. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, Unicamp, 1987, p. 119-42.
- 72 - RUBENSTEIN, K.E.; SCHNEIDER, R.S.; ULLMAN, E.F. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47:846-51, 1972.
- 73 - SALINAS, A.M.; GONZÁLEZ, K.; COLQUE, BARRAGÁN, L.F.; ARIAS, R. Estandarización de T4 neonatal por RIA utilizando gotas de sangre en papel filtro para detección de hipotiroidismo neonatal. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures: perspectives in developing countries. Proceedings of an international symposium on... held in Vienna, 26-30 August, 1991. Vienna, 1992. p. 325-33.
- 74 - SKOM, J.H. & TALMAGE, D.W. Nonprecipitating insulin antibodies. J. Clin. Invest., 37:783-6, 1958.
- 75 - SNEDCOR, G.W. & COCHRAN, W.G. One-way classification: analysis of variance. In: STATISTICAL methods. 6 ed. Iowa, The Iowa State University, 1967. p.258-96.
- 76 - SOELDNER, J.S. & SLONE, D. Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technic. Diabetes 14(12):771-9, 1965.
-

- 77 - SOINI, E. & KOJOLA, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates: a new generation of nonisotopic immunoassays. Clin. Chem., 29(1):65-8, 1983.
- 78 - STEINBUCH, M. & AUDRAN, R. The isolation of IgG from mammalian sera with aid of caprylic acid. Arch. Bioch. Biophysics, 134: 279-84, 1969.
- 79 - UTIGER, R.D.; PARKER, M.L.; DAUGHADAY, W.H. Studies on human growth hormone. I. A radioimmunoassay for human growth hormone. J. Clin. Invest., 41(2):254-61, 1962.
- 80 - VAITUKAITIS, J.; ROBBINS, J.B.; NEISCHLAG, E.; ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 33:988-91, 1971.
- 81 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184:1648-9, 1959.
-



M20144

Cidade Universitária - "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"
Travessa R nº 400 - Caixa Postal 11049 - Pinheiros
Telefone (PABX) 211-8011 - End. Telefônico IPENUCLEAR
Telex (11)83692 - IPEN - BR
São Paulo - Brasil