

PRODUÇÃO DE SEGUNDO ANTICORPO PARA RADIOIMUNOENSAIO (RIE) DE INSULINA E PEPTÍDEOS RELACIONADOS (ANTI-SORO DE CARNEIRO ANTI-IgG DE COBAIA.).

Maria do Carmo Castanheira*, Sandra Rosa da Silva*, Vânia Caira Borghi* e Bernardo Leo Wajchenberg **

*** Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares - CNEN
Caixa postal 11049
05422-970, São Paulo, SP, Brasil**

**** Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo - USP
Av. Dr. Arnaldo, 455
01246-903, São Paulo, SP, Brasil**

ABSTRACT

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 RIA. However, its high cost is its main disadvantage, which leads to employ less expensive techniques that are not so efficient. Therefore, our institution is producing a second antibody to be used in insulin assays, in which the first antibody is raised in guinea pig. Three sheep were immunized with 500 µg of guinea pig IgG purified at our laboratory emulsified in Freund Complete Adjuvante and administered by multisite subcutaneous injection at 20 day intervals. Blood samples were taken from the jugular vein 10 days after boosts. After each four boosts a great bleeding was done by the same route. After these bleedings, the animals were subjected to a rest before being reimmunized. The antisera titer were determined by the immunodiffusion method in comparison with a reference antiserum of known quality produced in goat by the Pel-Freez, USA. Approximately 3.5 L of antiserum were produced from the three sheep which presented titer very similar to those exhibited by the commercial product, even presenting higher values.

INTRODUÇÃO

O radioimunoensaio (RIE) desenvolveu-se muito rapidamente nos últimos 20 anos. Atualmente nos países em desenvolvimento, cerca de 500 hospitais, universidades e laboratórios de análises clínicas realizam estes ensaios em alguma proporção [1]. No Brasil, com raras exceções, a execução do RIE ainda depende da importação de seus reagentes biológicos, quer seja à granel, ou

na forma de conjuntos diagnósticos, o que resulta num preço elevado deste exame.

Com o objetivo de substituir as importações, o laboratório de RIE da Divisão de Medicina da nossa Instituição está preparando os reagentes específicos para alguns RIEs hormonais, como antígenos purificados, traçadores, primeiro e segundo anticorpo.

A maioria dos RIEs são semelhantes na etapa inicial de incubação do anticorpo com o antígeno marcado isotopicamente e com o antígeno padrão ou com a amostra desconhecida. Entretanto, estes diferem quanto ao método utilizado na etapa final para separar o antígeno ligado ao anticorpo daquele livre que é a principal fonte de imprecisão destes ensaios [2].

O método de separação denominado de duplo anticorpo, que emprega um segundo anticorpo para precipitar o complexo antígeno-anticorpo é um dos mais utilizados, satisfazendo os critérios de eficiência, praticabilidade e aplicação geral [3]. Entretanto, seu custo elevado da ordem de Us\$ 1.000,00 cada 500 ml [4] é a sua principal desvantagem, o que muitas vezes conduz ao emprego de reagentes menos onerosos, mas que não são tão eficientes para a separação dos RIEs.

Realizou-se portanto, no presente trabalho, a produção de um segundo anticorpo anti IgG de cobaia a ser empregado no RIE de insulina e peptídeos relacionados, desenvolvidos em nossos laboratórios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se três ovinos deslanados e do sexo masculino, recebidos como doação do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo (IZSA). Eles encontram-se alojados nas dependências do Instituto Biológico e estão sendo mantidos pela Fundação Faculdade de Medicina da USP (TABELA1).

TABELA 1. Identificação dos Ovinos Utilizados na Produção do Segundo Anticorpo.

NOME	Nº	RAÇA
Havaiano	919	Morada nova
Hemafrodita	952	Morada nova
Horteleiro	1009	Morada nova

Após verificação do estado normal de saúde, por meio de exames hematológico e parasitológico de fezes, esses animais foram submetidos ao esquema de imunização.

A imunização dos ovinos foi realizada empregando-se IgG de cobaia obtida em nossos laboratórios por meio de fracionamento do soro com sulfato de amônia, seguido de purificação em "bach" com DEAE-celulose [5]. Foram realizadas injeções subcutâneas de 2 ml de uma emulsão formada por volumes iguais de solução fisiológica contendo a IgG (500 µg), e de adjuvante de Freud completo, distribuídos em 20 pontos da região paraesternal dos animais, seguindo-se esquema já empregado em nossos laboratórios para a produção de um duplo anticorpo contra IgG de coelho [6]. Essas injeções foram repetidas com intervalo de 20 dias, colhendo-se pequenas amostras de sangue pela veia jugular 10 dias após cada injeção de reforço, para avaliação do imunossoro dos carneiros anti-IgG de cobaia.

A cada 4 injeções de reforço, foram realizadas sangrias de grande volume pela mesma via, totalizando cerca de 1,5 litros de sangue, obtidos em duas colheitas espaçadas de três dias. Após cada uma dessas sangrias de grande volume, os animais foram submetidos a um período de descanso de um mês antes de serem reimunizados.

Os antissoros provenientes das diferentes sangrias foram avaliados pela técnica de

imunodifusão, segundo o método de Ouchterlony [7], em comparação com o segundo anticorpo de qualidade conhecida, produzido em cabra pela Pel-Freecz, EUA [4]. Realizaram-se diluições seriadas, que variaram de 1:1 até 1:128, distribuídos nos orifícios periféricos de duas rosetas, dispostas lado a lado em uma mesma lâmina. O antígeno (IgG de cobaia purificada) foi colocado no orifício central, na concentração de 0,5 mg/ml. Foram estimados os títulos correspondentes à maior diluição, que apresentou uma linha de precipitação uniforme.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A formação de nódulos nos locais das injeções do imunógeno foi visualizada nos animais poucos dias após a imunização primária (Figura 1).

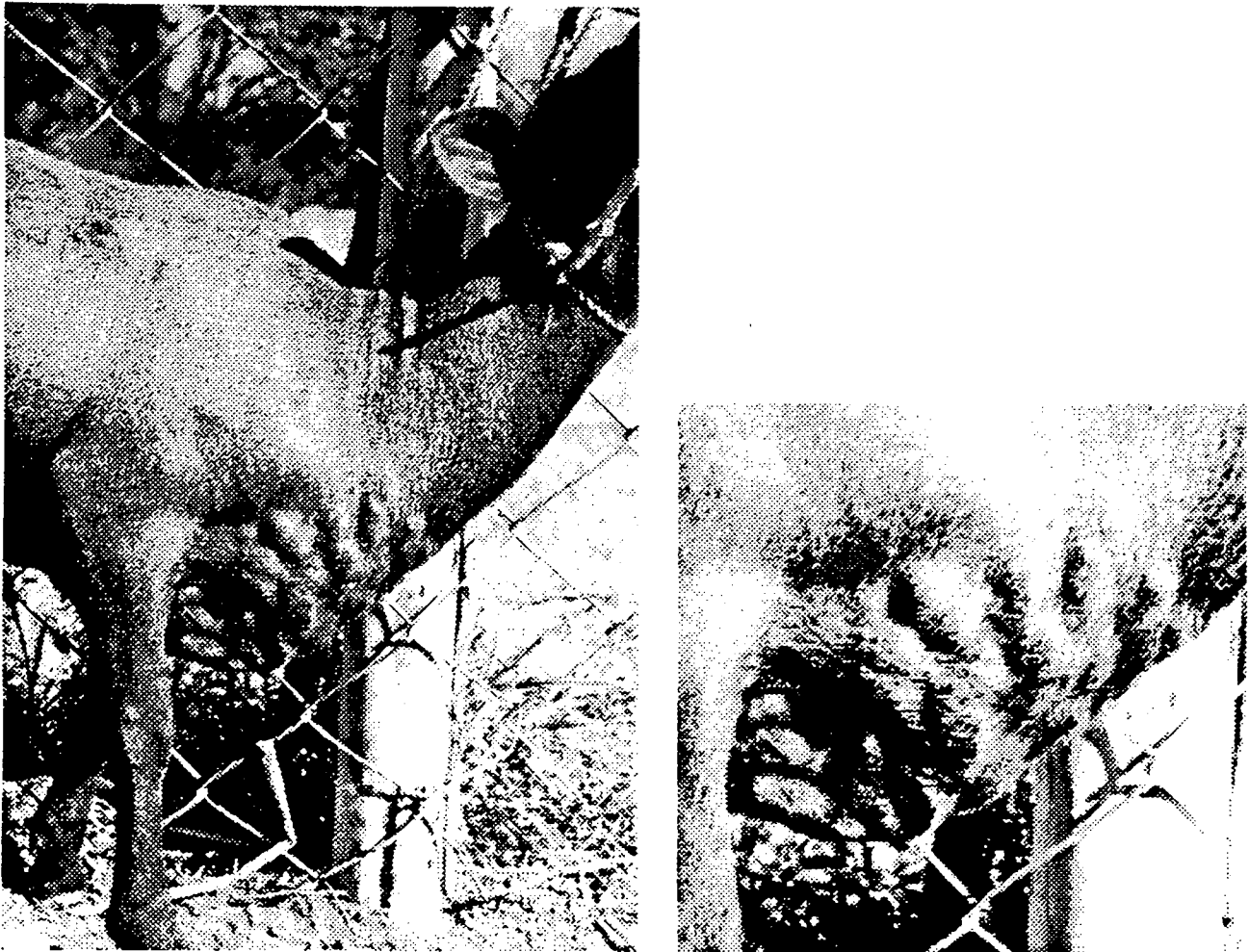


Figura 1 - Fotografia do Ovino 952 após a Nona Injeção de Reforço.

Foram realizadas quatro sangrias de grande volume durante o período de produção do imunossoro anti-IgG de cobaia demonstradas na Figura 2. Essa Figura também apresenta a evolução dos títulos dos antissoros dos ovinos no período em que foram imunizados com a IgG de cobaia. Como pode ser observado nesta Figura, todos os animais apresentaram resposta imunológica a partir da primeira injeção de reforço, e após a quarta injeção apresentaram antissoros com títulos da ordem de 1:8 .

Após o primeiro período de descanso, os títulos dos antissoros produzidos pelos animais 952 e

1009 aumentaram de 1:8 para 1:32, valor este que permaneceu inalterado até a oitava sangria

Entretanto, o ovino 919 não apresentou esta resposta, mantendo o título de seu antissor inalterado após o quinto reforço. Este título baixo pode ser devido ao aparecimento de um cálculo uretral naquela ocasião, quando foi transferido para tratamento no Hospital Veterinário da FMVZ/USP, vindo a óbito no mesmo dia, não sendo possível colher seu sangue. O ovino 1009 que apresentava um título de 1:64 após o décimo terceiro reforço também veio a óbito devido a um cálculo uretral

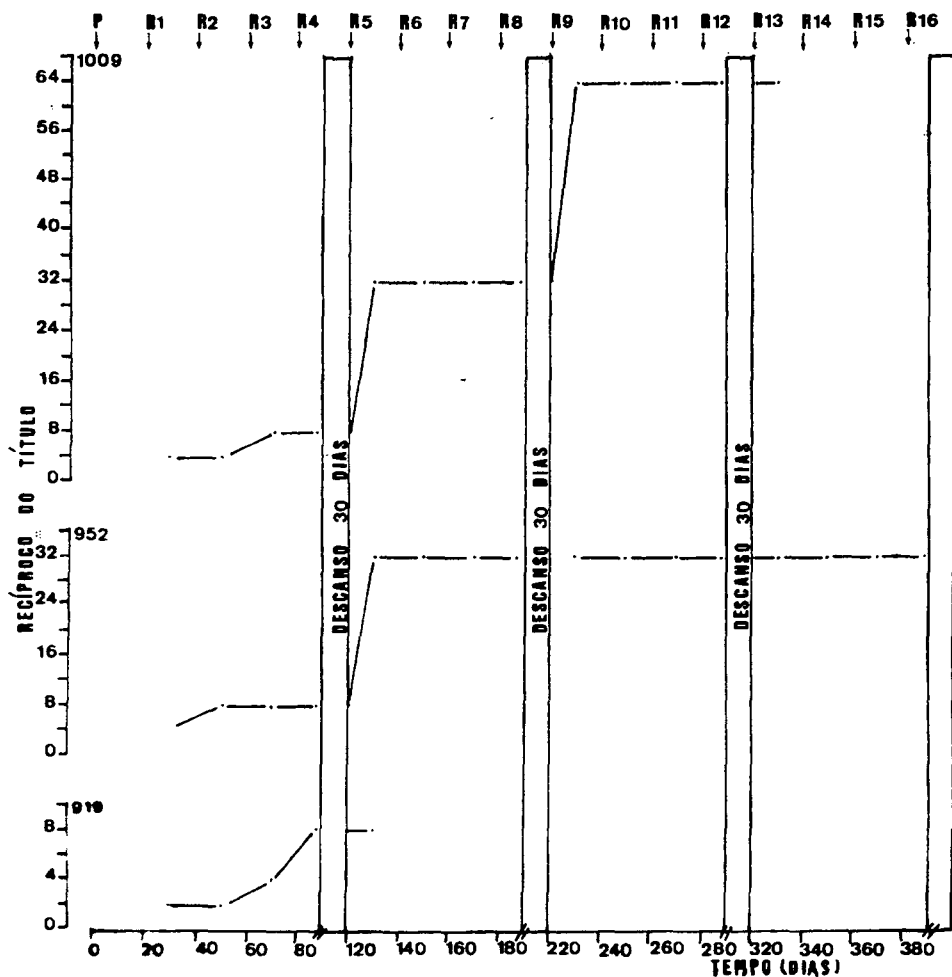


Figura 2 - Evolução dos Títulos dos Antissoros dos Ovinos em Função do Tempo em que Foram Submetidos a Imunização, Intercalada por Períodos de Descanso. As Setas Indicam o Período das Injeções Primárias (P) e de Reforço (R1 a R16). São Indicados na Figura os Volumes de Sangue Colhidos dos Animais.

O ovino 952 manteve o título de 1:32 até o décimo sexto reforço.

Os títulos dos antissoros aumentaram após a imunização que sucederam os períodos de repouso. Esse efeito já havia sido verificado por Chapman e colaboradores [8], em jumentos imunizados com a IgG de coelho, que também apresentavam títulos mais elevados.

Foram obtidos portanto, imunossoros de carneiros contra IgG de cobaia com títulos superiores àquele importado.

Esses estudos estão sendo conduzidos de forma a permitir a futura produção e distribuição desse duplo anticorpo produzido integralmente no país.

A Figura 3 apresenta as imunodifusões dos antissoros após a última sangria de grande volume

de cada animal em comparação com o antissoro comercial da Pel - Frecz .

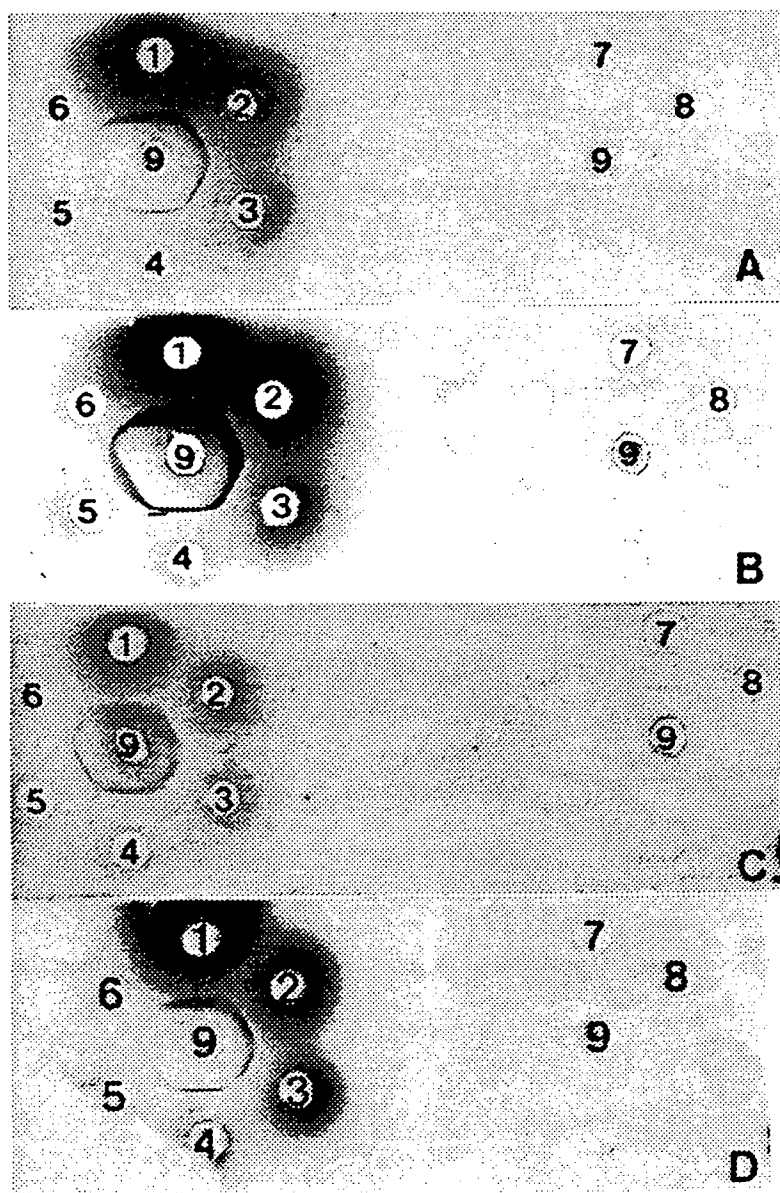


Figura 3 - Imunodifusão dos Antissoros dos Ovinos 919 (A), 952 (B) e 1009 (C), Obtidos na Última Sangria de Grande Volume, e Antissoro Comercial (D).

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

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permite concluir que:

- Confirmou-se a adequação da IgG de cobaia isolada e purificada em nossos laboratórios,

para a indução de anticorpos específicos em carneiros.

- 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 imunossoros contra IgG de cabaia.

- Pelo menos quatro injeções de reforço foram necessárias para produzir boa resposta nos animais, que foram incrementadas seguindo-se os períodos de descanso.

- Os imunossoros dos carneiros apresentaram títulos superiores àquele exibido pelo produto comercial.

- A produção deste antissoro realizada integralmente no país poderá ser efetuada em maior escala, substituindo o emprego dos produtos importados.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo a doação dos ovinos, ao Dr. Enrico Lippiorlani da Faculdade de Medicina Veterinária da USP o tratamento dos animais e a realização de seus exames laboratoriais e à Comissão Nacional de Pesquisa (CNPq) o auxílio financeiro.

BIBLIOGRAFIA

1. PIASENA, R.D., AIREY, P.L., GANATRA, R.D. e NOTAL, M. . Radioimmunoassay for human health in developing contries. IAEA Bulletin, v.1 p.5-9,1988.
2. BORGHI, V.C. Dosagens hormonais "in vitro" com radioisótopos . Considerações gerais e análise crítica. Ciência e Cultura v.35 (10) v. 1456-66,1982
3. RATCLIFFE, J.G. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull, v.30 p.32-7,1974.
4. PEL FREEZ BIOLOGICALS. Goat anti Guinea pig IgG-2ND Antibody. Arkansas, USA, 1992. (Catalog number 12890-2 cc).
5. SILVA, S.R., BORGHI, V.C., BELLINI, M.H., WAJCHENBERG, B.L.. Isolamento e purificação da imunoglobulina G de cabaia para a produção de segundo anticorpo para radioimunoensaio. Ciência e Tecnologia em Saúde: Anais do I Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde realizado em Caxambú, MG, novembro de 1992. Sociedade Brasileira de Biologia e Medicina Nuclear, 1992 p. 464-6 .
6. BORGHI, V.C.; SILVA, S.R.; BELLINI, M.H; LIN, L.H. Produção de Reagentes Biológicos para Radioimunoensaio; Segundo Anticorpo. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1992 (Publicação IPEN 361)
7. OUCHTERLONY, O. Difusion in gel methods for immunological analysis. Prod Allergy v.5 p.1-78, 1958
8. CHAPMAN, R.S., MUNRO, A.C., TEMPLETON, J.G., FATORE, P.. Production of second antibody for radioimmunoassay. In: HUNTER, W.M., CORRIE, J.E.T.. eds Immunoassay for chemical chemistry. London, Churchill Livingstone, 1983 p. 456-68.