

ESTUDO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE ARMAZENAMENTO DO SEGUNDO ANTICORPO PARA RADIOIMUNOENSAIO (RIE) PRODUZIDO INTEGRALMENTE NO PAÍS (SORO DE CARNEIRO ANTI-IGG DE COELHO)

S.R.SILVA, V.C.BORGHI, C.H.MESQUITA e B.L.WAJCHENBERG*
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP
Travessa R - n.4DD - Cidade Universitária - 05508-900,
São Paulo, SP e Laboratório de Investigação Médica 25 da
FMUSP*.

RESUMO

Este trabalho teve como finalidade o estabelecimento das condições ideais de armazenamento do segundo anticorpo para RIE produzido no IPEN-CNEN/SP. Pequenas amostras desse antissor foram submetidas a duas formas de congelamento (lento e rápido), ambos seguidos de liofilização. Compararam-se as interferências dos processos de congelamento e liofilização por meio da análise da curva de título. Os valores obtidos indicaram não haver diferença significativa entre as condições avaliadas.

INTRODUÇÃO

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 (1). 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 (2). 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 anti-IGG de coelho existentes no mercado são importados por um preço bastante elevado, da ordem de US\$ 1750,00 FOB cada 500 ml (3).

No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-CNEN/SP foram produzidos a partir de quatro ovinos cerca de 3,6 l de antissor (soro de carneiro anti-IGG de coelho), para serem empregados em radioimunoensaios, nos quais o primeiro anticorpo é gerado em coelhos. Esses antissoros apresentaram títulos e características de precipitação muito similares àquelas exibidas pelo produto comercial importado, apresentando até títulos mais elevados (4).

A finalidade deste trabalho foi o estabelecimento das condições ideais de armazenamento desse segundo anticorpo produzido integralmente no país.

MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de se determinar a melhor forma de armazenamento dos antissoros, realizou-se inicialmente uma análise com o antissor submetido a três tratamentos: congelamento lento, por permanência durante 24 h em congelador a -20°C, congelamento rápido, por imersão em nitrogênio líquido (N₂) a -190°C e congelamento em N₂ seguido de liofilização.

Para essa análise empregou-se uma amostra dos antissoros, 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 antissor liofilizado, essas três

amostras do antissor foram empregadas na diluição de 1:2 na separação do RIE de tireotrofina humana (5). A fim de se verificar se a forma de estocagem do duplo 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.

Após a separação, os valores médios de B/T foram comparados empregando-se o teste "t" de Student para observações pareadas (6).

Avaliou-se a seguir o procedimento de liofilização do antissor, 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. Os antissoros foram distribuídos em frascos com capacidade para 25 e 30 ml, em volumes de 10, 15, e 20 ml, sendo liofilizados conforme especificado na Tabela 1. Cada análise foi efetuada com uma mistura de soro diferente, porém a mesma mistura sempre foi avaliada antes e após a liofilização.

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

Essa avaliação foi realizada em curva de titulação do antissor, para a separação do RIE.

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:

$$\% \text{ de ligação} = Y_{\max} (1 - e^{-\frac{\alpha \cdot 1}{d}}) \quad (1)$$

onde:

Y = B/T

Y_{max} = percentagem de ligação máxima teórica,

α = parâmetro exponencial, proporcional à afinidade do antissor,

d = diluição do antissor.

Tabela 1 - 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

Os parâmetros α e Y_{max} foram estimados pelo método não linear dos mínimos quadrados (7, 8).

As funções experimentais resultantes foram consideradas similares quando ambos os parâmetros α e Y_{max} não apresentaram diferenças significativas ao nível de $p > 0,05$, pelo teste t de Student (6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são expostos os valores das percentagens de ligação fornecidos pelos antissoros submetidos ao congelamento lento ou rápido, este último seguido de liofilização.

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. Entretanto, esses diferiram significativamente entre os antissoros congelados a -190°C , avaliados antes e após a liofilização ($p > 0,05$), indicando que este procedimento pode diminuir o título do antissoro.

A Figura 1 exibe as curvas de título das amostras dos antissoros que foram liofilizadas, em comparação com as mesmas não liofilizadas.

Tabela 2 - Valores das percentagens de ligação máxima (B/T) obtidos no RIE de hTSH separado pelo antissoro submetido a três formas de tratamento:

- 1 - congelamento a -20°C e não liofilizado.
- 2 - congelamento a -190°C e não liofilizado.
- 3 - congelamento 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	$\pm 1,303$	$\pm 1,213$	$\pm 1,451$

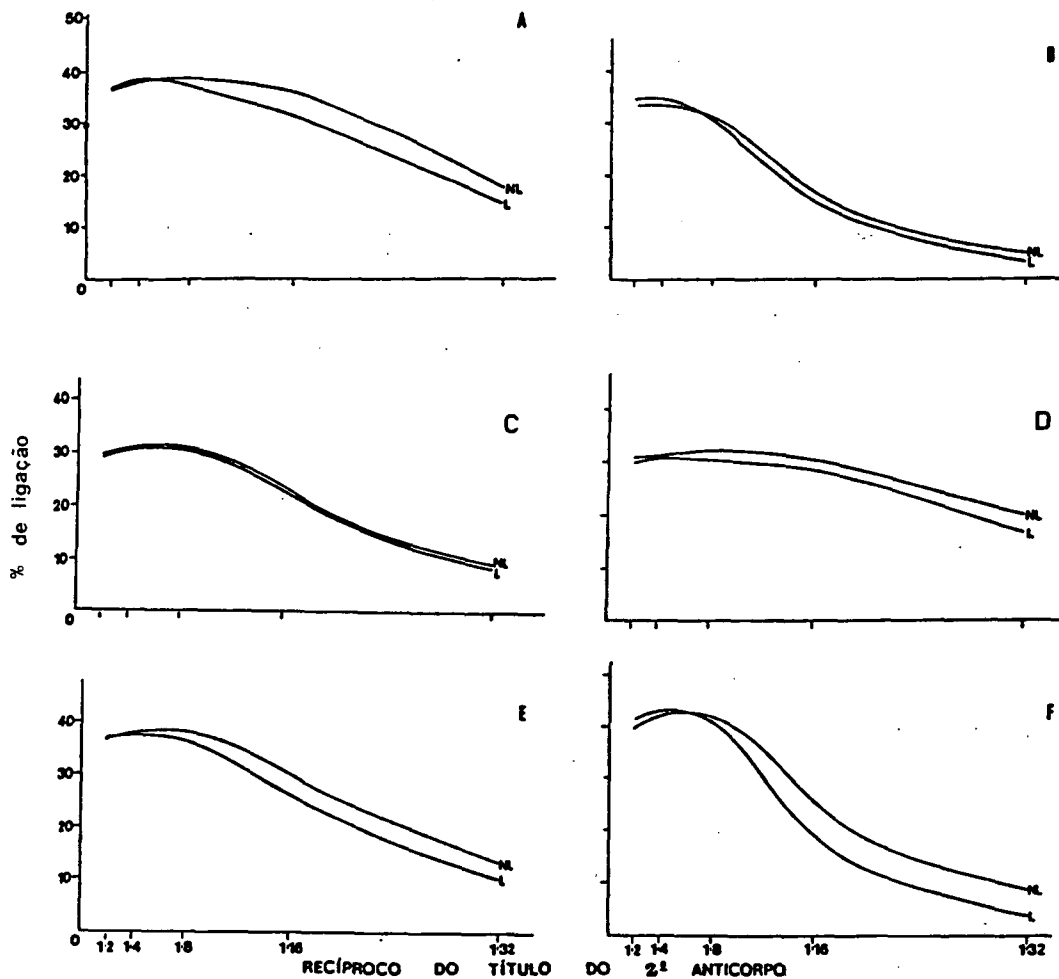


Figura 1 - Curvas de título fornecidas pelas várias amostras de antissoro (A a F) que foram liofilizadas (L) ou não (NL), após congelamento a -20°C ou a -190°C em volumes crescentes (de cima para baixo), em frascos de 25 ml (à esquerda) ou de 30 ml (à direita), conforme especificado na Tabela 1.

Na Tabela 3 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 ($p > 0,05$), indicando que qualquer uma das formas de estocagem analisada pode ser empregada.

Pelos resultados obtidos nesse estudo do armazenamento 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 .

Uma parte dos antissoros foi mantida nessa forma e armazenada em congelador a -40°C . Outra parte dos antissoros foi liofilizada e mantida nas mesmas condições.

A Figura 2 apresenta os frascos do antissoro nas formas liofilizada e congelada.

Relatos da literatura mencionam que o congelamento rápido é preferível para manter o antissoro inalterado e que a estocagem na forma liofilizada é ideal para preservar sua integridade por períodos longos (8). Além disso, a estocagem na forma liofilizada é preferível para o transporte desse tipo de material biológico.

Tabela 3 - 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}	α (AFINIDADE)	Y_{max}	
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 $P > 0,05$.

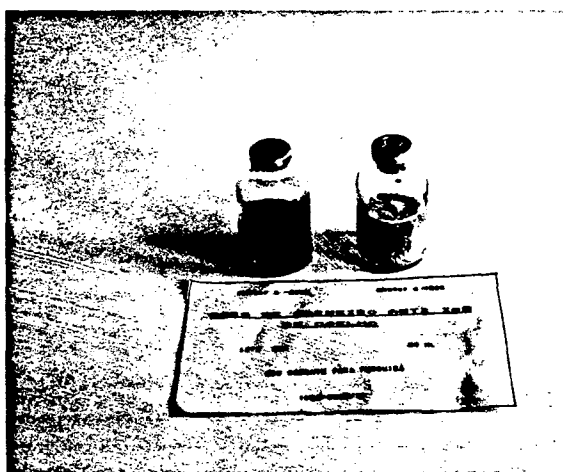


Figura 2 - Frascos dos antissoros produzidos e armazenados na forma congelada (à esquerda) e liofilizada (à direita).

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos concluiu-se que os antissoros foram armazenados apropriadamente, de forma a permitir seu emprego por um período longo e seu eventual transporte. Além disso, criou-se experiência suficiente para a produção e armazenamento deste reagente biológico do RIE, que poderá ser efetuada integralmente no país, em maior escala.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Supervisão de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN/SP a liofilização do antissoro e ao National Hormone and Pituitary Program (EUA) os reagentes biológicos para o RIE de hTSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BORGHI, V.C. Dosagens hormonais "In vitro" com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. *Cienc. Cult.*, 35(10): 1456-66, 1982.
- 2 - RATCLIFFE, J.G. Separation techniques in saturation analysis. *Br. Med. Bull.*, 30:32-7, 1974.
- 3 - ICN Biomedicals Inc. Diagnostics Division, International Product List. Carson, 1988. p. 5. Precipitating antisera.
- 4 - SILVA, S.R.; BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L. Estudo comparativo do segundo anticorpo para radioimunoensaio produzido integralmente no país com similar importado (soro de carneiro anti-IgG de coelho). In: IV CONGRESSO GERAL DE ENERGIA NUCLEAR. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 5 a 9 de Julho de 1992. Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Energia Nuclear, 1992. 29 vol. 659-64.
- 5 - 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 metabolismo: Anais do 17 Congresso de ... realizado em Olinda, 7-12 de setembro, 1986.* Recife, 1986. p.59.
- 6 - DIXON, W.J. & MASSEY Jr, F.J. *Introduction to statistical analysis.* 3 ed. New York, McGraw-Hill, 1966.
- 7 - BEVINGTON, P.R. *Data reduction and error analysis for the physical sciences.* Berkeley, Ca., MacGraw-Hill, 1969. p. 204-42.
- 8 - DRAPER, N.R. & SMITH, H. *Applied regression analysis.* New York, N.Y., John Wiley, 1966. 40.7p.
- 9 - LANDON, J. Storage of antisera. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.W. eds., *Radioimmunoassay methods.* Edinburger, Churchill Livingstone, 1971, p. 189-93.

ABSTRACT

This work had been carried out to establishing the ideal storage conditions of the second RIA antibody produced at IPEN-CNEN/SP. Small samples of these antisera were submitted to two kinds of freezing forms (slow and fast), both followed by lyophilization. The interference of the frozen and lyophilization processes were compared through the antibody dilution curve. The obtained values showed that no significant difference between the freezing forms occurred.