

PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE IMUNODIFUSÃO RADIAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS BOVINOS E SEU USO NO CONTROLE DE QUALIDADE DO SORO HIPERIMUNE ANTI-IgG BOVINO PRODUZIDO NO IFMG CAMPUS BAMBUÍ

Tiago da Silva Magalhães¹; Ana Victória Musallam Pimentel²; Raphael Steinberg da Silva³; Gustavo Augusto Lacorte³; Amanda Soriano Araújo Barezani³

1 Bolsista (CNPq), Curso Zootecnia, IFMG Campus Bambuí, Cidade - MG; magalhaes.tiago@outlook.com

2 Bolsista (FAPEMIG), Curso Zootecnia, IFMG Campus Bambuí, Cidade - MG; anampvick@gmail.com

3 Pesquisadores do IFMG, Campus Bambuí; correspondência: amanda.barezani@ifmg.edu.br

RESUMO

Técnicas clássicas de imunodiagnóstico como ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imuno-histoquímica (IHQ) e imunofluorescência (IF) utilizam-se de anticorpos primários e/ou secundários como reagentes. Estes insumos são obtidos de soros hiperimunes produzidos a partir de inoculações, em série, de moléculas antigênicas purificadas em animais doadores como cavalos e coelhos. No entanto, pesquisadores que utilizam anticorpos como ferramentas de pesquisa e os laboratórios que oferecem serviços de diagnóstico no Brasil dependem fortemente da importação desses imunobiológicos, na maioria das vezes como única opção de compra de empresas multinacionais. Estes anticorpos são caros, cotados em moeda estrangeira e dependentes da liberação de importação por órgãos reguladores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que acarreta em grande morosidade da sua entrega, onera custos e atrasa as pesquisas, sendo comum a entrega de produtos com prazo de validade vencido ou danificados por problemas de acondicionamento no transporte. A fim de reduzir o problema da aquisição desse produto, implementou-se no IFMG *campus* Bambuí uma plataforma de produção de anticorpos, com perspectivas de serem utilizados em pesquisas por alunos e professores de diversas áreas de atuação, seja ela medicina, veterinária, agronomia, zootecnia ou biologia, dentro e fora dos *campi*. Como primeira fase do projeto, o seguinte produto foi desenvolvido: anticorpo policlonal anti-IgG bovino. O objetivo deste trabalho foi avaliar se esse produto desenvolvido na plataforma de produção de soros hiperimunes do IFMG poderia ser utilizado como anticorpo primário em um teste imunológico, sendo capaz de substituir um anticorpo comercial e mantendo o mesmo padrão de qualidade do insumo importado. Para isto, um teste de IDGA radial foi padronizado utilizando o anticorpo produzido. Essa técnica é utilizada na quantificação de IgG de colostro e soro de vacas durante estudos de transferência de imunidade materna para o filhote. Foram padronizados: o tamanho da placa de deposição do gel, o volume e espessura do gel, o diâmetro do poço perfurado, a diluição do soro a ser colocada no gel e o tempo de leitura do teste. Uma curva padrão foi construída, através de uma concentração conhecida de proteínas plasmática bovina, para uso como padrão na quantificação do produto. O teste foi utilizado para medir a quantidade de IgG no colostro de 40 vacas. A concentração de IgG de todas as amostras também foi mensurada por IDGA radial contendo anti-IgG comercial importada e serviu de parâmetro para validar os resultados encontrados. A quantidade de IgG mensurada foi de $43,5 \pm 9,2$ mg/ml de colostro, o que corrobora com os resultados de diversos autores que afirmaram que a concentração de IgG no colostro bovino variava de 34 a 80 mg/ml. Além disso, a dosagem realizada com a IDGA radial padronizada com o anti-IgG produzido demonstrou alta relação com a dosagem anteriormente realizada nas mesmas amostras por IDGA radial contendo anti-IgG comercial importada ($44,4 \pm 8,3$ mg/ml), apontando a confiabilidade do produto e do teste desenvolvido.

INTRODUÇÃO:

Aproveitando-se da função fisiológica dos anticorpos de reconhecer e se ligar a determinadas moléculas contra as quais eles foram produzidos, eles tanto podem ser utilizados na produção de soros terapêuticos como o antiofídico, antirrábico, antitetânico e antiescorpiônico, como podem servir como reagentes/insumos em testes que identificam dezenas de doenças humanas, animais e vegetais, incluindo o teste de *Western blotting* utilizado para o diagnóstico da AIDS em humanos, febre aftosa em bovinos e doença do milho causada por molicutes. Técnicas clássicas de imunodiagnóstico como ensaio de imunoadsorção enzimática em placas (ELISA), imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imunohistoquímica (IHQ), imunofluorescência (IF) e immunoblotting têm esses soros como fonte para aquisição dos anticorpos primários e/ou secundários utilizados em seus protocolos (SILVA, 2014; JANEWAY et al, 2007).

O método usual para a obtenção de anticorpos policlonais envolve várias etapas: 1) preparo de antígenos puros ou parcialmente purificados; 2) Preparo do inóculo e adição do adjuvante; 3) inoculação em um animal de produção, seja ele um equino, coelho, cabra, ovelha ou ave; 4) coleta de sangue e obtenção do soro; 5) purificação de anticorpos e sua conjugação e/ou marcação, se necessário e; 6) testes para controle da qualidade do produto produzido. O produto aprovado nesta última etapa poderá ser utilizado nos testes de imunodiagnóstico (ROITT, 2018).

Como o soro hiperimune é retirado de animais previamente imunizados, geralmente coelhos ou equinos, essa produção de anticorpos exige um local para criação do animal doador de soro, seja este um biotério, granja ou fazenda, o que demanda grande área de produção, instalações adequadas e técnicos especializados, além dos gastos com alimentação e manejo desses animais. Além disso, as etapas de preparo da molécula que será inoculada, de purificação dos anticorpos produzidos e sua eventual conjugação e também os testes de controle de qualidade do produto deverão ser realizados em laboratórios que contenham equipamentos adequados e mão-de-obra qualificada que possam assegurar a pureza, inocuidade e qualidade dos soros e produtos produzidos.

Desta forma, o *campus* Bambuí demonstrou ser o local ideal para implementação da plataforma de produção de soros hiperimunes, já que, diferentemente de outros centros de pesquisa, é um local que conjuga a produção animal (como a cunicultura e a equideocultura), a expertise de professores doutores e pós-doutores na área de imunologia aplicada e o ambiente para implementação de laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e biotecnologia. Desta maneira, não houve a necessidade de gastos iniciais com a aquisição de terrenos e com a construção de galpões e biotérios, implementação de instalações, gaiolas, comedouros e bebedouros, nem mesmo com treinamento de mão-de-obra qualificada para manejar esses animais. Tendo ainda como vantagem, a própria demanda interna de uso do anticorpo a ser produzido, com a possibilidade concreta de sanar problemas específicos envolvendo os interesses locais como os questionamentos sobre a dinâmica da transferência de imunidade passiva em animais domésticos feitos por pesquisadores do próprio *campus*.

METODOLOGIA:

A padronização da IDGA radial foi uma das etapas da produção de soro hiperimune anti IgG bovino descritas a seguir:

1. Coleta de soro bovino, purificação de IgG e preparo do inóculo para imunização dos coelhos:

Amostras de sangue de três bovinos foram coletadas, mediante punção da veia jugular em tubos estéreis a vácuo sem anticoagulante, totalizando 30ml de sangue de cada animal. Após a coagulação e coleta dos soros, formou-se um *pool* com as três amostras. Anticorpos IgG foram purificados a partir do soro pelo método de precipitação conjugada de ácido caprílico seguida por sulfato de amônia, realizada segundo Mckinney e Parkinson (DONGMEI, HAI SI & ANG, 2019). O produto da precipitação foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 7,5% sob condições redutoras a fim de avaliar sua pureza. A dosagem de proteína total da amostra foi determinada pelo método colorimétrico do biureto empregando-se kit comercial (Proteínas totais monoreagente, Bioclin, MG, Brasil). O inóculo foi preparado a partir de adição em partes iguais do antígeno purificado com o adjuvante Incompleto de Freund. (Freund's Adjuvant, Incomplete, Sigma, MO, USA).

2. Inoculação em coelhos:

Coelhos da raça Nova Zelândia branca com cerca de 3 meses de idade e acima de 1,5 Kg de peso foram inoculados com 1ml do inóculo, por via subcutânea. As inoculações foram realizadas a cada 14 dias, durante quatro ciclos de imunização. Um teste de imunodifusão dupla foi realizado para verificação

da produção de anticorpos e, após confirmação, os coelhos foram submetidos a exsanguinação por punção cardíaca segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Resolução Normativa 13, de 20/09/2013). A plataforma de produção de soros hiperimunes foi implantada no Instituto Federal de Minas Gerais, *campus* Bambuí, sendo o projeto submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA IFMG) pelo parecer nº09/2017 de 14 de dezembro de 2017.

3. Padronização de IDGA radial:

Para a padronização e realização do teste imunodifusão radial foram utilizadas placas de vidros onde foi dispensado o gel de ágar noble contendo o soro produzido. Este gel foi preparado utilizando ágar noble a 3%, aquecido a 60°C, em tampão borato com pH= 8,6. O soro foi adicionado ao gel, pré-aquecido (56°C), diluído em PBS, em volume igual a do ágar. Foram padronizados: o tamanho da placa (gel 8 X 7cm), o volume (5ml) e espessura (0,75mm) do gel, o diâmetro do poço perfurado (2mm) e o tempo de leitura do teste (72 horas). Uma curva padrão foi construída, através de uma concentração conhecida de proteínas plasmática bovina, para uso como padrão na quantificação do produto. O diâmetro do halo formado foi medido a fim de avaliar a atividade biológica do anticorpo produzido e determinar a concentração de imunoglobulina G (IgG).

4. Avaliação do produto “anticorpo policlonal anti-IgG bovino”:

O teste padronizado utilizando os anticorpos anti-IgG bovinos produzido foi utilizado para medir a quantidade de anticorpos no colostro de 40 vacas. A concentração de anticorpos também foi mensurada utilizando o mesmo teste, mas contendo anti-IgG comercial importada (Anti-bovine IgG whole molecule, Sigma, MO, USA) e serviu de parâmetro para validar os resultados encontrados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A Figura 1 (A) demonstra que a IgG bovina foi purificada a partir do soro coletado e por isso pôde ser inoculada nos coelhos para a produção de soro hiperimune. As linhas de precipitação de imunocomplexos demonstrados na imunodifusão dupla da Figura 1 (B) evidenciam que os animais submetidos a inoculação foram capazes de responderem imunologicamente ao inóculo, produzindo assim o anticorpo policlonal anti-IgG bovino. Com o teste de IDGA radial desenvolvido, as IgG das amostras de colostro das 40 vacas puderam ser quantificadas através da mensuração da área do halo de precipitação formado, conforme demonstrado na Figura 1(C), já que existe uma relação linear entre ela e a concentração do antígeno (com o uso de IgG bovino em concentrações conhecidas construiu-se uma curva padrão, permitindo determinar a concentração em amostras desconhecidas).

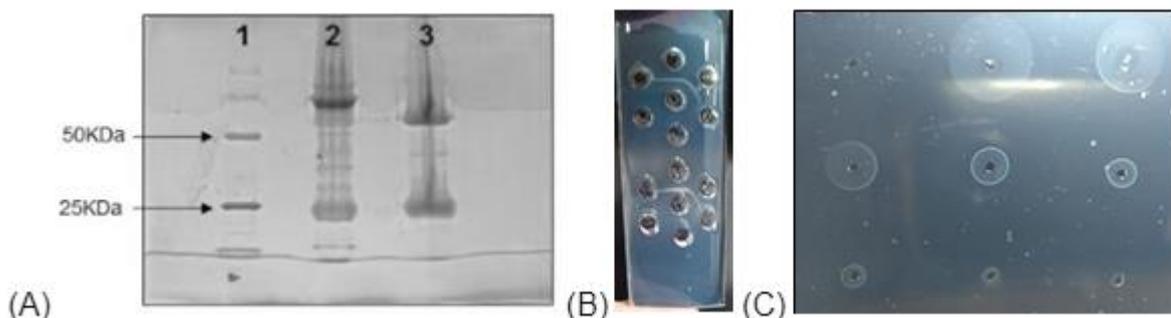


Figura 1- (A) SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras. Canaleta (1) padrão de peso molecular, (2) Soro bovino antes da purificação e (3) IgG bovina purificada. (B) IDGA dupla demonstrando a linha de

precipitação contendo imunocomplexos IgG bovino purificado- anti-IgG bovino. (C) IDGA radial padronizada utilizando o anti-IgG bovino produzido.

A quantidade de IgG encontrada foi de $43,5 \pm 9,2$ mg/ml de colostro, o que corrobora com os resultados de diversos autores (e compilados em TIZARD, 2014) onde a concentração varia de 34-80 mg/ml. Além disso, a dosagem realizada com a IDGA radial padronizada demonstrou alta correlação com a dosagem anteriormente realizada nas mesmas amostras ($44,4 \pm 8,3$ mg/ml).

CONCLUSÕES:

A padronização do teste de IDGA radial utilizando o “anticorpo anti-IgG bovino” foi concluída com sucesso e demonstrou a possibilidade de substituição do anticorpo comercial importado como anticorpo primário pelo produto desenvolvido na plataforma de produção de soros hiperimunes do IFMG. O primeiro produto desta plataforma foi avaliado e aprovado para uso na quantificação de anticorpos de bovinos, sendo uma ferramenta essencial para o entendimento dos mecanismos que resultam na mortalidade de crias que não conseguem adquirir os anticorpos advindos da mãe e assim, estudar novas formas de manejo e intervenção, principalmente da administração de colostro, a fim de reduzir esta mortalidade de recém-nascidos.

Como perspectivas da ampliação da plataforma produtora de soros hiperimunes do IFMG, outras aplicações dos anticorpos policlonais como ferramentas de pesquisa e diagnóstico que poderiam ser utilizadas por diversas áreas do *campus*: (a) desenvolvimento de anticorpos contra proteínas de equinos, por exemplo, que poderia ser utilizado na detecção de fraudes em carnes, onde a contaminação de carne bovina com carne equina seria rapidamente detectada; (b) desenvolvimento de kits diagnósticos para fitopatógenos de importância para agricultura como um soro contendo anticorpos capazes de detectar a presença do fungo na planta; (c) desenvolvimento de *kit* de diagnóstico para a detecção de patógenos de importância humana e veterinária e na área de segurança alimentar, por exemplo, detecção de salmonelose dentro de frigoríficos e abatedouros de aves e suínos; dentre outras infinitas possibilidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 13, de 20/09/2013. Available at: < <http://www.lex.com.br/legis.aspx>. > Accessed on: May. 28, 2019.

DONGMEI, L.; HAISI, D.; ANG, S. 2019. Magnetic Multiarm Scaffold for the One- Step Purification of Epitope-Specific Neutralizing Antibodies. *Analytical Chemistry* 91 (9): 6172-6179.

ROITT, I. *Fundamentos de Imunologia*. 13. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 182p.

SILVA, C.P.C.; BALDACIM, V.A.P.; REIS, J.F.; NOVO, S.M.F.; SANTOS, O.; STRICAGNOLO, C.R.; HURLEY, D.J.; GOMES, V. Functional activity of neutrophils CH138+ in bovine colostrum and transition milk through natural exposure to bacterias. In: *WORLD BUJATRICS CONGRESS*, 27., Cairns, Austrália, 2014. Resumos. Cairns, 2014.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária -Uma Introdução*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 568p.

Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:

Este trabalho é parte integrante do projeto intitulado “Produção de anticorpos policlonais para uso diagnóstico. Fase I - Produção e avaliação de anticorpo anti-IgG Bovino”, que teve seus resultados parciais apresentados na **XI Jornada Científica do IFMG campus Bambuí** (resumo expandido selecionado para apresentação oral) e enviados ao **29º Congresso Brasileiro de Zootecnia**.

