



PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA USO DIAGNÓSTICO. FASE I - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-IGG BOVINO

Ana Victória Musallam Pimentel^(1,2), Tiago da Silva Magalhães^(1,2), Fernanda Stefani Simões^(1,2),

Amanda Soriano Araújo Barezani⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) - Campus Bambuí

⁽²⁾ Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC / PIBIC Júnior / PIBITEX / PIBITI) – FAPEMIG / IFMG

anampvick@gmail.com, magalhaes.tiago@outlook.com,

fernandastefani74@gmail.com, amanda.barezani@ifmg.edu.br

RESUMO

A produção de soro hiperimune, de onde são obtidos os anticorpos policlonais para uso terapêutico, diagnóstico e em pesquisa, sempre teve importância tanto em medicina humana quanto em veterinária. Aproveitando-se da função fisiológica dos anticorpos em reconhecer e se ligar à determinadas moléculas contra as quais eles foram produzidos, eles podem ser utilizados tanto na produção de soros terapêuticos quanto podem servir de reagentes/insumos em testes que identificam diversas doenças humanas, animais e vegetais. Técnicas clássicas de imunodiagnóstico como imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imuno-histoquímica (IHQ) e imunofluorescência (IF) têm esse soro como fonte dos anticorpos primários e/ou secundários utilizados em seus protocolos. No entanto, pesquisadores que utilizam anticorpos como ferramentas de pesquisa e laboratórios brasileiros que fornecem os serviços de diagnóstico, dependem fortemente da importação desses imunobiológicos, na maioria das vezes como única opção de compra de empresas multinacionais, o que acarreta em onerosos custos, além de atrasar pesquisas, sendo comum a entrega de produtos fora da data de validade ou danificados por incorreto transporte. A fim de reduzir o problema da aquisição desses produtos, este trabalho propôs a implementação de um laboratório produtor de anticorpos policlonais dentro do próprio IFMG, com intuito de serem utilizados em pesquisas nas diversas áreas existentes dentro e fora do *campus*. Como fase 1 do projeto, está sendo desenvolvido o primeiro produto: anticorpo policlonal anti-IgG bovino. Este anticorpo será utilizado como reagente do teste de IDGA radial, que tem aplicação prática na quantificação de anticorpos do colostro de vacas e soro e bezerros durante pesquisa de transferência de imunidade da mãe para a cria e será testado em um experimento sobre a mortalidade de bezerros e sua ligação com a falha de transferência da imunidade passiva, a ser desenvolvido no setor de bovinocultura de leite do IFMG/Bambuí.

Palavras-chave: Teste diagnóstico. Bovinocultura de Leite. Anticorpos policlonais.



1 INTRODUÇÃO

Imunologistas utilizam o termo “antígeno” para se referirem a uma molécula reconhecida por agentes responsáveis pela defesa do organismo. Segundo ABBAS e colaboradores (2017), são os anticorpos as proteínas específicas no reconhecimento dessas moléculas estranhas ao organismo que as produz e estão distribuídas pelos líquidos corporais como sangue, leite e o colostro, sendo encontradas nas superfícies de determinados tipos celulares. Os anticorpos também podem ser utilizados em laboratório como ferramentas em testes diagnósticos, além da possibilidade de serem usados na clínica como agentes terapêuticos, quando produzidos contra uma enfermidade, organismo, veneno ou toxina conhecidos (ROITT, 2018).

É de conhecimento geral que, os recém-nascidos de várias espécies não são capazes de combater uma infecção já que seu sistema imune, apesar de completo, não é maduro o suficiente no momento do nascimento (TIZARD, 2014). Essa falta de maturação imunológica é compensada pela transferência de imunidade passiva, ou seja, a capacidade materna de passar para o feto anticorpos contra diversas doenças as quais já tenha entrado em contato anteriormente. Entretanto, diferentemente dos humanos, alguns ruminantes como bovinos, caprinos e ovinos não trocam imunoglobulinas entre o feto e mãe no período gestacional, isto porque as placentas desses animais, são formadas por diversas camadas de tecido que impedem que grandes moléculas como os anticorpos se difundam da mãe para o concepto (LAVEN, 2012; TIZARD, 2014). Com isso, estes animais dependem, exclusivamente, da ingestão do colostro como fonte destes anticorpos. Assim, o estudo da imunidade passiva é essencial para que se entenda os 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 a fim de reduzir esta mortalidade.

Como objetivo geral do projeto, buscou-se implementar uma plataforma de produção de soros policlonais, com o estabelecimento de um laboratório com experiência em produção de soro hiperimune dentro do IFMG, capaz de contribuir cientificamente na área da produção animal. Nesta primeira fase de implantação, foi dada ênfase na produção de anticorpos utilizados em testes de quantificação de imunoglobulinas do sangue, leite e colostro em bovinos de leite devido às grandes perdas econômicas advindas da mortalidade de bezerros por pneumonia e diarreia por causa de falhas na aquisição da imunidade passiva.

Além da contribuição econômica, alcançada pela produção de um anticorpo nacional, sem a necessidade da importação onerosa e morosa desse material, o projeto terá outras contribuições científicas como: o desenvolvimento a curto prazo de outros produtos capazes de quantificar o IgG e diagnosticar as falhas de transferência de imunidade passiva envolvendo outras espécies como



equinos, ovinos e caprinos e, a médio e longo prazos, produzir outros tipos de anticorpos contra microrganismos específicos e utilizados nas pesquisas e diagnósticos de doenças animais, humanas e vegetais. A partir daí novos kits comerciais de imunodiagnóstico que terão como base o uso desses anticorpos poderá ser desenvolvido através de parcerias entre os pesquisadores de outros institutos e universidades, além da integração de pesquisadores de diversos cursos do *campus*, como as pesquisas aplicadas nas áreas de Zootecnia, Agronomia, Biologia, Medicina Veterinária e Engenharia de Alimentos.

Assim, o presente trabalho ainda tem como objetivo específico utilizar os anticorpos policlonais anti-IgG bovino produzidos, em um experimento sobre a mortalidade de bezerros e sua relação com a falha na transferência da imunidade passiva, a ser desenvolvido no setor de bovinocultura de leite do IFMG/BambuÍ.

2 METODOLOGIA

2.1. MATERIAL

Foram utilizadas para a produção de anticorpos policlonais (etapa em desenvolvimento) as seguintes amostras: pool de soros de bovinos e soro hiperimune de coelhos. Para o desenvolvimento do estudo da imunidade passiva em bovinos (etapa a ser desenvolvida) serão utilizados: soro e colostro de vacas recém paridas, além de soro de bezerros recém-nascidos.

Para a coleta de soro para purificação de IgG bovina, foram utilizados três bovinos mestiços, adultos, de peso variável. Para a coleta de amostras de soro e colostro (etapa em desenvolvimento), estão sendo utilizadas vacas mestiças, recém paridas, de idade e peso variáveis, todas pertencentes ao setor de bovinocultura de leite do IFMG *campus* Bambuí. Já para a produção do soro hiperimune fonte dos anticorpos policlonais anti-IgG bovino (etapa a ser desenvolvida), serão utilizadas coelhas, fêmeas da raça Nova Zelândia branca com cerca de 3 meses de idade e acima de 1,5 Kg de peso, fornecidos pelo setor de Cunicultura do IFMG *campus* Bambuí.

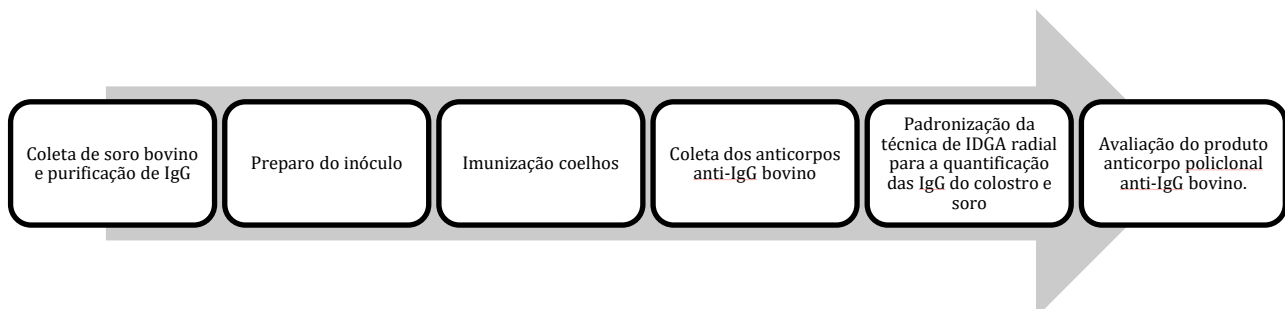


Figura 1- Etapas da produção de soro hiperimune de coelhos, contendo anti-IgG bovino, que será utilizado em pesquisa envolvendo a imunidade passiva em vacas leiteiras. As etapas de coleta de soro bovino, purificação de imunoglobulinas G e preparo do inóculo já foram concluídas. As demais etapas estão em andamento.



2.2. MÉTODO:

2.2.1. 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, sendo cerca de 30ml de sangue de cada animal. Após a coagulação e coleta dos soros, as três amostras foram misturadas formando um *pool*. Anticorpos IgG foram purificados a partir do soro por precipitação conjugada de ácido caprílico e sulfato de amônia. Primeiramente, acrescentou-se 200ml de tampão acetato (60Mm, pH 4,0), ajustando o pH para 4,5. Foi adicionado ácido caprílico, sob agitação constante. Após centrifugação, o sedimento foi desprezado. Adicionou-se solução saturada de sulfato de amônio, agitando por mais 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso em tampão PBS e uma amostra foi submetida a uma corrida em gel de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando-se tampão tris pH 9,5. para avaliar a pureza das moléculas precipitadas. A dosagem de proteína total da amostra foi determinada pelo método colorimétrico do método do biureto, empregando-se kit comercial. O inóculo foi preparado a partir de adição em partes iguais do antígeno purificado com o adjuvante Incompleto de Freund.

2.2.3. Inoculação em coelhos:

Os coelhos serão inoculados com 1ml de inóculo, por via subcutânea. As inoculações serão realizadas a cada 14 dias, durante três ciclos de imunização, quando então serão 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).

2.2.5. Padronização da técnica de imunodifusão radial (IDGA radial):

Para a padronização e realização do teste imunodifusão radial serão utilizadas placas de vidros onde será dispensado o gel de ágar noble contendo o soro produzido. Este gel será preparado utilizando ágar noble a 3%, aquecido a 60°C, em tampão borato com pH = 8,6. O antissoro será adicionado ao gel, pré-aquecido (56°C), diluído em PBS, em volume igual a do ágar. Serão padronizados: o tamanho da placa, o volume e espessura do gel, o diâmetro do poço perfurado, a diluição do antissoro a ser colocada no gel e o tempo de leitura do teste. Uma curva padrão de regressão linear será construída, através de uma concentração conhecida de proteínas plasmática bovina, para poder utilizá-la como padrão na quantificação do produto.

2.2.6. Avaliação do produto “anticorpo policlonal anti-IgG bovino coletado:



A técnica padronizada será utilizada para mensurar a concentração de IgG no colostro e soro das vacas, no dia do parto e no soro dos bezerros antes e 24 horas após a mamada do colostro. O diâmetro do halo formado será medido a fim de avaliar a atividade biológica do anticorpo produzido e a concentração de imunoglobulina G (IgG) será determinada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o trabalho ainda está sendo desenvolvido, tem-se ainda resultados parciais.

4 CONCLUSÃO

As primeiras metas para a produção do anticorpo anti-IgG bovino foram alcançadas com a coleta de sangue e processamento do soro bovino e posterior purificação de IgG. O banco de soro e colostro das vacas paridas e seus bezerros também já está sendo implementado. Embora ainda não seja possível concluir o estudo, a implantação de uma plataforma de produção de anticorpos policlonais dentro do IFMG, *campus* Bambuí já está se tornando realidade, sendo seu primeiro produto, anticorpo anti-IgG bovino, essencial para desenvolvimento de ferramentas para que se entenda os 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 a fim de reduzir esta mortalidade.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço à pró-reitora do IFMG pela oportunidade em desenvolver a pesquisa, à CNPq e FAPEMIG pela concessão das bolsas para desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 338p.

LAVEN, R.R. Effect of use of teatseal ants at drying off on the uptake of colostrum antibodies by calves, as estimated by measuring gamma-glutamyltransferase activity. *New Zealand Veterinary Journal*, v.60, n.1, p.47-49, 2012.

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 bacteria. In: *WORLD BUIATRICS CONGRESS*, 27., Cairns, Austrália, 2014. Resumos. Cairns, 2014.

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