

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS ANTI-ERITROPOETINA RECOMBINANTE HUMANA

COLLARES, Thaís Farias¹; XAVIER, Marina Amaral¹; COLLARES, Tiago²; SEIXAS, Fabiana Kömmiling³; DELLAGOSTIN, Odir Antonio⁴; HARTLEBEN, Cláudia Pinho¹

¹Laboratório de Imunodiagnóstico; ²Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese; ³Laboratório de Genômica Funcional; ⁴Laboratório de Biologia Molecular - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas
collares.thais@gmail.com / claudia.hartleben@pq.cnpq.br

1. INTRODUÇÃO

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoprotéico que possui como principal efeito fisiológico a indução da eritrocitose e conseqüente melhoria da capacidade de transporte de oxigênio no sangue (FISHER, 2003).

Devido ao fato do aumento do número de hemácias melhorar a performance de atletas em esportes de resistência, o uso de formas sintéticas da EPO é proibido pela Agência Mundial Anti-Doping (WADA). Na verdade, análogos da EPO, tais como a eritropoetina recombinante humana (rHuEPO), podem ser substitutos da eritropoetina endógena, através da ligação ao seu receptor e provocando sinalização intracelular de uma forma idêntica a do hormônio natural (LAMON et al., 2010).

No esporte, especula-se que a rHuEPO passou a ser utilizada de forma rotineira como meio artificial de produção de glóbulos vermelhos, devido a vantagem adicional da difícil detecção de sua presença na matriz biológica através dos métodos analíticos convencionais, além do efetivo ganho no desempenho esportivo (PASCUAL et al., 2004)

Durante vários anos foram pesquisadas maneiras de contornar o problema da dopagem por rHuEPO devido a impossibilidade de sua detecção e diferenciação, por se tratar de uma substância estruturalmente complexa de elevada massa molecular, presente em baixas concentrações nos fluidos biológicos e bastante semelhante a sua forma endógena. Além disso, podendo ser obtida e administrada sem supervisão médica, o que aumenta o risco de seu abuso (KAZLAUSKAS et al., 2002; SHARPE et al., 2002).

Estratégias de detecção do doping com rHuEPO incluem abordagens indiretas com marcadores da eritropoiese aumentada ou reduzida, bem como a detecção direta das isoformas recombinantes (EKBLUM, 2000).

A diferenciação analítica da eritropoetina endógena produzida a partir de sua contraparte recombinante usando focalização isoeletrica e duplo blotting é um marco na detecção do doping com eritropoetina recombinante. No entanto, vários análogos dos produtos recombinantes iniciais, nem sempre são facilmente detectáveis pelo método padrão-IEF, exigem o desenvolvimento de alternativas de análise para a detecção do doping com EPO (REICHEL et al., 2010).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é obter anticorpos monoclonais e policlonais anti-EPO para posteriormente avaliar sua utilização na detecção do doping com a rHuEPO.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Imunização dos camundongos com rHuEPO e obtenção do soro policlonal

Dois camundongos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram imunizados via intraperitoneal (i.p.) nos dias 0, 14, 21, 28 e 35 com 50 µg de rHuEPO (EPREX®). Na primeira inoculação usou-se igual volume de adjuvante de Freund completo e nas outras 4 imunizações utilizou-se adjuvante de Freund incompleto. Uma semana após a última imunização, foi feita uma titulação de anticorpos do soro através de um Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) indireto, utilizando rHuEPO como antígeno. O camundongo com título mais alto recebeu nova dose de antígeno via i.p., uma dose da proteína via endovenosa (aproximadamente 50 µg) e, após três dias, foi eutanasiado para obtenção dos esplenócitos para realização da fusão com as células de mieloma.

2.2 Avaliação do anticorpo policlonal (pAb)

Para a titulação do pAb anti-rHuEPO uma placa de ELISA foi sensibilizada com 50, 100 e 200 µg por poço de rHuEPO em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9.6 e incubadas overnight a 4°C. Após as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e incubadas por 1h a 37°C com o anticorpo policlonal diluído 1:12,5 até 1:12,800. Depois de nova série de 3 lavagens com PBS-T, anticorpo de coelho anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (diluído 1:2000) foi adicionado às cavidades seguido de incubação a 37°C por 1h. Após nova lavagem das placas, o substrato da enzima cromógeno (H₂O₂/OPD) em tampão citrato-fosfato foi adicionado. A reação ocorreu no escuro por 15 min e a leitura da densidade óptica realizada a 450 nm no espectrofotômetro VICTOR™ X5/2030 Multilabel Reader - PerkinElmer. Foram utilizados volumes de 50 µL para a reação.

Para o *Western Blotting* (WB), a rHuEPO foi submetida a SDS-PAGE em um gel 12%; o gel foi corado e transferido para uma membrana PVDF (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada, lavada duas vezes com PBS-T e incubada por 1h com pAb diluído 1/200 in PBS-T. Depois de 3 lavagens com PBS-T foi adicionado anticorpo de coelho anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) por 1h, novamente lavado 3 vezes com PBS-T, e as bandas foram visualizadas pela adição de solução de substrato cromógeno (H₂O₂/4-chloro-1-naphthol).

2.3 Produção dos anticorpos monoclonais (MAbs)

A produção dos MAbs está sendo realizada de acordo com as recomendações de Harlow & Lane (1988). Resumidamente, esplenócitos do camundongo imunizado e células de mieloma da linhagem SP2/0 foram misturadas numa proporção 1:10 e induzidas à fusão com solução de polietilenoglicol a 50%. As células foram ressuspensas em DMEM-HAT contendo 10% de soro fetal bovino e a suspensão foi distribuída em placas de cultivo de células que foram incubadas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

As cavidades que apresentarem bom crescimento de células serão testadas através de um ELISA indireto usando rHuEPO como antígeno para verificar a produção de anticorpos. Os hibridomas que apresentarem boa atividade de anticorpos serão clonados duas vezes pela técnica da diluição limitante, expandidos, retestados e congelados em nitrogênio líquido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Anticorpos policlonais têm sido utilizados em testes de detecção de doping com eritropoetina (GIMÉNEZ, 2007). Na titulação do anticorpo policlonais anti-EPO verificou-se que a concentração de 50 g de rHuEPO foi a que apresentou melhores resultados. Conforme a figura 1, a melhor titulação é a da diluição 1:3200. O pAb/rHuEPO alcançou título de 1,280 no ELISA indireto. Os resultados obtidos no WB mostram que o anticorpo policlonal anti-EPO foi capaz de reconhecer a proteína recombinante humana, como podemos observar na figura 2, demonstrando potencial para ser utilizado na detecção de doping.

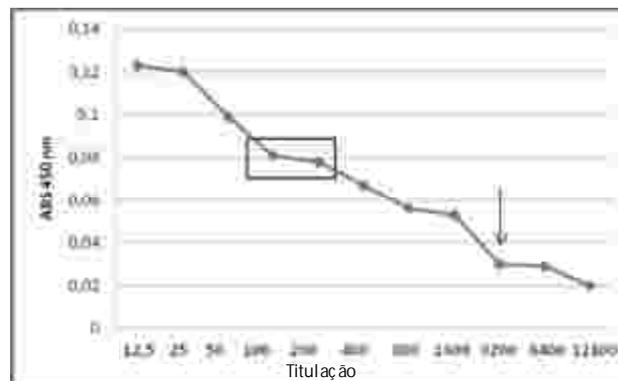


Figura 1 - Avaliação da atividade biológica do anticorpo policlonal (pAb) através de ELISA indireto. Titulação do pAb contra o antígeno rHuEPO.

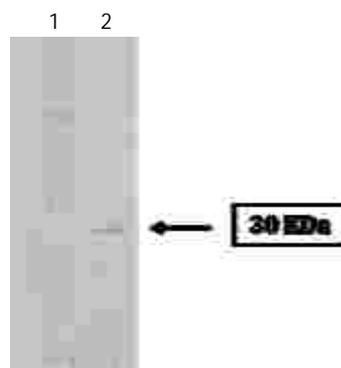


Figura 2 - Avaliação do anticorpo policlonal (pAb) anti-EPO na capacidade de reconhecer a proteína recombinante. *Western blotting*: 1- marcador; 2- pAb/rHuEPO

A fusão celular foi efetiva, uma vez que, somente células fusionadas permanecem viáveis após 10 dias de cultivo em meio seletivo DMEM-HAT. Os hibridomas serão testados contra seu antígeno específico assim que apresentarem crescimento esperado e então clonados, novamente testados em ELISA, reclonados, expandidos e congelados.

4. CONCLUSÕES

A rHuEPO foi capaz de gerar um anticorpo policlonal monoespecífico (pAb/rHuEPO) que reconheceu a proteína recombinante e pode ser útil em diferentes

formatos de testes para detecção de doping. Espera-se também obter clones secretores contra a eritropoetina recombinante humana. Posteriores testes com sangue e urina provenientes de modelos biológicos tratados e não tratados (controle) serão realizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EKBLOM, B.T. Blood boosting and sport. **Baillière's Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.14, n.1, p.89-98, 2000.

FISHER, J.W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. **Experimental Biology and Medicine**, v.228, n.1, p.1-14, 2003.

GIMÉNEZ, E; BOLÓS, C. de; BELALCAZAR, V; ANDREU, D; BORRÁS, E; DE LA TORRE, B.G; BARBOSA, J; SEGURA, J; PASCUAL, J.A. Anti-EPO and anti-NESP antibodies raised against synthetic peptides that reproduce the minimal amino acid sequence differences between EPO and NESP. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, n.7, p.1531-1538, 2007.

LAMON, S; ROBINSON, N; SAUGY, M. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogs in doping. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v.39, n.1, p.141-54, 2010.

HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

KAZLAUSKAS, R; HOWE, C; TROUT, G. Strategies for rhEPO detection in sport. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v.12, n.4, p.229-235, 2002.

PASCUAL, J.A; BELALCAZAR, V; DE, B.C; GUTIERREZ, R; LLOP, E; SEGURA, J. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.26, n.2, p.175-179, 2004.

REICHEL, C; GMEINER, G. Erythropoietin and analogs. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n.195, p.251-294, 2010.

SHARPE, K; HOPKINS, W; EMSLIE, K.R; HOWE, C; TROUT, G.J; KAZLAUSKAS, R; ASHENDEN, M.J; GORE, C.J; PARISOTTO, R; HAHN, A.G. Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. **Haematologica**, v.87, n.12, p.1248-1257, 2002.