

REA 04 - Avaliação da estabilidade de IgG de cabra anti-humano marcado com FITC por espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W)

Luãna Elisa Liebscher Vidal^{1*}; Giselle Santana de Oliveira²; Hilton Jorge dos Santos¹; Patricia Barbosa Jurgilas¹; Simone de Amorim Chermont²; José Godinho da Silva Junior¹.
1 Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratório de Macromoléculas (LAMAM);
2 Bio-Manguinhos / Fiocruz, Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA).

Introdução:

Conjugados são moléculas utilizadas em diversos ensaios imunológicos, formados através da ligação covalente entre um anticorpo e uma molécula que permita a sua detecção. Os kits de diagnóstico de imunofluorescência indireta produzidos por Bio-Manguinhos utilizam IgG de cabra anti-humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A estabilidade deste conjugado está associada com as condições de armazenamento, que podem afetar a sua integridade conformacional e atividade. Dessa forma, a avaliação de condições que permitam melhorar a estabilidade do conjugado se torna importante. Para tanto, a técnica de espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W) se mostra interessante por ser rápida, econômica e robusta.

Objetivo:

Avaliar a estabilidade do conjugado de IgG de cabra anti-humano/FITC através de espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W).

Metodologia:

Alterações conformacionais no anticorpo IgG de cabra anti-humano conjugado com FITC foram monitoradas através do espectro de fluorescência intrínseca do triptofano (W). O conjugado foi incubado em tampão fosfato-salino (PBS) com quatro diferentes estabilizantes: arginina 125mM, glicerol 10%, tween 20 0,01% ou albumina 1%, usando os mesmos parâmetros para a análise. Em seguida, a cinética térmica de desnaturação do conjugado foi realizada para cada condição, através de um intervalo de temperatura (25°C -85°C). O comprimento de onda de excitação usado foi 280nm, e a emissão do comprimento de onda foi escaneada de 295nm à 415nm. A análise de espalhamento de luz foi realizada no intervalo de 300-340nm, sendo excitado com 320nm.

Resultado:

Ensaio preliminares mostraram que o anticorpo se mantém estável até 50°C, enquanto o conjugado se mostrou estável até 55°C. O termograma do centro de massas mostrou que não houve diferença entre o conjugado sem ou com estabilizante, uma vez que nestas condições o valor de centro de massas se mantém estável até 55°C. O termograma de fluorescência mostrou um decaimento progressivo na razão 330/350, quando submetido ao aumento de temperatura, em diferentes condições. A análise do espalhamento de luz (LS) mostrou que há um aumento progressivo de agregação no conjugado, porém, quando incubado com tween e glicerol a agregação foi acentuada a partir de 60°C e 65°C, respectivamente. Além disso, o conjugado nas condições com estabilizantes apresentou uma redução de, aproximadamente, 75% na agregação na maior temperatura (85°C) quando comparado ao conjugado sem estabilizante.

Conclusão:

Os resultados mostraram que a temperatura induz modificações conformacionais nos resíduos de triptofano do anticorpo. O aumento da temperatura crítica quando o conjugado foi tratado previamente com glicerol sugere que esta é a melhor condição de estabilização. Ensaio por cromatografia de exclusão molecular serão realizados para confirmar os dados de agregação do conjugado.

Palavras-chave: Conjugado; Fluorescência Intrínseca do Triptofano; Estabilidade