

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Raíssa Lima Gonçalves Pereira

Comparação de técnicas de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anticocaína tipo IgG em camundongos.

Belo Horizonte - MG

2019

Raíssa Lima Gonçalves Pereira

Comparação de técnicas de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anticocaína tipo IgG em camundongos.

Versão Final

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Medicina Molecular

Orientador
Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia
Co-orientador
Prof^a. Dra. Sordaini Maria Caligiorne

Belo Horizonte - MG

2019

Pereira, Raíssa Lima Gonçalves.

P436c Comparação de técnicas de ensaio de absorção imuno-enzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anti-cocaína tipo IgG em camundongos [manuscrito]. / Raíssa Lima Gonçalves Pereira. -- Belo Horizonte: 2019.

85f.: il.

Orientador (a): Frederico Duarte Garcia.

Coorientador (a): Sordaini Maria Caligorne.

Área de concentração: Medicina Molecular.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 2. Anticorpos. 3. Vacinas. 4. Transtornos Relacionados ao Uso de Substâncias. 5. Dissertação Acadêmica. I. Garcia, Frederico Duarte. II. Caligorne, Sordaini Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 525.5.E6

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



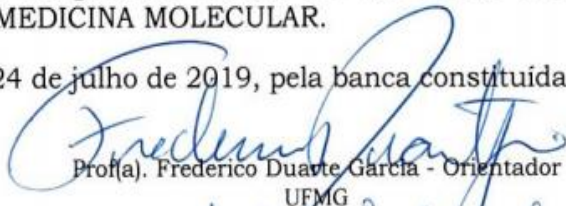
FOLHA DE APROVAÇÃO

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTICOCAÍNA EM ANIMAIS.

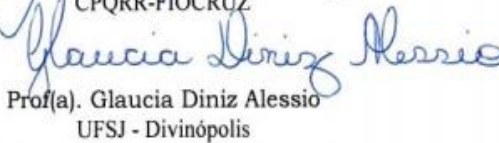
RAÍSSA LIMA GONÇALVES PEREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 24 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Frederico Duarte Garcia - Orientador
UFMG


Prof(a). Márcio Sobreira Silva Araújo
CPQRR-FIOCRUZ


Prof(a). Gláucia Diniz Alessio
UFSJ - Divinópolis


Prof(a). Sordaini Maria Caligorne
PCMG

Belo Horizonte, 24 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais e meu irmão e ao meu marido, Rafael Freire, por todo apoio e paciência.

À equipe do Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Vulnerabilidade e Saúde -NAVeS pela oportunidade de crescimento profissional, pessoal e suporte técnico científico.

Ao orientador Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia, coorientadora Prof^a Dra. Sordaini Maria Caligorne e à Prof^a Dra. Maila de Castro pelo constante auxílio e por acreditarem que eu poderia chegar até aqui.

À Angela Abreu Maia por sempre estar disponível para ajudar em tudo que fosse necessário para o andamento desse projeto.

Ao Paulo Augusto por todo suporte, conhecimento científico e por estar junto nos momentos mais críticos para a realização deste trabalho.

À Professora Gisele Goulart e às alunas Bruna e Hellen que sempre estiveram disponíveis para correção e padronização de todos os procedimentos operacionais padrão.

Às meninas da iniciação científica, Priscilla, Larissa e Karine por todo apoio que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Química da UFMG, Prof. Dr. Ângelo de Fátima, Leonardo Neto, Angélica e Adriana pelo desenvolvimento das moléculas imunogênicas, metabólitos da cocaína e por cedê-las para este trabalho.

À mestrande Tamires de Paula Silva do laboratório do Professor Lineu Freire Maia, que me auxiliou com o aparelho de leitor de ELISA e me ajudou nas leituras das microplacas.

À equipe do Biotério, Marcelo, Flávia e Zé Carlos pelo profissionalismo e organização do mesmo.

Aos colaboradores do Laboratório de Medicina Molecular pelo suporte e apoio técnico.

Aos pesquisadores do Instituto René Rachou – FIOCRUZ Minas – em especial Andréa Teixeira, Olindo Assis e Fernanda Fortes pela colaboração nesse projeto.

À Capes, FAPEMIG, CNPq e ao Deputado Hugo Leal pelo apoio financeiro.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”

(Isaac Newton)

RESUMO

Atualmente, o consumo de drogas ilícitas no Brasil tornou-se um problema de saúde pública. A imunofarmacoterapia é a estratégia mais promissora para o tratamento da dependência à cocaína e ao *crack*. O grupo de pesquisa NAVeS, em parceria com o Departamento de Química da UFMG, desenvolveu a molécula UFMG-VAC4N2, que se mostrou eficaz na produção de anticorpos anticocaína em camundongos. Esses anticorpos específicos reduzem a fração livre da droga na corrente sanguínea, moderando seus efeitos e reduzindo sua entrada na barreira hematoencefálica (BHE) e, conseqüentemente, no sistema nervoso central (SNC). Diante disto, é importante determinar-se a quantificação desses anticorpos específicos produzidos pela indução da vacina anticocaína. No presente estudo, utilizamos um Ensaio Imunoenzimático (ELISA), método analítico qualitativo/quantitativo que tem como princípio a reação de um antígeno-anticorpo (Ac-Ag) obtida por meio de um conjugado e substrato enzimático que permitem a mudança de coloração do meio e quantificação por espectrofotometria. Foram analisadas duas estratégias distintas de identificação e quantificação desses anticorpos tipo IgG em camundongos, as quais são: 1) uso do GNE, um hapteno de cocaína, conjugado à albumina sérica bovina (BSA) e fixado em base sólida e; 2) uso de cocaína livre em fase sólida. O método consistiu na imunização com a vacina de hapteno GNE conjugada à proteína KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), de atividade imunológica já estabelecida, em camundongos Balb/c machos e dosagem dos anticorpos anticocaína pelo método ELISA indireto e competitivo. Foram realizadas 3 imunizações nos tempos 0, 7 e 21 dias, sendo que cada animal recebeu, por imunização, 300 µL de emulsão contendo GNE-KLH disperso em adjuvante de Freund completo ou incompleto. Em cada imunização foi feita coleta de cerca de 400 µL de sangue dos animais pela via submandibular para separação do soro e realização dos ensaios imunológicos. Um *pool* de soros dos animais com densidade óptica maior a 0,7 foi produzido para os testes de linearidade e para identificar a técnica mais sensível de detecção dos anticorpos específicos para cocaína. No teste de linearidade para dosagem desses anticorpos foi encontrada uma resposta relativamente positiva nas duas técnicas, porém a resposta para GNE-BSA foi mais satisfatória. Conclui-se que, para dosagem de anticorpos anticocaína do tipo IgG em camundongos, as duas técnicas são confiáveis, contudo, os resultados para GNE-BSA permitem maior sensibilidade para detecção desses anticorpos. As perspectivas para esse trabalho são a padronização do método ELISA para a detecção de anticorpos anticocaína em humanos, visando o estudo clínico de fase 1 para a vacina UFMG-VAC4N2 e o estudo dos subtipos de anticorpos IgG produzidos pela vacina, relevante para a compreensão dos mecanismos pelos quais esses anticorpos podem reduzir o consumo de droga e para avaliar a seleção dos pacientes para receberem um futuro tratamento imunológico.

Palavras chave: ELISA. Anticorpo anticocaína. Vacina anticocaína. Dependência química.

ABSTRACT

Currently, illicit drug use in Brazil has become a public health problem. Immunopharmacotherapy is the most promising strategy for treating cocaine and crack addiction. The NAVEs research group, in partnership with the UFMG Department of Chemistry, developed the UFMG-VAC4N2 molecule, which has been shown to be effective in producing anticocaine antibodies in mice. These specific antibodies reduce the free fraction of the drug in the bloodstream, moderating its effects and reducing its entry into the blood-brain barrier (BBB) and, consequently, the central nervous system (CNS). Given this, it is important to determine the quantification of these specific antibodies produced by the induction of the cocaine vaccine. In the present study, we used an immunoenzymatic assay (ELISA), a qualitative / quantitative analytical method that has its principle the reaction of an antigen-antibody (Ac-Ag) obtained by means of a conjugate and enzymatic substrate that allow the color change of the medium and quantification by spectrophotometry. Two distinct strategies of identification and quantification of these IgG antibodies in mice were analyzed, which are: 1) use of GNE, a cocaine hapten, conjugated to bovine serum albumin (BSA) and fixed in solid base; 2) use of free cocaine in solid phase. The method consisted of immunization with the established immunological activity KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) hapten GNE-conjugated hapten vaccine in male Balb / c mice and anti-cocaine antibody measurement by the indirect and competitive ELISA method. Three immunizations were performed at times 0, 7 and 21 days, and each animal received, by immunization, 300 μ L of emulsion containing GNE-KLH dispersed in complete or incomplete Freund's adjuvant. At each immunization, approximately 400 μ L of blood was collected from the animals via the submandibular route for serum separation. An animal serum pool with an optical density greater than 0.7 was produced for linearity testing and to identify the most sensitive detection technique for cocaine-specific antibodies. In the linearity test for the dosage of these antibodies, a relatively positive response was found in both techniques, but the response to GNE-BSA was more satisfactory. It is concluded that for the measurement of anticocaine IgG antibodies in mice, both techniques are reliable, however, the results for GNE-BSA allow greater sensitivity for detection of these antibodies. Prospects for this work are the standardization of the ELISA method for the detection of anti-cocaine antibodies in humans, aiming at the phase 1 clinical study for the UFMG-VAC4N2 vaccine and the study of vaccine-produced IgG antibody subtypes relevant for understanding of the mechanisms by which these antibodies can reduce drug use and to evaluate patient selection for future immunological treatment.

Keywords: ELISA. Anticocaine antibody. Anticocaine vaccine. Chemical Dependence

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Construção de haptenos para a produção de vacinas antidrogas imuno-conjugadas..... | 19 |
| Figura 2. Esquema de ligação que ocorre no ELISA Direto..... | 25 |
| Figura 3. Etapas do ELISA indireto..... | 26 |
| Figura 4. Etapas ELISA competitivo..... | 27 |
| Figura 5. Figura do teste da Gota para emulsão A/O..... | 41 |
| Figura 6. Figura Ilustrativa do local de coleta do sangue submandibular em camundongos..... | 43 |
| Figura 7. Gráfico da avaliação da eficácia da imunização em ensaio de ELISA indireto com cocaína na fase sólida..... | 49 |
| Figura 8 Gráfico do teste de linearidade entre a concentração do pool e a densidade optica no ELISA com cocaína fixada na fase sólida..... | 50 |
| Figura 9. Gráfico do teste de linearidade por competição com cocaína no ELISA indireto com cocaína fixada na fase sólida..... | 51 |
| Figura 10. Gráfico do ELISA de competição com os principais metabólitos da cocaína e cocaína fixada na fase sólida..... | 52 |
| Figura 11. Gráfico da avaliação da melhor concentração de GNE-BSA na fase sólida e avaliação do uso de BSA no tampão de amostra..... | 54 |
| Figura 12. Gráfico teste de linearidade por competição com cocaína, GNE e metabólitos da cocaína no ELISA indireto com GNE-BSA fixado na fase sólida..... | 55 |
| Figura 13. Gráfico da dosagem do conjugado GNE-BSA pelo método do ácido Bicinconínico..... | 61 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Estudos de vacinas anticocaína e as metodologias de dosagem com enfoque nos pontos críticos do ensaio utilizado pelos autores..... | 29 |
| Quadro 2. Sumário de Prodecimentos seguindo a ordem de processo..... | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

Ag-Ac - Antígeno-anticorpo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A/O – Emulsão água em óleo

AQAC – do inglês *Analytical Quality Assurance Cycle*

BCA – Ácido Binciconínico

BSA – Albumina Soro Bovina

CV – Coeficiente de Variação

DP – Desvio Padrão

D.O – Densidade Óptica

EC – Comunidade Européia

EDC – do inglês *1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide*

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fc – Porção constante do anticorpo

FDA – *Food and Drug Administration*

g/mol – Gramas por mol

GNE – Hapteno de cocaína

GNC – Hapteno de cocaína

GND – Hapteno de cocaína

HEL- do inglês *Hen Egg Llysozyme*

IgA – Imunoglobulina A

ICH – do inglês *international conference on harmonisation*

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INMETRO – Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

i.p – Intraperitoneal

IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

ISO – do inglês *International Organization for Standardization*

kg – Quilogramas

KLH – Do inglês *Keyhole limpet hemocyanin*

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de Quantificação

LPD – Leite em pó desnatado

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitro

mm - Milímetros

MRC – Material de Referência Certificado

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm – nanômetros

NAVeS – Laboratório do Núcleo de Vulnerabilidade em Saúde

PBS – Tampão Fosfato Salino

pH – Potencial Hidrogeniônico

POP – Procedimento Operacional Padrão

RIE – Radioimunoensaio

rpm – Rotações por minuto

SMP – do inglês *Skim milk powder*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

µg – Micrograma

µL – Microlitro

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 18 |
| 2.1. Vacinas | 18 |
| 2.2. Imunoensaios | 22 |
| 2.3. Imunoensaios enzimáticos (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - ELISA)... | 23 |
| 2.4. Subtipos de ELISA | 25 |
| 2.4.1 ELISA direto | 25 |
| 2.4.3. ELISA indireto | 25 |
| 2.4.2 ELISA Competitivo | 26 |
| 2.5. Dosagem de anticorpos Anticocaína | 27 |
| 2.6. Métodos analíticos e seu processo de validação..... | 30 |
| 2.6.1. Seletividade/ especificidade | 32 |
| 2.6.2. Linearidade..... | 32 |
| 2.6.3. Exatidão | 33 |
| 2.6.4. Recuperação | 34 |
| 2.6.5. Precisão | 34 |
| 2.6.6. Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)..... | 35 |
| 2.6.7. Robustez..... | 35 |
| 3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE | 36 |
| 4. OBJETIVOS | 37 |
| 4.1. Objetivos específicos..... | 37 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 5.1. Métodos | 38 |
| 5.2. Etapa 1: Preparo dos conjugados imunogênicos..... | 38 |
| 5.2.1. Conjugação GNE-KLH / GNE-BSA | 39 |
| 5.2.2. Purificação do conjugado por dessalinização..... | 39 |
| 5.2.3. Conjugação/Acoplamento GNE-BSA | 40 |
| 5.2.4. Dosagem do conjugado GNE-BSA pelo uso do ácido bicinconínico | 40 |
| 5.2.5. Preparo da formulação da vacina | 41 |
| 5.3. Etapa 2: Imunização dos animais e construção do pool de amostras..... | 42 |
| 5.3.1. Animais | 42 |
| 5.3.2. Coleta de sangue | 42 |
| 5.3.3. Imunização | 44 |
| 5.3.4. Processamento das amostras e dosagens | 44 |
| 5.3.5. Construção dos pools de soro..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4 Etapa 3: Ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA)..... | 44 |
| 5.4.1. ELISA INDIRETO | 44 |
| 5.4.2. Fixação do hapteno na placa | 45 |
| 5.4.3. Diluição/ incubação do soro..... | 45 |
| 5.4.4. Revelação da placa..... | 45 |
| 5.5 ELISA COM COCAÍNA NA FASE SÓLIDA..... | 46 |
| 5.6 ELISA COM GNE-BSA NA FASE SÓLIDA..... | 47 |
| 5.7 Etapa 4: Análise estatística | 47 |
| 6. RESULTADOS | 48 |
| 6.1 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA IMUNIZAÇÃO EM ENSAIO DE ELISA INDIRETO COM COCAÍNA NA FASE SÓLIDA | 48 |
| 6.2. TESTE DE LINEARIDADE ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO POOL E A DENSIDADE ÓTICA NO ELISA COM COCAÍNA FIXADA NA FASE SÓLIDA..... | 49 |
| 6.3. TESTE DE LINEARIDADE POR COMPETIÇÃO COM COCAÍNA NO ELISA INDIRETO COM COCAÍNA FIXADA NA FASE SÓLIDA | 50 |
| 6.4. ELISA DE COMPETIÇÃO COM OS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA COCAÍNA E COCAÍNA FIXADA NA FASE SÓLIDA | 51 |
| 6.5. AVALIAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE GNE-BSA NA FASE SÓLIDA E AVALIAÇÃO DO USO DE BSA NO TAMPÃO DE AMOSTRA..... | 52 |
| 6.6. TESTE DE LINEARIDADE POR COMPETIÇÃO COM COCAÍNA, GNE E METABÓLITOS DA COCAÍNA NO ELISA INDIRETO COM GNE-BSA FIXADA NA FASE SÓLIDA | 54 |
| 7. DISCUSSÃO | 55 |
| 8. CONCLUSÃO | 58 |
| 9. PERSPECTIVAS | 58 |
| 10.ANEXOS | 60 |
| 10.1 Dosagem do conjugado BSA-GNE pelo método do ácido Bicinconínico.... | 61 |
| 10.2. Sumário de Procedimentos | 61 |
| 10.3. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO. | 62 |
| 10.4. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO COMPETITIVO | 67 |
| 10 REFERÊNCIAS | 74 |

1. INTRODUÇÃO

O uso, o abuso e a dependência de drogas psicotrópicas constituem um grave problema de saúde pública mundial, sobretudo quando se trata de drogas ilícitas. Dentre essas drogas está a cocaína, que, na constituição de hidrocloreto é consumida aspirada ou injetada e, na sua forma básica, produzida a partir da mistura do hidrocloreto com bicarbonato de sódio, é consumida na forma de fumo conhecida como *crack*.

A cocaína é um alcaloide tropânico de alto potencial adictivo derivado das folhas da planta *Erythroxylum coca* (De GIOVANNI & MARCHETTI, 2012). É uma droga estimulante do sistema nervoso central (SNC), capaz de produzir, nos usuários, efeitos rápidos e intensos, descritos como uma sensação de euforia, bem-estar e desinibição (KINSEY *et al.*, 2010).

Para identificar o perfil dos usuários em Belo Horizonte, a pesquisa Conhecer e Cuidar, realizada em 2015, avaliou o uso de cocaína e *crack*. Os resultados apontaram que aproximadamente um em cada 20 belo-horizontinos já experimentaram cocaína. Dos experimentadores, um em cada quatro fazem uso regular da droga e um a cada seis são dependentes da droga. Ainda, todos os participantes que relataram fazer uso regular de *crack* são dependentes, evidenciando a ideia do grande potencial de dependência que essa droga pode causar (GARCIA *et al.*, 2015).

O Relatório Mundial sobre Uso de Drogas do Gabinete das Nações Unidas contra a Droga e o Crime (UNODOC) em 2012, demonstrou que o uso de cocaína/*crack* no Brasil tem aumentado nos últimos anos quando comparado a outros países. O segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD, 2012) publicou as prevalências de uso de cocaína entre adolescentes de 2,3% e 3,8% em adultos e de uso recente (nos últimos 12 meses) de 1,6% em adolescentes e 1,7% em adultos (UNODOC, 2012; LENAD, 2012)

Até o momento, apesar da alta prevalência do uso de cocaína, nenhum tratamento específico para a dependência dessa droga foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulatório de medicamentos norte americano. Atualmente, fármacos de diversas classes terapêuticas, como antidepressivos, antipsicóticos e anticonvulsivantes são empregados para minimizar a intensidade e a frequência dos episódios de fissura e minimizar os

efeitos desagradáveis dos períodos de abstinência. Apesar de todo o esforço terapêutico, os medicamentos e os programas de tratamento acabam tendo uma baixa adesão pela inespecificidade dos fármacos utilizados, que tratam os sintomas da abstinência e não diretamente a ação da droga e, com isso, permitindo altas taxas de recaída entre os dependentes (KARILA *et al.*, 2011; LOFTIS & HUCKANS, 2013)

A ausência de um tratamento específico para a dependência à cocaína e ao crack abre oportunidades para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dentre elas, a imunofarmacoterapia tem se mostrado uma das mais promissoras, com o objetivo produzir anticorpos anticocaína, que impeçam a passagem da droga através da barreira hematoencefálica, impedindo a sua ação central. Essa nova terapêutica utiliza a administração de um imunocombinado proteico, conjugado com um análogo da cocaína (GNE), que é capaz de estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos específicos que reduzam as concentrações periféricas livres da droga, limitando sua ação central (HANEY *et al.*, 2010).

Todos os trabalhos conduzidos até o momento envolvendo as vacinas anticocaína mostraram resultados preliminares com boas perspectivas (BAGASRAL *et al.*, 1992; CARRERA *et al.*, 1995; FOX *et al.*, 1996; CARRERA *et al.*, 2001; KOETZNER *et al.*, 2001; KOSTEN *et al.*, 2002; KOSTEN *et al.*, 2014). Porém, essa linha de pesquisa ainda possui muitos desafios tais como: necessidade da construção de novas plataformas, desenvolver novas estratégias imunológicas e padronização de técnicas analíticas de dosagens efetivas e abrangentes que sejam capazes de avaliar e apresentar resultados com maior confiabilidade (BREMER & JANDA, 2017).

Neste contexto, o grupo de pesquisas do Professor Frederico Garcia, juntamente com o Professor Ângelo de Fátima, ambos da UFMG, tem desenvolvido novas moléculas que apresentam grande potencial imunogênico e que foram capazes produzir anticorpos anti-cocaína e inibir a resposta à droga em modelos animais (NETO, 2017).

O avanço biotecnológico dos últimos anos permitiu o desenvolvimento de métodos que sejam capazes de detectar antígeno e anticorpo com efetividade e confiabilidade. O entendimento das interações específicas da resposta imunológica proporciona a utilização e o desenvolvimento de técnicas bastante

eficazes. Por meio de técnicas imunológicas, os imunoenaios são empregados para demonstrar eficácia dos imunofármacos por meio da detecção de anticorpo ou antígeno na amostra (FERNANDES & ESPINDOLA, 2012).

O método de dosagens por ELISA do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* agrega a especificidade da ligação antígeno-anticorpo com a sensibilidade de uma reação enzimática, permitindo, assim, a detecção de quantidades mínimas de uma substância com grande confiabilidade. O ELISA é um método cuja utilização produz alta reprodutibilidade associada a um custo médio baixo quando comparado a outros imunoenaios (VOLLER, BIDWELL e BARTETT, 1980).

Assim, o ELISA foi o método escolhido e empregado nas detecções de anticorpos anticocaína nos estudos da vacina anticocaína. O método já foi utilizado para a detecção destes anticorpos em amostras de animais e de humanos. Apesar de ser o método eleito, nos demais artigos já publicados sobre a vacina anticocaína observa-se uma grande variabilidade na técnica (BAGASRAL *et al.*, 1992; CARRERA *et al.*, 1995; FOX *et al.*, 1996; CARRERA *et al.*, 2001; KOETZNER *et al.*, 2001; KOSTEN *et al.*, 2002; KOSTEN *et al.*, 2014). Além disso, não há um estudo que tenha comparado métodos ou que tenha descrito a padronização, o desenvolvimento ou a validação de um método analítico específico para a dosagem de anticorpos anticocaína. Esses procedimentos são de suma importância para se avaliar e garantir a qualidade dos resultados dos estudos pré-clínicos e clínicos.

Dessa forma, no presente trabalho iremos fazer uma breve revisão teórica sobre o desenvolvimento das vacinas terapêuticas para o tratamento da dependência à cocaína, os imunoenaios e sua aplicação na dosagem desses anticorpos e os pré-requisitos para a validação de um método analítico. Além disso, descreveremos nosso trabalho, que tem com objetivo comparar dois métodos de dosagem por ELISA e validar um método para a avaliação de anticorpos anticocaína em murinos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Vacinas

Historicamente, vacinas são consideradas o meio mais eficaz para prevenir, proteger e combater a disseminação de doenças infecciosas. O avanço na produção de vacinas acompanha o progresso da pesquisa científica em diversas áreas como imunologia, biologia molecular, química e biotecnologia levando ao desenvolvimento e implementação de novas vacinas e novas estratégias de imunização (BREMER & JANDA, 2017).

De forma simplificada, a resposta imunológica ocorre por meio da sensibilização do sistema imune a partir do contato com antígenos. O reconhecimento pelos linfócitos B e T, principalmente na resposta imune do tipo T dependente, ativa as células B de memória, capazes de produzir resposta rápida, de maior extensão e afinidade. É necessária a ativação desse sistema para desencadear uma resposta imune humoral eficiente e assim a produção de anticorpos específicos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012; SCHATZMAYR, 2003).

Todavia, nem todas as substâncias são antigênicas, ou seja, são capazes de ativar uma resposta imunológica. Empiricamente, demonstrou-se que o sistema imunológico não é capaz de promover uma resposta imune quando encontra moléculas de baixa massa molecular (menos de 1000g/mol) (GALLACHER, 1994). A cocaína apresenta massa molar de 303,353g/mol, e por isso, não possuem boa imunogenicidade. Para se tornar imunogênica, a cocaína precisa ser conjugada a uma molécula carreadora, de elevada massa molar, como, por exemplo, uma proteína. Uma vez conjugada, quando inoculada no organismo, o sistema imune reconhece a molécula de elevada massa molecular como antigênica e expõe partes das moléculas ligadas à molécula conjugada, ativando a produção de anticorpos contra a droga alvo (KINSEY *et al*, 2010; NETO, 2017).

Essa estratégia de conjugação depende de alguns elementos, o primeiro é que a molécula de baixo peso molecular apresente sítios de ligação aos aminoácidos da proteína; o segundo é que a proteína carreadora apresente aminoácidos que possam ser ligados pela molécula. As moléculas que são

preparadas para se ligar numa proteína carreadora são denominadas haptenos. A preparação de um hapteno envolve, algumas vezes, a introdução de cadeias carbônicas espaçadoras e sítios de ativação para ligação. A conjugação do hapteno com uma proteína transportadora resulta na formação do imunoconjugado da droga. Associa-se ao imunoconjugado uma ou mais substâncias adjuvantes. Essas substâncias induzem uma resposta imune intensa, atraindo as células imunes a se expor ao imunoconjugado, conforme ilustrado na Figura 1 (MORENO & JANDA, 2009; NETO, 2013; BREMER & JANDA, 2017).

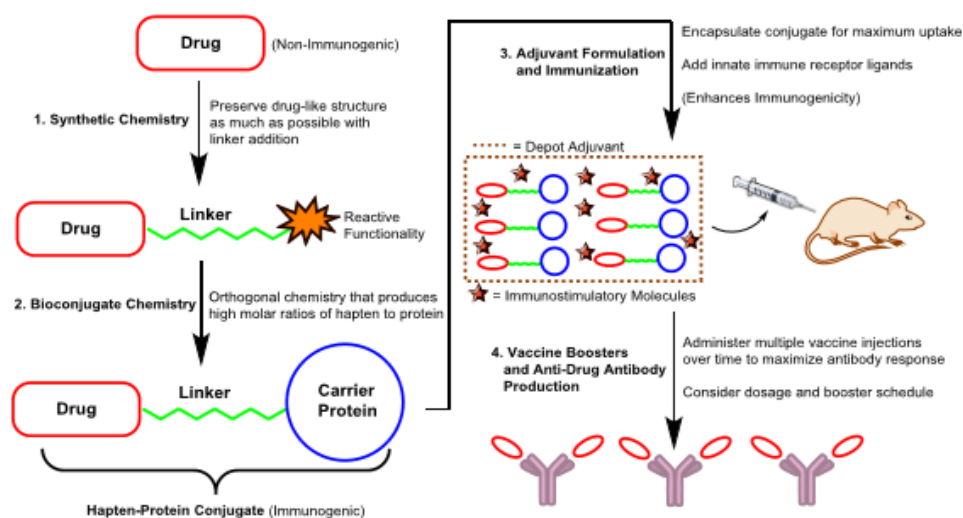


Figura 1. Construção de haptenos para a produção de vacinas antidrogas imunoconjugadas. Através da química sintética, um ligante é ligado numa terminação química da droga para permitir o acoplamento de uma proteína carreadora. O adjuvante é utilizado como imunoestimulador e para completar a formulação da vacina. Algumas doses são necessárias para estimular o desenvolvimento de imunoglobulinas neutralizantes antidroga (extraído de BREMER & JANDA, 2017).

Em 1992 foi publicado o primeiro estudo para vacina anticocaína por Omar Bagasra e colaboradores (KINSEY *et al.*, 2010). O imunógeno foi preparado através da conjugação da cocaína à estrutura da proteína hemocianina do molusco *Megathura crenulata* (*Keyhole limpet hemocyanin* – KLH), juntamente com adjuvante completo de Freund. Os animais que receberam o tratamento com a vacina imunoconjugada apresentaram efeito analgésico significativamente reduzido quando comparado ao grupo controle. Além disso, os animais apresentaram completa resistência aos efeitos da

cocaína no sistema nervoso central com correlação direta aos níveis altos de anticorpos IgG anticocaína verificados por meio de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) (BAGASRAL *et al.*, 1992).

Três anos depois, Carrera e colaboradores (CARRERA *et al.*, 1995) descreveram a síntese de um conjugado estável GNC-KLH para aumentar a produção de anticorpos catalíticos. Os resultados apresentaram uma diminuição da atividade locomotora em modelo animal. Elevação dos títulos de anticorpos IgG foram relatados e através de estudos de ligações competitivas entre as imunoglobulinas IgG antidroga e metabólitos da cocaína, revelaram alta especificidade para cocaína, além disso, os ratos tratados com GNC-KLH apresentaram menores níveis de cocaína no corpo estriado e no cerebelo em comparação ao grupo controle (CARRERA *et al.*, 1995). Esses dados sugerem a produção de anticorpos com alta afinidade para cocaína. Baseados nesses resultados, no ano seguinte, em 1996, Fox e colaboradores descrevem uma abordagem imunológica para tratamento da dependência à cocaína. Os autores consideraram que os anticorpos catalíticos são capazes de se ligar na cocaína ao chegar no sangue, promovendo a quebra da droga antes que ela ultrapasse a barreira hematocefálica, impedindo sua entrada no cérebro, podendo, assim, ser utilizado como forma de tratamento (FOX *et al.*, 1996)

Vários estudos foram publicados nos anos seguintes até o presente momento, cujos resultados foram capazes de comparar a estabilidade de diferentes haptenos de cocaína em termos de duração e ação da resposta (CARRERA *et al.*, 2001), bem como de diferentes métodos de conjugação (ETTINGER, ETTINGER, W & HARLESS, 1997), da utilização de espécies não roedoras como, por exemplo, o uso do macaco do gênero *Rhesus* e o conjugado do metabólito ativo da cocaína norcocaína-BSA (albumina soro bovina) (KOETZNER *et al.*, 2001) além de estudos realizados por Cai e colaboradores utilizando a conjugação do hapteno GNE a KLH testada em primatas não humanos (MAOZ *et al.*, 2013).

A vacina anticocaína aprovada pela FDA para experimentação em estudos clínicos e testada em humanos foi a denominada TA-CD da Xenova (Cambridge, UK), grupo farmacêutico que adquiriu os direitos do bioconjugado desenvolvido por Fox, Kantak e colaboradores (1996). A vacina é composta do conjugado de succinil-norcocaína (metabólito ativo da cocaína) com a toxina do

Vibrio cholerae subunidade B, bactéria causadora da cólera, como proteína carreadora. Os resultados do estudo mostraram que a vacina apresentou boa tolerância após três aplicações/reforços dadas por doses intramuscular no período de 2 meses, tanto no local da aplicação como sistemicamente. As dosagens das imunoglobulinas IgG anticocaína apresentaram níveis elevados de anticorpos apenas por 3 meses, com queda significativa após um ano. Além disso, a afinidade média de ligação da droga e anticorpos específicos à cocaína foi muito abaixo do nível essencial para reduzir a abstinência a droga (KOSTEN *et al.*, 2002).

O estudo foi conduzido até a fase III com a participação de 300 indivíduos. Os participantes que apresentaram níveis de IgG > 42 ug/ml foram mais propensos a tolerar a abstinência; foram capazes de manter o tratamento para a dependência três vezes mais do que o grupo controle, porém não houve diferença significativa entre a taxa de urina livre de cocaína entre os três grupos. Apesar da vacina ter alcance suficiente da imunogenicidade em 2/3 dos pacientes entre a semana 9 e 16, os autores consideraram o estudo da fase III ineficiente e falho (KOSTEN *et al.*, 2014).

Apesar da cocaína ser considerada uma molécula não antigênica, estudos demonstraram que usuários que utilizam grandes quantidades da droga com maior frequência podem apresentar anticorpos anticocaína. Esses estudos sugeriram então, que esses anticorpos poderiam promover redução da ação da droga pela ligação desta aos anticorpos, produzindo, assim, um efeito de tolerância à droga. Foi a partir desta observação que se postulou que, se uma vacina fosse capaz de produzir uma quantidade significativa de anticorpos anticocaína, poderia-se diminuir o efeito de seu uso no caso de recaídas. Mais tarde, em um ensaio clínico de uma vacina anticocaína, mostrou-se que a presença prévia de anticorpos anticocaína está correlacionado a uma diminuição na eficácia imunogênica das vacinas anticocaína. Aventa-se que esses anticorpos podem interferir na ligação antigênica às células imunitárias ou na exposição dos haptenos ao sistema do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Entender os isotipos dos anticorpos anticocaína produzidos por usuários pesados e por indivíduos imunizados pode ajudar a entender os fundamentos do sistema imunológico evocado pela cocaína (ORSON *et al.*, 2013)

Neto *et al.*, (2017) apresentaram estudos sobre o desenvolvimento de novas moléculas com grande potencial imunogênico e que foram capazes de inibir a resposta à cocaína em modelos animais. No entanto, além da construção de novas plataformas e novas estratégias imunológicas, é imprescindível a padronização de técnicas de dosagens efetivas e abrangentes que sejam capazes de avaliar e apresentar resultados com maior confiabilidade.

2.2. Imunoensaios

Os imunoensaios são técnicas para a detecção ou quantificação de substâncias como os antígenos ou os anticorpos. Dessa forma, os imunoensaios são capazes de detectar e quantificar antígenos específicos que estimulam reações imunológicas específicas, levando a produção de proteínas específicas: os anticorpos. Os imunoensaios apresentam um alto nível de sensibilidade, estabilidade, requerem pequenos volumes de reagentes, são muito replicáveis e precisos para a detecção de antígenos ou anticorpos, apesar de consumir grandes quantidades de amostras de plasma ou soro, quando no ensaio de ELISA vários isotipos de imunoglobulinas são medidos (VAZ, 2012)

A reação antígeno anticorpo é reversível e a força de ligação (afinidade) obedece a uma constante de dissociação (K_D). Assim, a reação é dependente das concentrações relativas de antígeno e anticorpo, ou seja, quando as quantidades de ambos é a mesma, há a formação máxima do complexo que vai decrescendo à medida que um dos dois componentes está em excesso. Nessa situação, e devido a ligação ser reversível, o excesso de um dos componentes pode levar à dissociação do complexo formado, causando erros na interpretação dos resultados. A importância e necessidade de detectar os possíveis erros durante a realização de imunoensaios, bem com a correção dos parâmetros para garantir a confiabilidade dos resultados, é obtida por meio dos processos de validação dos ensaios. O processo de validação é chave na prevenção de erros (imprecisão e inexatidão) e interpretação dos resultados (ABBAS, LICHTMAN & PILAI, 2012)

Os imunoensaios se destinam ao diagnóstico laboratorial através de técnicas imunológicas por meio das quais podem ser detectados o complexo antígeno-anticorpo (Ag–Ac) com efetividade ou ainda a presença de Ac ou Ag

na amostra (FERNANDES & ESPÍNDOLA, 2012). Testes como ELISA, usam o produto da mudança de cor da interação da enzima com o seu substrato para medir a reação entre o antígeno e o anticorpo (HIRATA & HIRATA, 2012).

2.3. Imunoensaios enzimáticos (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA)

O nome ensaio de absorção imunoenzimático refere-se a um método heterogêneo (de múltiplas fases) do tipo monoplex, para a análise quantitativa de antígenos ou anticorpos. Um dos reagentes é imobilizado na fase sólida, que pode ser constituída por placas, tubos ou esferas de poliestireno, polivinil ou polipropileno, enquanto o outro reagente deve ser ligado a uma enzima. O método é considerado sensível, preciso e é capaz de detectar até mesmo quantidades ínfimas de antígenos ou anticorpos. Para isso é essencial que os reagentes e os parâmetros das dosagens e análises estejam bem padronizados e validados no laboratório (CROWTIER, 2001)

O imunoensaio utiliza a reação antígeno-anticorpo, com um anticorpo de revelação conjugado a uma enzima. Quando ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo, ao adicionar o substrato cromogênico ele reage com seu substrato específico dando origem a produtos solúveis coloridos, cuja determinação da absorção da luz é feita medindo-se a absorbância através da densidade óptica da solução por espectrofotometria (AYDIN, 2015; Vaz 2012).

Reações enzimáticas ocorrem durante o processo das análises. A enzima Fosfatase alcalina (da classe das hidrolases) tem como seu substrato P-Nitrofenilfosfato, sendo uma das enzimas mais utilizadas. A hidrólise enzimática libera um íon monofosfato e 4-nitrofenol, que apresenta cor amarelada com um pico de absorção na faixa de 400 a 410 nm. A atividade enzimática é proporcional à quantidade de 4-nitrofenol formada, que é medida colorimetricamente e possibilita a determinação da concentração do anticorpo primário ligado ao antígeno (Da POIAN *et al.*, 2010).

A mudança de coloração é quantificada em um aparelho com fundamentos da espectrofotometria e expressa em densidade óptica correspondente a absorbância, a qual é determinada através da expressão:

$$D.O = \log (I_0/I),$$

Onde I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida. Os comprimentos de onda frequentemente utilizados para medição da D.O de proteínas ou imunoglobulinas variam em espectro de 405, 540, 600 ou 640 nm (GALO & COLOMBO, 2009).

A formação do complexo imune não depende apenas da quantidade de anticorpos mas também da afinidade da ligação. A sensibilidade de detecção de anticorpos necessita de determinantes antigênicos (epítomos) com densidades relevantes para a adsorção na fase sólida, com isso, os antígenos para diagnóstico devem ser o mais puro possível (KENNY & DUNSMOAR, 1983; PORSTMANN & KIESSIG, 1992).

A adsorção do antígeno no suporte sólido, como microplacas de poliestireno contendo 96 poços, ocorre por adsorção passiva, processo que é chamado de revestimento. A fixação de compostos no poliestireno, polímero que possui uma cadeia longa de carbono ligado a um anel de benzeno, provavelmente ocorre entre a interação hidrofóbica do plástico com a proteína, reação que independe da carga líquida das proteínas, portanto cada uma apresenta uma constante de ligação. Fatores como pH, coeficiente de difusão da molécula, relação da área de superfície sendo revestida com o volume da solução de revestimento, concentração da substância adsorvida, temperatura e tempo de adsorção são cruciais para o revestimento eficaz do antígeno na fase sólida do ensaio (CROWTIER, 2001).

O ensaio imunoenzimático, ELISA, tem habilidade de mensurar vários compostos, desde drogas a pequenas e grandes moléculas, por ser um método quantitativo fundamentado em um sinal de respostas geradas por consequência da ligação entre antígeno-anticorpo. O sinal de resposta é ocasionado pelo marcador enzimático, ligado ao analito (antígeno) ou anticorpo. A pesquisa de anticorpos pelo método de ELISA é altamente empregada para avaliar o grau de imunogenicidade de drogas injetáveis (vacinas) em desenvolvimento (FINDLAY *et al.*, 2000).

2.4. Subtipos de ELISA

2.4.1 ELISA direto

Os primeiros pesquisadores a relatar um ELISA direto para anticorpos específicos foram Engvall e Perlmann em 1971. O anticorpo é quimicamente marcado por uma enzima e o componente não marcado, o analito (antígeno), é ligado a um suporte sólido, tal como um poço de uma microplaca, que irá adsorver uma certa quantidade de qualquer proteína. O anticorpo marcado pode se ligar ao antígeno não marcado, sob condições em que a adsorção inespecífica é bloqueada e quaisquer anticorpos não ligados e outras proteínas são retirados por lavagens, esquema representado pela figura 2. A ligação do anticorpo é medida por uma reação que torna um substrato incolor em um produto colorido. A mudança de cor pode ser lida diretamente na placa onde ocorreu, facilitando a coleta de dados (JANEWAY *et al.*, 2005).

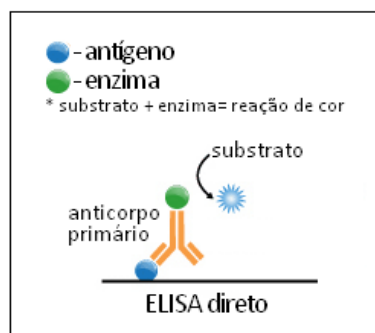


Figura 2. Esquema de ligação que ocorre no ELISA Direto. Adaptado de:

<https://www.biomedicinapadiao.com.br/2010/05/ELISA.html>

Acesso em : 12/05/19

2.4.3. ELISA indireto

ELISA indireto, ou também chamado de ensaio imunométrico (Figura 3), identifica e quantifica anticorpos contidos na amostra por meio da ligação com o antígeno adsorvido na fase sólida (BENDER & VON MUHLEN, 2018). A formação do complexo antígeno-anticorpo é evidenciada pelo anticorpo secundário conjugado com a enzima, seguido do substrato dessa enzima, para produzir cor através da oxidação ou hidrólise entre a enzima e substrato e possibilitar a determinação da concentração do anticorpo primário (AYDIN,

2015). Esse ensaio permite identificar os diversos isotipos de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e IgE) e alotipos como IgG1, IgG2a, IgG3 e IgG4 (BENDER & VON MUHLEN, 2018).

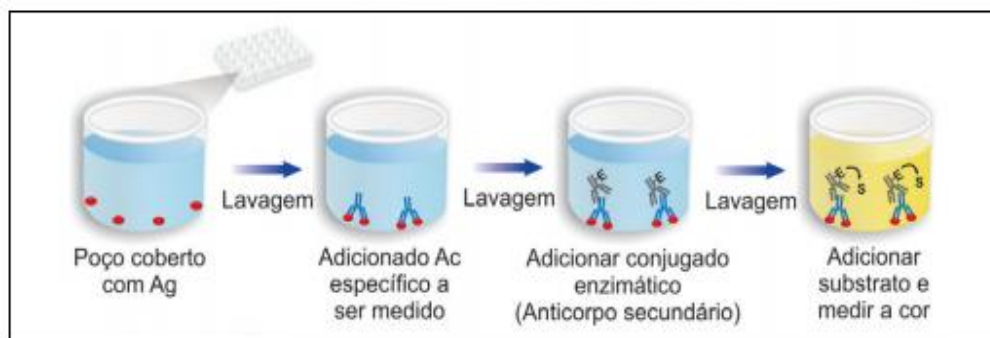


Figura 3. Passo a passo do ensaio de ELISA indireto. Adaptado de:

<https://www.sobrau.com/wp-content/uploads/2016/11/Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf>
Acesso em: 12/05/19

2.4.2 ELISA Competitivo

Yorde e colaboradores (1976) desenvolveram um método quantitativo para antígenos e haptenos solúveis por meio da inibição competitiva entre a ligação dos anticorpos em antígenos imunoabsorvidos em microesferas (*Beads*) aos antígenos livres, para quantificação de gonadotrofina coriônica humana em amostras de soro e urina (YORDE *et al.*, 1976).

No ensaio de competição (Figura 4) tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser utilizados para o revestimento na fase sólida. Para a detecção de anticorpos, o antígeno contido na amostra é previamente incubado com concentrações conhecidas do antígeno e, ao ser transferido para a placa, não haverá ligação entre anticorpo e o antígeno fixado na fase adsortiva, ocasionando uma proporção inversa entre a concentração do analito e a intensidade de coloração resultante. Se a solução não contiver o antígeno, os anticorpos se ligarão ao fixado na placa (AYDIN, 2015).

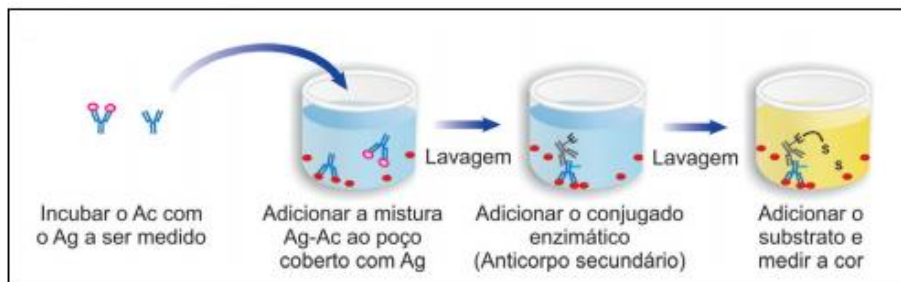


Figura 4. Etapas do ELISA Competitivo.

Extraído de: <https://www.sobrau.com/wp-content/uploads/2016/11/Testes-Laboratoriais-Aplicados-Imunologia-Clinica.pdf>
 Acesso em: 12/05/19

2.5. Dosagem de anticorpos Anticocaína

A dosagem de anticorpos anticocaína é descrita em praticamente todos os estudos que avaliaram a ação de uma vacina anticocaína, conforme pode ser observado no Quadro 1. Esses dados correspondem ao resultado de uma revisão bibliográfica feita desses estudos abrangendo o período de 1995 a 2018.

Pode-se observar que os métodos variam em termos de analitos, de diluição das amostras, bloqueio de sítios de ligação inespecíficos, nos anticorpos secundários e suas enzimas, além do reagente para interrupção das reações.

Em relação ao analito, há uma tendência a se fixar na fase sólida o mesmo hapteno que foi utilizado para imunizar os animais no estudo. Se, por um lado, essa estratégia é mais prática, visto que elimina a síntese de outra molécula para ser utilizada na dosagem dos anticorpos, por outro, limita a interpretação dos dados, visto que, apesar de as moléculas haptênicas serem muito semelhantes, apresentam diferenças químicas com relação à molécula de cocaína. Essas diferenças podem produzir respostas inespecíficas que fazem com que os anticorpos produzidos pela imunização não necessariamente sejam capazes de se ligar à cocaína, mas somente ao próprio hapteno. Dos analitos descritos, o BSA é a proteína conjugada em praticamente todos os estudos. Quanto ao hapteno, encontramos três artigos que fixam a cocaína na fase sólida, três artigos que fixam GNE-BSA, dois artigos que usaram GNC-BSA, um artigo que fixou GND-BSA, um artigo que usou benzoilecgonina-ovalbumina e um artigo que usou benzoilecgonina-BSA.

Se o uso da cocaína como analito é por um lado interessante, sendo ela, em princípio, a molécula alvo dentro da estratégia terapêutica, por outro, seu uso tem uma limitação importante, devido ao risco de sua transformação em benzoilecgonina quando em solução aquosa. O GNE é mais interessante, visto que é uma molécula mais estável e que apresenta um epitopo muito semelhante ao da cocaína. Além disso, ao menos teoricamente, o GNE-BSA apresenta mais sítios de ligação para anticorpos anticocaína do que a cocaína ligada à fase sólida. Essa característica confere, teoricamente, ao ELISA com GNE-BSA, maior sensibilidade a esse método quando comparado à fixação da cocaína apenas.

Em relação ao tampão de diluição, observamos alguma heterogeneidade, encontrando com maior frequência o uso de PBS ou TRIS como tampão e o bloqueio da amostra feito com BSA em concentrações que variam de 0,5 a 2%, ou leite desnatado em pó (SMP) diluído a 1%. O uso de BSA é feito sobretudo quando se usa essa proteína como proteína de conjugação do hapteno, o que faz sentido como estratégia, visto que é importante bloquear as ligações inespecíficas do anticorpo da amostra para se minimizar o ruído da leitura.

Os anticorpos secundários utilizados variam segundo o fabricante, a espécie alvo e a enzima ou substrato conjugado. Seis estudos utilizaram anticorpos conjugados à peroxidase; três estudos utilizaram a biotina e um a fosfatase alcalina.

Quanto à solução de interrupção também há certa variação, que se relaciona à enzima e ao substrato utilizado.

| Authors | Year | Method | Analite | Sample buffer | Blockage | Secondary antibody | Stop solution | Reading frequency |
|-----------------------------------|------|---------------------------------------|--|--|--|--|-------------------|-------------------|
| Carrera et al. | 1995 | Indirect ELISA/ RIA | GNC-BSA | LPD + etanol+PBS | LPD + etanol+PBS | Anti IgG conjugated to Alcaline phosphatase | Not reported | 405 nm |
| Barbara S FOX et al. | 1996 | Indirect ELISA/ ELISA COMPETIVO | cocaine conjugated to HEL | Not reported | Not reported | Goat anti-mouse IgG Biotinilated | Not reported | Not reported |
| Kathleen M. Kantak et al. | 2000 | Indirect ELISA | cocaine conjugated to HEL | Not reported | 0,5% de gelatin | Goat anti-mouse IgG Biotinilated | Phosporic acid 1M | 450 nm |
| Andrew B. Norman et al. | 2008 | Indirect ELISA | Benzoilecgonine+Ov oalbumine ou anticorpos de cabra IgG anti-humanos | 0,5% de BSA in saline bufferd with Tris (Tris 10 mM, NaCl 140 mM e NaN3 a 0,02%, pH 6,9) | 0,5% de BSA in saline bufferd with Tris (Tris 10 mM, NaCl 140 mM e NaN3 a 0,02%, pH 6,9) | Policlonal Goat anti-human IgG Biotinilated | NaOH 1M | 405 nm |
| Martin J Hicks et a. | 2011 | Indirect ELISA, Competitive ELISA/RIA | GNC-BSA | PBS+ 1% SMP | PBS+ 5% SMP | IgG de cabra anti-camundongo conjugada com HRP | Ácido Oxilco 2% | 415 nm |
| Thomas Kosten et al. | 2014 | Indirect ELISA | Cocaïne - BSA | Not reported | Not reported | Anti-human IgG conjugated to HRP | Not reported | Not reported |
| Suzette M. Evansa et al. | 2016 | Indirect ELISA/ RIA | GNC-BSA | PBS+ 1% SMP | PBS+ 5% SMP | Donkey anti-monkey IgG conjugated to HRP | Not reported | 415 nm |
| J Cody et al. | 2017 | Indirect ELISA/ RIA | GNE-BSA | PBS + 1% BSA | PBS + 5% SMP | Donkey anti-mouse IgG conjugated to HRP | Not reported | 450 nm |
| Hanna Wetzel, et al. | 2017 | Indirect ELISA | Benzoilecgonine-BSA (BE-BSA) | Tris + 0,5% BSA | BSA 0,5% | Policlonal Goat anti-human IgG Biotinilated | NaOH 1M | 405 nm |
| Atsushi Kimishimaa, et al. | 2018 | Indirect ELISA/ Competitive RIA | GNE-BSA | PBS + 2% BSA | PBS + 5% SMP | Donkey anti-mouse IgG conjugated to HRP | Sulfuric acid 2M | 450 nm |
| Atsushi Kimishima et al. | 2018 | Indirect ELISA/ RIA | GNE-BSA or GND-BSA | PBS + 2% BSA | PBS + 5% SMP | Donkey anti-mouse IgG conjugated to HRP | Sulfuric acid 2M | 450 nm |

Quadro 1. Estudos de vacinas anticocaína e as metodologias de dosagem com enfoque nos pontos críticos do ensaio utilizado pelos autores.

Pode-se inferir, a partir da análise desse quadro, que há grande variabilidade nos métodos previamente utilizados para a mensuração de anticorpos anticocaína nos estudos de desenvolvimento da vacina anticocaína. Essa variabilidade denota possível falta de validação de um método para a quantificação destes anticorpos. Em nossos conhecimentos, nenhum estudo

comparou métodos ou validou um procedimento para mensuração de anticorpos anticocaína, sendo assim o objetivo do nosso estudo.

2.6. Métodos analíticos e seu processo de validação

Vários parâmetros biológicos podem ser alterados em consequência da interação entre uma substância exógena e o organismo. A análise qualitativa e quantitativa desses parâmetros é fundamental para a pesquisa. É através de métodos analíticos eficazes, ou seja, com garantia de confiabilidade e de qualidade, que se deve realizar a mensuração de biomarcadores em fluidos biológicos (OLIVARES, 2016).

Os marcadores bioquímicos apresentam um papel central na clínica médica e no desenvolvimento de novas drogas. Um dos métodos comumente utilizado para detectar e quantificar moléculas, em pequenas quantidades, nos fluidos corporais é o ELISA, contudo a eficiência do método pode variar, causando erros sistemáticos e aleatórios. Dessa forma, o método de ELISA deve ser controlado de forma rigorosa após a validação seus parâmetros (ANDREASSON *et al.*, 2015).

É de fundamental importância demonstrar que os métodos de dosagens utilizados por laboratórios assegurem que os ensaios executados produzam resultados que levem à correta interpretação dos dados, sendo, assim, confiáveis e por isso, adequados. Assim, o método analítico deve passar por uma série de etapas de avaliação e testes. (OLIVARES & LOPES, 2012). Esse processo é denominado de validação, que é, portanto, um processo que permite verificar se um método é adequado para um determinado propósito, garantindo a liberação de resultados confiáveis (BRITO *et al.*, 2003).

Os parâmetros de validação devem ser executados a partir dos procedimentos adotados. É essencial que um procedimento operacional padrão (POP) seja confeccionado no intuito de que o método possa ser utilizado corriqueiramente por todos no laboratório, sem qualquer treinamento prévio, e produzindo resultados confiáveis, confirmando, assim, que as características do método satisfaçam as especificações e qualidade para os resultados analíticos (ANDREASSON *et al.*, 2015).

A utilização de um método não validado pode ter consequências desastrosas, pois implicam em interpretação de resultados errados, podendo

levar ao desperdício ou perda de tempo, de recursos financeiros, bem como colocar em dúvida a credibilidade do laboratório e dos profissionais envolvidos em todo processo (ANDREASSON *et al.*, 2015)

Na elaboração de métodos internos de ensaios que passarão a ser utilizados por um laboratório, a fim de que produzam resultados confiáveis, é necessário e fundamental que ocorra a padronização do método já validado. Essa padronização para a implementação de novos métodos de ensaio deve ser realizada por meios e critérios que demonstrem, recorrendo aos parâmetros de validação, que esses métodos internos darão origem a resultados adequados e de qualidade. Portanto, um novo processo de validação deve ocorrer sempre que alguma modificação em métodos validados ou implantação de novos métodos de ensaio forem utilizados em um laboratório (DE SOUZA, SOBRINHO & BOZA, 2016).

A validação de métodos analíticos é caracterizada por diversos parâmetros que, analisados em conjunto, são capazes de demonstrar que o método analítico proposto é adequado. No entanto, a validação de métodos internos deve ser adaptada caso a caso, de acordo com o método e objetivo das análises, sendo necessário o estudo e conhecimento dos diversos parâmetros regulamentados para as análises qualitativas e quantitativas. (MAGNUSSON, 2014). Assim, a validação de um método analítico não tem necessariamente que passar por todos os parâmetros, sendo suficiente algumas etapas, efetuando-se, assim, uma validação parcial do método, porém suficiente para que este se torne válido e de uso rotineiro em um laboratório (ANDREASSON *et al.*, 2015)

O presente trabalho buscou seguir alguns parâmetros em comum em validação, baseado nas diretrizes nacionais como a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 de 2017, guia para validação de métodos analíticos (ANVISA) e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) de orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos (2016) e de diretrizes internacionais como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), Conferência Internacional em Harmonização (ICH), a Agência dos Estados Unidos que regula sobre alimentos e drogas (FDA, *Food and Drug Administration*) e a Comunidade Européia (EC). Os parâmetros utilizados para a

validação do imunoenensaio de ELISA e os analitos pesquisados, são apresentados a seguir:

2.6.1. Seletividade/ especificidade

A capacidade do método analítico em dosar isoladamente o analito de interesse com a presença de outros componentes da amostra sem sofrer nenhuma interferência, compreende-se por especificidade. A seletividade é a habilidade do método em detectar as substâncias de interesse (ICH, 2005). Deve ser avaliada continuamente, do início ao fim da validação e subsequente uso do método em aplicação clínica, pois é considerado o passo primordial para o desenvolvimento da validação (GRANGEIRO JÚNIOR *et al.*, 2004).

É essencial e primordial conhecer o analito em questão e as substâncias que possam estar relacionadas a ele, como, por exemplo, metabólitos do analito que podem influenciar na sua dosagem. O método que produz resposta para apenas um analito é considerado específico, e o método que consegue distinguir a resposta de um analito e de outros é considerado seletivo (ANDREASSON *et al.*, 2015; INMETRO, 2011)

A avaliação pode ser feita através da identificação de substâncias físico-quimicamente semelhantes no qual o ensaio é desenvolvido para mensurar, investigando até que ponto elas podem interferir nas medições, amostras contendo impurezas ou produtos de degradação e por outra forma considerando amostras placebo com valores encontrados após análise da amostra sem os interferentes. Para métodos baseados em anticorpos é indicado realizar um mapeamento de epitopos (United States Pharmacopeia XXIV, 2000; ANDREASSON *et al.*, 2015).

2.6.2. Linearidade

Capacidade do método em produzir resultado linear, relativo à concentração versus sinal analítico, determinando em qual medida a dose-resposta do analito é linear em um diluente específico dentro da faixa da curva padrão. A diluição da amostra não deve afetar a exatidão e precisão (ANDREASSON *et al.*, 2015).

A análise estatística para avaliar a linearidade pode ser feita pelo teste t de student, regressão linear em que o gráfico representativo dispõe de uma inclinação da reta que seja diferente de zero (CURRIE, 1994).

O gráfico analítico deve conter informações estatísticas como: intersecção, equação da regressão linear, coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração estimada dos calibradores (soluções-padrão) (MCDOWALL,1999).

De acordo com Currie e Svehla (1994), considera-se compatível a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade. No caso, considera-se:

| | |
|-----------------|-----------------------|
| R = 1 | Correlação perfeita |
| 0,91 < R < 0,99 | Correlação fortíssima |
| 0,61 < R < 0,91 | Correlação forte |
| 0,31 < R < 0,60 | Correlação média |
| 0,01 < R < 0,30 | Correlação fraca |
| R = zero | Correlação nula |

2.6.3. Exatidão

Define-se como o grau de conformidade entre os resultados individuais obtidos em um determinado ensaio e um valor de referência creditado como verdadeiro, sendo normalmente expresso pela tendência (erro sistemático) (INMETRO, 2011). Para o estudo de exatidão, são propostos os métodos: uso de material de referência certificado (MRC), comparação do método proposto pelo método padrão-ouro, ensaios de recuperação na matriz e estudos colaborativos (THOMPSON, ELLISSON & WOOD, 2006).

Os MRC's são os mais indicados por apresentarem padrões internacionais, contudo, nem sempre estão disponíveis e denotam alto custo. Na comparação dos dois métodos, proposto e padrão ouro (método previamente validado), após a dosagem com ambos, os valores obtidos são analisados e se estabelece o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração da amostra. Os estudos colaborativos implicam na aceitação de, no mínimo, 8

laboratórios para desenvolver o método, usando a análise de variância entre os valores obtidos em cada laboratório (INMETRO, 2011).

A exatidão também pode ser estimada empregando várias repetições do analito, em diversas matrizes ou em diversas concentrações. A recuperação de um método analítico, ou seja, o erro sistemático desse método, também é uma maneira de calcular a tendência ou exatidão do método (DE SOUZA, SOBRINHO & BOZA, 2016).

2.6.4. Recuperação

Recuperação é a quantidade de analito recuperada no processo em relação a quantidade real presente na amostra que pode ser expressa num ensaio com tendência natural $R(\%) = [(C1 - C2)/C3] \times 100$, com C1 a concentração medida na amostra fortificada, C2 a concentração medida na amostra não fortificada e C3 a concentração adicionada, sendo necessário fazer a fortificação da amostra, que é a adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Em outros ensaios, pode-se usar a recuperação acima ou outros estimadores, como exatidão (%) = concentração média experimental x 100 / concentração teórica (INMETRO, 2011; DE SOUZA, SOBRINHO & BOZA, 2016)

2.6.5. Precisão

É o parâmetro que avalia o grau de concordância entre várias medidas da mesma amostra. A partir dos valores obtidos, são calculados a média e o Desvio Padrão (DP), determinando-se o Coeficiente de Variação (CV), que são expressos em porcentagens e representam a reprodutibilidade realizada em diferentes condições (laboratórios, analistas, equipamento e tempo) e a repetibilidade feita pelo mesmo laboratório, mesmo analista em um curto período. A repetibilidade é o critério que interessa em um método analítico oficial (PINTO *et al.*, 2003). Avalia a proximidade da concordância entre os resultados obtidos dos testes independentes sob condições estipuladas (ANDREASSON *et al.*, 2015)

2.6.6. Limite de detecção e quantificação (LD e LQ)

A menor quantidade de analito que pode ser identificada na amostra, sem a necessidade de quantificar com precisão é denominado limite de detecção. O limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão presumíveis (ANVISA RDC 166, 2017).

2.6.7. Robustez

É a capacidade de um método em permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método (ANDEARSSON *et al.*, 2015).

A robustez avalia os efeitos de pequenas alterações nas variáveis do método e a capacidade de não sofrer interferências sob essas alterações. O teste de robustez ajuda a entender melhor o que pode influenciar a resposta analítica o método (VAN DER HEYDEN *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O grupo de pesquisa NAVES está desenvolvendo uma vacina anticocaína, baseada em uma nova molécula imunogênica. As pesquisas avançam para um ensaio clínico, que demanda o registro do dossiê de desenvolvimento clínico de um medicamento (DDCM), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dentre as exigências para o registro do DDCM, está a padronização do método de quantificação dos biomarcadores modificados pela molécula estudada. Em nosso conhecimento, nenhum trabalho comparou métodos de dosagem de anticorpos anticocaína. Além disso, vários analitos foram utilizados na fase sólida, assim como outras variações no método de quantificação. A cocaína e, mais recentemente, o GNC ligado à seroalbumina bovina (BSA), ou GNE-BSA são os analitos mais frequentemente utilizados nos estudos do desenvolvimento de uma vacina anticocaína.

Nesse contexto, levantamos a hipótese de que o método de ELISA indireto utilizando o analito GNE-BSA produz resultados mais sensíveis, específicos e confiáveis do que o analito cocaína em fase sólida quando se quantifica anticorpos anticocaína.

Para a avaliação desta hipótese, o presente trabalho, realizou a comparação de dois métodos de ELISA para dosagem de anticorpos anticocaína em soro de camundongos.

4. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi comparar dois métodos de ELISA para a dosagem de anticorpos anti-cocaína presentes em amostras de camundongos e padronizar um método de avaliação de anticorpos anticocaina, com potencial uso na rotina do laboratório, com base no método ELISA indireto.

4.1. Objetivos específicos

- Produzir elevados níveis de Ac anticocaína (D.O > 0,7) a partir de um grupo controle, para a construção de *pools* de anticorpos, para uso nos experimentos de comparação dos dois analitos na fase sólida do ELISA;
- Testar o efeito dose-resposta de diferentes concentrações dos pools na densidade óptica dos dois analitos na fase sólida do ELISA;
- Testar o efeito dose-resposta da inibição dos anticorpos anticocaína nos pools, após a adsorção nos ELISA's com os dois analitos na fase sólida;
- Avaliar o efeito da BSA no bloqueio de ligações inespecíficas no procedimento de ELISA com os dois analitos;
- Avaliar a especificidade de ligação à cocaína ou a seus metabólitos dos pools dos anticorpos policlonais;
- Avaliar parâmetros da validação do método analítico;
- Confeccionar os Procedimentos Operacionais Padrão (POP's) dos métodos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho faz parte dos projetos que compõem um conjunto de estudos envolvendo o desenvolvimento de uma vacina anticocaína e foi realizado no laboratório do Núcleo de Pesquisas em Vulnerabilidade em Saúde - NAVES da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a coordenação do Professor Frederico Duarte Garcia, em colaboração com o departamento de Química, farmácia da UFMG e do Laboratório de Biomarcadores de diagnóstico e monitoração do Instituto René Rachou – FIOCRUZ MINAS.

5.1. Métodos

Para alcançar os objetivos propostos neste trabalho, a metodologia adotada seguiu as seguintes etapas:

- 1- Na etapa 1, descreveremos o procedimento para preparo dos imunocombinados GNE-KLH e GNE-BSA;
- 2- Na etapa 2, descreveremos o procedimento de imunização dos animais para a obtenção dos pools de amostra de soro para serem utilizados como referência durante o estudo;
- 3- Na etapa 3, descreveremos os métodos para realização do ELISA na avaliação da reatividade dos anticorpos anticocaína utilizando a cocaína ou o GNE-BSA na fase sólida; os testes para avaliação da melhor concentração de GNE-BSA para a realização de dosagens de anticorpos anti-cocaína e os testes de linearidade dos pools e o teste de inibição de resposta com o uso da cocaína adsorvida;
- 4- Na fase 4, descreveremos a análise estatística

5.2. Etapa 1: Preparo dos combinados imunogênicos

Os combinados imunogênicos foram produzidos a partir da conjugação do hapteno GNE com a KLH ou a BSA.

O hapteno GNE foi produzido e caracterizado por ressonância magnética, conforme método desenvolvido e caracterizado pela equipe do NAVeS e do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFMG (NETO, 2017).

A conjugação do transportador protéico KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) ao GNE seguindo as instruções do fabricante do kit Imject® EDC Carrier Protein Spin Kits da Thermo Fisher Scientific® (Illinois, USA) e o acoplamento do transportador-KLH ao hapteno-GNE seguiu o protocolo e as recomendações do fabricante, descritos resumidamente a seguir:

5.2.1. Conjugação GNE-KLH / GNE-BSA

A conjugação do hapteno com o transportador proteico (GNE-KLH) partiu de 2 mg de GNE, que foram dissolvidos em 450 μ L de tampão de conjugação (0.083M sodium phosphate, 0.1M EDTA, 0.9M NaCl, 0.1M sorbitol and 0.02% sodium azide; pH 7.2) obtendo-se a **Solução A**.

No frasco contendo 2mg da proteína KLH foram adicionados 200 μ L de água ultrapura para produzir uma solução na concentração de 10 mg/mL (**Solução B**). A **Solução A** foi adicionada ao conteúdo da **Solução B** formando a **Solução C**, por meio de agitação manual.

A seguir, diluiu-se 10mg de 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) em 1 mL de água e uma alíquota de 50 μ L dessa solução foi adicionada na **Solução C** formando a **Solução D**. O produto formado foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente antes de ser purificada.

5.2.2. Purificação do conjugado por dessalinização

A purificação do conjugado tem como objetivo separar o imunoc conjugado das demais substâncias utilizadas na produção do mesmo. Para isso utilizamos a coluna de desalinização Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific® Illinois, USA) de 5 mL. Essa coluna de cromatografia retém as moléculas com até 1000 Da, permitindo a passagem de moléculas grandes como as proteínas.

O processo começa com a homogeneização do conteúdo da coluna com agitação manual, após isso se retira a solução de armazenamento da coluna através de centrifugação a 1000 x g por 2 minutos. A coluna é lavada por 2 vezes com 2,5 mL de tampão de purificação (0.083M sodium phosphate, 0.9M sodium chloride, 0.1M sorbitol; pH 7.2) e centrifugação a 1000 x g por 2 minutos e descarte do conteúdo. Por fim, toda a **Solução D** foi colocada na coluna e a mesma foi centrifugada a 1000 x g por 2 minutos com um tubo estéril para coleta

O conteúdo eluído foi dosado e a concentração foi ajustada para uso na imunização e alíquotas de 125 μ L foram armazenados em microtubos de 1,5 mL. As amostras foram identificadas e armazenadas em freezer -20°C para uso posterior.

5.2.3. Conjugação/Acoplamento GNE-BSA

O processo de conjugação do hapteno GNE a BSA, foi realizado da mesma forma descrita no item Conjugação/Acoplamento GNE-KLH, apenas com a substituição da proteína KLH por BSA e o uso de 1mL de EDC diluído a 10 mg/mL em água ultrapura.

5.2.4. Dosagem do conjugado GNE-BSA pelo uso do ácido bicinconínico

A dosagem dos conjugados GNE-BSA ou GNE-KLH foi realizada através do método usando ácido bicinchoninico, segundo as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, MO). Esse método é baseado na redução do cobre +2 para cobre +1 na presença de proteínas, formando uma coloração púrpuro-azulada.

O reagente de trabalho BCA foi elaborado com 8 mL de reagente A (ácido bicinconínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em 0,1 N NaOH; pH final 11,25) e 0,160 mL de reagente B (4% de cobre II em sulfato penta-hidratado) seguido de homogeneização manual.

A curva-padrão do teste foi construída com a solução padrão de BSA 1mg/mL com os pontos de concentrações de 200µg/mL, 400µg/mL, 600µg/mL, 800µg/mL e 1000µg/mL diluída em água deionizada. Uma alíquota de 25 µL de cada ponto da diluição foi transferida para os poços da placa em duplicata. 25 µL e 50 µL da solução D contendo GNE-KLH ou GNE-BSA foram adicionados aos poços da microplaca em duplicata para a análise da concentração do imunoc conjugado. 25 µL de água deionizada foram adicionados aos poços da placa em duplicata estabelecendo-se a referência de branco e o ponto 0 da curva padrão. 200 µL de reagente BCA foram adicionados aos poços da placa contendo a amostra de proteína padrão BSA, no GNE-KLH ou GNE-BSA e no branco. A microplaca foi incubada em banho-maria a 37 graus por 30 minutos. A leitura foi realizada no leitor de microplacas SPECTRAmax com filtro de 562 nm em programa *BCA protein assay*.

5.2.5. Preparo da formulação da vacina

A formulação utilizada para imunização dos animais foi feita através da mistura dos conjugados com adjuvante de Freund. O adjuvante completo de Freund é composto de uma emulsão água em óleo adicionada de *Mycobacterium* sp. Já no adjuvante incompleto de Freund não há a presença de *Mycobacterium* sp. O adjuvante completo merece atenção especial devido aos seus efeitos colaterais: dor, febre, nódulos, eritema, necrose e abscesso, sendo utilizado somente em projetos experimentais (SCHEIBNER, 2001).

Foi preparada uma emulsão por meio da adição de um volume necessário para o número de animais do conjugado GNE-KLH ao adjuvante completo de Freund, para a primeira imunização. As demais imunizações utilizaram o adjuvante incompleto de Freund. Após a mistura, por se tratar de uma fase líquida e outra oleosa, foi realizada a agitação em agitador por 10 minutos ou até a homogeneização completa das duas fases. A confirmação da integridade da emulsão foi feita através do teste de gota (MONCADA, TORRES & ISRAEL, 1993). Este consiste em adicionar 20 μ L da emulsão a 50 mL de água destilada e observar por 1 minuto. Caso não ocorra a separação da fase sólida da oleosa, confirma-se a produção da emulsão, conforme pode ser visualizado na Figura 7.

Quando observada a dispersão da gota, foi realizada nova homogeneização em vortex durante 10 minutos e novo teste de gota.

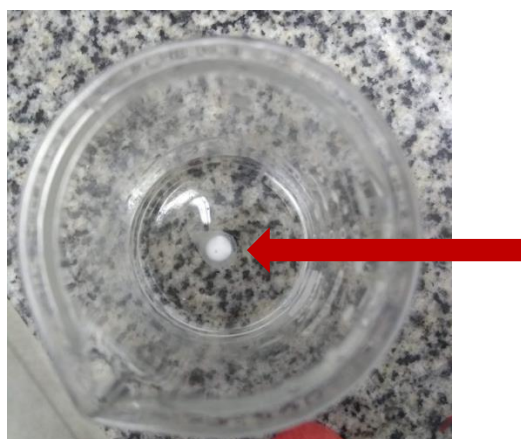


Figura 5. Figura da visão vertical do Becker onde foi adicionada uma gota da emulsão, ponta da seta. Nota-se a ausência de dispersão da gota indicando a integridade da emulsão preparada.

5.3. Etapa 2: Imunização dos animais e construção do pool de amostras

5.3.1. Animais

Para a obtenção dos pools, foi realizada a imunização de camundongos Balb/c machos com idade entre 1 e 2 meses, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brasil). O ganho de massa foi acompanhado semanalmente até atingir os 25 gramas necessários para dar início ao experimento. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas e receberam ração e água *ad libitum*.

Os animais foram randomicamente divididos em dois grupos experimentais: controle (n=5), que recebeu apenas a emulsão adjuvante e grupo vacinado (n=6) que recebeu emulsão adjuvante com GNE-KLH por via intraperitoneal.

As amostras de sangue foram coletadas antes de cada imunização e o peso foi avaliado semanalmente em ambos os grupos. Ao final dos experimentos (tempo 57) os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono, precedida de anestesia com solução contendo xilazina (0,43mg/Kg) e quetamina (0,5mg/kg) via intraperitoneal.

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas para o uso de animais de laboratório e receberam aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 323/2017), em conformidade com a Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde.

5.3.2. Coleta de sangue

Antes de cada imunização uma amostra de sangue foi coletada em tubos sem anticoagulante, para posterior obtenção de soro.

As coletas de sangue foram realizadas por punção no plexo submandibular nos dias 0, 7, 21, 42 e 57.

A coleta de sangue foi realizada no feixe vascular localizado na parte de trás da mandíbula na porção onde veias orbitais, veias submandibulares e veias

que drenam a região facial se juntam para formar o começo da veia jugular (Figura 8).

Para coleta, o animal foi imobilizado pelo dorso e, com uma agulha de 25 x 0,8 mm, foi feita uma leve punção na região submandibular do animal para atingir a plexo vascular, de forma que as gotas de sangue, aproximadamente 6 no total, pudessem ser coletadas, obtendo-se um volume aproximado de 400 μ L armazenados em microtubos de polipropileno de 1,5 mL estéril. Uma simples pressão com gaze ou algodão na área puncionada foi suficiente para interromper o gotejamento. Esse método foi escolhido para obtenção de um volume maior de sangue, por provocar menor sofrimento aos animais, não demandar anestesia e ser rápido (GOLDE, GOLLOBIN e RODRIGUEZ, 2005).

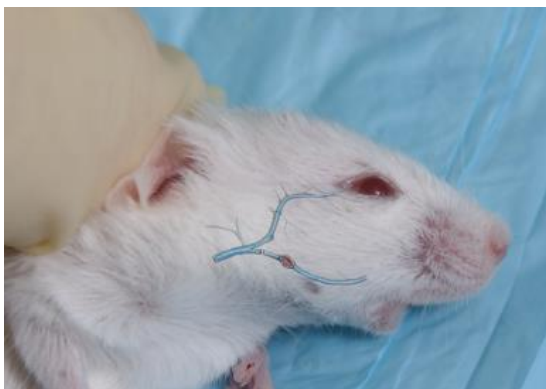


Figura 6. Figura de um animal imobilizado, com imagem ilustrativa do feixe submandibular composto por veias retro-orbitais, partindo do canto inferior dos olhos e veias submandibulares (extraída de: Golde, Gollobin & Rodriguez 2005).

Para eutanásia, ao final do experimento, 60 dias após a primeira imunização, os animais foram anestesiados com solução contendo xilazina (0,43mg/Kg – Virbaxyl 2% injetável 0,1 mL/Kg i.p) e quetamina (0,5mg/Kg - Dopalen injetável, imL/Kg i.p.) (Flecknell, 2000) via intraperitoneal, em seguida os animais foram exsanguinados por rompimento da aorta abdominal para a coleta do sangue total.

5.3.3. Imunização

Após a coleta de sangue, cada camundongo recebeu uma dose de 300 μ L, por via intraperitoneal, de uma das duas formulações, conforme seu grupo de alocação. As imunizações aconteceram nos dias 0, 7 e 21 dias. Os animais tiveram a massa corporal medida semanalmente e imediatamente antes da injeção.

5.3.4. Processamento das amostras e dosagens

Após a coleta, as amostras de sangue total foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C a 10.000 rpm por 20 minutos. O soro obtido foi transferido e estocado em alíquotas em freezer a -80°C para posterior análise.

5.3.5. Construção dos pools de soro

Após a determinação dos títulos de anticorpos anticocaína através do ELISA utilizando a cocaína como fase sólida, conforme descrito abaixo, agrupou-se os 5 soros que apresentaram a menor densidade ótica (D.O.) no grupo controle e aqueles que apresentaram uma D.O superior a 0.7 no grupo vacinado. Os pools foram homogeneizados, alíquotados e armazenados a -80°C até sua utilização.

5.4 Etapa 3: Ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA)

5.4.1. ELISA INDIRETO

A técnica de ELISA indireto aqui descrita foi adaptada do procedimento descrito para a quantificação de auto-anticorpos anti-neuropeptídeos descrita por Fetissov, 2011 e que vinha sendo utilizada como padrão por nosso grupo de pesquisa desde 2012 (Fetissov *et al.*, 2011). Descreveremos um procedimento genérico e, depois, as especificidades de cada experimento. Os sais foram adquiridos na Sigma-Aldrich, IL, quando não especificado.

5.4.2. Fixação do hapteno na placa

Para a fixação do analito na fase sólida foi diluído 10µL de uma solução de estoque do analito (cocaína 2mg/mL) em tampão de fixação (0,05M carbonato bicarbonato + ázida sódica; pH 9,6) para formar 10 mL de solução de fixação. Com uma pipeta multicanal, adicionaram-se 100 µL de solução de fixação em cada poço de uma placa de 96 poços Nunc MaxiSorp™ (Sigma Aldrich, IL). A placa foi armazenada coberta com filme plástico *overnight* a 4°C. Esse tipo de placa apresenta um tratamento de superfície que apresenta alta afinidade para moléculas com domínios hidrofílicos/hidrofóbicos.

5.4.3. Diluição/ incubação do soro

Na manhã seguinte à fixação, cada poço foi lavado 3 vezes com 100 µL de tampão de lavagem (PBS (1,37M de NaCl; 27mM de KCl; 81 mM de NaHPO₄ 7H₂O; 15mM de KH₂PO₄) + Tween 20 a 0,05%; pH 7.4).

As amostras de soro dos animais foram diluídas segundo as especificações em tampão de amostra (PBS + ázida sódica pH 7.4), fazendo a solução de amostra. Após a diluição, 100 µL de solução de amostra foram adicionados em triplicada nos poços da placa fixada com o analito e esta foi armazenada, coberta por filme plástico *overnight* a 4°C. Para o estabelecimento do branco, foram adicionados 100 µL de tampão de amostra, também em triplicata.

5.4.4. Revelação da placa

Para a revelação das placas, diluíram-se 5 µL do anticorpo secundário (*Anti-mouse IgG F(ab)₂ específico* - Sigma Aldrich, USA) ligado à fosfatase alcalina em tampão de amostra para formar uma solução final de 10 mL (1/2000).

Após a lavagem de cada poço com 100 µL de tampão de lavagem por 3 vezes, adicionaram-se 100 µL de solução de anticorpo secundário. A placa foi armazenada coberta com filme plástico por 3 horas a 37°C.

Diluiu-se o substrato p-Nitrophenyl, SIGMAFAST™ (Sigma Aldrich, MO) conforme a orientação do fabricante. Após a terceira hora, lavou-se cada poço com 100 µL de tampão de lavagem por 3 vezes. Após a lavagem, adicionaram-

se 100 μL de solução do substrato em cada poço, cobriu-se a placa com filme plástico e armazenou-se por 40 minutos à temperatura ambiente.

A interrupção da reação foi feita adicionando-se 50 μL de NaOH 3N em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (VICTOR X4 Perking Elmer, MA) a 405 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) e correspondem à média do valor das triplicadas dividido pelo valor do branco.

5.5 ELISA COM COCAÍNA NA FASE SÓLIDA

O uso de cocaína na fase sólida é feito pelo grupo desde 2012. Nessa época, replicando o protocolo de Fetissov (2011), optou-se por utilizar uma concentração de 2mg/mL de solução de estoque deste analito. Esse valor foi confirmado frente a outras concentrações e por isso será usado nesse experimento como referência para o ELISA, utilizando cocaína na fase sólida.

O grupo também usa desde 2012 uma concentração e 1/200 para diluição da amostra em tampão de amostra. Na época, foi feita uma curva de diluição de 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 e 1/1000 com 20 amostras de animais imunizados e a concentração de 1/200 foi aquela que apresentou menor variância. Por isso, essa diluição da amostra foi usada para quantificação do soro dos animais imunizados no experimento.

Para realização do teste de linearidade, ambos os pools foram diluídos em concentração de 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 e 1/1000 em tapão de amostra e 100 μL de cada foi cocado em cada poço em triplicata. As outras etapas seguem o protocolo acima descrito.

Para o estudo de competição, incubou-se com cocaína, norcocaína, egconina e benzoilecgonina diluídas em tampão de amostra. Utilizou-se a diluição da amostra em tampão de diluição na concentração de 1/200. Incubaram-se 300 μL de solução de amostra em 300 μL de solução de competição a 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} mg/mL por duas horas a 4°C sob agitação (FOX *et al.*, 1996; HICKS *et al.*, 2011; HICKS *et al.*, 2014). Após isso, incubaram-se 200 μL de cada uma das soluções em triplicada em cada poço *overnight* a 4°C. As outras etapas seguem o protocolo acima descrito.

5.6 ELISA COM GNE-BSA NA FASE SÓLIDA

O ELISA utilizando-se GNE-BSA na fase sólida foi realizado em etapas conforme descrito a seguir. Na primeira etapa, avaliamos a melhor concentração de GNE-BSA a ser fixada na placa. Dessa forma, fez-se uma solução estoque com 2µg, 5µg, 7µg, 10µg e 20µg/mL e se diluíram-se 10 µL dessa solução em em tampão de fixação para formar um volume final de 10mL. O analito foi fixado na fase sólida conforme descrito no protocolo inicial. As outras etapas seguem o protocolo acima descrito.

Para o teste de linearidade de cada concentração de analito, os pools foram diluídos na concentração de 1/200, 1/500, 1/1.000, 1/5.000 e 1/10.000 em tampão de amostra e 100 µL de solução de amostra foram adicionados em um poço da placa em triplicada. As outras etapas seguem o protocolo acima descrito.

Para o estudo de competição, incubou-se o *pool* com cocaína, norcocaína, egconina e benzoilecgonina diluídas em tampão de amostra e utilizou-se a diluição do *pool* na concentração de 1/200. Incubou-se 300 µL de solução de amostra diluída em 300 µL de solução de competição a 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} mg/mL por duas horas a 4°C sob agitação (FOX *et al.*, 1996; HICKS *et al.*, 2011; HICKS *et al.*, 2014). Após incubação, transferiram-se 200 µL de cada uma das soluções em triplicada em cada poço. As outras etapas seguem o protocolo acima descrito.

5.7 Etapa 4: Análise estatística

Os dados foram tabulados no software Excel (Microsoft, WA). As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando-se o programa Prisma (*Graphpad Prism*, San Diego, Califórnia). O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. A normalidade das amostras foi testada com o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

A comparação de médias das amostras entre os pools controle e vacinado foi realizada para cada dia com o test T de Student. Para avaliação dos testes de linearidade e de competição, utilizou-se a regressão linear entre as concentrações dos pools e a densidade óptica.

6. RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA IMUNIZAÇÃO EM ENSAIO DE ELISA INDIRETO COM COCAÍNA NA FASE SÓLIDA

Para a construção dos *pools*, a dosagem de anticorpos anticocaína tipo IgG foi realizada pelo ELISA INDIRETO utilizando a cocaína fixada na fase sólida. Na Figura 9, observa-se que as médias da D.O do tempo 0 não diferem entre o grupo vacinado e o controle (0.235 ± 0.048 versus 0.248 ± 0.103 ; $p=0.79$) e difere de forma estatisticamente significativa nos tempos 7 (0.552 ± 0.243 versus 0.265 ± 0.099 ; $p = 0.036$); 21 (0.66 ± 0.239 versus 0.27 ± 0.98 ; $p = 0.0098$) e 42 (0.57 ± 0.248 versus 0.27 ± 0.06 ; $p = 0.032$). Observa-se também uma tendência ao aumento progressivo da D.O. média dos animais do grupo tratado ao longo do tempo, exceto no tempo 42.

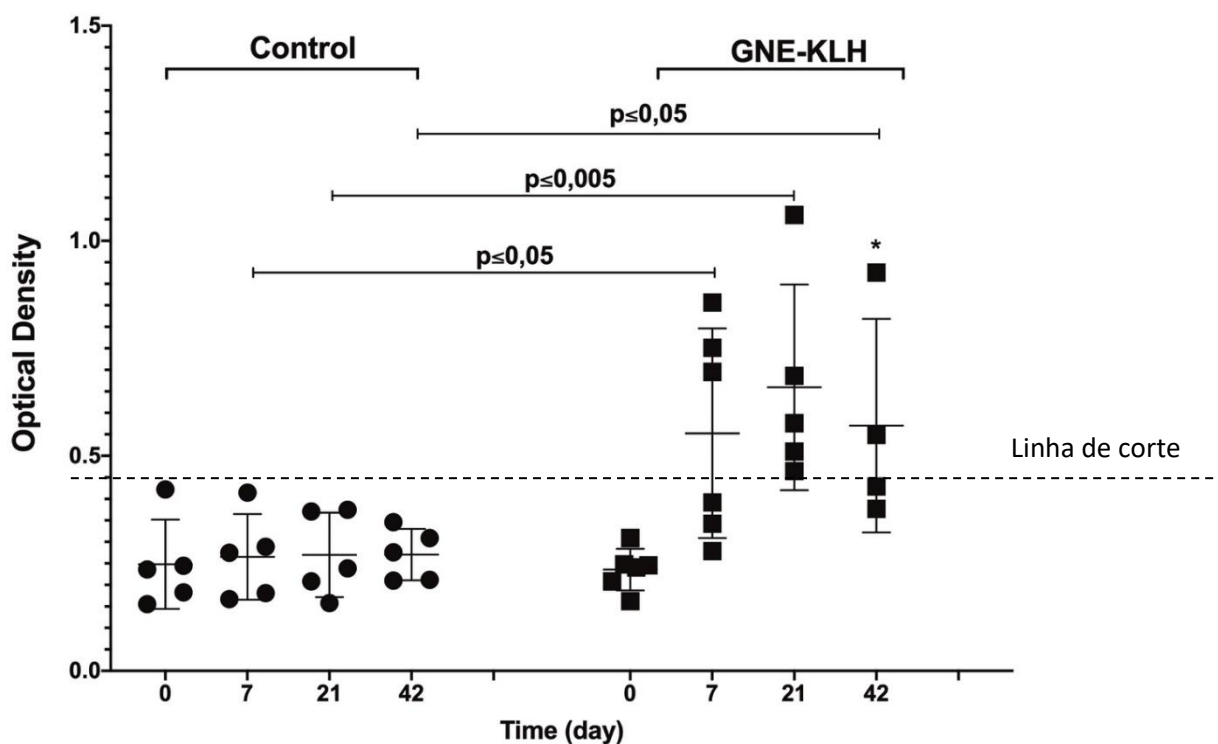


Figura 7. Os anticorpos contra a cocaína são produzidos em animais imunizados (quadrados) e não são produzidos em animais tratados com placebo (círculos). Os valores são expressos em densidade óptica média e desvio padrão. Day n control X Day n GNE-KLH, Student t Test. O valor de densidade óptica escolhido para os plasmas do pool vacinado foi de 0,7 D.O, conforme representado pela “linha de corte”.

6.2. TESTE DE LINEARIDADE ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO POOL E A DENSIDADE ÓTICA NO ELISA COM COCAÍNA FIXADA NA FASE SÓLIDA

Para avaliar a linearidade do ELISA indireto com cocaína fixada na fase sólida, utilizaram-se diluições seriadas dos *pools*. O resultado pode ser observado na Figura 10. Nela, observa-se a linearidade dos pontos do grupo tratado e a regressão linear apresentou um resultado estatisticamente significativo ($r^2 = 0.79$; $p = 0.0177$) de maneira diferente do grupo controle ($r^2 = 0.227$; $p = 0.338$).

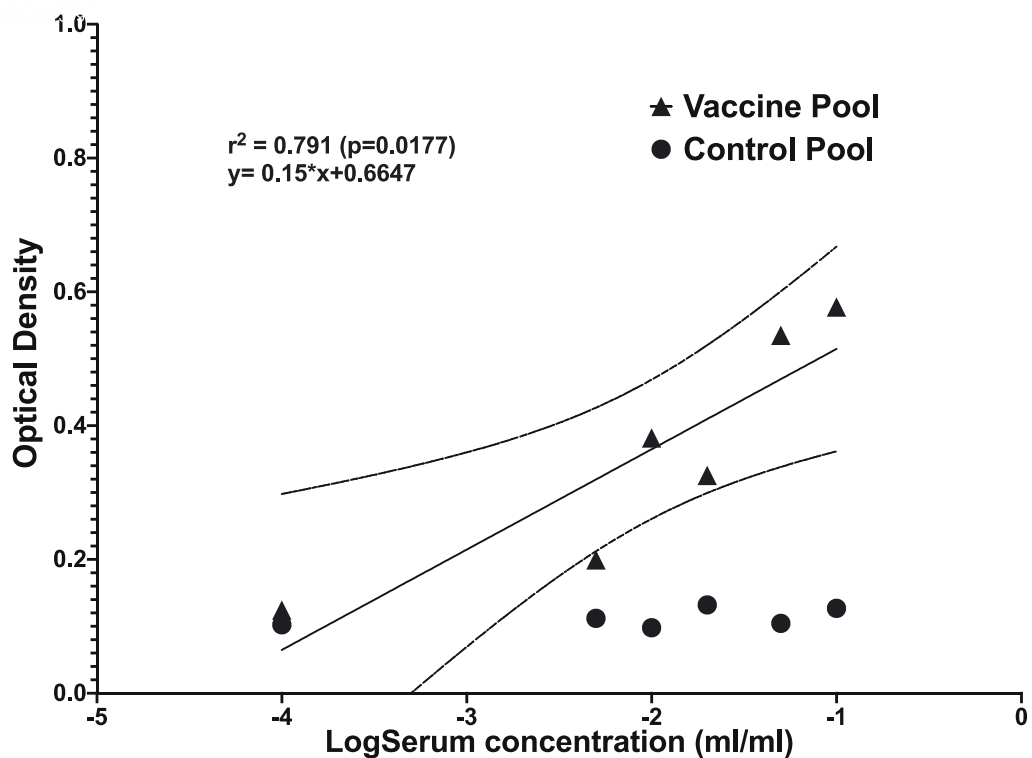


Figura 8. Teste de linearidade da amostra dos pools controle e vacinado. Observa-se a existência de uma correlação da diluição e da D.O. no pool vacinado e não se observa no pool controle.

6.3. TESTE DE LINEARIDADE POR COMPETIÇÃO COM COCAÍNA NO ELISA INDIRETO COM COCAÍNA FIXADA NA FASE SÓLIDA

Na avaliação da inibição produzida pela cocaína na capacidade de ligação dos Ac dos *pools* usando a adsorção por cocaína das amostras, encontramos uma correlação negativa estatisticamente significativa no grupo vacinado ($r^2 = 0.98$; $p < 0.0001$; $Y = -0.049X + 0.728$) e não no grupo controle ($r^2 = 0.071$; $p = 0.335$). Na concentração de cocaína de 10^{-4} , a D.O. do grupo vacinado foi idêntica a do controle sugerindo que, nessa concentração de cocaína, a inibição dos anticorpos é total.

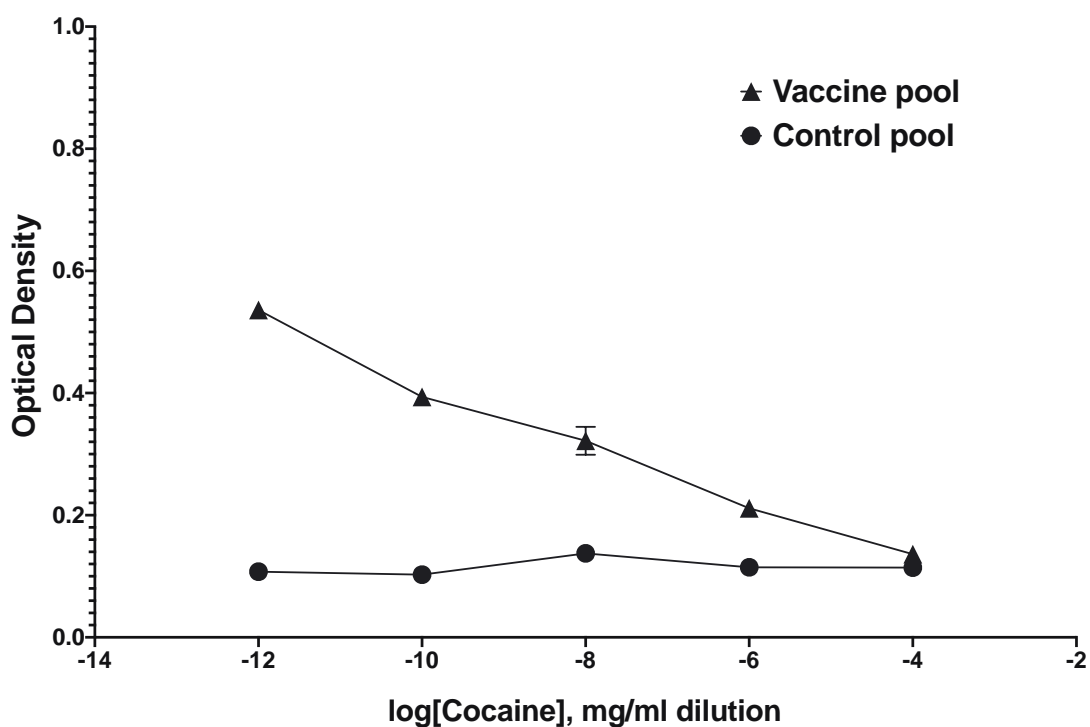


Figura 9. Curvas de adsorção de cocaína em concentrações de 10^{-12} a 10^{-4} e leitura de níveis de IgG anti-cocaína IgG com cocaína fixada em fase sólida

6.4. ELISA DE COMPETIÇÃO COM OS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA COCAÍNA E COCAÍNA FIXADA NA FASE SÓLIDA

Na figura 12 pode-se observar o resultado do ELISA de competição com os metabólitos norcocaína, ecgonina e benzoilecgonina nas concentrações de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} mg/mL.

Observamos uma correlação na regressão linear para todos os metabólitos no grupo vacinado e não no grupo controle. A correlação entre os *pools* vacinado e controle para a norcacaína foi de $r^2 = 0.938$; $p < 0.001$ versus $r^2 = 0.007$; $p = 0.76$. A correlação entre os *pools* vacinado e controle para a ecgonina foi de $r^2 = 0.97$; $p = 0.01$ versus $r^2 = 0.143$; $p = 0.163$. A correlação entre os *pools* vacinado e controle para a benzoilecgonina foi de $r^2 = 0.94$; $p = 0.03$ versus $r^2 = 0.00026$; $p = 0.85$. Este resultado sugere que os anticorpos produzidos pela vacina são policlonais e apresentam especificidades diferentes.

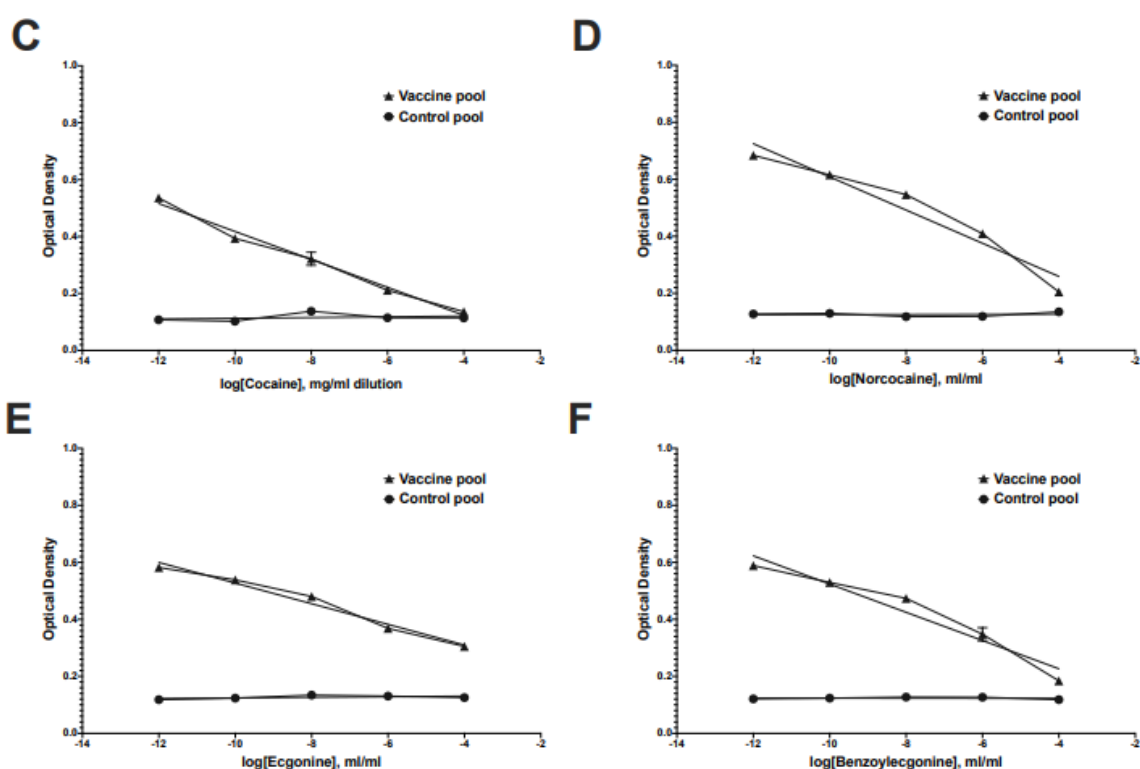


Figura 10. Curvas de adsorção dos principais metabólitos da cocaína em concentrações de 10^{-12} a 10^{-4} e leitura de níveis de IgG anti-cocaína IgG com cocaína fixada em fase sólida. Em A observa-se a curva da norcocaína, em D. a curva da Ecgonina em E e a curva da Benzoilecgonina em F. Observa-se que em alguma forma todos os metabólitos produzem alguma inibição, contudo, esta inibição é menor que aquela observada para a cocaína, no item C.

6.5. AVALIAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE GNE-BSA NA FASE SÓLIDA E AVALIAÇÃO DO USO DE BSA NO TAMPÃO DE AMOSTRA

Para avaliação da melhor concentração de GNE-BSA na fase sólida do ELISA comparamos as concentrações de 2µg, 5µg, 7µg, 10µg e 20µg/mL com e sem bloqueio de ligações inespecíficas com BSA a 1% no tampão de fixação e de amostra.

Os resultados estão grafados na figura 13, onde se vê que, exceto para as concentrações de 10 e 20 ug/mL na solução de estoque, onde se obteve um sinal negativo nas leituras das D.O., nas outras concentrações, com e sem tampão, obteve-se sinal mais intenso no grupo vacinado do que no grupo controle, tanto nos grupos com bloqueio e sem bloqueio. Observa-se uma tendência de aumento da distância entre o sinal do grupo controle, do grupo vacinado, com o aumento da concentração da solução de estoque nos grupos com e sem bloqueio com BSA. Essa diferença foi maior no ELISA em que se utilizou a solução de estoque com 7µg/mL com bloqueio de BSA.

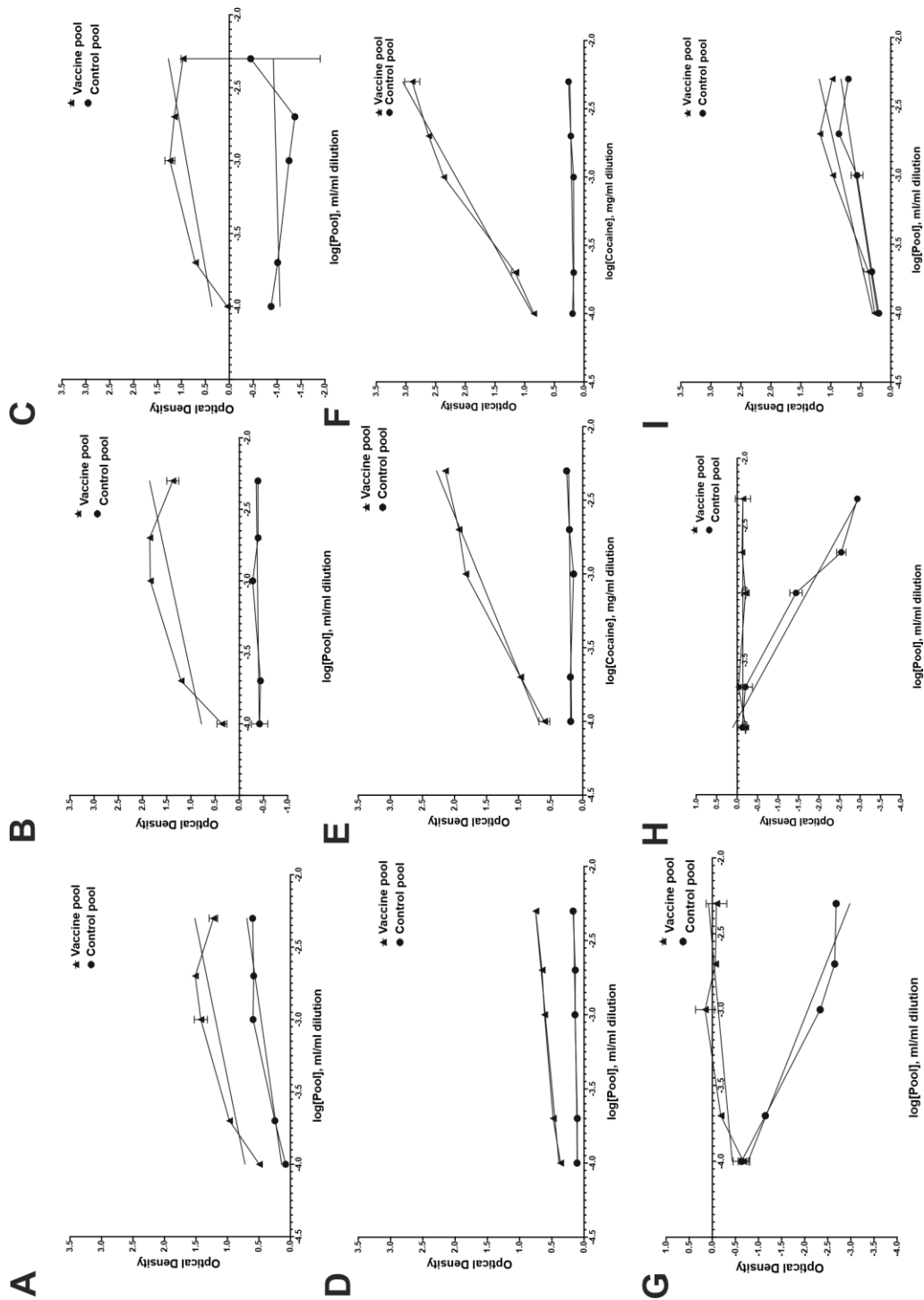


Figura 11. Teste de linearidade com ELISA através da diluição seriada dos pools vacinado e controle 1/10000; 1/5000; 1/1000; 1/500; 1/200. Nas figuras A a H se utilizou o GNE-BSA como analito fixado à fase sólida, sendo A. e D. 2 μ g/mL; B. e E. 5 μ g/mL; C. e F. 7 μ g/L; G. 10 μ g/ml e H. 20 μ g/mL. Na figura I. foi fixada cocaína a 2 mg/ml na fase sólida. Nas figuras D a F se utilizou 1% de BSA no tampão de fixação e no tampão de amostra. Observa-se quando se utiliza o GNE-BSA como analito fixado na fase sólida, se tem uma densidade óptica maior quando se usa uma concentração de 0,7 μ g/mL e o BSA nas soluções de fixação e amostra, do que quando comparado às demais situações.

6.6. TESTE DE LINEARIDADE POR COMPETIÇÃO COM COCAÍNA, GNE E METABÓLITOS DA COCAÍNA NO ELISA INDIRETO COM GNE-BSA FIXADA NA FASE SÓLIDA

Para a avaliação da inibição dos anticorpos anticocaína IgG realizou-se o ELISA com 2 uL/mL de GNE-BSA fixado na fase sólida com bloqueio por BSA. Pode-se observar que a inibição foi máxima com o GNE, formando uma curva sigmoideal, sendo maior para a cocaína que para os demais metabólitos em todas as concentrações.

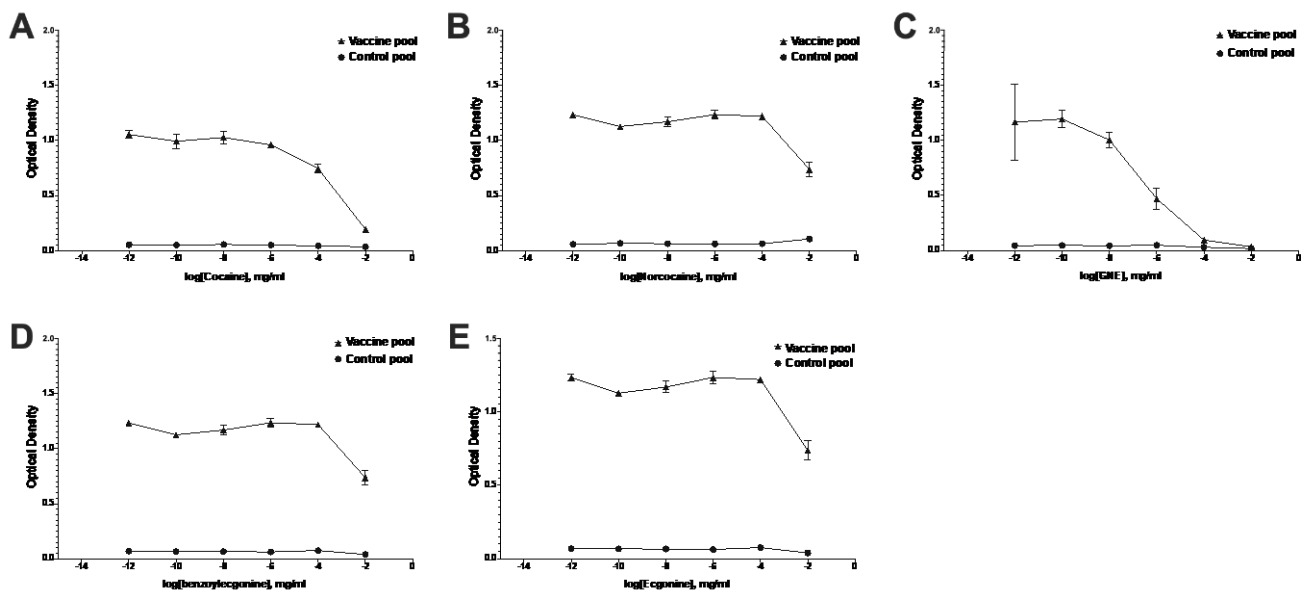


Figura 12. Resultados ELISA de competição com 2 ug de GNE-BSA na fase sólida. A concentração das soluções de cocaína, hapteno GNE e metabólitos foi de 10^{-2} a 10^{-12} . A) Curva de competição com cocaína B) Curva de aspecto sigmoideal de competição com o hapteno de cocaína (GNE) C) Competição com metabólito Norcocaína D) Competição com metabólito benzoilecgonina E) Competição com metabólito ecgonina

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam a hipótese de que o ELISA indireto utilizando o analito GNE-BSA produz resultados mais sensíveis que o analito cocaína, quando fixado em fase sólida para semiquantificação de anticorpos anticocaína do tipo IgG em soro de camundongos. Tanto o teste de linearidade do *pool* de amostras quanto o teste de competição com GNE-BSA produzem sinais com D.O. mais intensos que quando usamos a cocaína pura.

Das concentrações testadas, o protocolo que utilizou uma solução estoque de 7 µg GNE-BSA obteve maior inclinação e área sobre a curva entre o grupo controle e o grupo vacina.

O bloqueio de ligações inespecíficas com o uso de BSA a 1% no tampão de fixação e tampão de amostras também corroborou com o aumento do sinal no ELISA que utilizou GNE-BSA fixado na fase sólida.

Esses resultados estão alinhados com a prática de outros pesquisadores que utilizam uma estratégia semelhante à descrita no presente estudo (WENTHUR, et al., 2017; KIMISHIMA, et al., 2018)

Os resultados deste estudo também corroboram com dados anteriores de que o ELISA utilizando cocaína na fase sólida também é capaz de diferenciar níveis de anticorpos anticocaína tipo IgG, contudo os resultados parecem inferiores ao uso de GNE-BSA (NETO, 2017)

Para avaliar se o GNE-BSA melhora a quantificação dos anticorpos anticocaína, utilizamos o GNE-BSA na fase sólida. Inicialmente, comparamos a resposta às concentrações de 20 µg, 10 µg, 7 µg, 5 µg e 2 µg em 10 mL de tampão de fixação frente às concentrações de 1/200; 1/500; 1/1.000; 1/5.000; 1/10.000 do *pool*.

No primeiro teste do ELISA com GNE-BSA fixado em fase sólida, sem a utilização do BSA a 1% para bloqueio, observamos três fenômenos. O primeiro é uma densidade óptica maior dos grupos tratados com relação ao ELISA onde se utilizou cocaína na fase sólida. O segundo é uma maior distinção entre o sinal e o ruído, ou seja, uma maior diferença entre os pontos do grupo vacinado e do

grupo controle. O terceiro é que concentrações acima de 0,7 µg/mL, o sinal e o ruído são expressos em densidades ópticas acima do limite de detecção do aparelho.

Seguindo nossos experimentos para aprimoramento do método de detecção de anticorpos anticocaína tipo IgG em soro de camundongos, avaliamos o uso do bloqueio de sítios inespecíficos de ligação usando o BSA a 1% nos tampões de fixação e de amostra. Conforme foi observado nos gráficos onde se compara o uso de bloqueio com BSA, este aumenta a inclinação da curva de detecção do grupo vacinado em relação ao controle, permitindo melhor distinção entre as densidades ópticas dos grupos controle vacinado, quando a concentração de GNE-BSA fixada é de 0,7 µg/ml.

A padronização desse método enfrenta diversos desafios. O primeiro é que não estamos lidando com um analito único e bem caracterizado. A produção de anticorpos pelo sistema imune é feita de forma progressiva em termos de especificidade, níveis e afinidade (ABBAS, LICHTMAN & PILAI, 2012). Dessa forma, quando avaliamos os *pools* de soro dos animais estamos avaliando anticorpos policlonais que contém afinidade e especificidade distintas. Assim, apesar de podermos fazer uma avaliação semi-quantitativa dos níveis de anticorpos anticocaína, não conseguimos necessariamente estabelecer os níveis de anticorpos com precisão, pois não se trata do único parâmetro a ser avaliado. Além disso, não há um padrão de referência ou um teste padrão ouro para a dosagem de anticorpos anticocaína. Uma opção seria o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anticocaína tipo IgG produzido na espécie estudada a ser usado como referência. Contudo o desenvolvimento deste é caro e demanda um período longo para a seleção de subtipos de anticorpos de alta afinidade. Dessa forma, podemos considerar os dois métodos de ELISA aqui desenvolvidos como métodos semiquantitativos para dosagem de níveis de anticorpos anticocaína tipo IgG em murinos.

A forma que encontramos para tentar avaliar a capacidade de medida do método foi através da adsorção da cocaína nas amostras. Avaliando as doses de bloqueio, pode-se inferir a capacidade do *pool* de se ligar a cocaína. Essa seria uma forma indireta de se avaliar quantitativamente os níveis de anticorpos anticocaína na amostra.

Um outro aspecto importante de ser discutido é o fato de que no ELISA no qual fixamos GNE-BSA estamos avaliando a capacidade de ligação dos anticorpos da amostra ao GNE e não à cocaína. Isso é um fato importante, visto que, apesar do GNE ser uma molécula muito similar à cocaína, não apresenta necessariamente os mesmos sítios de ligação. Esse fenômeno pode ser observado de forma clara quando fizemos a adsorção com GNE no ELISA com GNE-BSA, em que observamos uma curva de inibição sigmoide, caracterizando um verdadeiro efeito dose resposta e que essa curva, apesar de presente para a cocaína, foi muito mais importante que aquela apresentada pela adsorção de cocaína. Temos que destacar que esse resultado é o resultado não da avaliação do teste, mas da avaliação do pool de soros usado nesse estudo e que ele pode não ser o mesmo para outras formulações de vacina anticocaína ou para outras espécies.

Apesar dos resultados com GNE-BSA serem bem superiores ao da cocaína em fase sólida, os resultados do presente estudo devem ser analisados dentro de algumas limitações. A primeira é que o *pool* de amostras de animais vacinados é apenas um conjunto de soros que não representa necessariamente todas as respostas possíveis em termos de níveis, especificidade ou afinidade. Segundo, que os resultados aqui apresentados são válidos apenas para camundongos e não podem ser extrapolados para outras espécies. Terceiro, que o teste de competição com o GNE-BSA foi realizado na concentração da solução estoque a 2 µg/mL e não a 7 µg/mL, na qual o sinal foi o mais intenso. Quarto, ainda é necessária padronização de outros subtipos de imunoglobulinas importantes de serem avaliados nos estudos para a vacina anticocaína como a IgM, e os subtipos de IgG.

8. CONCLUSÃO

As técnicas de dosagens apresentadas nessa dissertação foram eficientes e confiáveis para quantificar anticorpos anticocaína tipo IgG em camundongos. O GNE-BSA aumenta a sensibilidade para mensuração de anticorpos anticocaína.

9. PERSPECTIVAS

A padronização do método ELISA para dosagem de anticorpos anticocaína mostrou-se eficiente nas etapas que foram testadas no presente trabalho. Os resultados apresentados promoveram os primeiros passos para prosseguir na garantia de qualidade do método proposto e avaliado. Há ainda testes complementares a se fazer, visando tornar o método um processo de uso contínuo no laboratório. Por exemplo, em relação ao uso de amostras, pretende-se utilizar amostras de outras espécies de animais experimentais, bem como o uso de amostras de humanos, uma vez que esse é o objetivo final do projeto de desenvolvimento da vacina anticocaína.

O conhecimento das interações antígeno-anticorpo torna necessário a utilização de métodos de detecção e quantificação de anticorpos e antígenos que resultem no desenvolvimento de métodos amplamente utilizados na rotina laboratorial. É necessário estudar novos parâmetros que permitam as análises de forma tão efetiva quanto o ELISA, sobretudo no que diz respeito a velocidade de processamento das amostras. Dentre os imunoenaios disponíveis, os ensaios de microarranjos líquidos baseados em microesferas são uma tecnologia mais recente que começou a ser utilizada no final da década de 1990 (VIGNALI, 2000; KELLAR & OLIVER, 2004) e que apresenta algumas vantagens em relação às outras, como a análise simultânea de analitos e, conseqüentemente, redução de custo e tempo (ELSHAL & McCO, 2006).

Os ensaios múltiplos de microarranjos líquidos utilizam o mesmo princípio dos ensaios imunoenzimáticos tradicionais, porém com a vantagem de detectar simultaneamente diversas proteínas através do uso de microesferas em

suspensão, as quais funcionam como suporte sólido para a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) (LENG *et al.*, 2005). Essa abordagem possui as vantagens de uma melhor reprodutibilidade do ensaio, sensibilidade e especificidade, além de possibilitar a redução de quantidade de amostra.

O ensaio de microarranjos líquidos possui diversos parâmetros relevantes para serem avaliados pelo operador ou equipe que pretenda utilizá-lo como por exemplo, o tempo de incubação e o sistema de captura/detecção.

Assim, para poder considerar um método eficaz e eficiente para incluir em um processo de rotina no laboratório é necessário padronizar todas essas etapas do processamento, o que representa ainda muito esforço e trabalho futuro!

10.ANEXOS

10.1. Dosagem do conjugado BSA-GNE pelo método do ácido Bicinconínico

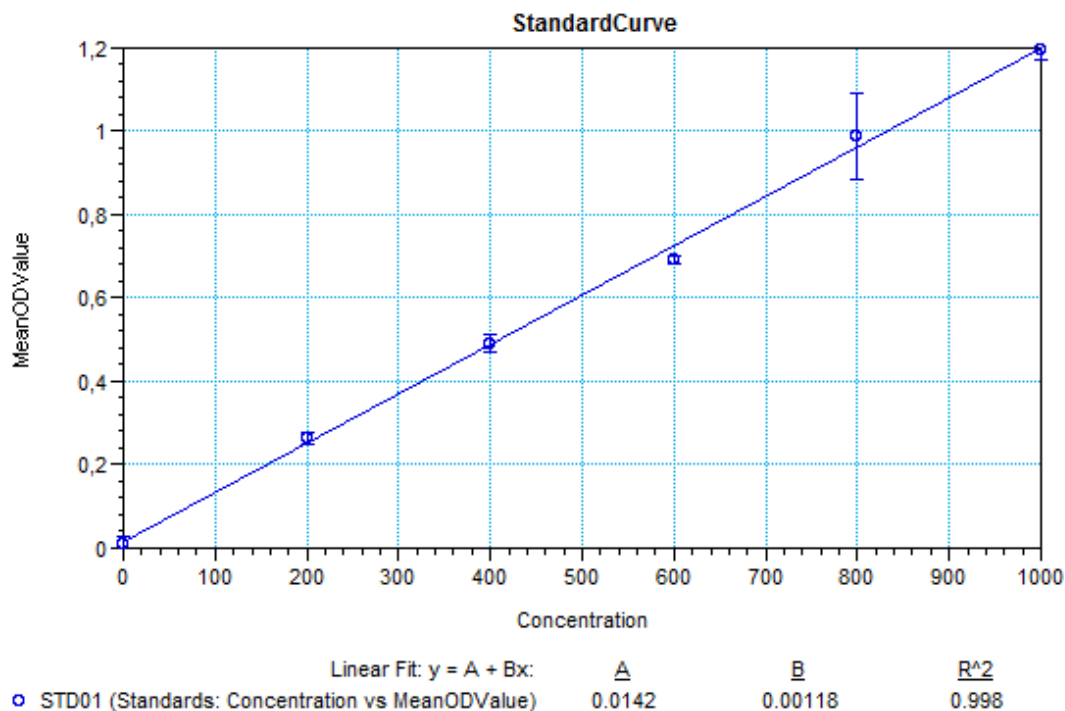


Figura 13. Curva padrão linear obtida das amostras de proteína padrão (BSA) nas concentrações de 0ug; 200 ug; 400ug; 600ug; 800ug e 1000ug; e de 50 ul de amostra BSA-GNE.

Obteve-se assim, a equação da reta $Y = a + b \cdot X$, onde:

$a \Rightarrow$ coeficiente linear

$b \Rightarrow$ coeficiente angular

$Y \Rightarrow$ absorvância da amostra

$X \Rightarrow$ concentração da amostra

Equação final: $0,7305$ (média das absorvâncias de 50ul de BSA-GNE) $= 0,0142 + 0,00118 \cdot X$

Concentração de BSA-GNE em 50 uL = 51,36 $\mu\text{g/mL}$

10.2. Sumário de Procedimentos

O quadro 2 representa o sumário de procedimentos adotados pelo laboratório NAVeS para a realização do ELISA's. Os procedimentos estão em ordem de processo.

| | | SUMÁRIO DE PROCEDIMENTO | | |
|-------|--|---|-------------------|---------------------------------|
| Ordem | Protocolos Operacionais Padrão | Título | Número de páginas | Status |
| 1.º | IO-000-CC- Solução PBS | PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO-SALINO PBS UTILIZADO NO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO | 3 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 2.º | IO-001-CC- Solução Tampão de amostra | PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DO TAMPÃO DE AMOSTRA UTILIZADO NO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO | 3 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 3.º | IO-002-CC- Solução tampão de Fixação | PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DO TAMPÃO DE FIXAÇÃO UTILIZADO NO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO | 4 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 4.º | IO-004-CC-Solução de interrupção de reação | PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DA SOLUÇÃO DE INTERRUPTÃO DE REAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO | 3 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 5.º | IO-005-CC- Peptídeo de cocaína a 2mg/ml | PROCEDIMENTO DE PREPARO DO PEPTÍDEO DE COCAÍNA (2 mg/mL) | 3 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 6.º | POP-2018-003-CC-Centrífuga Refrigerada | PROCEDIMENTO OPERACIONAL DE MANUSEIO DA CENTRÍFUGA REFRIGERADA HERAEUS FRESCO 21 DA THERMO SCIENTIFIC | 8 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 7.º | POP-2018-004-CC- Pipeta Multicanal Automática | PROCEDIMENTO OPERACIONAL DE UTILIZAÇÃO DA PIPETA MULTICANAL AUTOMÁTICA EPPENDORF RESEARCH PRO | 9 | EM REVISÃO |
| 8.º | POP-2018-001-CC-Ensaio Imunoenzimático | PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO | 8 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 10.º | POP-2019-011-CC Ensaio imunoenzimático competitivo | PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO COMPETITIVO | 8 | EM REVISÃO PROF Frederico |
| 11.º | POP-2018-002-CC-Leitor de Microplacas | PROCEDIMENTO DE LEITURA DAS MICROPLACAS DE 96 POÇOS DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO | 3 | EM REVISÃO PROF Frederico |

Quadro 2. Sumário de Prodecimentos seguindo a ordem de processo

Um dos objetivos específicos deste trabalho foi construir um Protocolo Operacional Padrão dos ELISA's desenvolvidos e padronizados nessa dissertação. A seguir, encontram-se os POPS's dos ensaios ELISA INDIRETO e COMPETITIVO:

10.3. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO.

1. OBJETIVO: Padronizar o procedimento de preparação e condução do ensaio de absorção imunoenzimático.

2. APLICAÇÃO: Ensaio de absorção imunoenzimático para detecção de auto anticorpos anticocaína em amostras de plasma humano.

3. REFERÊNCIAS:

POP-2018-001-CC - Ensaio imunoenzimático

POP-2018-002-CC - Leitor de ELISA

IO-000-CC - Solução PBS

IO-001-CC - Solução Tampão de Lavagem

IO-002-CC - Solução Tampão de Amostra

IO-003-CC - Solução Tampão de Fixação

IO-004-CC - Solução Tampão de Interrupção de Reação

IO-005-CC - Peptídeo de cocaína a 2 mg/mL

FETISSOV, Sergueï O. Neuropeptide autoantibodies assay. In: **Neuropeptides**. Humana Press, 2011. p. 295-302.

4. SIGLAS E ABREVIATURAS:

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

NaOH – Hidróxido de Sódio

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IO – Instrução Operacional

μL – Microlitros

ml – mililitros

nm – Nanômetro

3N – 3 Normal

BSA – Albumina Soro Bovina

POP – Procedimento Operacional Padrão

RPM – Rotação por minuto

PBS – Tampão fosfato-salino

5. MATERIAIS:

5.1 Reagentes: tampão de amostra produzido conforme **IO-002-CC**, tampão de lavagem produzido conforme **IO-001-CC**, tampão de fixação produzido conforme **IO-003-CC**, tampão de interrupção de reação produzido conforme **IO-004-CC**, alíquota de 10 μL de Peptídeo de cocaína produzido conforme **IO-005-CC**, anticorpo secundário ligado à enzima Fosfatase Alcalina da marca Sigma Aldrich dirigido contra a Imunoglobulina e à espécie específica (ex. A8542 Anti-Human IgG (Fab specific) e A2490 Anti-Human IgM (μ-chain specific), substrato SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl, 50 mL de água destilada, amostras de sangue colhidas sem anticoagulante e separadas em soro.

5.2 Vidrarias e outros utensílios: placa com 96 poços de 1 mL (MicroWell™ MaxiSorp™), papel alumínio, papel toalha, papel pardo, par de luvas, caneta marcador permanente, banho de gelo, pipeta regulável de 200 microlitros (Eppendorf), 3 caixas de ponteiros de pipeta 200 microlitros (Eppendorf), pipeta Multicanal de 300 microlitros por canal (Eppendorf), pipeta de 1000 microlitros (Eppendorf), pipeta regulável de 20 microlitros (Eppendorf), 1 caixa de ponteiros de 1000 microlitros (Eppendorf), Proveta de 10 e 20 mL, Rack para micro-tubos eppendorf de 2,0 mL caixa para descarte de agulhas e material contaminado, folha de controle de

placas/amostras, micro-tubos eppendorf de 2,0 mL, 1 Tubo do tipo Falcon de 15 mL, 1 Tubo do tipo Falcon de 50 mL.

5.3 Equipamentos: autoclave, agitador do tipo Vortex® Genie 2T (Scientific industries, United States), incubadora do tipo banho maria (Benfer, Brasil), agitador orbital de microplacas Kline (Labor import, Brasil), leitor de microplacas multidetector VICTOR™ X4 ajustado para filtro de 405 nm (ParkinElmer, USA).

6. PROCEDIMENTO:

6.1 Embalar em papel pardo e autoclavar a 120º C por 15 minutos os seguintes materiais: 3 caixas de ponteiras de pipeta 200 microlitros, 1 caixa de ponteiras de 1000 microlitros, Micro-Tubos eppendorf de 2,0 mL.

6.2 1º Dia – Fixação do Peptídeo na Placa

6.2.1 Dissolver uma alíquota de 10 µL do peptídeo de cocaína ou 7 µg de GNE-BSA em 10 mL do tampão de fixação medido em proveta de 10 mL e transferido para tubo falcon de 15 mL formando a solução de fixação.

Obs: se o GNE-BSA for utilizado na fase sólida, é necessário adicionar 1% de BSA no tampão de amostras.

6.2.2 Com a pipeta multicanal, colocar 100 µL de solução de fixação em cada poço da placa de ELISA.

6.2.3 Cobrir a placa com papel alumínio, identificar com nome e data, colocar na geladeira a 4ºC e deixar incubar por no mínimo 12 horas

Notas: A saturação máxima de ligação do peptídeo de cocaína no fundo do poço da placa ocorre após 48 horas

As placas podem ser armazenadas a 4ºC durante no máximo uma semana.

6.3 2º Dia – Diluição e incubação do soro

6.3.1 Fazer a programação da placa a ser usada, na folha de protocolo do ELISA (folha de posicionamento das amostras na placa anexada neste documento), anotando a posição dos brancos, poços onde não irão receber as amostras diluídas (3 vezes), das amostras (3 vezes), peptídeos, anticorpos e as diluições utilizadas.

6.3.2 Retirar uma alíquota (10 µL) de cada amostra de soro e deixar descongelar dentro do gelo em uma caixa de isopor sob a bancada.

6.3.3 Para cada amostra, identificar tubos de eppendorf de 2 mL, conforme identificação já existente na amostra.

6.3.4. Colocar 2000 µL do tampão de amostra com auxílio da pipeta regulatória de 1000 µL em cada micro-tubo eppendorf de 2 mL.

6.3.5 Pegar 10 µL da amostra que foi previamente descongelada em gelo e colocar em tubo eppendorf com 2 mL de tampão de amostra (formando uma diluição de 1/200).

6.3.6 Agitar em agitador do tipo vortex em rotação de 1.600 RPM por 30 segundos e colocar no gelo em caixa de isopor sobre a bancada.

6.3.7 Retirar o papel alumínio da placa que se encontra em geladeira (vide item 6.2.3) e descartar o material que se encontra na placa por inversão desta em recipiente apropriado. Colocar 100 µL de tampão de lavagem em cada poço com auxílio da pipeta multicanal, agitar levemente manualmente por 1 minuto e descartar. Repetir a operação com tampão de lavagem por três vezes. Após a terceira vez bater delicadamente a placa invertida em papel toalha para retirar o excesso do tampão.

6.3.8 Colocar 100 µL de tampão de amostra com auxílio da pipeta de 300 µL em cada poço identificado como “branco”.

6.3.9 Colocar 100 µL de plasma diluído com auxílio da pipeta de 300 µL, conforme item 6.3.5, em cada poço identificado como amostra do paciente.

6.3.10 Cobrir a placa com papel alumínio novamente, colocar na geladeira a 4°C e deixar incubar por no mínimo 12 horas.

6.4 3º Dia – Revelação da Placa

6.4.1 Diluir 5 µL do anticorpo secundário da marca Sigma Aldrich (anti FC humano) ligado a enzima fosfatase alcalina em 10 mL tampão de amostra medido em proveta de 10 mL formando a solução tampão de revelação.

6.4.2 Descartar as amostras que se encontram na placa por inversão em recipiente específico para lixo químico.

6.4.3 Fazer o procedimento de lavagem conforme descrito anteriormente no item 6.3.7.

6.4.4 Com auxílio da pipeta multicanal regulável colocar 100 µL de solução tampão de revelação em cada poço da placa.

6.4.5 Cobrir a placa com papel alumínio e incubar por 3 horas à 37°C em incubadora do tipo banho maria (Benfer).

6.4.6 30 minutos antes do final das 3 horas de incubação, diluir 1 comprimido dourado e 1 comprimido prateado da SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl em 20 mL de água destilada medida em proveta de 20 mL que formarão o substrato enzimático da enzima fosfatase alcalina ligada ao anticorpo secundário.

Nota: Diluição a ser feita em tubo Falcon de 50 mL recoberto com papel alumínio para proteção da solução de substrato da luz.

6.4.7 Agitar manualmente por 5 minutos o tubo Falcon de 50 mL até a completa diluição dos comprimidos.

6.4.8 Após finalizar o período de incubação da placa, descartar conteúdo em recipiente próprio para produtos químicos.

Nota: Tal cuidado no descarte é necessário devido à azida contida no tampão de amostra.

6.4.9 Fazer procedimento de lavagem da placa conforme descrito anteriormente no item 6.3.7.

6.4.10 Com auxílio da pipeta multicanal regulável colocar 100 µL da solução de substrato produzido conforme item 6.4.6 em cada poço da placa, em um ambiente protegido da luz.

6.4.11 Cobrir a placa com papel alumínio (ainda em ambiente protegido da luz) e deixar incubando por 40 minutos em temperatura ambiente.

6.4.12 Após o período de incubação, colocar, com auxílio da pipeta multicanal, 50 µL da solução de interrupção de reação (3N NaOH) produzida conforme **IO-004-CC** em cada poço da placa.

6.4.13 Cobrir a placa com papel alumínio novamente e deixar em agitação de 50 RPM em agitador de microplacas por 5 minutos.

6.4.14 Realizar leitura da densidade óptica em leitor de microplaca com filtro de 405 nm, conforme **POP-2018-002-CC – Leitor de ELISA**.

6.4.15 Imprimir relatório de resultados e registrá-los na base de dados no computador do laboratório.

6.4.16 Após leitura e registro de resultados, descartar material em recipiente apropriado para lixo biológico.

7. ANEXOS: Pág. 7 e 8.

8. CONTROLE E DISTRIBUIÇÃO: Este documento será impresso em uma via controlada, que será guardada no laboratório Nave's da Universidade Federal de Minas Gerais. Não são permitidas cópias não controladas deste POP.

9. RESPONSÁVEL PELA IMPLANTAÇÃO: Raíssa Lima

10.4. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO E CONDUÇÃO DO ENSAIO DE ABSORÇÃO IMUNOENZIMÁTICO COMPETITIVO

1. OBJETIVO: Padronizar o procedimento de preparação e condução do ensaio de absorção imunoenzimático competitivo

2. APLICAÇÃO: Ensaio de absorção imunoenzimático competitivo para detecção da ligação entre anticorpos anticocaína e cocaína/metabolitos para construir a curva dose resposta

3. REFERÊNCIAS:

POP-2018-001-CC - Ensaio imunoenzimático

POP-2018-002-CC - Leitor de ELISA

IO-000-CC - Solução PBS

IO-001-CC - Solução Tampão de Lavagem

IO-002-CC - Solução Tampão de Amostra

IO-003-CC - Solução Tampão de Fixação

IO-004-CC - Solução Tampão de Interrupção de Reação

IO-005-CC - Peptídeo de cocaína a 2 mg/mL

FETISSOV, Sergueï O. Neuropeptide autoantibodies assay. In: **Neuropeptides**. Humana Press, 2011. p. 295-302.

4. SIGLAS E ABREVIATURAS:

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

NaOH – Hidróxido de Sódio

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IO – Instrução Operacional

µL – Microlitros

ml – mililitros

nm – Nanômetro

3N – 3 Normal

BSA – Albumina Soro Bovina

POP – Procedimento Operacional Padrão

RPM – Rotação por minuto

PBS – Tampão fosfato-salino

5. MATERIAIS:

5.1 Reagentes: tampão de amostra produzido conforme **IO-002-CC**, tampão de lavagem produzido conforme **IO-001-CC**, tampão de fixação produzido conforme **IO-003-CC**, tampão de interrupção de reação produzido conforme **IO-004-CC**, alíquota de 10 µL de Peptídeo de cocaína produzido conforme **IO-005-CC**, Metabólitos da cocaína (benzoilecgonina, ecgonina, norcocaína), anticorpo secundário ligado à enzima Fosfatase Alcalina da marca Sigma Aldrich dirigido contra a Imunoglobulina e à espécie específica (ex. A8542 Anti-Human IgG (Fab specific) e A2490 Anti-Human IgM (µ-chain specific), substrato SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl, 50 mL de água destilada, amostras de sangue colhidas sem anticoagulante e separadas em soro.

5.2 Vidrarias e outros utensílios: placa com 96 poços de 1 mL (MicroWell™ MaxiSorp™), papel alumínio, papel toalha, papel pardo, par de luvas, caneta marcador permanente, banho de gelo, pipeta regulável de 200 microlitros (Eppendorf), 3 caixas de ponteiros de pipeta 200 microlitros (Eppendorf), pipeta Multicanal de 300 microlitros por canal (Eppendorf), pipeta de 1000 microlitros (Eppendorf), pipeta regulável de 20 microlitros (Eppendorf), 1 caixa de ponteiros de 1000 microlitros (Eppendorf), Proveta de 10 e 20 mL, Rack para micro-tubos eppendorf de 2,0 mL caixa para descarte de agulhas e material contaminado, folha de controle de placas/amostras, micro-tubos eppendorf de 2,0 mL, 1 Tubo do tipo Falcon de 15 mL, 1 Tubo do tipo Falcon de 50 mL.

5.3 Equipamentos: autoclave, agitador do tipo vortex Genie 2T (Scientific industries, United States), incubadora do tipo banho maria (Benfer, Brasil), agitador orbital de microplacas Kline (Labor import, Brasil), leitor de microplacas multidetector VICTOR™ X4 ajustado para filtro de 405 nm (ParkerElmer, USA).

6. PROCEDIMENTO:

6.1 Embalar em papel pardo e autoclavar a 120^o C por 15 minutos os seguintes materiais: 3 caixas de ponteiros de pipeta 200 microlitros, 1 caixa de ponteiros de 1000 microlitros, Micro-Tubos eppendorf de 2,0 mL.

6.2 1º Dia – Fixação do Peptídeo na Placa

6.2.1 Dissolver uma alíquota de 10 µL do peptídeo de cocaína ou 7µg de GNE-BSA em 10 mL do tampão de fixação medido em proveta de 10 mL e transferido para tubo falcon de 15 mL formando a solução de fixação.

OBS: Se utilizar GNE-BSA na fixação é necessário adicionar 1% de BSA no tampão de amostras

6.2.2 Com a pipeta multicanal, colocar 100 µL de solução de fixação em cada poço da placa de ELISA.

6.2.3 Cobrir a placa com papel alumínio, identificar com nome e data, colocar na geladeira a 4°C e deixar incubar por no mínimo 12 horas

Notas: A saturação máxima de ligação do peptídeo de cocaína no fundo do poço da placa ocorre após 48 horas

As placas podem ser armazenadas a 4°C durante no máximo uma semana.

6.3 2º Dia – Diluição e incubação do soro

6.3.1 Fazer a programação da placa a ser usada, na folha de protocolo do ELISA (folha de posicionamento das amostras na placa anexada neste documento), anotando a posição dos brancos, poços onde não irão receber as amostras diluídas (3 vezes), das amostras (3 vezes), peptídeos, anticorpos e as diluições utilizadas.

6.3.2 Retirar uma alíquota (10 µL) de cada amostra de soro e deixar descongelar dentro do gelo em uma caixa de isopor sob a bancada.

6.3.3 Para cada amostra, identificar tubos de eppendorf de 2 mL, conforme identificação já existente na amostra.

6.3.4 Colocar 2000 µL do tampão de amostra com auxílio da pipeta regulatória de 1000 µL em cada micro-tubo eppendorf de 2 mL.

6.3.5 Pesar 10mg de cocaína e metabólitos e diluir cada um em 1 ml de tampão de amostra em eppendorfs (separados para cada um) para formar a diluição 10^{-2}

6.3.6 Fazer a diluição seriada da cocaína e metabólitos a partir da 10^{-2} , tirando 10 ul da solução de 10^{-2} e colocando em 990 ul de tampão de amostra para formar 10^{-4} . Fazer 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} até 10^{-12}

6.3.7 Pegar 10 μL da amostra que foi previamente descongelada em gelo e colocar em tubo eppendorf com 2 mL de tampão de amostra (formando uma diluição de 1/200).

6.3.8 Em outro tubo eppendorf, juntar o soro diluído 1/200 nas diluições da cocaína e metabolitos na proporção 1:1

6.3.9 Agitar em agitador do tipo vortex em rotação de 1.600 RPM por 30 segundos e colocar no gelo em caixa de isopor sobre um agitador de placas e deixar incubando por duas horas.

6.3.10 Após incubação de duas horas, retirar o papel alumínio da placa que se encontra em geladeira (vide item 6.2.3) e descartar o material que se encontra na placa por inversão desta em recipiente apropriado. Colocar 100 μL de tampão de lavagem em cada poço com auxílio da pipeta multicanal, agitar levemente manualmente por 1 minuto e descartar. Repetir a operação com tampão de lavagem por três vezes. Após a terceira vez bater delicadamente a placa invertida em papel toalha para retirar o excesso do tampão.

6.3.11 Colocar 100 μL de tampão de amostra com auxílio da pipeta de 300 μL em cada poço identificado como “branco”.

6.3.12 Colocar 100 μL do soro diluído com auxílio da pipeta de 300 μL , conforme item 6.3.5, em cada poço identificado como amostra do paciente.

6.3.13 Colocar 200 μL da solução de soro diluído junto com as demais diluições da cocaína e metabolitos em triplicata nos poços da placa

6.3.10 Cobrir a placa com papel alumínio novamente, colocar na geladeira a 4°C e deixar incubar por no mínimo 12 horas.

6.4 3º Dia – Revelação da Placa

6.4.1 Diluir 5 μL do anticorpo secundário da marca Sigma Aldrich (anti FC humano) ligado a enzima fosfatase alcalina em 10 mL tampão de amostra medido em proveta de 10 mL formando a solução tampão de revelação.

6.4.2 Descartar as amostras que se encontram na placa por inversão em recipiente específico para lixo químico.

6.4.3 Fazer o procedimento de lavagem conforme descrito anteriormente no item 6.3.7.

6.4.4 Com auxílio da pipeta multicanal regulável colocar 100 µL de solução tampão de revelação em cada poço da placa.

6.4.5 Cobrir a placa com papel alumínio e incubar por 3 horas à 37°C em incubadora do tipo banho maria (Benfer).

6.4.6 30 minutos antes do final das 3 horas de incubação, diluir 1 comprimido dourado e 1 comprimido prateado da SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl em 20 mL de água destilada medida em proveta de 20 mL que formarão o substrato enzimático da enzima fosfatase alcalina ligada ao anticorpo secundário.

Nota: Diluição a ser feita em tubo Falcon de 50 mL recoberto com papel alumínio para proteção da solução de substrato da luz.

6.4.7 Agitar manualmente por 5 minutos o tubo Falcon de 50 mL até a completa diluição dos comprimidos.

6.4.8 Após finalizar o período de incubação da placa, descartar conteúdo em recipiente próprio para produtos químicos.

Nota: Tal cuidado no descarte é necessário devido à azida contida no tampão de amostra.

6.4.9 Fazer procedimento de lavagem da placa conforme descrito anteriormente no item 6.3.7.

6.4.10 Com auxílio da pipeta multicanal regulável colocar 100 µL da solução de substrato produzido conforme item 6.4.6 em cada poço da placa, em um ambiente protegido da luz.

6.4.11 Cobrir a placa com papel alumínio (ainda em ambiente protegido da luz) e deixar incubando por 40 minutos em temperatura ambiente.

6.4.12 Após o período de incubação, colocar, com auxílio da pipeta multicanal, 50 µL da solução de interrupção de reação (3N NaOH) produzida conforme **IO-004-CC** em cada poço da placa.

6.4.13 Cobrir a placa com papel alumínio novamente e deixar em agitação de 50 RPM em agitador de microplacas por 5 minutos.

6.4.14 Realizar leitura da densidade óptica em leitor de microplaca com filtro de 405 nm, conforme **POP-2018-002-CC – Leitor de ELISA**.

6.4.15 Imprimir relatório de resultados e registrá-los na base de dados no computador do laboratório.

6.4.16 Após leitura e registro de resultados, descartar material em recipiente apropriado para lixo biológico.

7. ANEXOS: Pág. 7 e 8.

8. CONTROLE E DISTRIBUIÇÃO: Este documento será impresso em uma via controlada, que será guardada no laboratório Nave's da Universidade Federal de Minas Gerais. Não são permitidas cópias não controladas deste POP.

9. RESPONSÁVEL PELA IMPLANTAÇÃO: Raíssa Lima

10 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V (2012) *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Andreasson, U., Perret-Liaudet, A., van Waalwijk van Doorn, L. J., Blennow, K., Chiasserini, D., Engelborghs, S., ... & Kulic, L. (2015). A practical guide to immunoassay method validation. *Frontiers in neurology*, 6, 179.

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.

Bagasral, O., Forman, L. J., Howeedy, A., & Whittle, P. (1992). A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis. *Immunopharmacology*, 23(3), 173-179.

Bender, L.A; Von Mühlen, C.A. (2018) *Testes Laboratoriais. Aplicados à Imunologia Clínica. Testes sorológicos ou imunoensaios. Capítulo 5*

Bottini, P. V., Alves-Cunha, F. A., Moda, M. A., Souza, M. I., & Garlipp, C. R. (1998). Monitoramento dos níveis de ciclosporina em sangue total em transplantes renais. *Revista da Associação Médica Brasileira*.

Brasil Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - julho, 2017.

Bremer, P. T., & Janda, K. D. (2017). Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder. *Pharmacological reviews*, 69(3), 298-315

Bremer, P. T., Schlosburg, J. E., Lively, J. M., & Janda, K. D. (2014). Injection route and TLR9 agonist addition significantly impact heroin vaccine efficacy. *Molecular pharmaceuticals*, 11(3), 1075-1080.

Brito, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13.

Cai, X., Tsuchikama, K., & Janda, K. D. (2013). Modulating cocaine vaccine potency through hapten fluorination. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), 2971-2974.

Cai, X., Whitfield, T., Hixon, M. S., Grant, Y., Koob, G. F., & Janda, K. D. (2013). Probing active cocaine vaccination performance through catalytic and noncatalytic hapten design. *Journal of medicinal chemistry*, 56(9), 3701-3709.

Carrera, M. R. A., Ashley, J. A., Parsons, L. H., Wirsching, P., Koob, G. F., & Janda, K. D. (1995). Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature*, 378(6558), 727.

Carrera, M. R. A., Ashley, J. A., Wirsching, P., Koob, G. F., & Janda, K. D. (2001). A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1988-1992.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS. (2012). *II Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira*. São Paulo: CEBRID.

Collins KC, Schlosburg JE, Bremer PT, and Janda KD (2016) Methamphetamine vaccines: improvement through hapten design. *J Med Chem* 59:3878–3885.

Crowther, J. R. (2001). *The ELISA guidebook* (Vol. 149). Springer Science & Business Media.

Currie, L. A., & Svehla, G. Y. U. L. A. (1994). Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and applied chemistry*, 66(3), 595-608.

Da Poian, A; Foguel, D; Petretski, D; Machado, O; Abreu-Fialho, A. (2010) Bioquímica I. *Fundação CECIRJ*, v.2. 5 edições p. 177-180.

De Giovanni, N., & Marchetti, D. (2012). Cocaine and its metabolites in the placenta: a systematic review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 33(1), 1-14.

De Souza, G.B; Sobrinho, M.R.; Boza, Y. (2016) Validação de métodos para análise de alimentos: enfoque em análise centesimal. *REMESP*, 1. ed. – São Paulo.

Deelder, A. M. & Streefkerk, J. G. (1975). *Experimental parasitology*, 37: 405

Elshal, M. F., & McCoy, J. P. (2006). Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), 317-323.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.

Evans, S. M., Foltin, R. W., Hicks, M. J., Rosenberg, J. B., De, B. P., Janda, K. D., ... & Crystal, R. G. (2016). Efficacy of an adenovirus-based anti-cocaine vaccine to reduce cocaine self-administration and reacquisition using a choice procedure in rhesus macaques. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 150, 76-86.

Escritório Das Nações Unidas Sobre Drogas e Crime. (2012). Relatório Mundial sobre as Drogas. Recuperado em 20 abril, 2013, do <http://www.unodc.org/unodc/index.html>.

Ettinger, R. H., Ettinger, W. F., & Harless, W. E. (1997). Active immunization with cocaine-protein conjugate attenuates cocaine effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1), 215-220.

Fernandes I, Espíndola NM. Imunodiagnóstico: antígeno, anticorpo e interação antígeno-anticorpo (2012) In: Vaz AJ, Takei K, Bueno EC, editors. Imunoensaios fundamentos e aplicações, p.7-23. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Fetissov, S. O. (2011). Neuropeptide autoantibodies assay. In *Neuropeptides* (pp. 295-302). Humana Press.

Findlay, J. W. A., Smith, W. C., Lee, J. W., Nordblom, G. D., Das, I., DeSilva, B. S., ... & Bowsher, R. R. (2000). Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 21(6), 1249-1273.

Fox, B. S., Kantak, K. M., Edwards, M. A., Black, K. M., Bollinger, B. K., Botka, A. J., ... & Gefter, M. L. (1996). Efficacy of a therapeutic cocaine vaccine in rodent models. *Nature medicine*, 2(10), 1129.

Gallacher, S. J., Deighan, C., Wallace, A. M., Cowan, R. A., Fraser, W. D., Fenner, J. A. K., ... & Boyle, I. T. (1994). Association of severe haemophilia A with osteoporosis: a densitometric and biochemical study. *QJM: An International Journal of Medicine*, 87(3), 181-186.

Galo, A. L., & Colombo, M. F. (2009). Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, 488-492.

Garcia, F. Pesquisa Conhecer e Cuidar 2015. (2016). Journal Article. Imprensa Universitária UFMG, Belo Horizonte.

Golde, W. T., Gollobin, P., & Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab animal*, 34(9), 39.

Grangeiro Junior, S., Galindo Bedor, D. C., Soares Sobrinho, J. L., Strattmann, R., Rolim Neto, P. J., & Albuquerque, M. M. (2004). Validação da metodologia

analítica de comprimido à base de nevirapina. *Controle de Contaminação, São Paulo*, (65), 24-28.

Haney, M., Gunderson, E. W., Jiang, H., Collins, E. D., & Foltin, R. W. (2010). Cocaine-specific antibodies blunt the subjective effects of smoked cocaine in humans. *Biological psychiatry*, 67(1), 59-65.

Hatsukami, D. K., Jorenby, D. E., Gonzales, D., Rigotti, N. A., Glover, E. D., Oncken, C. A., ... & Kessler, P. D. (2011). Immunogenicity and smoking-cessation outcomes for a novel nicotine immunotherapeutic. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(3), 392-399.

Hicks, M. J., De Bishnu, P., Rosenberg, J. B., Davidson, J. T., Moreno, A. Y., Janda, K. D., ... & Worgall, S. (2011). Cocaine analog coupled to disrupted adenovirus: a vaccine strategy to evoke high-titer immunity against addictive drugs. *Molecular Therapy*, 19(3), 612-619.

Hicks, M. J., Kaminsky, S. M., De, B. P., Rosenberg, J. B., Evans, S. M., Foltin, R. W., ... & Ricart Arbona, R. J. (2014). Fate of systemically administered cocaine in nonhuman primates treated with the dAd5GNE anticocaine vaccine. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 25(1), 40-49.

Hirata, RDC, Hirata MH. Biologia molecular aplicada aos imunoensaios (antígenos recombinantes). (2012) In: Vaz AJ, Takei K, Bueno EC, editors. Imunoensaios fundamentos e aplicações, p.24-38, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Hoff, J. (2000). Methods of blood collection in the mouse.

ICH International Conference on Harmonisation: Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) .

Inmetro (2011) Instituto Nacional de Metrologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de carácter orientativo. DOQ – CGCRE - 008. Revisão 04 de julho de 2011. 19 p.

Iyer, S., HogenEsch, H., & Hem, S. L. (2003). Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine*, 21(11-12), 1219-1223.

Janeway, C.A. Walport, P.T.M. Shlomchik, M.(2005). *Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença*. 5ª edição, p.645-647.

Kantak, K. M., Collins, S. L., Lipman, E. G., Bond, J., Giovanoni, K., & Fox, B. S. (2000). Evaluation of anti-cocaine antibodies and a cocaine vaccine in a rat self-administration model. *Psychopharmacology*, 148(3), 251-262.

Karila, L., Reynaud, M., Aubin, H. J., Rolland, B., Guardia, D., Cottencin, O., & Benyamina, A. (2011). Pharmacological treatments for cocaine dependence: is there something new. *Current pharmaceutical design*, 17(14), 1359-1368.

Kato, K., HAMAGUCHI, Y., OKAWA, S., ISHIKAWA, E., KOBAYASHI, K., & KATUNUMA, N. (1977). Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *The Journal of Biochemistry*, 82(1), 261-266.

Kellar, K. L., & Oliver, K. G. (2004). Multiplexed microsphere assays for protein and DNA binding reactions. In *Methods in cell biology* (Vol. 75, pp. 409-429). Academic Press.

Kenney, J. S., Hughes, B. W., Masada, M. P., & Allison, A. C. (1989). Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *Journal of immunological methods*, 121(2), 157-166.

Kenny, G. E., & Dunsmoor, C. L. (1983). Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology*, 17(4), 655-665.

Kimishima, A., Olson, M. E., Natori, Y., & Janda, K. D. (2018). Efficient Syntheses of Cocaine Vaccines and Their in Vivo Evaluation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(5), 411-416.

Kinsey, B. M., Kosten, T. R., & Orson, F. M. (2010). Anti-cocaine vaccine development. *Expert review of vaccines*, 9(9), 1109-1114.

Koetzner, L., Deng, S., Sumpter, T. L., Weisslitz, M., Abner, R. T., Landry, D. W., & Woods, J. H. (2001). Titer-dependent antagonism of cocaine following active immunization in rhesus monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(3), 789-796.

Koob, G., J Hicks, M., Wee, S., B Rosenberg, J., P De, B., M Kaminsky, S., ... & G Crystal, R. (2011). Anti-cocaine vaccine based on coupling a cocaine analog to a disrupted adenovirus. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 10(8), 899-904.

Kosten, T. R., Domingo, C. B., Shorter, D., Orson, F., Green, C., Somoza, E., ... & Tompkins, D. A. (2014). Vaccine for cocaine dependence: a randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial. *Drug and alcohol dependence*, 140, 42-47.

Kosten, T. R., Rosen, M., Bond, J., Settles, M., Roberts, J. S. C., Shields, J., ... & Fox, B. (2002). Human therapeutic cocaine vaccine: safety and immunogenicity. *Vaccine*, 20(7-8), 1196-1204.

Larsen, N. A., Zhou, B., Heine, A., Wirsching, P., Janda, K. D., & Wilson, I. A. (2001). Crystal structure of a cocaine-binding antibody. *Journal of molecular biology*, 311(1), 9-15.

Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. (2005), ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *Journal of Gerontology. Medical Sciences* 2008; 63: 879-884.

Loftis, J. M., & Huckans, M. (2013). Substance use disorders: psychoneuroimmunological mechanisms and new targets for therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 139(2), 289-300.

Magnusson, B. (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics.

Maoz, A., Hicks, M. J., Vallabhjiosula, S., Synan, M., Kothari, P. J., Dyke, J. P., ... & Martinez, D. (2013). Adenovirus capsid-based anti-cocaine vaccine prevents cocaine from binding to the nonhuman primate CNS dopamine transporter. *Neuropsychopharmacology*, 38(11), 2170.

McDowall, R. D. (1999). The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Analytica chimica acta*, 391(2), 149-158.

McKee, A. S., & Marrack, P. (2017). Old and new adjuvants. *Current opinion in immunology*, 47, 44-51.

Moncada, C., Torres, V., & Israel, Y. (1993). Simple method for the preparation of antigen emulsions for immunization. *Journal of immunological methods*, 162(1), 133-140.

Moreno, A. Y., & Janda, K. D. (2009). Immunopharmacotherapy: vaccination strategies as a treatment for drug abuse and dependence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(2), 199-205.

Neto, L.S. *Desenvolvimento de Substâncias Imunogênicas para o Tratamento de Dependentes Químicos da Cocaína*. Orientador: Prof. Dr. Ângelo de Fátima. Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Duarte Garcia. 2017. Tese (Doutorado em Química – Química Orgânica) – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Belo Horizonte, 2017.

Norman, A. B., Norman, M. K., Buesing, W. R., Tabet, M. R., Tsibulsky, V. L., & Ball, W. J. (2009). The effect of a chimeric human/murine anti-cocaine

monoclonal antibody on cocaine self-administration in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 873-881.

Olivares, I. R. B. *Gestão de Qualidade em Laboratórios*.(2016).3.ed,p.160. Campinas: Átomo .

Olivares, I. R. B., & Lopes, F. A. (2012). Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 109-121.

Orson, F. M., Kinsey, B. M., Singh, R. A., Wu, Y., & Kosten, T. R. (2009). Vaccines for cocaine abuse. *Human vaccines*, 5(4), 194-199.

Orson, F. M., Rossen, R. D., Shen, X., Lopez, A. Y., Wu, Y., & Kosten, T. R. (2013). Spontaneous development of IgM anti-cocaine antibodies in habitual cocaine users: effect on IgG antibody responses to a cocaine cholera toxin B conjugate vaccine. *The American journal on addictions*, 22(2), 169-174.

Pinto, T. D. J. A., Ferrarini, M., & Gatti, R. M. (2003). Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. *Farmácia e Química*, 36(1), 26-36.

Porstmann, T., & Kiessig, S. T. (1992). Enzyme immunoassay techniques an overview. *Journal of immunological methods*, 150(1-2), 5-21.

Prichard, E., & Barwick, V. (2007). *Quality assurance in analytical chemistry* (Vol. 25). John Wiley & Sons.

Salgado, H., Michelin, D., & Chorilli, M. (2007). Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, 28(1)

Schatzmayr, H. G. (2003). Novas perspectivas em vacinas virais. *Hist. ciênc. saúde-Manguinhos*, 10(supl. 2), 655-669.

Scheibner, V. (2000). Adverse effects of adjuvants in vaccines.

Schlosburg, J. E., Banks, M. L., Steele, F. F., Zhou, B., Poklis, J. L., & Janda, K. D. Development of a clinically viable heroin vaccine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 139, n. 25, p. 8601-8611, 2017.

Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2006). The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 78(1), 145-196.

United States Pharmacopeia. (2000) .Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention 24.ed. p.2149-63.

Vander Heyden, Y., Jimidar, M., Hund, E., Niemeijer, N., Peeters, R., Smeyers-Verbeke, J. & Hoogmartens, J. (1999). Determination of system suitability limits with a robustness test. *Journal of Chromatography A*, 845(1-2), 145-154.

Vaz, AJ. Imunoensaios utilizando conjugados. (2012). In: Vaz AJ, Takei K, Bueno EC, editors. Imunoensaios fundamentos e aplicações, p.67-83. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Vignali, D. A. (2000). Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), 243-255.

Voller, A., Bidwell, D., & Bartett, A. (1980). Microplate ELISA and its application. *The Hagne. Immuno enzymatic assay technique. Martinus Nijhoff. Publ*, 104-115.

Wee, S., Hicks, M. J., De Bishnu, P., Rosenberg, J. B., Moreno, A. Y., Kaminsky, S. M., ... & Koob, G. F. (2012). Novel cocaine vaccine linked to a disrupted adenovirus gene transfer vector blocks cocaine psychostimulant and reinforcing effects. *Neuropsychopharmacology*, 37(5), 1083.

Wenthur, C. J., Cai, X., Ellis, B. A., & Janda, K. D. (2017). Augmenting the efficacy of anti-cocaine catalytic antibodies through chimeric hapten design and combinatorial vaccination. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(16), 3666-3668.

Wetzel, H. N., Webster, R. P., Saeed, F. O., Kirley, T. L., Ball, W. J., & Norman, A. B. (2017). Characterization of a recombinant humanized anti-cocaine monoclonal antibody produced from multiple clones for the selection of a master cell bank candidate. *Biochemical and biophysical research communications*, 487(3), 690-694.

Yorde, D. E., Sasse, E. A., Wang, T. Y., Husa, R. O., & Garancis, J. C. (1976). Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clinical chemistry*, 22(8), 1372-1377