



Desafios na técnica de imunodifusão: Um estudo sobre a eficácia dos anticorpos IgY

Challenges in the immunodiffusion technique: A study on the efficacy of IgY antibodies

Ana Paula Schneiders Dani¹, Yuri Kauan Zulkowski², Victor Gabriel de Faria Pastre³,
Matheus Luquirini Penteado dos Santos⁴, Flavia Regina Oliveira de Barros⁵

RESUMO

A imunodifusão é uma técnica imunológica essencial na pesquisa biomédica, permitindo a detecção de substâncias específicas em amostras por meio da formação de complexos antígeno-anticorpo. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia dos anticorpos IgY isolados de gema de ovo, por meio de testes de imunodifusão. Os testes envolveram placas de Petri com diferentes concentrações de gel de agarose (1 ou 2%) e três orifícios contendo diferentes quantidades de reagentes (IgY e IgG, nas concentrações de 50 ou 150 µL), além do controle (PBS). A incubação das placas ocorreu ao longo de 48 horas. Após o período de incubação, não foi possível observar a formação da linha de precipitação, que seria indicativa da interação entre o anticorpo e o antígeno. Várias hipóteses foram consideradas para explicar essa ausência de especificidade, incluindo a possível presença de contaminantes devido ao armazenamento prolongado dos anticorpos. Para esclarecer essa falta de especificidade, sugere-se a repetição da análise utilizando outra metodologia como ensaio ELISA ou após a purificação por afinidade do anticorpo. Esse estudo ressalta os desafios da imunodifusão e destaca a importância de abordagens complementares para validar os resultados, enfatizando a necessidade contínua de aprimorar essa técnica tradicional em pesquisas futuras.

PALAVRAS-CHAVE: anticorpo, imunodifusão, imunologia.

ABSTRACT

Immunodiffusion is an essential immunological technique in biomedical research, allowing the detection of specific substances in samples through the formation of antigen-antibody complexes. This study evaluated the effectiveness of IgY antibodies isolated from egg yolk through immunodiffusion tests. The tests involved Petri dishes with different concentrations of agarose gel (1 or 2%) and three holes containing different amounts of reagents (IgY and IgG, at concentrations of 50 or 150 µL) in addition to the control (PBS). The plates were incubated for 48 hours. After the incubation period, it was impossible to observe the formation of the precipitation line, which would indicate the interaction between the antibody and the antigen. Several hypotheses were considered to explain this lack of specificity, including the possible presence of contaminants due to prolonged storage of the antibodies. To clarify this lack of specificity, we suggest repeating the analysis using another methodology, such as ELISA assay or after antibody affinity purification. This study highlights the challenges of immunodiffusion and the importance of complementary approaches to validate results, emphasizing the continued need to improve this traditional technique in future research.

KEYWORDS: antibody, immunodiffusion, immunology.

¹Bolsista do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: anapaulasdani@gmail.com. ID Lattes: 7397734275739243.

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: yurizulkowski@gmail.com. ID Lattes: 4552161240912969.

³Doutorando em Fisiopatologia Médica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. E-mail: victorfpastre@gmail.com. ID Lattes: 9808897914695722

⁴Doutorando em Biologia Geral e Aplicada. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: matheus.luquirini@unesp.br. ID Lattes: 2609304493861186

⁵Docente no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: flaviabarros@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5232976682216683.



INTRODUÇÃO

A imunodifusão, uma técnica imunológica clássica, tem sido uma ferramenta indispensável na pesquisa biomédica e diagnóstica por décadas. Esta técnica baseia-se no princípio fundamental da formação de complexos antígeno-anticorpos que, quando visualizados, fornecem informações cruciais sobre a presença de substâncias específicas em uma amostra. Amplamente utilizada tanto em estudos laboratoriais quanto clínicos, a imunodifusão oferece uma variedade de aplicações que abrangem desde a avaliação de concentrações de proteínas e detecção de antígenos até a produção de anticorpos e diagnóstico de doenças. Portanto, a imunodifusão é uma técnica qualitativa e com um ótimo custo benefício, visto que possui alta especificidade, praticidade e baixo custo, principalmente quando comparado a um teste de ELISA (NASCIMENTO et al., 2014; MARTINS, 2004).

Ademais, um resultado positivo em um teste de imunodifusão é caracterizado pela formação de uma linha de precipitação claramente visível entre os poços contendo as amostras, indicativo visual da interação entre um anticorpo específico e seu antígeno correspondente. Se o antígeno estiver presente na amostra, ele se ligará aos anticorpos no gel, formando um complexo antígeno-anticorpo. À medida que o complexo antígeno-anticorpo se acumula, ele se precipita em uma linha característica na placa, criando uma "linha de precipitação" (FERREIRA et al., 1996).

Nesse contexto, o objetivo principal deste estudo foi conduzir testes de imunodifusão com o propósito de avaliar a eficácia e especificidade de anticorpos. Essa pesquisa visa contribuir para um estudo principal sobre a produção de anticorpos policlonais do tipo IgY obtidos a partir da purificação da gema do ovo de galinhas matrizes.

MÉTODOS E MATERIAIS

Para testar a especificidade antígeno-anticorpo das IgY isoladas de gema de ovo em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, um teste piloto de imunodifusão radial foi conduzido, adaptando a metodologia de Magalhães *et al.* (2019), utilizando IgY dialisada, IgG de coelho (usada como antígeno na produção da IgY) e PBS como controle negativo. Uma placa de Petri e gel de agarose a 1% (m/v) foi empregada. Os furos foram realizados com um molde, com uma distância de 2 cm entre eles e 50 µL de cada reagente, juntamente com o controle negativo, foram adicionados aos respectivos poços, tendo o IgY no centro. A placa foi então incubada por 48h quando os resultados foram então registrados.

Como mostrado nos resultados a seguir, não foi observada a formação de uma linha de precipitação com formação de complexos antígeno-anticorpo. Assim, com o intuito de verificar se foi observada uma falha de condução da técnica de imunodifusão ou se, de fato, a IgY obtida não apresenta especificidade para o antígeno testado, foram conduzidos mais quatro testes de imunodifusão. Esses testes ocorreram em placas de Petri, utilizando diferentes concentrações de gel de agarose, 1 ou 2%. Após a gelificação, os furos foram feitos da mesma forma que no teste piloto. Em seguida, adicionou-se 50 ou 150 µL de cada

reagente, juntamente com o controle negativo em seus respectivos poços. A placa foi incubada por 48h em temperatura ambiente.

Os detalhes relativos à concentração do gel de agarose e a quantidade de amostra utilizada em cada poço da técnica estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade do gel de agarose e de amostra utilizados para o teste

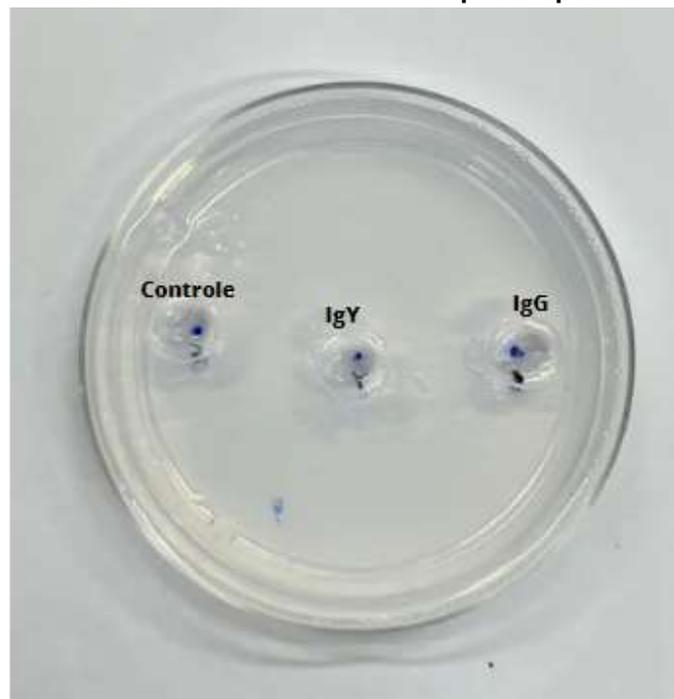
	1A	1B	2A	2B
Gel de agarose (%)	1%	1%	2%	2%
Amostras (μL)	50 μ L	150 μ L	50 μ L	150 μ L

Fonte: Autoria própria (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio piloto, após o período de incubação de 48 horas, não se observou a formação da linha de precipitação característica na formação de complexos antígeno (IgG de coelho) anticorpos (IgY teste), conforme demonstrado na Figura 1.

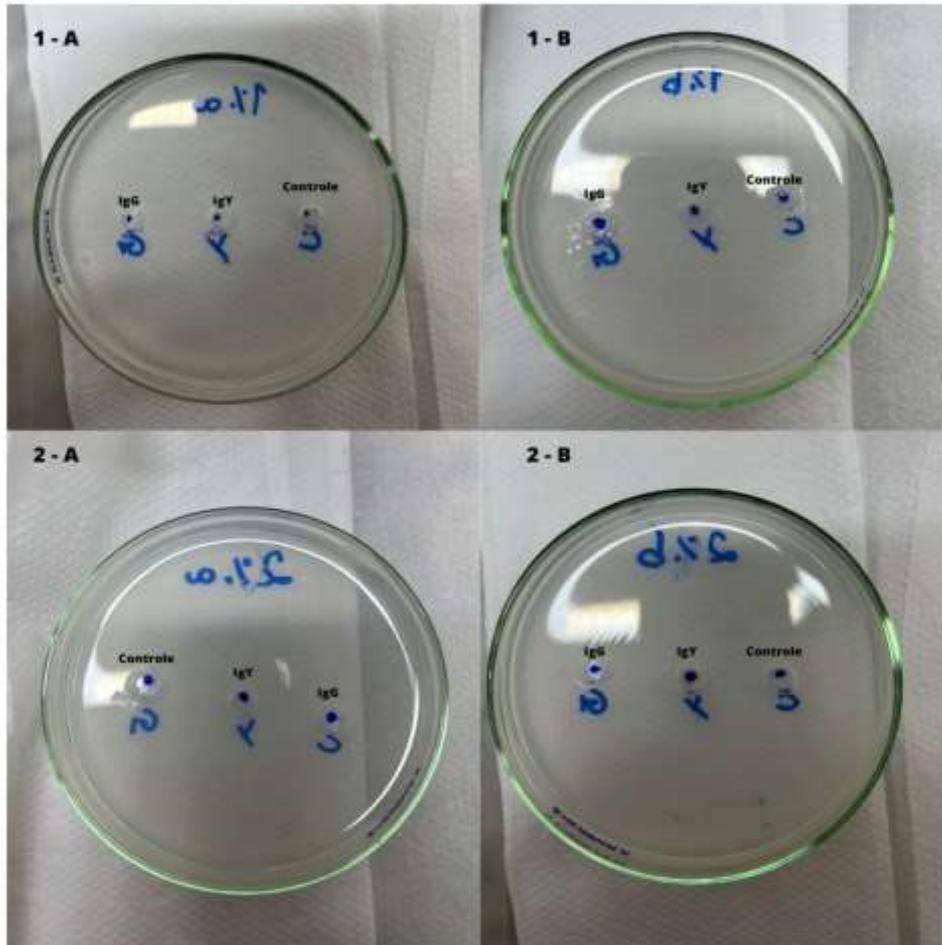
Figura 1 - Resultado do teste de imunodifusão piloto após 48h



Fonte: Autoria própria (2023).

Diante do resultado negativo na formação da linha de precipitação, prosseguimos com os testes subsequentes, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Resultado do teste de imunodifusão após 48h



Fonte: Autoria própria (2023).

Neste segundo teste, foram comparadas duas concentrações de agarose além de duas concentrações das soluções de IgG e IgY, o que não ofereceu resolução da ausência de observação de uma linha de precipitação. Novamente, não se evidenciou a formação da linha de precipitação que conectaria o poço central, contendo o anticorpo produzido, ao poço periférico contendo o antígeno utilizado. Portanto, não foi possível comprovar a especificidade do IgY em relação ao antígeno IgG de coelho (DE ARRUDA et al., 2011). Esses resultados sugerem que a IgY testada, no momento da realização do estudo, não apresenta especificidade ao antígeno teste. Diversas hipóteses foram levantadas para explicar este resultado. Uma delas sugere a possível presença de contaminantes devido ao longo tempo de armazenamento dos anticorpos IgY e IgG, uma vez que a análise de imunodifusão foi realizada em 2023, enquanto todas as outras etapas do estudo foram conduzidas em 2022, o que poderia afetar a concentração e a eficácia dos reagentes, assim como também o pH das soluções, interferindo na formação da linha de precipitação.



Outra possibilidade considerada foi a degradação das imunoglobulinas devido ao longo tempo de armazenamento.

Além das hipóteses mencionadas, é importante explorar outras abordagens para esclarecer a ausência da linha de precipitação na imunodifusão. Uma estratégia viável seria repetir a técnica após a purificação do anticorpo por meio da purificação por afinidade, pois essa etapa adicional pode auxiliar na remoção de contaminantes e aprimorar a especificidade e a eficiência da interação entre o anticorpo e o antígeno.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os testes de imunodifusão realizados não forneceram evidências conclusivas da ligação entre o anticorpo produzido e o antígeno utilizado. Essa falta de confirmação da especificidade levanta a necessidade de repetir a análise usando uma outra metodologia mais robusta ou após a realização da purificação por afinidade do anticorpo. Os desafios encontrados nesta pesquisa destacam a complexidade inerente à técnica de imunodifusão e ressaltam a importância de abordagens complementares para validar os resultados.

Agradecimentos

Agradeço o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio dado através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – PIBITI, ao Laboratório Multiusuário de Análises Biológicas e Biologia Molecular do Campus Dois Vizinhos – BioMol pela disponibilização de espaço e equipamentos e a doutoranda Julia Morgana Vieira Dada pela ajuda e apoio essenciais para realização do projeto.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

DE ARRUDA, E. T. et al. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira/Brazilian Animal Science**, v. 12, n. 3, p. 560-565, 2011.

FERREIRA, A.; WATTER, A.; SANDRA L.M. **Diagnóstico Laboratorial**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996, p. 78-82.



MAGALHÃES, S. et al. **Padronização De Um Teste De Imunodifusão Radial Para Quantificação De Anticorpos Bovinos E Seu Uso No Controle De Qualidade Do Soro Hiperimune Anti-IgG Bovino Produzido No IFMG Campus Bambuí.** VIII Seminário de Iniciação Científica, 2019.

MARTINS, M. F. **Comparação entre testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp90) no diagnóstico da anemia infecciosa Equina.** 2004. 44 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

NASCIMENTO, C. B. et al. Ferramentas diagnósticas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 9-15, 2014.