# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

# Desenvolvimento de técnicas de imunoensaio para a detecção

### de microcistina em amostras ambientais

Aluna: Fabyana Maria dos Anjos

Tese apresentada ao programa de pósgraduação em Farmácia - Análises Clínicas para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo Dez/2009 Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Anjos, Fabyana Maria dos Desenvolvimento de técnicas de imunoensaio para detecção de A599d microcistina em amostras ambientais / Fabyana Maria dos Anjos. -- São Paulo, 2009. 225p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Tese (doutorado) da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Pinto, Ernani 1. Peptídeo : Imunologia 2. Poluição ambiental : Toxicologia 3. Imunoensaio I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.37 CDD

Fabyana Maria dos Anjos

# Desenvolvimento de técnicas de imunoensaio para a detecção de microcistina em amostras ambientais

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Dr. Ernani Pinto Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, dezembro 2009.

"Os nossos problemas diminuem a medida em que aumentamos a confiança em nós mesmos" Dedico esta minha tese a todas as pessoas que são importantes em minha vida...

À Deus, por iluminar meus caminhos e por me dar força, coragem e serenidade ao longo desta trajetória...

Ao meu amado pai **Elias**, fonte de inspiração, pelos ensinamentos de vida e pelas duras palavras, as quais me tornaram mais madura. Seu carinho, honestidade e humildade me ensinaram a ser uma pessoa melhor, mas segura e independente...

À minha amada mãe **Luíza**, que mesmo à distância, acreditou na educação ensinada, me deu carinho e afeto nos momentos difíceis, sempre rezou por mim pedindo proteção...

À minha querida irmã **Lillian**, pelo incentivo e pelo jeito doce de ser, me ensinaram a ter paciência e acreditar que nada é por acaso. Agora é mãe da Ana Luiza, minha sobrinha tão esperada...

À minha querida avó **Maria Divina** (in memorian) que esteve presente nos meus últimos instantes em Goiânia, seu incentivo foi único. Ao meu querido amigo e orientador **Prof. Dr. Ernani Pinto**, pelo incentivo acadêmico, profissional e pessoal. Seus desafios me fizeram persistir em todas as etapas experimentais. Foi uma pessoa que me ensinou à nunca desistir perante os obstáculos e a ter paciência. Foi mais que um professor, foi um amigo que mostrou que pós-graduação não se resume só em fazer experimentos e escrever tese, mas também, em aprender a lidar com todas as pessoas à nossa volta.

À minha co-orientadora **Profa. Ass. Adelaide José Vaz**, pela ajuda nos protocolos e discussões dos resultados. Trabalha 24 horas, muito inteligente e simples. Agradeço também por ter sido muito bem recebida em seu laboratório, principalmente pelas suas alunas **Andréia e Cristiane**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por ter concedido uma bolsa de estudos, a qual possibilitou minha dedicação exclusiva na concretização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Kioko Takei**, pela paciência em todos os momentos de indecisão experimental. Foi uma professora fundamental para análise detalhada dos resultados. Sua perspicácia e experiência profissional foram fundamentais para a elaboração deste trabalho e padronização do ensaio enzimático.

Ao **Prof. Dr. Pio Colepícolo**, por ter sido muito importante nas etapas iniciais do meu projeto, por ter estado presente em minha banca de qualificação para doutorado direto, nos tempos em que meu orientador nem tinha laboratório ainda. Agradeço também à sua aluna **Dra. Karina H. M. Cardozo**, pelo exemplo de dedicação.

Ao meu colega **Filmon Solomon**, por ter sido muito prestativo e por te me apresentado ao meu futuro orientador em julho de 2005.

Ao aluno de mestrado do nosso grupo de pesquisa **Vinícius**, por te auxiliado na validação do método imunoenzimático, resultados e interpretações. À **Dra. Nodi Maria Espíndola**, pelas ajudas experimentais com relação à obtenção do anticorpo monoclonal. Agradeço também pela sua amizade, carinho e espírito esportivo.

À **Profa. Dra. Irene Fernandes** pelas dicas fundamentais em meu trabalho. Agradeço também por ter cedido gentilmente seu laboratório no Instituto Butantã nos períodos de final de ano.

A todos os **docentes do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas**, por terem sido exemplos de dedicação como pesquisadores. São professores comprometidos com o trabalho e que, de alguma forma atuaram como colaboradores em meu trabalho.

A todos os amigos do grupo de pesquisa do prof. Dr. Ernani Pinto: Fabiana Missau e Lidia (Pós-doc); Vania, Sidnei, Stella, Felipe, Vanessa, Mariah e Natalia (Doutorado); Vinícius, Bruna e Josiane (Mestrado); Ariane, Regiane e Bruno (Iniciação Científica) e aos ex-alunos Prof. Dr. Diogo O. Silva, Profa. Dra. Paula Kujbida, Sara, Raphael, Meron, Humberto e Maya; pelo companheirismo sempre presente.

A todos os **alunos no bloco 13B e 17**, por terem sido fundamentais para dar continuidade ao meu trabalho e que estiveram presentes nos momento de descontração.

À minha querida amiga **Jaqueline**, pelo incentivo e amizade verdadeiros. Apesar da distância, a sua amizade e carinho sempre foram renovadores.

À minha querida professora e amiga Eliana Riva Campelo, pela sua experiência de vida e por suas palavras ditas no momento certo. É uma pessoa que acredita em meu potencial e que me ajudou a estar aqui hoje, na pós-graduação.

Aos meus queridos amigos **Alexandre Ferreira e Sandrinha**, por me ensinarem a ser uma pessoa mais independente, a lidar com decepções e a nivelar os problemas.

À minha querida **Dona Luzia**, pessoa marcada pela simplicidade e trabalho, agradeço pela sua preocupação diária e pelo instinto materno.

A todos aqueles que um dia hospedaram em minha casinha, Dina, Vanessa, Nilton Lincopan, Nivia, Vania e Thomas.

A todos os **amigos do Solar dos Príncipes**, Claudio Pereira, Fabriciano, Tiago Peixe, Filmon Solomon, Sidnei, Rodrigo, André, Tiago Barcelos, Daniel, Renato e Renor.

Aos meus tios **Valdomiro Pinto e Vicente Pinto, e família**, pela constante preocupação, orientação e pelas palavras de carinho.

E a todas as pessoas que, apesar de não citadas, contribuíram para a realização deste trabalho!

RESUMO

### Desenvolvimento de técnicas de imunoensaio para a detecção de microcistina em amostras ambientais

A contaminação da água para consumo humano por toxinas produzidas por cianobactérias é um problema de saúde pública e das autoridades em todo o mundo. Microcistina-LR (MCLR) é uma cianotoxina heptapeptídica cíclica que inibe as proteínas fosfatases PP1 E PP2A nos hepatócitos. Microcistinas são produzidas por diversos gêneros de cianobactérias e mais de 70 variações estruturais têm sido caracterizadas em florações naturais. Por serem haptenos, as microcistinas são incapazes de induzir uma resposta imune em animais. Conseqüentemente, foi necessário aplicar métodos de conjugação envolvendo a adição de uma proteína carreadora, mcKLH (cationized Keyhole Limpet Hemocyanin). Portanto, o objetivo inicial desta tese foi o de obter anticorpos monoclonal (em camundongos) e policional (em coelho) anti-MCLR. Com relação ao anticorpo monoclonal foram obtidos 9 hibridomas (k<sub>2</sub>9, k<sub>2</sub>10, k<sub>3</sub>17, k<sub>2</sub>48, k<sub>2</sub>84, k<sub>2</sub>90, k<sub>2</sub>161, k<sub>2</sub>226, k<sub>2</sub>232), sendo que apenas 5 se mostraram estáveis (k<sub>2</sub>9, k<sub>3</sub>17, k<sub>2</sub>48, k<sub>2</sub>84, k<sub>2</sub>232). Estes foram selecionados para serem isotipados, expandidos em líquido ascítico, purificados em coluna cromatográfica de proteína-A e titulados. Dentre estes cinco hibridomas secretores de anticorpos, o clone k<sub>3</sub>17 foi o que melhor reconheceu (mais específico) a toxina MCLR. Os anticorpos do sobrenadante de meio de cultura do hibridoma e o fluido ascítico purificado foram identificados pelo ensaio ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) previamente padronizado. Mesmo sensibilizando a placa de ELISA com diferentes antígenos, tais como MCLR-cBSA, MCLR, MCLR, MCRR, MCYR e MCLA, o clone 17 foi o que apresentou melhor linearidade frente às variantes de microcistina. Portanto, o clone 17 (isótipo IgG1) obtido é muito promissor e será usado para detecção de MCLR na água para consumo humano através do desenvolvimento de um kit de ELISA competição. Com relação ao anticorpo policional, o antígeno de imunização foi MCLR-mcKLH, enquanto que o antígeno de sensibilização foi MCLRcBSA para o ensaio de titulação de anticorpos de classe IgG por ELISA indireto. Na seqüencia, foi padronizado um ensaio ELISA competição utilizando somente a toxina MCLR como antígeno de sensibilização. Este método Caseína foi padronizado, validado e comparado com o kit comercial Abraxis<sup>®</sup>. O kit ELISA competição que utiliza anticorpo policlonal, nomeado como método Caseína, foi avaliado quanto Limite Inferior de Quantificação, Especificidade, Seletividade, influência do metanol no ensaio, Recuperação, Linearidade, Precisão, Exatidão e Robustez. Este método de triagem apresentou excelente resultado quando comparado ao kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, pois foi capaz de detectar tanto variantes de microcistinas como nodularinas no ambiente aquático. O ensaio ELISA competição utilizando anticorpo policional anti-MCLR foi submetido à patente pela Agência USP de Inovação (I.N.P.I. 018090046230).

Palavras chave: microcistina, nodularina, conjugação de peptídeos, hibridoma, anticorpo monoclonal, anticorpo policional, ELISA.

### Development of immunoassay techniques to detect microcystin in environmental samples

The contamination of drinking water by cyanobacterial toxins is a public health issue and a concern for water authorities throughout the world. Microcystin-LR (MCLR) is a hazardous cyclic heptapeptide cyanotoxin, which inhibits protein phosphatase PP1 and PP2A in hepatocytes. Microcystins are produced by several genera of cyanobacteria and presents more than 70 structural variations characterized in natural blooms. As haptens, microcystins are unable to invoke an immune response in animals. Consequently, the application of conjugation methods with an additional carrier protein, the KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) was necessary. The main objective of this study was to obtain monoclonal (in mice) and polyclonal (in rabbits) antibodies for reacting against MCLR. In what refers to monoclonal antibodies, 9 hybridomas (k<sub>2</sub>9, k<sub>2</sub>10, k<sub>3</sub>17, k<sub>2</sub>48, k<sub>2</sub>84, k<sub>2</sub>90, k<sub>2</sub>161, k<sub>2</sub>226, k<sub>2</sub>232) were obtained; however only 5 were stables (k<sub>2</sub>9, k<sub>3</sub>17, k<sub>2</sub>48, k<sub>2</sub>84, k<sub>2</sub>232). These were selected to be isotyped, expanded in ascitic fluid, purified by protein-A column chromatography and then, they were titrated. Out of these five antibody-secretor hybridomas, clone k<sub>3</sub>17 was the best to recognize (more specific) the MCLR toxins. Antibodies in hybridoma cell culture supernatant and purified ascites fluid were identified by ELISA assay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) as prior standardized. Even when sensitizing ELISA plate with different antigens, as MCLR-cBSA, MCLR, MCLR, MCRR, MCYR and MCLA, clone 17 presented the best linearity against microcystin variants. Therefore, the obtained clone 17 (isotype IgG1) is a promising clone and shall be used for detecting MCLR in drinking water through the development of a competitive ELISA immunoassay kit. In what refers to the polyclonal antibody, MCLR-mcKLH was used as immunization antigen, while MCLR-cBSA was used as sensitizing antigen for the IgG titration assay by indirect ELISA. In the sequence, a competition ELISA assay was standardized using the MCLR toxin as sensitizing antigen. This Casein method was standardized, validated and compared to the commercial kit Abraxis<sup>®</sup>. The competition ELISA kit using polyclonal antibody, known as Casein method, was analyzed concerning its Quantification Inferior Limit, Specificity, Selectivity, methanol influence of the assay, Recuperation, Linearity, Precision, Accuracy and Robustness. This screening method reached excellent results if compared to the commercial kit Abraxis<sup>®</sup>, for being able to detect both the microcystins variants and the nodularins in aquatic environmental. The competition ELISA assay using anti-MCLR polyclonal antibody was submitted to the grant of a patent by USP Innovation Agency (INPI 018090046230).

Key Words: microcystin, nodularin, peptide conjugation, hybridoma, monoclonal antibody, polyclonal antibody, ELISA.

# x\*+ \$\$\$x\* x\* & \*\*\* \*\*\* \*\*\*\*

# LISTADE FIGURAS

Figura 1. Foto de uma floração na Represa Americana, Americana-São Paulo, 2005
Figura 2. Estrutura química da microcistina
Figura 3. Estrutura química da microcistina-LR (A) e nodularina (B)
Figura 4. Relação entre Sensibilidade e Seletividade de métodos analíticos para detecção de
microcistina43
Figura 5. Modelo esquemático de conjugação pelo método MBS48
Figura 6. Esquema de cationização da proteína carreadora BSA, mediada pelo etilenodiamino51
Figura 7. Modelo esquemático dos componentes celulares que estão presentes em uma imunização
via bub-cutânea
Figura 8. Diagrama esquemático da molécula de Imunoglobulina55
Figura 9. Esquema da técnica imunoenzimática, Método indireto para pesquisa de anticorpos de
classe IgG
Figura 10. Esquema da técnica imunoenzimática, Sistema Avidina-Biotina para pesquisa de
anticorpos de classe IgG
Figura 11. Estrutura da cadeia polipeptídica de subclasses de IgG em camundongos59
Figura 12. Árvore da família de mieloma obtida em camundongos Balb/c, a partir da linhagem
MOPC21 até a linhagem SP2061
Figura 13. Esquema da síntese de nucleotídeos63
Figura 14. Estágios do ciclo celular67
Figura 15. Modelo esquemático da obtenção de anticorpos monoclonais. Fusão das células de
mieloma com células linfóides provenientes do linfonodo e do baço92
Figura 16. Esquema de clonagem pela metodologia Diluição Limitante
Figura 17. Esquema de tratamento celular BM Cyclin seguido de ciprofloxacina (cipro), sendo o
tempo em dias
Figura 18. Esquema de tratamento celular de ciprofloxacina (cipro) seguido de BM Cyclin, sendo o
tempo em dias
Figura 19. Cromatograma e espectro de absorção em 238nm da microcistina-LR obtidos por HPLC-
PDA referentes ao padrão Sigma <sup>®</sup> <b>120</b>
Figura 20. Cromatograma e espectro de absorção em 238nm da microcistina-YR obtidos por HPLC-
PDA referentes ao padrão Sigma <sup>®</sup> <b>120</b>
Figura 21. Cromatograma e espectro de absorção em 238nm referentes à cepa BCCUSP 100 obtidos
por HPLC-PDA121
Figura 22. Espectro de Massas obtido por MS-ESI referente à infusão direta da MCLR presente na
cepa BCCUSP 100 em scan <i>m/z</i> 200-1050 [M+H] <sup>+</sup> <b>121</b>
Figura 23. MS/MS do íon <i>m</i> /z 995.4 mostrando a fragmentação característica da MCLR122

rigura 24. MS/MS do ion de m/2 509.5. A fragmentação mostra que se trata de um ion dupla carga
[M+Na+H] da MCLR122
Figura 25. Ampliação de espectro mostrando a abundância isotópica característica de ions dupla carga: picos separados por <i>m/z</i> 0,5
Figura 26. Distribuição isotópica de íons com uma carga apenas: separação dos picos por m/z 1, e
não <i>m/z</i> 0,5 como na Figura anterior123
<b>Figura 27.</b> Padrão de fragmentação da MCLR, enfatizando os íons <i>m/z</i> 599.3 e <i>m/z</i> 135,08, onde
este último refere-se ao grupamento Adda124
Figura 28. Cromatograma e espectro de uma amostra positiva para microcistina proveniente de
Pernambuco-PE125
Figura 29. Cromatograma e espectro de uma amostra positiva para microcistina proveniente de
Natal-RN126
Figura 30. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma amostra contendo padrões de
microcistina na concentração de 1µg/L127
Figura 31. Espectro de Massas obtido por LC-MS-ESI referente ao padrão de MCRR m/z 520
[M+2H] <sup>2+</sup> <b>128</b>
Figura 32. Espectro de Massas obtido por LC-MS-ESI referente ao padrão de MCYR m/z 1045
[M+H] <sup>+</sup> 128
Figura 33. Espectro de Massas obtido por LC-MS-ESI referente ao padrão de MCLR <i>m/z</i> 995 [M+H] <sup>+</sup> .128
Figura 34. Espectro de Massas obtido por LC-MS-ESI referente ao padrão de MCLA m/z 910 [M+H] <sup>+</sup> .129
Figura 35. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na Praia de
Sales-SP129
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS.       129         Figura 37. Modelo esquemático da conjugação MCLR-cBSA via carbodiimida       131         Figura 38. Distribuição esquemática dos aminoácidos no interior celular quanto à sua hidrofobicidade.132         Figura 39. Modelo esquemático da conjugação MCLR-KLH via glutaraldeído       135         Figura 40. Teste da Oxidação do OPD, como controle da reação, frente a todos os reagentes do       142         Figura 41. Avaliação da produção de anticorpos IgG pelo método ELISA indireto utilizando soro       144         Figura 42. Fotos de órgãos linfóides de camundongo Balb/c retirados para realização da fusão       149         Figura 43. Fotos retiradas em diferentes períodos de fusão entre células linfóides retiradas de       151         Figura 44. Esquema do ensaio de ELISA captura (segundo kit Sigma <sup>®</sup> ) para pesquisa do isótipo de       156         Figura 45. Curva de titulação dos anticorpos monoclonais anti-MCLR, secretados pelos clones k <sub>3</sub> 17 e       159
Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na         Barragem do Rio Areia-RS.       129         Figura 37. Modelo esquemático da conjugação MCLR-cBSA via carbodiimida       131         Figura 38. Distribuição esquemática dos aminoácidos no interior celular quanto à sua hidrofobicidade.132         Figura 39. Modelo esquemático da conjugação MCLR-KLH via glutaraldeído       135         Figura 40. Teste da Oxidação do OPD, como controle da reação, frente a todos os reagentes do       142         Figura 41. Avaliação da produção de anticorpos IgG pelo método ELISA indireto utilizando soro       144         Figura 42. Fotos de órgãos linfóides de camundongo Balb/c retirados para realização da fusão       149         Figura 43. Fotos retiradas em diferentes períodos de fusão entre células linfóides retiradas de       151         Figura 44. Esquema do ensaio de ELISA captura (segundo kit Sigma®) para pesquisa do isótipo de       156         Figura 45. Curva de titulação dos anticorpos monoclonais anti-MCLR, secretados pelos clones k <sub>3</sub> 84 e       159         Figura 46. Curva de titulação dos anticorpos monoclonais anti-MCLR, secretados pelos clones k <sub>3</sub> 84 e       159

Figura 47. Scan do Gel SDS-PAGE (5 a 15%) dos anticorpos monoclonais corados pelo coomassie
blue sem agente redutor162
Figura 48. Scan do Gel SDS-PAGE (5 a 20%) dos anticorpos monoclonais corados pelo coomassie
blue com agente redutor163
Figura 49. Esquema da distribuição aleatória da microcistina-LR na superfície da proteína carreadora
<i>mc</i> KLH164
Figura 50. Cinética da produção de anticorpos IgG em coelho imunizado com MCLR-mcKLH por
ELISA indireto frente a dois antígenos de sensibilização165
Figura 51. Reatividade do anticorpo policional anti-MCLR-mcKLH antes e após purificação frente a
diferentes antígenos de sensibilização166
Figura 52. Absorbâncias resultantes do ELISA indireto, utilizando anticorpo policional purificado anti-
MCLR-mcKLH em diferentes diluições frente às variantes de microcistina168
Figura 53. Absorbâncias resultantes do ensaio ELISA indireto. Titulação da concentração de
antígeno (MCLR sem conjugação e MCLR conjugada ao cBSA) x Diluição do Anticorpo Policlonal
obtido em coelho imunizado com MCLR-mcKLH169
Figura 54. Índice de Reatividade da MCLR frente às diferentes diluições de Anticorpo Policional anti-
MCLR- <i>mc</i> KLH171
Figura 55. Índice de Reatividade do Anticorpo Policional anti-MCLR x Concentração de MCLR172
Figura 56. Dosagem de microcistina e nodularinda utilizando dois kits ELISA competição173
Figura 57. Definição do LIQ segundo a média da concentração calculada referente ao ponto mais
baixo da curva de calibração175
Figura 58. Cálculo do Índice de Reatividade de amostras negativas, para avaliação da Seletividade
do método por ELISA176
Figura 59. Avaliação da influência do metanol no ensaio ELISA competição em Caseína177
Figura 60. Avaliação da influência do metanol no ensaio ELISA competição referente ao kit comercial
Abraxis <sup>®</sup> 178
Figura 61. Cálculo da Recuperação Absoluta, Relativa e Efeito Matriz179
Figura 62. Análise da Distribuição dos Resíduos com Relação à Concentração Nominal de MCLR
calculados com função Logarítmica (In) a partir da Curva de Calibração181
Figura 63. Análise da Distribuição dos Resíduos com Relação à Concentração Nominal de MCLR
calculados com Regressão Linear a partir da Curva de Calibração181
Figura 64. Curva de Calibração para MCLR. Validação da Linearidade do Método182
Figura 65. Avaliação da Linearidade do Método, a partir da Variação da Recuperação Absoluta (%)183
Figura 66. Cálculos de Precisão e Exatidão para validação do método intra-ensaio (azul) e
interensaio (verde) no primeiro dia184
Figura 67. Cálculos de Precisão e Exatidão para validação do método intra-ensaio (azul) e
interensaio (verde) no segundo dia184
Figura 68. Cálculos de Precisão e Exatidão para validação do método intradia (azul) e inter-dia
(verde)

Figura 69. Detecção e quantificação de variantes de microcistina e/ou nodularina em diferentes	
matrizes18	6
Figura 70. Cromatograma da amostra 6. Análise da variante [D-Asp <sup>3</sup> ]MCLR por LC-MS18	8
Figura 71. Relação entre as concentrações calculadas entre dois ensaios ELISA competição,	
padronizado em Caseína e kit comercial Abraxis <sup>®</sup> <b>19</b>	0
Figura 72. Correlação de Pearson entre dois ensaios ELISA competição, padronizado em Caseína e	
kit comercial Abraxis <sup>®</sup> <b>19</b>	0

# x\*+ Sextx tr & + + # xt+ Sext+

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do Meio BG11     7	'9
Tabela 2. Resumo do protocolo de imunização em camundongos machos, Balb/c, 2 meses, 30	
gramas8	57
Tabela 3. Preparo do tampão de amostra 5x - SDS-PAGE1	01
Tabela 4. Preparo do tampão de corrida - SDS-PAGE1	02
Tabela 5. Solução A - Gel de separação - SDS-PAGE	02
Tabela 6. Solução B - Gel de separação - SDS-PAGE	02
Tabela 7. Solução C - Gel de separação - SDS-PAGE1	03
Tabela 8. Preparo do persulfato de amônio1	03
Tabela 9. Preparo do gel de separação - gel de poliacrilamida1	03
Tabela 10.    Preparo do gel de empilhamento1	04
Tabela 11. Preparo do corante Coomassie Blue         1	04
<b>Tabela 12.</b> Leitura da absorbância em $\lambda$ = 280nm do eluato obtido a partir da coluna de gel filtração	
após conjugação MCLR-cBSA1	33
<b>Tabela 13.</b> Leitura da absorbância em $\lambda$ = 280nm do eluato obtido a partir da coluna de gel filtração	
após conjugação MCLR- <i>mc</i> KLH <b>1</b>	34
Tabela 14. Diferença de absorbância entre os soros nos tempos T <sub>50</sub> e T <sub>0</sub> , em poços sensibilizados	
com diferentes concentrações de Microcistina-LR conjugada ao cBSA (0,25, 0,5 e 1,5µg MCLR-	
cBSA/poço)1	38
Tabela 15. Absorbância dos soros de em $T_{50}$ e $T_0$ , em poços sensibilizados ou não com toxina	
conjugada (MCLR-cBSA), frente a diversos reagentes de bloqueio1	39
Tabela 16. Anticorpos monoclonais anti-MCLR obtidos, sua reatividade por ELISA e seu isótipo1	52
Tabela 17. Reatividade dos anticorpos antes e após tratamento com antibióticos	57
Tabela 18. Volume de líquido ascítico e concentração de anticorpo de cada clone1	57
Tabela 19.         Determinação da concentração ótima de Antígeno de Sensibilização x Diluição ótima do	
Anticorpo Policlonal anti-MCLR1	70

#### 

Esquema 1. Esquema do ensaio de ELISA referente ao kit comercial Abraxis®, com adaptações.......88

Quadro 1. Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio	69
---	----

# メ<sup>オ</sup>キ Sex なかのですなな LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: absorbância lida em espectrofotômetro ACF: adjuvante completo de freund AIF: adjuvante incompleto de freund Ag: antígeno Adda: ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4(E)6(E)-dienóico AGPRT: enzima adenina-guanina fosforribosiltransferase Ala: alanina ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária APC: célula apresentadora de antígeno Arg: arginina Asp: ácido aspártico BCR: receptor de antígeno de linfócitos B **BSA:** soro albumina bovina cBSA: soro albumina bovina cationizado **CETESB:** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental Cis: cisteína CMD: concentração média determinada CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono CQ: Controle de Qualidade CV%: coeficiente de variação (%) DCR: região determinante de complementaridade Des (%): Desvio do Valor Nominal (%) **D-MeAsp:** ácido D-*eritro*-β-metilaspartico DMSO: dimetilsulfóxido DP: desvio padrão **DPR:** desvio padrão relativo (%) **DTT:** ditiotreitol EDC: via de conjugação 1-Etil-3-[3-Dimetilaminopropil]carbodiimida Hidroclorido ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay **ESI:** ionização ElectroSpray EXT: amostra em matriz extraída

Glu: glutamato

HAT: hipoxantina, aminopterina e timidina

HGPRT: enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

His: histidina

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HRP: peroxidase de rábano

HT: hipoxantina e timidina

i.p.: via intra-peritoneal

ICAM-1,2,3: molécula de adesão intracelular

ICH: International Conference on Harmonization

IFNy: interferon gama

IL: interleucina

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia

IR: Índice de Reatividade (%)

KLH: keyhole limpet hemocyanin

Lis: lisina

LB: linfócito B

LC-MS: Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas

LD: limite de detecção

Leu: leucina

LFA-1: antígeno 1 com função leucocitária, integrina

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

LQ: limite de quantificação

LMQ: Limite Máximo de Quantificação

LSQ: Limite Superior de Quantificação

LT: linfócito T

LTh-2: linfócito T-helper 2

MBS: via de conjugação ácido m-maleimidobenzoico N-hidroxisuccinimida ester

mcKLH: Megathura crenulata keyhole limpet hemocyanin

MCLA: microcistina-LA

MCLR: microcistina-LR

- MCRR: microcistina-RR
- MCYR: microcistina-RR

MCLR-Ltx: microcistina-LR conjugada à partícula de látex

MCLR-BSA-Ltx: microcistina-LR conjugado ao BSA e à partícula de látex

MCLR-BSA: microcistina-LR conjugado ao BSA

MCLR-mcKLH: microcistina-LR conjugado ao mcKLH

MCLR-cBSA: microcistina-LR conjugado ao cBSA

Mdha: N-metildehidroalanina

Mdhb: N-metildehidrobutirina

MeOH: metanol

MMPB: ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutirico

MOPC-1: plasmocitomas induzidos por óleo mineral

MTZ: amostra em matriz

N<sub>2</sub>: nitrogênio gasoso

NH2: grupo amino

NH3: nitrato

NH4+: amônio

NOD: nodularina

O2: oxigênio gasoso

**OPD:** ortofenilenediamino

OVA: ovalbumina

PBS: tampão fosfato salina (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,008M, KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,00146M, NaCl 0,15M e

KCI 0,002M, pH 7,2)

PBS-T: tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20

p.c.: peso corpóreo

PCC: condensação prematura cromossômica

**PEG:** polietilenoglicol

PLL: poli-I-lisina

PP1 e PP2A: enzimas fosfatases PP1 e PP2A

PSS/DDA: poliestireno sulfato/brometo de dioctadecildimetilamônio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

**RPMI**: meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina 1%,

piruvato de sódio 2%, MEM não essenciais 1%, Gentamicina 0,1% e HEPES 1,5%

**RPMI<sup>+</sup>:** meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino 10%

R<sup>2</sup>: quadrado do coeficiente de correlação linear

SÇÃO: amostra preparada em solução

SLD: soro lactato dehidrogenase

SBF: soro fetal bovino

**SDS:** sulfato dodecil de sódio

**SSD:** soro sorbitol dehidrogenase

TCR: receptor de antígeno de linfócitos T

Tir: tirosina

TK: enzima timidinocinase

TLC: cromatografia em camada delgada

TMB: 3,3,5,5-tetrametilbenzidina

T<sub>50</sub>: tempo de 50 dias

**MBI:** metilisoborneol

# 

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ESQUEMAS	xv
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
SUMÁRIO	xxi
1.0 INTRODUÇÃO	27
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 Poluição das águas	31
2.2 Floração algal e cianotoxinas	32
2.3 Aspectos gerais da microcistina e nodularina	36
2.4 Mecanismo de ação das toxinas no organismo	38
2.5 Quadro clínico das toxinas no organismo	39
2.6 Conseqüências da interação microcistina-fosfatase no organismo	40
2.7 Métodos de detecção e quantificação de variantes de microcistinas	42
2.8 Propriedades do peptídeo	45
2.9 Estratégias de acoplamento e vias de conjugação do peptídeo à uma proteína carreador	a <b>47</b>
2.9.1 Via EDC	47
2.9.2 Via Glutaraldeído	47
2.9.3 Via MBS	47
2.10 Resposta imune e seus componentes celulares após imunização via subcutânea	53
2.11 Estrutura e função das imunoglobulinas	54
2.12 Métodos imunoenzimáticos utilizados para detecção de anticorpos IgG em soro de ar	imais
(camundongo e/ou coelho)	56
2.12.1 Método Indireto	57
2.12.2 Sistema Avidina-Biotina	57
2.13 Isotipagem de imunoglobulinas	58
2.14 Anticorpos policional e monocional	59
2.15 Produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais	60
2.16 Fatores que influenciam a fusão celular	64
2.16.1 Uso do PEG e a importância do seu pH	64
2.16.2 Influência do DMSO	65
2.16.3 Fusão do DNA entre duas células diferentes com formação de um hibridoma	66

SUMÁRIO

2.16.4 Presença de contaminantes celulares em meio de cultura	67
2.17 Validação de testes imunológicos	68
2.17.1 Conceitos de Validação	70
2.17.1.1 Especificidade e Seletividade	70
2.17.1.2 Linearidade	70
2.17.1.3 Intervalo	71
2.17.1.4 Precisão	71
2.17.1.5 Limite de Detecção (LD)	72
2.17.1.6 Limite de Quantificação (LQ)	72
2.17.1.7 Exatidão	72
2.17.1.8 Robustez	73
2.17.1.9 Recuperação	73
2.17.1.10 Reprodutibilidade	74
3.0 OBJETIVOS	76
3.1 Objetivo geral	76
3.2 Objetivos específicos	76
3.2.1 Análises cromatográficas	76
3.2.2 Anticorpo monoclonal anti-MCLR	76
3.2.3 Anticorpo policional anti-MCLR	77
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	78
4.1 Obtenção da microcistina	78
4.1.1 Manutenção da cepa BCCUSP 100 em meio de cultura BG11	78
4.1.2 Extração de microcistina-LR a partir do meio de cultura BG11	79
4.1.3 Extração de microcistina-LR a partir de florações	80
4.2 Desenvolvimento de um multi-método para determinação de microcistina-RR, YR, LR e	⇒ LA
por Espectrometria de Massas	80
4.3 Conjugação da microcistina-LR	82
4.3.1 Ao cBSA (soro albumina bovina cationizado) via carbodiimida	82
4.3.2 Ao mcKLH (Megathura crenulata Keyhole Limpet Hemocyanin) via carbodiimida	83
4.3.3 Ao KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) via glutaraldeído	83
4.3.4 À partícula de látex ou PLL (Poli-I-lisina)	83
4.4 Imunização de camundongos Balb/c	84
4.4.1 Via sub-dorsal (implante de membrana)	84
4.4.2 Via sub-plantar	85
4.4.3 Via intra-peritoneal	85
4.4.4 Via sub-dorsal	86
4.4.5 Via sub-plantar e sub-dorsal	86
4.5 Padronização de um método imunoenzimático para determinação da produção de anticor	rpos
IgG por ELISA "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" em soro de animal e/ou sobrenadante	∍ de
cultura celular	88

4.5.1 ELISA para controle da adsorção da microcistina-LR, utilizando componentes l	kit
comercial Abraxis <sup>®</sup>	88
4.5.2 Padronização do ensaio ELISA indireto	89
4.6 Obtenção de Anticorpos Monoclonais	90
4.6.1 Obtenção das células dos órgãos linfóides: linfonodos poplíteos, linfonodos abdomina	ais
e baço	90
4.6.2 Cultivo das Células de Mieloma	90
4.6.3 Preparo do "Feeder Layer"	91
4.6.4 Obtenção dos hibridomas (Fusão celular)	91
4.6.5 Clonagem dos hibridomas	94
4.6.6 Expansão dos hibridomas clonados	95
4.6.7 Congelamento dos hibridomas e células de mieloma	95
4.6.8 Descongelamento dos Hibridomas	96
4.6.9 Isotipagem dos anticorpos monoclonais obtidos	96
4.7 Tratamento celular dos clones secretores de anticorpo anti-MCLR utilizando os antibiótico	os
BMCyclin 1 e 2, e Ciprofloxacina	96
4.7.1 Obtenção dos antibióticos	97
4.7.1.1 Ciprofloxacina	97
4.7.1.2 BM Cyclin 1 e 2	97
4.7.2 Ciclos de tratamento celular	97
4.8 Obtenção de anticorpos monoclonais por expansão dos hibridomas em ascite	99
4.9 Purificação dos anticorpos monoclonais por cromatografia de afinidade	99
4.9.1 Remoção de lípides do liquido ascítico	99
4.9.2 Empacotamento da coluna de proteína A	100
4.9.3 Purificação do anticorpo em coluna de proteína A	100
4.10 Reatividade dos anticorpos monoclonais	101
4.11 Caracterização dos anticorpos purificados por SDS-PAGE	101
4.11.1 Preparo dos reagentes necessários para realização do ensaio SDS-PAGE	101
4.11.1.1 Preparo do tampão de amostra (5X)	101
4.11.1.2 Preparo do tampão de corrida	102
4.11.1.3 Preparo da solução vedante	102
4.11.1.4 Preparo do gel de separação	102
4.11.1.5 Preparo do persulfato de amônio	103
4.11.1.6 Preparo do agente redutor, gel de separação e gel de empilhamento	103
4.11.1.7 Preparo do corante Coomassie Blue	104
4.11.2 Ensaio SDS-PAGE utilizando DTT como agente redutor	104
4.12 Obtenção de Anticorpos Policionais	105
4.12.1 Imunização do coelho	105
4.12.2 Padronização de um método de imunoensaio para determinação da produção o	le
anticorpos IgG por ELISA "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" em soro de coelho	106

4.12.3 Purificação de soro de coelho imunizado com MCLR-mcKLH (Precipitação em Sulfa	to
de Amônio)	106
4.13 Padronização e validação do método de ELISA competição para detecção e quantificaçã	io
de microcistina e nodularina utilizando anticorpos policionais anti-MCLR-mcKLH obtido em coelho	107
4.13.1 Padronização do ensaio ELISA competição	107
4.13.1.1 Determinação da concentração e do antígeno de sensibilização ideais ao ensa	io
ELISA competição	107
4.13.1.2 Determinação da diluição do anticorpo policlonal ideal ao ensaio ELIS	A
competição	108
4.13.1.3 Determinação da região linear da curva dose-resposta de MCLR pré-incubac	la
com o anticorpo policional obtido no ensaio ELISA competição	108
4.13.1.4 Método enzimático por ELISA competição otimizado para determinação	е
quantificação de microcistina e nodularina em amostras ambientais	108
4.13.2 Validação do ensaio ELISA competição	109
4.13.2.1 Limite Inferior de Quantificação	109
4.13.2.2 Especificidade e Seletividade	110
4.13.2.2.1 Influência do metanol no ensaio ELISA competição	110
4.13.2.2.2 Protocolo kit comercial Abraxis <sup>®</sup> - ELISA competição indireto	111
4.13.2.3 Recuperação	111
4.13.2.3.1 Processo de extração	111
4.13.2.3.2 Amostra em Solução, Amostra em Matriz Extraída, Amostra em Matriz	112
4.13.2.4 Linearidade	113
4.13.2.5 Precisão e Exatidão	114
4.13.2.6 Robustez	115
4.14 Descrições das amostras analisadas quanto a sua origem, coleta, armazenamento	о,
transporte e processo de extração	115
4.15 Métodos de detecção e quantificação de variantes de microcistina e/ou nodularina	116
5.0 RESULTADOS E DISCUSSAO	118
5.1 Análise da obtenção da microcistina-LR	118
5.1.1 Análise da manutenção da cepa BCCUSP 100 em meio de cultura BG11	118
5.1.2 Análise da extração de microcistina-LR a partir do meio de cultura BG11	119
5.1.3 Análise da extração de microcistina-LR a partir de florações	125
5.2 Análise do desenvolvimento de um multi-método para determinação de microcistinas	e
algumas de suas variantes por Espectrometria de Massas	127
5.3 Análise da conjugação da microcistina-LR	130
5.3.1 Via carbodiimida	130
5.3.1.1 Ao cBSA	132
5.3.1.2 AO <i>mc</i> KLH	134
	135
5.3.2.1 A0 KLH	135

5.4 Análise da padronização de um método de imunoensaio para avaliação da produção de
anticorpos IgG por ELISA indireto "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"137
5.4.1 ELISA indireto137
5.4.2 "Teste de Oxidação" do OPD (controle de reação) frente a todos os reagentes da reação
de ELISA indireto no sistema Avidina-Biotina140
5.5 Análise da cinética da produção de anticorpos IgG em animais imunizados utilizando
diferentes vias, antígenos e adjuvantes143
5.6 Obtenção de Anticorpos Monoclonais146
5.6.1 Escolha do camundongo para realização da fusão148
5.6.2 Obtenção de células linfóides: Linfonodos Poplíteos, Linfonodos Abdominais e Baço148
5.6.3 Cultivo das Células de Mieloma149
5.6.4 Preparo do "Feeder Layer"
5.6.5 Obtenção dos hibridomas (Fusão Celular)150
5.6.6 Clonagem dos hibridomas pela técnica de diluição limitante
5.6.7 Expansão dos hibridomas clonados154
5.6.8 Congelamento dos hibridomas e células de mieloma154
5.6.9 Descongelamento dos hibridomas154
5.6.10 Isotipagem dos anticorpos monoclonais obtidos155
5.6.11 Análise dos clones submetidos ao tratamento com antibiótico156
5.6.12 Análise do rendimento dos anticorpos monoclonais obtidos por expansão dos
hibridomas em ascite157
5.6.13 Reatividade dos anticorpos monoclonais158
5.6.14 Caracterização dos anticorpos purificados por SDS-PAGE161
5.7 Obtenção de Anticorpo Policional164
5.7.1 Avaliação da produção e especificidade de anticorpos IgG em coelho, por ELISA
indireto padronizado164
5.7.2 Purificação de soro de coelho imunizado com MCLR-mcKLH (Precipitação em Sulfato
de Amônio)165
5.7.3 Curva de titulação do anticorpo policional anti-MCLR166
5.7.4 Avaliação da reatividade do anticorpo policlonal anti-MCLR- <i>mc</i> KLH <b>167</b>
5.7.5 Padronização do ensaio ELISA competição para detecção e quantificação de
microcistina e nodularina utilizando anticorpos policionais anti-MCLR-mcKLH obtido em coelho168
5.7.5.1 Titulação em bloco do antígeno de sensibilização X diluição do anticorpo
policional anti-MCLR169
5.7.5.2 Curva de calibração para MCLR para ensaios quantitativos para determinação de
MCLR
5.7.6 Validação do ensaio ELISA competição para detecção de microcistina e nodularina em
amostras ambientais e em água para consumo humano
5.7.6.1 Limite Interior de Quantificação
5.7.6.2 Especificidade e Seletividade175

5.7.6.2.1 Avaliação da influência do metanol no ensaio ELISA competição1	76
5.7.6.3 Recuperação1	79
5.7.6.4 Linearidade1	80
5.7.6.4.1 Linearidade da Metodologia Analítica1	80
5.7.6.4.2 Linearidade do Método1	82
5.7.6.5 Exatidão e Precisão1	83
5.8 Determinação de variantes de microcistina e/ou nodularina em amostras de água para	
consumo humano, amostras ambientais e de meio de cultura, utilizando dois kits ELISA competição1	85
7.0 CONCLUSÕES1	91
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS1	94
9.0 APÊNDICES	207
APÊNDICE I: Complemento: Órgãos linfóides2	208
APÊNDICE II: Complemento: Resposta imune e interação peptídeo-anticorpo	213
APÊNDICE III: Complemento: Fatores que influenciaram a padronização do ensaio ELISA indireto	
para avaliação da produção de anticorpos IgG anti-MCLR2	217
10.0 ANEXOS2	219
ANEXO I: Portaria 518/2004 - Ministério da Saúde2	20
ANEXO II: Pedido de Patente2	21
ANEXO III: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	22
ANEXO IV: Análise de micoplasma em cinco clones secretores de anticorpos monoclonais anti-	
MCLR	23
ANEXO V: Curriculum Vitae2	24
ANEXO VI: Trabalho originado no período2	225

O material apresentado nesta introdução não tem como objetivo principal uma revisão sobre os temas abordados. São citadas algumas referências que são consideradas importantes sobre os assuntos em questão para auxiliar o leitor a compreender o motivo dos experimentos realizados dentro de cada contexto e, para a produção de um ensaio imunoenzimático nacional para a detecção de microcistina, uma classe de toxina produzida por cianobactérias de água doce.

A qualidade de rios, lagos e represas vêm diminuindo drasticamente nas últimas décadas, principalmente pela contaminação da água por ações antropogênicas, efluentes domésticos e fertilizantes. Como conseqüência da contaminação, cianobactérias podem crescer em grande quantidade em corpos d'água, fenômeno denominado floração. As florações podem deixar a água com odor e gosto desagradáveis, mesmo após o tratamento, pois as cianobactérias produzem substâncias com essas características, por exemplo, os compostos metilisoborneol e geosmina. Além desse problema, em algumas ocasiões, a água pode apresentar toxinas (cianotoxinas: microcistinas, saxitoxinas, anatoxinas e cilindrospermopsina) também produzidas por cianobactérias. De fato, o monitoramento de cianotoxinas é obrigatório (Portaria Nº 518/2004 - ANEXO I) em água para consumo humano e apresenta custo elevado para as agências de tratamento e fornecimento. Um fato que ressaltou a importância do monitoramento de cianotoxinas em água foi a "Síndrome de Caruaru" ocorrida em 1996 no Instituto de Doenças Renais em Caruaru - Pernambuco, onde pacientes entraram em contato direto com microcistinas via hemodiálise. Pelo menos 52 pacientes foram a óbito.

Todas as cidades brasileiras devem garantir a qualidade da água para os seus cidadãos. Os resultados desse trabalho podem ser potencialmente utilizados por prefeituras e agências de tratamento de água de várias cidades brasileiras que necessitam realizar o monitoramento de microcistinas rotineiramente. Órgãos ambientais governamentais e laboratórios privados também podem ter interesse por esses resultados. Atualmente, as análises utilizadas para esse fim utilizam Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (custo aproximado de cada análise - R\$200,00) e kits de diagnóstico por enzimaimunoensaio (≈ R\$50,00 por amostra,

pois são importados). Entretanto, um kit de ELISA para o monitoramento de microcistinas em água para consumo humano pode ser produzido aqui no Brasil, reduzindo assim os custos de transporte e taxas de importação.

Os métodos convencionais supracitados utilizam equipamentos de alto custo e não estão presentes em todas as agências de água. Além disso, necessitam de muito tempo para um resultado e mão de obra qualificada e, por isso, muitas agências terceirizam estas análises. O desenvolvimento e a produção de um kit envolvem tecnologia 100% nacional e facilidade de utilização. O ensaio descrito nesse trabalho é baseado em anticorpos contra as microcistinas que, em contato com essas toxinas e, na presença de um substrato e de uma substância cromógena, podem mudar de cor.

Diversos autores publicaram trabalhos relacionados à obtenção, padronização e aplicação de anticorpo anti-MCLR. A variante de microcistina, MC-LR, é a mais comum. Entretanto, eles se diferenciam em pontos específicos durante as etapas do ensaio imunoenzimático.

Brevemente, temos que, (i) como imunógeno utilizamos a toxina íntegra (sem modificação sintética) conjugada à proteína carreadora cationizada *mc*KLH (MCLR-*mc*KLH), (ii) como modelo animal utilizamos coelho (anticorpo policlonal) e camundongo (anticorpo monoclonal), (iii) no ensaio ELISA indireto para titulação de lgG, tanto em coelho quanto em camundongo, utilizamos placa Corning<sup>®</sup> high binding (EUA), sensibilizada com MCLR conjugada ao cBSA (MCLR-cBSA), (iv) como solução de bloqueio utilizamos Caseína 2,5%, (v) no ensaio ELISA competição indireto a placa é sensibilizada com MCLR sem conjugação e, a amostra contendo a toxina e o anticorpo policlonal diluídos são pré-incubados durante 20min a 37°C e, a placa contendo o imunocomplexo formado é incubada logo em seguida.

A grande maioria dos ensaios por ELISA descritos, além de não descreverem a reatividade do anticorpo obtido frente à toxina nodularina (toxina com estrutura semelhante à microcistina), também não avaliaram a influência do metanol no ensaio, visto que este solvente pode estar presente no processo de extração de amostras e, em alguns casos, interferir na detecção como falso positivo.

Alguns artigos relatam na literatura métodos moleculares que detectam a presença de cianobactérias com potencial genético para produção da microcistina independente de sua categoria taxonômica. Este método apesar de ser bem

sensível e de necessitar de pequena quantidade de amostra, baseia-se na detecção de cianobactéria, podendo esta ser tóxica ou não (patente nacional PI 0400576-7).

Existe também outro kit de modelo de utilidade chinesa (patente internacional CN 201183798) que determina se uma parte do corpo de peixes de água doce contém toxina como, por exemplo, a microcistina. Este ensaio baseia-se no nível de expressão gênica que codifica uma enzima que promove remoção de toxinas no corpo de peixes. Esse tipo de teste apresenta limitação de ser aplicado somente em tecidos de peixe e não em água, que é onde a toxina se encontra com maior freqüência.

FISCHER *et al.* (2001) desenvolveu um ensaio ELISA competição indireto para detecção de microcistina. Este ensaio baseia-se (i) na utilização de anticorpo policional obtido em ovelha, sendo o imunógeno uma região da microcistina sintetizada, modificada e conjugada ao BSA (BSA-ADDA), cBSA (cBSA-ADDA) ou OVA (OVA-ADDA), (ii) a placa de ELISA utilizada no ensaio é a placa Nunc (MaxiSorp Immuno<sup>TM</sup>Plates, Dinamarca) sensibilizada com OVA-ADDA ou BSA-ADDA, (iii) como reagente de bloqueio é utilizada solução de OVA e/ou BSA 1% e, (iv) a amostra contendo a toxina e o anticorpo policional diluídos são acrescidos diretamente à placa e incubados durante 2h a temperatura ambiente.

SHENG *et al.* (2006) elaborou um imunoensaio ELISA competição direto (placa sensibilizada com anticorpo policional) para detectar microcistina e sua variantes em água. Apesar de o ensaio ter apresentado boa recuperação e confiabilidade, o autor também utiliza (i) como imunógeno a toxina MCLR modificada pelo acréscimo de um grupamento amino (NH<sub>2</sub>) na molécula antes de ser conjugada ao BSA e, (ii) no ensaio ELISA indireto para titulação de IgG em coelho a placa Nunc (MaxiSorp Immuno<sup>TM</sup>Plates, Dinamarca) é sensibilizada com MCLR-OVA por 0,5h a 37°C.

Em suma, as principais diferenças observadas entre os trabalhos publicados estão:

(i) modelo animal: galinha (McDERMOTT *et al.*, 1995), camundongo (PYO *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2007) ou coelho (CHU *et al.*, 1989; AN & CARMICHAEL, 1994;
BAIER *et al.*, 2000; METCALF *et al.*, 2000; MIKHAILOV *et al.*, 2001; MHADHBI *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2006).

(ii) imunógeno: MCLR conjugada ao cBSA (MCDERMOTT *et al.*, 1995), MCLR conjugada ao BSA sem cationização (MHADHBI *et al.*, 2006), MCLR conjugada ao

EDA (BSA modificada) ou PLL (Poli-L-lisina) (CHU *et al.*, 1989; AN & CARMICHAEL, 1994), MCLR modificada ao BSA (MIKHAILOV *et al.*, 2001; BAIER *et al.*, 2000; SHENG *et al.*, 2007)

(iii) solução de bloqueio: PBS (McDERMOTT *et al.*, 1995), gelatina (CHU *et al.*, 1989; AN & CARMICHAEL, 1994), leite desnatado (Molico, Nestle<sup>®</sup>, Brasil) (YOUNG *et al.*, 2006), solução de OVA (PYO *et al.*, 2005; MHADHBI *et al.*, 2006; SHENG *et al.*, 2007), solução de BSA (BAIER *et al.*, 2000; METCALF *et al.*, 2000).

(iv) princípio de reação: ELISA competição indireto com anticorpo marcado (McDERMOTT *et al.*, 1995), ELISA indireta (CHU *et al.*, 1989; MHADHBI *et al.*, 2006), ELISA competição direto (AN & CARMICHAEL, 1994), ELISA competição indireto (BAIER *et al.*, 2000; METCALF *et al.*, 2000; MIKHAILOV *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 2006; SHENG *et al.*, 2007), ELISA competição com MCLR marcada (MATHYS *et al.*, 2004; PYO *et al.*, 2005).

#### 2.1 Poluição das águas

x \* Cax \* \* Co \* \* \* \* \*

A água é o elemento fundamental da vida e sua importância para a manutenção e sobrevivência dos organismos terrestres é inegável. O desenvolvimento das cidades, a crescente expansão demográfica (há 2000 anos a população mundial correspondia a 3% da população atual) e industrial observada nas últimas décadas têm aumentado a demanda de água doce de boa qualidade. O aumento da poluição doméstica e industrial criou condições ambientais inadequadas, propiciando o desenvolvimento de doenças, poluição do ar, aumento da temperatura, e o comprometimento das águas de rios, lagos e reservatórios. A disponibilidade de água doce na natureza é limitada e sua obtenção para o consumo humano de fontes menos convencionais tais como poços artesianos e destilação da água do mar são de alto custo (SIVONEN & JONES, 2003).

O termo poluição da água pode ser entendido como uma alteração de suas características por quaisquer ações ou interferências, sejam elas naturais ou provocadas pelo homem. Existem vários tipos de poluição, os principais são (BAIRD, 1999):

(i) Poluição natural - É o tipo de poluição não associada à atividade humana, causada por chuva, escoamento superficial, salinização, decomposição de vegetais e animais mortos.

(ii) Poluição industrial - Referem-se aos resíduos gerados nos processos industriais de uma maneira geral.

(iii) Poluição urbana - É aquela proveniente da população urbana, que gera esgoto doméstico lançado direta ou indiretamente nos corpos d'água. O esgoto doméstico contém, além de matéria orgânica, sabões e detergentes, sendo considerado um dos principais fatores de poluição de águas em regiões densamente povoadas.

(iv) Poluição agrícola - Decorrente de atividades ligadas à agricultura e pecuária por meio de defensivos agrícolas, fertilizantes, excrementos de animais e erosão.

#### 2.2 Floração algal e cianotoxinas

A principal espécie entre as algas tóxicas que poluem as águas está a *Microcystis aeruginosa*, a qual faz parte da Ordem *Chroococcales*, família *Chroococcaceae*. Apresenta colônias formadas por poucas ou centenas de células, podendo apresentar morfologia variada, tais como arredondada, alongada, lobulada ou irregular; células esféricas, sempre com aerótopos, irregularmente distribuídas na bainha de mucilagem, composta principalmente por polissacarídeos (**Figura 1C**).

As cianoabactérias são organismos procariontes, isto é, não possuem núcleo verdadeiro. Além disso, não têm conteúdo celular diferenciado dentro de membranas, formando estruturas como plastos e mitocôndrias. Por não terem núcleo nem estruturas definidas, esses organismos são semelhantes às bactérias, daí o nome cianobactéria. Portanto, as cianobactérias se assemelham às algas por apresentarem clorofila-*a* (pigmento fotossintético) e por serem organismos fotossintetizantes (produtores de oxigênio). Ao mesmo tempo se assemelham às bactérias por serem procariontes com reprodução assexuada. As formas coloniais da espécie *Microcystis sp.* (**Figura 1B**) multiplicam-se pela fragmentação da colônia através da divisão celular simples (SANT'ANNA *et al.*, 2004).

A floração algal ou eutrofização (**Figura 1A**) tem como significado o crescimento acelerado da biomassa vegetal (fitoplâncton e plantas aquáticas) decorrente do aumento da concentração de nutrientes e matéria orgânica num ecossistema aquático, entre eles os fosfatos e nitratos. A eutrofização pode ser de origem natural ou artificial. Na eutrofização natural os nutrientes são trazidos pelas chuvas que lavam a superfície terrestre, ocasionando a lenta e gradual eutrofização dos corpos d'água. Na eutrofização artificial, também chamada de eutrofização antrópica, há um aceleramento do processo, com interrupção dos ciclos biológicos e químicos. A utilização desta água sem um tratamento eficaz pode trazer efeitos nocivos à saúde (BAIRD, 1999).





Florações superficiais que formam "natas" e que podem mudar a coloração da água (verde ou marrom) são compostas por cianobactérias que possuem aerótopos (vesículas gasosas) em suas células, possibilitando a flutuação e permanência na superfície. Embora presentes em grandes quantidades, algumas espécies de cianobactérias também com aerótopos não formam "natas" e nem tornam a água esverdeada em virtude de não possuírem bainhas mucilaginosas que agregam e mantêm os organismos juntos. Portanto a água que apresenta aspecto claro, não necessariamente significa ausência de altas densidades de cianobactérias. Estas florações podem conferir gosto (de capim) e odor desagradáveis à água devido aos metabólitos presentes, como a geosmina e o metilisoborneol (MBI) (SOUZA & CARVALHO, 2006).

Vários problemas de saúde humana, após o contato com águas com cianobactérias em floração, foram reportados mundialmente em atividades recreacionais ou pelo consumo de águas de reservatórios contaminadas (CODD *et al.*, 1989; ELDER *et al.*, 1993; CARMICHAEL, 1994).

As algas se desenvolvem muito rapidamente. Elas utilizam a luz solar, o dióxido de carbono  $(CO_2)$  e a água durante o processo de fotossíntese (com

liberação de O<sub>2</sub>) ou para produzir matéria orgânica. Quando morrem, é consumido por bactérias ou pelo zooplâncton, que convertem a matéria orgânica, de novo, em CO<sub>2</sub>, liberando na água os nutrimentos do fitoplâncton, utilizando oxigênio. Este processo é chamado remineralização e tem lugar, principalmente, nas águas superficiais. As cianobactérias (também chamadas *blue-green algae*) são organismos muito discutidos, tanto pela capacidade de alguns gêneros de converter N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub>, como por serem provavelmente, um dos primeiros organismos responsáveis pela geração de O<sub>2</sub> na atmosfera terrestre. Elas são algas unicelulares que podem habitar vários ambientes em função da sua pouca exigência nutricional (energia luminosa, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, água e alguns minerais), sendo encontradas tanto em água continental como salobra (SVERCK *et al.*, 2004; VIDOTTI *et al.*, 2004). Para se desenvolver, o fitoplâncton precisa de alguns nutrientes, tais como:

(i) Fósforo. As principais fontes humanas de fósforo são os detergentes e as águas dos esgotos. A melhoria das técnicas de tratamento das águas usadas e a utilização de detergentes sem fosfato permitiram limitar hoje, a introdução de fósforo nos rios e nos mares.

(ii) Nitrogênio. A maior parte das células de fitoplâncton não consegue captar o nitrogênio que se encontra no ar (N<sub>2</sub>), porém ela pode estar presente sob a forma de nitrato(NH<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Assim, o plâncton vegetal se desenvolve até esgotar todo o nitrogênio e todo o fósforo disponíveis. Na maior parte dos oceanos, é o nitrogênio quem se esgota primeiro e diz-se que o desenvolvimento do plâncton é limitado por ele.

(iii) Vestígios de metais. O fitoplâncton necessita de poucas quantidades de metais, tais como o ferro, o cobre, o zinco e o cobalto. Em grandes regiões dos oceanos, o ferro não se encontra em quantidades suficientes para que o fitoplâncton se desenvolva.

O fitoplâncton pode ser responsável por alguns problemas ecológicos quando se desenvolve demasiadamente. Em uma situação de excesso de nutrientes e de temperatura favorável, estes organismos podem se multiplicar rapidamente formando o que se costuma chamar de florescimento (ou "bloom", a palavra inglesa mais usada). Numa situação destas, a água fica esverdeada (dependendo da temperatura), se tornando acastanhada quando o plâncton esgota os nutrientes e começa a morrer. Nessa altura, a decomposição mais ou menos rápida dos organismos mortos pode levar ao esgotamento do oxigênio na água e, como conseqüência, à morte em massa de peixes e outros organismos. Esta situação pode ser natural, no caso de um afloramento intenso, mas pode também ser devida a uma situação de poluição causada pela descarga de excesso de nutrientes na água. Neste caso, diz-se que aquela massa de água se encontra eutrofizada.

A grande maioria das cianobactérias é de água doce (água continental), onde podem viver no plâncton (comunidade de organismos que vivem em suspensão) e/ou perifiton (comunidade de organismos que se aderem às superfícies de pedras e plantas). Algumas condições físicas e químicas do local de coleta podem interferir diretamente no desenvolvimento da comunidade fitoplanctônica, tais como pH, temperatura, transparência e concentração de nutrientes.

Muitas espécies podem biosintetizar toxinas, aumentando ainda mais o risco à população (CARMICHAEL, 1994). Os incidentes toxicológicos relacionados com as cianotoxinas incluem intoxicações de seres humanos e animais, trazendo como conseqüência, morte de gado, animais selvagens, animais domésticos e até humanos em todo o mundo (TURNER *et al.*, 1990; HUMPAGE *et al.*, 1994; CODD *et al.*, 2005).

Entre as espécies de cianobactérias que produzem cianotoxinas estão *Anabaena, Oscillatoria* (conhecida também como *Planktothrix*), *Nostoc, Microcystis* e *Synechocystis* (CARMICHAEL, 1994). Muitos incidentes toxicológicos, incluindo intoxicações humanas e animais, têm sido reportados em todo o mundo incluindo América do Norte, Austrália, China, Europa e Brasil (POURIA *et al.*, 1998). O envenenamento hepático causado pela ingestão de água contendo cianobactéria (produtora da toxina nodularina) foi primeiramente observado no lago Alexandrina, sul da Austrália em 1878 (COOD *et al.*, 1989).

Em 1988, durante a construção do Reservatório Dam em Itaparica, região de Paulo Afonso, Estado da Bahia, ocorreram mais de 2000 casos de gastroenterite, resultando em 80 mortes em um período de 42 dias. Dados clínicos sugeriram que a irritação gastrointestinal não foi causada por agentes como *Vibrio cholerae, Shigela, Yersinia e Campylobacter*, mas, provavelmente por toxinas de cianobactérias (gênero *Microcystis sp. e Anabaena sp.*), as quais causam gastroenterites e estariam presentes na água do Rio São Francisco tratada com sulfato de cobre. Este caso ficou conhecido como o primeiro caso de contaminação por toxinas de cianobactérias de cianobactérias em humanos no Brasil (SIVONEN & JONES, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 1993).
Informações recentes referentes ao Brasil relatam a presença de florações de cianobactérias pelo aumento de nutrientes nas águas causando problemas de saúde pública (DOMINGOS *et al.*, 1999; SANT'ANNA *et al.*, 2004). Outro fato que ressaltou a importância do monitoramento de algas e suas toxinas nas águas foi o acidente ocorrido em fevereiro, 1996, cidade de Caruaru-PE, citado na introdução deste trabalho (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2002).

As cianotoxinas são metabólitos secundários das cianobactérias que causam efeito deletério em tecidos, células ou organismos. Pelo fato de serem solúveis em água (hidrofílicas), as microcistinas e nodularinas não são capazes de penetrar diretamente na membrana lipídica de animais, plantas e paredes celulares de bactérias. Em ambientes aquáticos, essas toxinas podem permanecer no interior celular da alga ou serem liberadas para o ambiente com a lise celular (CARMICHAEL, 1994; SIVONEN & JONES, 2003).

Os mecanismos de ação das cianotoxinas são diversos, podendo ser hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas, promotoras de inibição da síntese de proteínas ou alteração no sistema imune (KUJBIDA *et al.*, 2006).

#### 2.3 Aspectos gerais da microcistina e nodularina

Dentre as hepatotoxinas, as mais representativas são as microcistinas, heptapeptídeos cíclicos que foram responsáveis pelo primeiro relato toxicológico relacionado com cianotoxinas envolvendo humanos. Atualmente, mais de 90 variantes de microcistinas são conhecidas na literatura sendo isoladas tanto de florações como de culturas de laboratório (ZECK *et al.*, 2001a).

As microcistinas, produzidas pelo gênero *Microcystis*, são peptídeos cíclicos e apresentam como estrutura geral a seguinte seqüência de aminoácidos (**Figura 2** e **3A**): ciclo-(D-Alanina<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-L-Y<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glutamato<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>), onde X e Y são aminoácidos variáveis, D-MeAsp refere-se ao aminoácido acido D-eritro- $\beta$ -metilaspartico e, Mdha refere-se ao *N*-metildehidroalanina (Zeck *et al.*, 2001b).

As diferenças estruturais entre as variantes das microcistinas têm sido reportadas nos seus sete aminoácidos, sendo as mais freqüentes substituições nos L-aminoácidos nas posições 2 e 4 e desmetilação de aminoácidos nas posições 3 e/ou 7 (SIVONEN & JONES, 2003). A **Figura 2** mostra a estrutura química geral das microcistinas. A variante mais comumente encontrada na natureza é a microcistina-

LR (MCLR). As variantes YR (MCYR), RR (MCRR) e LA (MCLA) são encontradas em menor freqüência, quando comparada à MCLR.

A MCLR apresenta este nome em decorrência da presença de uma leucina (localizada na posição R2) e uma arginina (localizada na posição R4) em sua estrutura. A MCRR apresenta uma arginina localizada na posição R2 e outra na posição R4. A MCYR apresenta uma tirosina (posição R2) e uma arginina (posição R4), enquanto que MCLA apresenta uma leucina (posição R2) e uma alanina (posição R4).



Figura 2. Estrutura da química da microcistina. Fonte: ZECK et al. (2001a).



Figura 3. Estrutura da química da microcistina-LR (A) e nodularina (B). *Fonte:* SIVONEN & JONES, 2003.

A estrutura química na toxina nodularina (NOD) apresentada na **Figura 3B**, é muito semelhante à microcistina, diferenciando-se apenas por ser um pentapeptídeo,

e não um heptapeptídeo como a MCLR. As nodularinas, produzidas pelo gênero *Nodularia*, também são peptídeos cíclicos e apresentam como estrutura geral a seguinte seqüência de aminoácidos:

ciclo-(D-MeAsp<sup>1</sup>-L-Arginina<sup>2</sup>-Adda<sup>3</sup>-D-Glutamato<sup>4</sup>-Mdhb<sup>5</sup>), onde Mdha refere-se ao aminoácido *N*-metildehidrobutirina (SIVONEN & JONES, 2003).

As nodularinas são predominantemente encontradas no ambiente marinho e em água salobra (COOD, 2005).

## 2.4 Mecanismo de ação das toxinas no organismo

As toxinas produzidas pelas cianobactérias são predominantemente hepatotóxicas ou neurotóxicas (CARMICHAEL, 1994).

Embora doenças humanas atribuídas a MCLR e NOD estejam relacionadas à gastroenterites e reações alérgicas, o alvo primário da toxina é o fígado, onde o desarranjo do citoesqueleto conseqüente da inibição das enzimas fosfatases 1 e 2 A (PP1 e PP2A), causa hemorragia intrahepática maciça (AN & CARMICHAEL, 1994).

A microcistina purificada é estável a irradiação solar, porém a irradiação na presença de pigmentos contidos no interior da cianobactéria decompõe significantemente a toxina por isomerização da dupla ligação presente na cadeia lateral do aminoácido Adda (TSUJI *et al.*, 1995). Este aminoácido presente na molécula de microcistina (**Figura 2**) é essencial para a expressão da atividade biológica e, a estereoquímica referente à dupla ligação, por exemplo, resulta numa diminuição da sua toxicidade. Essas toxinas foram facilmente decompostas pela luz UV em comprimentos de onda próximos à absorção máxima da toxina, dependendo da intensidade desta luz empregada. Em outras palavras, a MCLR é decomposta totalmente por uma intensidade de irradiação de 2550 µW/cm<sup>2</sup> após 10 minutos sob luz UV. Porém, ao serem submetidas a irradiações fracas, observou-se uma isomerização no grupamento Adda presente na microcistina, tornando-a menos hepatotóxica e diminuindo sua atividade de inibição de fosfatase (TSUJI *et al.*, 1995; DAWSON, 1997).

A água quando tratada com cloro é capaz de eliminar as células algais, porém com conseqüente liberação da toxina na água, sendo esta concentração de cloro insuficiente para inativar a microcistina. Processos de tratamento convencional, como o tratamento com carvão ativado, não removem completamente a microcistina da água (LAMBERT *et al.*, 1996).

A maioria das variantes de microcistina e nodularina são altamente tóxicas em uma faixa de 50 a 300 ug.kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo), via intra-peritoneal (i.p.) (SIVONEN & JONES, 2003). Atualmente algumas variantes de microcistina tóxicas foram identificadas. Em geral, uma modificação estrutural na região Adda-Glutamato ou uma isomerização da cadeia Adda ou uma acilação do glutamato, pode reduzir a toxicidade de ambas as toxinas, microcistina e nodularina. Em sua forma linear, são 100 vezes menos tóxicas que o mesmo composto em sua forma cíclica (HARADA *et al.*, 1991).

#### 2.5 Quadro clínico das toxinas no organismo

As microcistinas podem causar intoxicações agudas ou crônicas e, dependendo da dose ingerida, provocar a morte do animal em horas ou dias. No quadro clínico apresentado por animais de experimentação são observados fraqueza, palidez, ereção de pêlos, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarréia. A microcistina tem o fígado como alvo, causando lesão no citoesqueleto, necrose, hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico com o consegüente aumento da relação fígado/peso corpóreo de 5% para cerca de 8-10% (SOUZA & CARVALHO, 2006). Microscopicamente são observadas invaginações nos hepatócitos, com desarranjo da estrutura lobular e sinusoidal do fígado. A inibição das fosfatases leva a uma fosforilação das proteínas do citoesqueleto e das proteínas associadas (αactina e talina), com consegüente redistribuição das mesmas. Estudos utilizando fígado de rato demonstraram que o colapso dos microfilamentos de actina precede o deslocamento das proteínas associadas (MARCÍAS-SILVA et al., 1994). A morte dos hepatócitos pode ocorrer em decorrência do choque hemorrágico dentro de poucas horas após altas doses de toxina. A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere que 1 µg/L seria a concentração máxima que poderia estar presente na água para consumo humano (SIVONEN & JONES, 2003).

A microcistina não é um composto permeante celular e seu transporte para dentro da célula é mediado por um carreador, tendo como conseqüência a inibição protéica serina/treonina (PP1 e PP2A). Esta interação toxina-fosfatase é muito forte, e a ligação é essencialmente estequiométrica. A MCLR apresenta uma afinidade crescente pelas fosfatases PP2C, PP1, PP2B e PP2A. Tanto a MCLR quanto a MCLA inibem a fosfatase PP3 com um potencial similar àquele observado contra as fosfatases do tipo PP1 e PP2A. A natureza da interação da microcistina com essas proteínas tem sido recentemente elucidada. A inibição da atividade enzimática é resultado de uma interação inicial não-covalente, ou seja, inclui o aminoácido hidrofóbico Adda presente na cadeia lateral da microcistina e o grupamento carboxílico presente no glutamato. Uma segunda ligação covalente ocorre entre o carbono do resíduo *N*-metildehidroalanina da microcistina com o grupamento tiol da cisteína-273 presente na enzima fosfatase PP1 ou cisteína-266 da PP2A. A formação da ligação covalente não é essencial para a inibição da atividade enzimática, embora uma redução na afinidade pela microcistina possa ser observada em decorrência de uma mutação no aminoácido cisteína-273 por uma leucina, alanina ou serina (DAWSON, 1997).

#### 2.6 Conseqüências da interação microcistina-fosfatase no organismo

Alguns autores propõem que o desarranjo no citoesqueleto em conseqüência da inibição das fosfatases, pode causar uma alteração no acoplamento entre a proteína G (proteína responsável pela transdução de sinal para inúmeros neurotransmissores) e a fosfolipase C (ou adenil ciclase) (NASEEM *et al.*,1991).

Dentre os efeitos relacionados à toxicidade induzida pela MCLR estão a ativação da fosforilase (que promove a redução de glicogênio hepático), redução nos níveis de glutationa e aumento nos níveis de glicose, cálcio e enzimas mitocondriais hepáticas (SSD - Soro Sorbitol Dehidrogenase e SLD - Soro Lactato Dehidrogense) (RUNNEGAR *et al.*,1991).

Experimentos realizados em nosso grupo de pesquisa comprovaram o aumento de IL-8 em cultura de neutrófilos humanos pré-incubados com microcistina (KUJBIDA *et al.*, 2008).

Analisando os resultados obtidos por KUJBIDA *et al.* (2008), entende-se que quando as microcistinas penetram no tecido hepático, através da interação toxinafosfatase, têm-se um estímulo à produção de quimiocinas/citocinas por parte do endotélio hepático. A partir deste momento a célula endotelial é ativada, ou seja, pela presença de toxinas no interior hepático, observa-se a produção de quimiocinas IL-8 (interleucina 8) pelas células endoteliais. Esta quimiocina se liga ao sulfato de heparana presente na superfície do endotélio do vaso, recobrindo toda a superfície, sinalizando assim a migração do neutrófilo para aquele local específico.

Concomitantemente, têm-se a expressão de selectinas que se ligam a açúcares na superfície de outra célula. Para aumentar a interação leucócitoendotélio ("espraiamento" celular), têm-se a ligação de Selectina-E expressa pelo endotélio com Selectina-L expressa pelo neutrófilo. Ainda paralelamente à expressão de moléculas de adesão e, seguindo uma ordem na expressão das mesmas, as moléculas ICAM-1,2,3 (molécula de adesão intracelular) são expressas na parede do endotélio. Isso faz com que as células que contenham a integrina LFA-1 (antígeno 1 com função leucocitária), como os neutrófilos por exemplo, interajam com seus ligantes protéicos específicos (ICAM) presentes na superfície endotelial, favorecendo o recrutamento dos leucócitos.

Em outras palavras, quando o neutrófilo aproxima-se do local sinalizado pela quimiocina IL-8, ele "reconhece" a molécula de adesão (interação LFA-1 do neutrófilo com seu ligante ICAM-1 no endotélio) permitindo a finalização do rolamento leucocitário e início da transmigração, que é a passagem da célula neutrofílica do vaso para o tecido, em encontro ao antígeno (toxina microcistina).

Outro fato importante é que a toxina microcistina provoca apoptose de hepatócitos em decorrência da inibição das fosfatases (MARCÍAS-SILVA *et al.*, 1994) e, com isso têm-se a lesão de mastócitos presentes nos sinusóides hepáticos que liberam grânulos de histamina. A histamina promove uma vasodilatação, diminuição da velocidade do fluxo sangüíneo e aumento do volume sangüíneo. Em resultado a essas alterações os neutrófilos, por exemplo, começam a fluir de uma forma mais lenta. Com a vasodilatação dois processos podem ser observados. O primeiro seria que os leucócitos, que antes fluíam no centro do vaso sangüíneo, passam a margear a periferia do vaso promovendo o rolamento, como foi explicado acima. E, também com a vasodilatação tem-se a normalização da movimentação de neutrófilo.

Com isso conseguimos explicar que o acúmulo de neutrófilos no fígado ocasionado por um processo inflamatório induzido por MCLR principalmente, pode ser devido às quimiocinas derivadas de neutrófilos (IL-8), causando injúria e necrose hepática (KUJBIDA *et al.*, 2008).

Devido à rápida, irreversível e grave lesão do fígado causada pela microcistina, a terapia é quase insignificante, e o efeito profilático é crítico.

A Rifampicina, antibiótico produzido pelo *Streptomices mediterranei* é muito utilizado no tratamento da Tuberculose e outras infecções bacterianas. Além de apresentar um mecanismo protetor contra os efeitos letais da toxina, ela também previne mudanças bioquímicas e patológicas causadas pela MCLR (THOMPSON *et al.*, 1992). A ciclosporina-A também tem um efeito protetor contra a dose letal de MCLR, porém está mais relacionada à imunossupressão, onde o tempo de administração e dose de ciclosporina-A são determinantes críticos dos efeitos quimioprotetores (HERMANSKY *et al.*, 1990).

Em camundongos, por via intra-peritoneal (i.p.), a LD<sub>50</sub> da MCLR varia de 36 a 122 ug.kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo); para as demais microcistinas, esses valores situam-se entre 50 e 120 ug.kg<sup>-1</sup> p.c., sendo esta variação atribuída às diferenças entre as estruturas das moléculas dessas cianotoxinas (ITO *et al.*, 1997).

## 2.7 Métodos de detecção e quantificação de variantes de microcistina

Existem na atualidade diversos métodos de detecção de variantes de microcistina em amostras ambientais, porém alguns são mais sensíveis (ELISA) (MOUNTFORT *et al.*, 2005), outros mais seletivos (LC-MS) (DAHLMANN *et al.*, 2003), outros de baixo (Bioensaio) ou alto custo (RMN e LC-MS) (BLOM *et al.*, 2001) e, outros mais viáveis e de mais fácil acesso (PP-2A - ensaio de inibição da enzima fosfatase PP-2A).

O kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA, utilizado rotineiramente, tem como princípio competição indireta. É um kit baseado em anticorpo policional obtido em ovelha. Como todo ensaio por ELISA, é um método de triagem e que não diferencia as variantes de microcistina. Este kit sofre a influência do metanol presente na solução de extração de amostras extraídas e têm como principal desvantagem, as burocracias de um processo de importação, devido à necessidade de temperatura específica para transporte e armazenamento, além do alto custo.

Um esquema que correlaciona sensibilidade e seletividade entre diferentes métodos analíticos para detecção de microcistina é mostrado na **Figura 4**.



#### Sensibilidade

Figura 4. Relação entre sensibilidade e seletividade de métodos analíticos para detecção de microcistina.

TLC (Cromatografia em camada delgada), LC-MS (Cromatografia Líquida-Espectrometira de Massas), MMPB (ácido 2-metil-3-metoxi-4-fenilbutirico), HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), ELISA (Enzime Linked Immuno Sorbent Assay), RMN (Ressonância Magnética Nuclear), PP-2A (ensaio de inibição da enzima fosfatase 2A).

Como pode ser observado na **Figura 4** acima, o ensaio por ELISA é mais sensível que o sistema por LC-MS, porém o método analítico LC-MS é mais seletivo (SIVONEN & JONES, 2003).

O método por HPLC muito utilizado na detecção de variantes de microcistina (MERILUOTO *et al.*, 1997) é limitado devido à forte influência de interferentes. Esse método não é muito efetivo para análises de toxinas em amostras de água *in natura* devido à ocorrência de picos contendo impurezas. E para solucionar esse problema, é indicado um prévio *clean up* das amostras a serem analisadas por HPLC. Além da relativa sensibilidade deste método, é também comum observar picos referentes à microcistinas que coeluem em um mesmo tempo de retenção (microcistinas de polaridade muito próximas), dificultando, portanto, a identificação das mesmas. Neste caso devem ser adaptadas as fases estacionária e/ou móvel do sistema cromatográfico para que haja uma separação dos picos em tempos de retenção diferentes (LI *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm demonstrado que os ensaios de inibição da enzima fosfatase (PP-2A) têm sua resposta alterada frente às diversas variantes de microcistina, dependendo da sua toxicidade (MOUNTFORT *et al.*, 2005).

Apesar dos métodos por HPLC e LC-MS detectarem microcistinas individualmente com alta seletividade e acurácia, eles necessitam de uma análise prévia, ou seja, de uma corrida analítica dos padrões de toxina disponíveis (MOUNTFORT *et al.*, 2005) ou de cepas comprovadamente produtoras da toxina a ser analisada, para que sejam quantificadas outras amostras através de uma curva de calibração estabelecida. Em outras palavras, uma amostra pode ser quantificada por HPLC baseada em uma curva de calibração construída a partir de uma concentração conhecida do padrão comercial (por exemplo, padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA). Entretanto, podemos quantificar uma amostra pelo mesmo método, porém utilizando uma cepa sabidamente produtora de determinada toxina. Neste último caso a quantidade de toxina produzida pela cepa pode variar dependendo das condições de crescimento da mesma em meio de cultura, alterando a concentração inicialmente pré-estabelecida na curva de calibração, ocasionando falsos resultados e erros de quantificação (FASTNER *et al.*, 2002).

Certa incompatibilidade entre diferentes sistemas de detecção de microcistina e nodularina, como por exemplo, entre os ensaios por ELISA e PP-2A, têm sido observadas (AN & CARMICHAEL, 1994). Este fato pode ser justificado pelo fato de que ensaios por ELISA estimam a quantidade total de microcistina e nodularina presentes na amostras, enquanto que os ensaios de inibição de fosfatase estimam a toxicidade das mesmas (MOUNTFORT *et al.*, 2005). Portanto, ensaios combinados permitem a inclusão de informações adicionais de toxicidade referente a uma amostra específica, protegendo os consumidores dos efeitos adversos das toxinas produzidas por cianobactérias na água para consumo humano e animal.

Alguns kits imunoenzimáticos para dosagem de microcistina utilizam anticorpos policionais para detecção de toxinas algais (GIL *et al.*, 1999). Já outros, empregam anticorpos monocionais. Apesar dos anticorpos policionais serem mais acessíveis economicamente, os monocionais são mais específicos.

Vários métodos de ELISA têm sido estudados na tentativa de detectar as microcistinas e nodularinas (SHENG *et al.*, 2007). Para desenvolver este tipo de teste, os anticorpos devem ser obtidos por imunização prévia de camundongos com a toxina conjugada a uma proteína carreadora de alto peso molecular, como por

exemplo, soro albumina bovina (BSA) (HERMANSON, 1996), "keyhole limpet hemocyanin" (KLH) (McDERMOTT *et al.*, 1995), poli-I-Iisina (PLL) (CHU *et al.*, 1989) ou ovalbumina (OVA) (ZECK *et al.*, 2001a,b). Obtendo o anticorpo específico (anticorpo monoclonal), pode-se desenvolver imunoensaios para detecção da toxina em amostras ambientais.

O princípio geral do ensaio por ELISA para avaliar a cinética de produção de anticorpos pelo camundongo é baseado na sensibilização da placa com a toxina, onde se acrescenta o anticorpo presente no soro do camundongo. A presença do imunocomplexo será detectada após adição de conjugado anti-IgG de camundongo (anticorpo de classe IgG marcado com HRP - peroxidase de rábano). E este, na presença do substrato produz uma cor que é lida em  $\lambda$  = 492 nm (YU *et al.*, 2002). Outro ensaio por ELISA pode ser aplicado, adicionando a água contaminada à placa

Outro ensaio por ELISA pode ser aplicado, adicionando a agua contaminada a piaca previamente sensibilizada com o anticorpo monoclonal obtido (anti-MCLR-LR) diluído em tampão carbonato/bicarbonato. Na seqüência, acrescenta-se o conjugado (que pode ser o próprio anticorpo monoclonal) marcado com peroxidase que reconhecerá o imunocomplexo fixado à placa de ELISA. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), na presença de tetrametilbenzidina (TMB) ou ortofenilenodiamino (OPD), pode ser utilizado como substrato e, o ácido sulfúrico como solução de parada da reação. A leitura pode ser feita em 450 ou 492nm, respectivamente (MIKHAILOV *et al.*, 2001).

### 2.8 Propriedades do peptídeo

Anticorpos contra peptídeos têm se tornado uma ferramenta essencial na pesquisa científica, no qual as aplicações incluem a detecção e identificação de produtos genéticos, estudos de processamento de proteínas, diagnóstico, localização protéica, determinação de sítio ativo, estudo de proteínas homólogas, purificação protéica, etc. Além de não ser um procedimento simples, durante a produção de anticorpos contra peptídeos, é importante levar em conta a aplicação do anticorpo obtido (HARLOW & LANE, 1988).

Contudo, o primeiro passo no processo é a seleção de uma seqüência apropriada do peptídeo. Se o anticorpo tiver como alvo um domínio específico, a escolha é simples. Por exemplo, em um estudo proteolítico, se o alvo for uma região N-terminal presente em uma proteína, anticorpos contra a região N-terminal de interesse pode ser obtido. Da mesma maneira, se o objetivo for monitorar um estado de fosforilação de uma seqüência específica, anticorpos contra essa seqüência fosforilada podem ser usados.

Já, se o objetivo é o de gerar anticorpos que reconhecem a proteína em seu estado nativo, o problema é mais complexo. Anticorpos anti-peptídeo vão sempre reconhecer o peptídeo. No entanto, o mesmo anticorpo pode não reconhecer uma seqüência dentro de uma proteína que está intacta e compactada. Seqüências de epítopos em proteínas geralmente consistem de 6 a 12 aminoácidos e podem ser classificados em contínuos e descontínuos.

Epítopos contínuos são compostos por uma seqüência de aminoácidos adjacentes na proteína. Neste caso, anticorpos anti-peptídeo vão se ligar a esses tipos de epítopos na proteína nativa, pois esta seqüência não está internalizada na proteína. Epítopos descontínuos consistem de um grupo de aminoácidos que não estão adjacentes, mas que estão juntamente expostos pelo dobramento de uma cadeia de peptídeo ou por justaposição de duas cadeias polipeptídicas separadas. Neste caso, anticorpos anti-peptídeo podem ou não reconhecer esta classe de epítopo, dependendo se o peptídeo usado para a geração de anticorpos tiver uma estrutura secundária similar ao epítopo e/ou se o epítopo presente na proteína tiver uma seqüência de aminoácidos adjacentes suficiente para permitir que o anticorpo se ligue com baixa afinidade (HARLOW & LANE, 1988; HERMANSON, 1996)

O método mais comum de acoplamento conta com a presença de grupos amino livres (Lis, Arg), regiões sulfidrílicas (Cis), ou grupos carboxílicos (Asp, Glu) no peptídeo. A lisina e a arginina são aminoácidos básicos com cadeias laterais longas e muito polares, o que os tornam hidrofílicos. Ambos têm cargas positivas em pH neutro. Já a cisteína contém uma sulfidrila (-SH) em sua cadeia lateral, tornando este aminoácido mais hidrofóbico comparando-o com outros aminoácidos, porém, essa sulfidrila é muito reativa e exerce papel fundamental na estrutura da proteína ao formar pontes dissulfeto. Os ácidos aspártico e glutâmico são aminoácidos hidrofílicos e possuem cadeias laterais ácidas com cargas negativas em pH fisiológico (HARLOW & LANE, 1988).

#### 2.9 Estratégias de acoplamento

Os tipos de reação de acoplamento podem empregar diferentes vias, entre elas estão a via (i) EDC (1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclorido), que reage com grupamentos amino e carboxílicos da molécula, (ii) via MBS (ácido *m*-maleimidobenzoico *N*-hidroxisuccinimida ester), que reage com sulfidrilas livres e, (iii) via *bis*-diazobenzidina, que reage com resíduos de tirosina.

## 2.9.1 Via EDC

A via EDC ou método carbodiimida é mais usado rotineiramente. A carbodiimida ativa o grupamento carboxílico presente na cadeia lateral do aminoácido do peptídeo para que este sítio possa ser acoplado ao grupamento amina primária da proteína carreadora. Os peptídeos ativados são misturados à proteína carreadora para produzir um conjugado final.

## 2.9.2 Via Glutaraldeído

O glutaraldeído é um reagente de acoplamento bifuncional, que liga dois compostos pelo grupamento amina (NH<sub>2</sub>). Ele proporciona um espaçador altamente flexível entre o peptídeo e a proteína carreadora para favorecer a apresentação ao sistema imune. Infelizmente, o glutaraldeído é um composto muito reativo e vai interagir com resíduos de Cis (Cisteína), Tir (Tirosina) e His (Histidina). O resultado é então, um conjugado pobremente definido. O método Glutaraldeído é particularmente aplicado quando o peptídeo contém somente um único grupo amino livre na região N-terminal. Se o peptídeo tiver mais de um grupo amino livre, complexos multiméricos grandes podem ser formados, os quais não são bem definidos e podem apresentar uma imunogenicidade muito variada.

## 2.9.3 Via MBS

Este éster (MBS) é um reagente heterobifuncional que pode ser usado para ligar peptídeos a proteínas carreadoras via cisteína. A reação ocorre entre o grupamento tiol do resíduo de cisteína presente no peptídeo (**Figura 5**). Se o

peptídeo não contém na seqüência um resíduo deste aminoácido, seria interessante inseri-lo na região C- ou N-terminal para que se tenha um controle da ligação do peptídeo ao carreador. Para peptídeos sintéticos é recomendado que a Cis seja inserida na região N-terminal do peptídeo se possível.



Figura 5. Modelo esquemático de conjugação pelo método MBS

O critério de escolha de uma proteína carreadora e uma conjugação ideal inclui o potencial de imunogenicidade, a presença de grupos funcionais no hapteno e as propriedades de solubilidade.

Os métodos disponíveis para acoplamento entre peptídeos e carreadores são muito variados, mas podem ser classificados dependendo do grupo funcional do peptídeo que é empregado na reação. A grande maioria dos peptídeos usados como imunógenos é sintetizado com grupamentos amino e carboxílico livres, e estes são mais comumente empregados para um acoplamento. Isto ocorre não somente porque existem diversos métodos que envolvem estes grupos disponíveis, mas também porque não é uma boa escolha modificar uma seqüência de aminoácidos, visto que isto poderia modificar a estrutura original da proteína.

A reação de conjugação da toxina MCLR á proteína carreadora pode ser realizada de duas maneiras:

(i) Via resíduo do ácido glutâmico. Os anticorpos produzidos contra o complexo reconhecem o grupo Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4(E)6(E)-dienóico), mas não o suficiente para reconhecer diferentes microcistinas. Isso gera problemas principalmente quando os dois aminoácidos variáveis são expostos em células imunocompetentes durante o desenvolvimento de uma resposta imune primária (MIKHAILOV *et al.*, 2001).

(ii) Por introdução de um grupo amino (NH<sub>2</sub>) na molécula. Isto é feito através de uma aminoetilação do resíduo N-metildehidroalanina presente na molécula da microcistina por ligação covalente. Este resíduo de aminoácido está localizado distante dos aminoácidos variáveis e do grupo Adda. Usando a aminoetilação seguida da conjugação com a proteína carreadora, pode-se obter um imunógeno capaz de induzir uma alta resposta imune específica sem uma toxicidade muito grande (MIKHAILOV *et al.*, 2001).

Um fator que freqüentemente atrapalha a conjugação quando usamos peptídeos sintéticos é o método de acoplamento do peptídeo à proteína carreadora. O mais importante é garantir que o peptídeo será apresentado ao sistema imune de uma maneira muito similar ao que ele seria apresentado por uma proteína nativa (natural). Por exemplo, seqüências N-terminal poderiam ser acopladas em regiões C-terminal de aminoácidos e vice-versa. Outro fator importante que deve ser considerado é quando se trata de proteína empacotada, no qual algumas seqüências internas terminais são abundantes em acetilato e amidato, o que dificulta a conjugação, pois estas seqüências não têm cargas terminais disponíveis para que ocorra a reação.

Para realização da conjugação de haptenos, várias proteínas carreadoras têm sido usadas com sucesso, entre elas o BSA/cBSA (soro albumina bovina, soro albumina bovina cationizado, PM = 67kDa), lipossomas (lipídeos biliares), polímeros (dextran, PLL - poli-I-lisina), OVA (ovalbumina, PM = 43kDa), tireoglobulina (PM =

660kDa), KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, PM = 450 a 13000kDa) e alguns toxóides, entre eles o tetânico e o diftérico. Ocasionalmente, outras proteínas podem ser utilizadas, como a mioglobina, RSA (soro albumina de coelho) e até mesmo moléculas de imunoglobulinas (IgG proveniente de soro de bovinos ou de camundongo). Além do mais, proteínas carreadoras que apresentam alta solubilidade e um grande número de grupos funcionais são as escolhidas para a reação de conjugação a um hapteno. Quando proteínas são usadas como carreadoras na formação de um imunógeno, os conjugados podem ser injetados em qualquer animal, exceto no animal a qual deu origem à proteína carreadora. Em outras palavras, o BSA não pode ser administrado em bovinos, mesmo porque autoproteínas não induzem uma boa resposta imune, mesmo quando utilizadas como uma proteína carreadora.

O BSA (PM = 67 kDa) ou cBSA é uma proteína altamente solúvel que contém numerosos grupos funcionais disponíveis à conjugação. Mesmo após sua conjugação ao hapteno este carreador mantém sua solubilidade, com exceção quando peptídeos hidrofóbicos são submetidos à reação de conjugação. Neste caso a superfície hidrofílica da molécula pode ficar internalizada, resultando em uma precipitação.

Esta proteína carreadora apresenta 59 grupamentos amina provenientes do aminoácido lisina (sendo que somente 30 a 35 destes estão disponíveis para conjugação), 1 grupo sulfidrila livre originado do aminoácido cisteína (sendo que 17 grupos estão internalizadas dentro da estrutura tridimensional da molécula), 19 grupos fenólicos fornecidos pela tirosina e 17 grupos imidazólicos presentes no aminoácido histidina. A carga negativa do BSA é resultante da grande quantidade de grupamentos carboxílicos presente na molécula.

A presença tanto de grupamentos carboxílicos quanto de grupamentos amino na partícula de BSA faz com que ela se auto-polimerize quando em contanto com o etilenodiamino carbodiimida (EDC) durante a reação de conjugação. É sabido que, por este método, a conjugação pode ocorrer pelo grupamento amino ou carboxílico do BSA ao grupamento carboxílico ou amino do peptídeo, respectivamente (HERMANSON, 1996). E quando se tem como alvo uma região específica do peptídeo, esta aleatoriedade de conjugação pode dificultar a interpretação da conjugação, pois não se teria como fazer uma afirmação precisa do local exato da ligação. E uma das formas parciais para resolver este problema seria a cationização da proteína carreadora BSA, agora cBSA, o qual definiria que, estando assim carregada positivamente (com grupamentos amino disponíveis) a reação de conjugação ocorreria preferencialmente na região mais negativa do peptídeo (nos grupamentos carboxílicos disponíveis). Assim sendo, podemos direcionar a resposta imune induzida a uma região de interesse.

A **Figura 6** mostra um dos esquemas de cationização da proteína BSA, mediada pelo etilenodiamino. Este composto diamino apresenta uma cadeia curta e por isso minimiza os efeitos estéricos e não promove muitas interações hidrofóbicas. Na verdade o que ocorre é uma aminoalquilação, promovida pelo etilenodiamino, isto é, se tem um bloqueio dos grupamentos carboxílicos presente nas cadeias laterais dos aminoácidos ácido glutâmico e ácido aspártico do BSA, formando uma ligação amida com um grupo alquil, contendo uma amina primária terminal. Além desta modificação covalente dos ácidos carboxílicos, a ligação amida elimina o potencial negativo dos carboxilatos e acrescenta a carga positiva fornecida pela amina terminal (HARLOW & LANE, 1988; HERMANSON, 1996).



Figura 6. Esquema de cationização da proteína carreadora BSA, mediada pelo etilenodiamino.

A proteína *mc*KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), isolada de hemolinfa do molusco *Megathura crenulata*, pertence a uma grande família de proteínas respiratórias (proteína carreadora de oxigênio) conhecidas como hemocianinas, as quais são encontradas em moluscos, artrópodes e outros seres marítimos primitivos. Devido ao seu alto peso molecular (PM que pode variar de 450 a 13000 kDa), o KLH é um importante imunógeno. O grande número de resíduos de lisina disponíveis para que seja realizada a conjugação, faz do KLH a proteína carreadora mais

utilizada. Em pesquisas básicas, pequenos peptídeos podem ser acoplados ao KLH através de vários métodos de conjugação.

O KLH contém diversos grupos funcionais disponíveis para a conjugação com haptenos. Por exemplo, um mol de KLH (PM = 5000 kDa) apresenta mais de 2000 aminas provenientes de resíduos de lisina, mais de 700 sulfridrilas de resíduos de cisteína e mais de 1900 tirosinas. Este carreador é uma proteína constituída de inúmeras subunidades composta por um complexo contendo cobre quelado, e que pode apresentar diferentes estágios de agregação dependendo do pH do meio e da concentração de íon divalente (dois pares de íons localizados no sítio ativo do KLH). Em pH acima de 9,5 a proteína pode ser completamente dissociada em subunidades, enquanto que em pH 7,4 e na presença de íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> a proteína permanece em estado agregado. Em pH acima de 7,0 o KLH pode apresentar coloração azul. Já em ambiente ácido (pH abaixo de 6,5) esta cor muda do azul para verde (HERMANSON, 1996).

Acredita-se que essas proteínas apresentam uma maior imunogenicidade quando suas subunidades estão em estado dissociado, provavelmente devido à exposição adicional de sítios do epítopo ao sistema imune, o que não acontece quando uma proteína se encontra em seu estado intacto ou natural. Porém esta afirmação sofre controvérsias, pois outros pesquisadores defendem a hipótese de que complexos protéicos, que ainda não são bem definidos, podem ser altamente imunogênicos em razão de sua estrutura ser bem maior (BARTEL *et al.*, 1959).

As propriedades de solubilidade da proteína carreadora após a conjugação não representam grande importância, visto que moléculas que se precipitam podem ser altamente imunogênicas (e têm perda de toxicidade *in vivo*). Contudo, existem carreadores sintéticos que apresentam baixa imunogenicidade e, conseqüentemente, minimizam a produção de anticorpos contra ele mesmo. Quando um hapteno é acoplado a essas moléculas, a resposta imune é direcionada principalmente ao alvo desejado (ao peptídeo) e não ao carreador, diminuindo assim a presença de anticorpos inespecíficos que poderiam atrapalhar a análise da cinética de cada animal imunizado.

# 2.10 Resposta imune e seus componentes celulares após imunização via subcutânea

Para realização da fusão celular podem ser utilizados os órgãos linfóides baço e linfonodo. Estes órgãos são os principais locais para o início das respostas imunes e para ativação dos linfócitos B e para produção de anticorpos (**APÊNDICE I**).

Quando o antígeno de imunização não é uma partícula solúvel, uma fração deste antígeno injetado poderá ser encontrada nas bainhas linfóides periarteriolares, que são ricas em células dendríticas e linfócitos T. Contudo, em indivíduos previamente imunizados, os antígenos injetados formam imunocomplexos com anticorpos, e a maioria deste complexo é fagocitada e destruída. Outra pequena fração é exibida na superfície das células dendríticas e este depósito de antígenos poderá persistir por semanas ou meses, proporcionando um estímulo de longa duração para os linfócitos de memória. Os sinusóides terminam em vênulas que drenam para a veia esplênica, onde esta transporta o sangue do baço para a circulação porta. Os antígenos são transportados para os linfonodos na forma solúvel ou inseridos às superfícies das células. O destino dos antígenos, depois que estes entram nos linfonodos ainda não está esclarecido, embora as características gerais provavelmente sejam semelhantes à do baço.

As células B podem ser ineficientes para ativar as células T virgens, e seu papel como APC (célula apresentadora de antígeno) pode ser mais importante nas respostas secundárias de produção de anticorpos. Os macrófagos (abundantes na polpa vermelha do baço e na medula dos linfonodos) também atuam na captação de antígenos particulados, bem como as células dendríticas. Esses macrófagos, uma vez dentro dos tecidos linfóides podem migrar para zonas ricas em linfócitos T, estimulando o desenvolvimento de células CD4<sup>+</sup> em células efetoras (**APÊNDICE II**).

Vale lembrar que os tecidos conjuntivos da derme apresentam linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) predominantemente em uma localização perivascular, e macrófagos dispersos. Já, quando um antígeno protéico entra através da pele, as células de Langerhans ligam esses antígenos às suas superfícies podendo processá-los, como uma célula apresentadora de antígeno. E se houver um estímulo inflamatório concomitante (tarefa exercida pelo adjuvante completo de freund), as células de Langerhans migram da epiderme para os vasos linfáticos e linfonodos regionais, respectivamente (ABBAS, 2000).

Entretanto, se o antígeno protéico entra diretamente na derme, esses antígenos devem ser apresentados às células T pelos macrófagos dérmicos (**Figura 7**). A maioria das células T na derme são células efetoras ou de memória previamente ativadas. Por isso, as reações das células T a antígenos associados a macrófagos na derme poderão ser mais importantes para gerar respostas efetoras ao desafio antigênico em indivíduos anteriormente imunizados do que para iniciar respostas primárias a antígenos encontrados pela primeira vez.



**Figura 7.** Modelo esquemático dos componentes celulares que estão presentes em uma imunização via sub-cutânea. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

## 2.11 Estrutura e função das imunoglobulinas

As moléculas de anticorpos são formadas por duas cadeias pesadas (H heavy) idênticas, e duas leves (L - light) também idênticas. As cadeias pesadas determinam a classe ou isótipo das imunoglobulinas e são designadas por letras gregas: cadeia  $\gamma$  (IgG), cadeia  $\mu$  (IgM), cadeia  $\delta$  (IgD), cadeia  $\epsilon$  (IgE) e cadeia  $\alpha$ (IgA). A cadeia leve está ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfídica e as duas cadeias pesadas estão ligadas entre si por outras pontes dissulfídicas. Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas contêm uma série de unidades homólogas, repetitivas, com cerca de 110 aminoácidos, os chamados domínios, que se apresentam sob a forma de estruturas globulares devido a um dobramento na molécula, produzido por pontes dissulfídicas intracadeia (**Figura 8**).

Tanto as cadeias leves quanto as pesadas contêm regiões variáveis (V) aminoterminais (N-terminais) e regiões constantes (C) carboxiterminais (C-terminais). A cadeia pesada H é composta por um domínio variável (VH) e três ou quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4). Os isótipos IgM e IgE são os únicos que apresentam o domínio CH4. A cadeia leve L possui um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL).

As regiões variáveis são assim designadas por apresentarem variabilidade na seqüência de aminoácidos que distinguem os anticorpos produzidos por um clone de célula B de outro. A região variável de uma cadeia pesada (VH) é justaposta a uma região variável de cadeia leve (VL) para formar o sítio de combinação com o antígeno. Essas duas regiões (VH+VL) constituem o fragmento variável (Fv). Cada monômero de imunoglobulina possui dois sítios idênticos de combinação com o antígeno, sendo, portanto, bivalente (MALE, 2006).



Figura 8. Diagrama esquemático da molécula de Imunoglobulina. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

O sítio de combinação com o antígeno é formado por regiões hipervariáveis na seqüência de aminoácidos, dentro de cada região variável das cadeias H e L. E são essas regiões hipervariáveis quem compõem o sítio de combinação com o antígeno e formam uma superfície complementar à estrutura tridimensional do antígeno ligado, por isso são chamadas de DCRs (regiões determinantes da complementaridade).

A região da dobradiça é uma pequena região protéica flexível localizada entre os domínios CH1 e CH2 de certos isótipos, rica em prolina e serina. A flexibilidade dessa região permite que o anticorpo se ligue a isótipos distantes, chegando a atingir um ângulo de até 180º (ABBAS, 2000).

A maioria das funções efetoras dos anticorpos é mediada por ligações da região Fc com diferentes receptores de superfície celular e macromoléculas, tais como proteínas do sistema complemento. Os isótipos ou subclasses de anticorpos diferem na região constante C e, portanto, nas suas funções efetoras. As funções efetoras mediadas pelo isótipo IgG estão mais relacionadas à opsonização, ativação do complemento, citotoxicidade, etc. Já o isótipo IgM apresenta função primária como receptor de antígeno em células B virgens. A IgM sérica tem importante função na ativação do complemento e na neutralização. A neutralização é a única função dos anticorpos mediada inteiramente pela ligação ao antígeno e não requer a participação das regiões constantes da imunoglobulina.

A resposta imune humoral é especializada de tal maneira que, diferentes antígenos estimulam a célula B a trocar de isótipo para que ocorra a melhor defesa do organismo. A troca (*switch*) das cadeias H que ocorre durante a síntese das imunoglobulinas irá determinar a classe de imunoglobulina a ser secretada. Os primeiros anticorpos produzidos na resposta humoral são de classe IgM, subseqüentemente ocorre a troca da cadeia H e a célula passa a secretar anticorpos de outra classe, como IgG ou IgE, em camundongos. A especificidade do anticorpo (sítio combinatório) não muda com a troca de classe (**APÊNDICE II**).

2.12 Métodos imunoenzimáticos utilizados para detecção de anticorpos IgG em soro de animais (camundongo e/ou coelho)

#### 2.12.1 Método indireto

Como mostra a **Figura 9**, o método indireto é amplamente empregado para pesquisa de anticorpos, apresentando como vantagens a possibilidade de utilizar um único conjugado em diferentes sistemas e, conjugado classes específicos, para determinação de anticorpos de diferentes classes. Neste método, placas plásticas são sensibilizadas com o antígeno que, após bloqueio, reage com anticorpos na amostra. Para revelar a reação, a enzima peroxidase presente no anticorpo antiimunoglobulina de camundongo reduz o substrato, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ocasionando a oxidação do cromógeno solúvel, que passa de incolor para solução colorida, como OPD ou TMB. A reação é interrompida, e a intensidade de cor é medida em espectrofotômetro. O grau de degradação do substrato, geralmente indicado pela intensidade de cor da solução, é proporcional à concentração de anticorpo.



Figura 9. Esquema da técnica imunoenzimática, Método indireto para pesquisa de anticorpos de classe IgG.

## 2.12.2 Sistema Avidina-Biotina

O sistema esquematizado na **Figura 10** é uma técnica de amplificação, utilizada em reações de ELISA e testes de Imunofluorescência. Esse sistema é semelhante ao método indireto, diferenciando-se pelo fato de que o anticorpo secundário está ligado à biotina, e que, com uma etapa de incubação a mais, acrescenta-se a avidina marcada com a peroxidase, e só depois a reação é revelada com uma solução cromógena. A avidina é uma glicoproteína derivada da albumina do ovo e possui alta afinidade pela biotina, vitamina do complexo B. Os compostos da biotina, disponíveis no mercado, contêm o domínio quimicamente ativo, N-hidroxissuccinimida. A avidina pode ser saturada com peroxidase, sem perder sua capacidade de ligação à biotina (SANCHEZ, 2001). A biotina pode ser ligada covalentemente a um anticorpo e, em uma segunda etapa, reagir com a avidina marcada com peroxidase. Após a reação da MCLR com o anticorpo não marcado alvo, um segundo anticorpo marcado com a biotina é adicionado. Como muitas moléculas de biotina podem se ligar a um anticorpo, a adição da avidina marcada com peroxidase resulta em uma amplificação da reação enzimática.



Figura 10. Esquema da técnica imunoenzimática, Sistema Avidina-Biotina para pesquisa de anticorpos de classe IgG.

## 2.13 Isotipagem de imunoglobulinas

As imunoglobulinas de mamíferos podem diferir entre si pelo peso molecular, carga, aminoácidos e carboidratos presentes em sua estrutura (o que é pode ser observado em uma eletroforese). Em geral, a classe IgG é a que apresenta uma maior heterogeneidade quanto à sua carga, quando comparada às outras imunoglobulinas.

As subclasses de imunoglobulinas surgem após uma especiação e, as subclasses de humanos são diferentes das subclasses de outras espécies, como em rato, cabra, porco, coelho e camundongo. As diferentes moléculas de IgG nessas espécies apresentam variações quanto à sua estrutura molecular e quanto ao número de isótipos que eles trazem em seu genoma. Um exemplo seria no domínio constante da cadeia leve de IgG de coelho, o qual apresenta duas pontes

dissulfídicas dentro da cadeia (**Figura 11**). Em camundongos podemos observar as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (MALE, 2006).



Figura 11. Estrutura da cadeia polipeptídica de subclasses de IgG em camundongos. (il. color. adaptada do livro Immunology. MALE, 2006)

## 2.14 Anticorpos policional e monocional

O sangue contém uma variedade de diferentes anticorpos, cada um derivado de um clone particular de célula B, e cada um tendo uma estrutura e uma especificidade distintas para o antígeno. Apesar disso, as imunoglobulinas são estruturalmente semelhantes entre si. Todavia, a heterogeneidade molecular desses anticorpos policionais (isto é, anticorpos produzidos por múltiplos clones de célula B) interfere na determinação da seqüência dos aminoácidos que forma esses anticorpos. E por isso, dependendo do experimento em análise, o anticorpo policional pode apresentar uma aplicação limitada devido à sua múltipla especificidade para diferentes epítopos antigênicos e heterogeneidade da resposta imune humoral.

O primeiro isolamento de células homogêneas de anticorpos veio através de estudos de tumor de célula B. Populações clonais dessas células podem ser propagadas como um tumor em animais ou em expansão em cultura de células. Como todos os anticorpos secretados por clones de células B são idênticos, essas células tumorais são uma fonte de anticorpos homogêneos (HARLOW & LANE, 1988).

#### 2.15 Produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais

Em animais, os anticorpos são sintetizados primariamente por células plasmáticas, um tipo de linfócitos B diferenciados. Como as células plasmáticas não podem crescer em meio de cultura celular, elas não podem ser usadas como uma fonte de anticorpos *in vitro*.

Em 1975, KOHLER & MILSTEIN descreveram um método para imortalizar individualmente células secretoras de anticorpos a partir de um animal imunizado, permitindo a seleção de anticorpos monoclonais de especificidade definida, ou seja, de anticorpos homogêneos.

A técnica para produzir quantidades virtualmente ilimitadas de anticorpos com uma única especificidade para um determinante antigênico em particular revolucionou a imunologia. Em outras palavras, cada tumor monoclonal derivado de um único linfócito B, chamado mieloma, produz apenas anticorpos idênticos entre si. Esses tumores ocorrem espontaneamente no homem e podem ser induzidos experimentalmente por vários tratamentos em camundongos (KOHLER, 1986). A maioria dos mileomas secreta anticorpos com especificidades antigênicas desconhecidas, porque o processo de transformação que dá origem a esses tumores afeta os linfócitos B aleatoriamente e não é possível prever a especificidade de qualquer clone transformado dos linfócitos B ao acaso. Uma vez que os linfócitos B normais não conseguem crescer indefinidamente, tentativas têm se focalizado na imortalização dos linfócitos B para que produzam um anticorpo específico. Descrita em 1975, a primeira técnica a ser usada é conhecida por imortalizar os linfócitos B (KOHLER & MILSTEIN, 1975).

Este método consiste na fusão celular ou hibridização de células somáticas entre um linfócito B normal produtor de anticorpo e uma linhagem de mieloma, seguindo-se subseqüentemente a seleção de células fusionadas que secretam anticorpo da especificidade desejada, derivada da célula B normal. Essas linhagens celulares imortalizadas derivadas de fusões são chamadas de hibridomas, e os anticorpos que elas produzem são anticorpos monoclonais.

As linhagens de hibridomas podem ser obtidas por diversas técnicas de seleção. Uma delas foi através do uso da oubaína, um inibidor da enzima ATPase, enzima esta que promove a entrada K<sup>+</sup> e saída de Na<sup>+</sup> da célula. Outra forma foi através do uso de análogos purínicos sintéticos. A resistência celular frente a esses

compostos é mediada primariamente pela redução ou perda da enzima hipoxantinaguanina fosforribosiltransferase (HGPRT). Outra técnica utilizada, e que deu origem à linhagem de mieloma SP2O, foi uma alteração no cromossoma 8 que desencadeia uma deficiência na enzima adenina-guanina fosforribosiltransferase (AGPRT) (HARLOW & LANE, 1988).

Essas primeiras linhagens de células de mieloma foram obtidas a partir de um tumor induzido por injeção de óleo mineral via intraperitoneal em camundongos Balb/c, as quais foram chamadas de MOPC-1 (plasmocitomas induzidos por óleo mineral). Após serem adaptadas para sobreviver em meio de cultura e se dividirem intensamente receberam o nome de MOPC-21. Após fusão com linfócitos B, alguns desses clones eram secretores de imunoglobulina enquanto outros não, e estes últimos foram selecionados para produção de hibridomas.

Existem diversas linhagens células de mieloma (**Figura 12**), tais como P3K, P3-X63Ag8, X63-Ag8.653, SP2O/Ag-14, NSI/1-Ag4-1, FOX-NY, etc. Essas linhagens foram obtidas de tumor de camundongo, com algumas especificações particulares. A linhagem P3K, oriunda da linhagem MOPC-21, é secretora de imunoglobulina, resistente à azaguanina e HGPRT negativa (alteração no cromossoma X). Quando essa linhagem deficiente dessa enzima foi cultivada em meio seletivo contento azacerina, a síntese de purina ficou bloqueada pela *via de novo*. Essa linhagem ficou conhecida como FOX-NY (isoladas da linhagem NS1/1-Ag4-1) que são HPRT negativa e AGPRT negativa (alteração no cromossoma 8) e também sintetizam a imunoglobulina (HARLOW & LANE, 1988).



Figura 12. Árvore da família de mieloma obtida em camundongos Balb/c, a partir da linhagem MOPC21 até a linhagem SP2O. (il. color. adaptada do livro Antibodies - A Laboratory Manual, HARLOW & LANE, 1988)

Através de análises mais detalhadas, as linhagens de mieloma deveriam crescer em meio de cultura normal, ou talvez, poderiam não crescer em um meio seletivo, porque lhes faltava um gene funcional necessário para a síntese de DNA neste meio. As linhagens celulares que podem ser usadas como parceiras de fusão são criadas induzindo-se defeitos nas vias de síntese dos nucleotídeos (**Figura 13**). Na fusão de células normais com células de mieloma defeituosas o gene necessário para a sobrevida em meio seletivo é fornecido pelas células normais, de modo que somente os híbridos das células somáticas poderiam continuar a crescer nesse meio. Além disso, os genes das células de mieloma tornam esses híbridos imortais.

As células de mieloma utilizadas na fusão provêm de uma correção gênica para fazer com que essas células possam se dividir continuamente em meio de cultura *in vitro*, enquanto que as células secretoras de anticorpos provêm de genes funcionais de imunoglobulinas.

Células normais de animais sintetizam de novo nucleotídeos de purina e timidina, respectivamente, a partir do fosforribosil pirofosfato e do uridilato, em várias etapas, umas das quais consiste na transferência de um grupo metila ou formila do tetraiodofolato ativado. Drogas antifolínicas, como a aminopterina bloqueiam a reativação do tetraiodofolato, assim inibindo a síntese da purina e do timidilato. Como estas são componentes necessários ao DNA, a aminopterina bloqueia a síntese do DNA pela via de novo. As células tratadas pela aminopterina podem usar uma via de salvamento, na qual a purina é sintetizada a partir da hipoxantina fornecida hipoxantina-guanina exogenamente pelo uso da enzima fosforribosiltransferase (HGPRT), e o timidilato é sintetizado a partir da timidina pelo uso da enzima timidinocinase (TK). Por isso, se o meio de cultura for também suplementado com hipoxantina e timidina, as células crescem normalmente na presença da aminopterina (meio HAT). Entretanto as linhagens celulares (por exemplo, SP2O) poderão se tornar carentes em HGPRT se for mutagenizadas e selecionadas em quanina ou azaguanina, que são análogas de metabólitos normais do HGPRT, mas dão origem a purinas não funcionais.



Figura 13. Esquema da síntese de nucleotídeos. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

Por outro lado, as células podem se tornar carentes em TK por mutagênese. Essas células negativas em HGPRT ou em TK não podem usar a *via de salvamento* e, portanto, poderão morrer no meio HAT. Quando células normais são fusionadas com células HGPRT-negativas ou TK-negativas, as células normais proporcionam as enzimas necessárias de modo que os híbridos sintetizem o DNA e cresçam no meio HAT.

Este princípio foi aplicado à geração de hibridomas produtores de anticorpo pelo desenvolvimento de linhagens de mieloma HGPRT-negativas ou TK-negativas. As linhagens de mieloma são as melhores células para se fundir aos linfócitos B, uma vez que dão origem a híbridos estáveis mais eficientemente que outras células (ABBAS, 2000).

Na época do desenvolvimento e estudo das primeiras fusões realizadas, os pesquisadores tiveram que buscar soluções para alguns interferentes que impossibilitavam a formação de hibridomas secretores de anticorpos, tais como (i) encontrar um "parceiro" ideal para fusão, (ii) definir condições ideais para que ocorra fusão célula-célula e (iii) escolher um sistema apropriado para selecionar células híbridas contra um *background* de células não fundidas (HARLOW & LANE, 1988).

Neste trabalho de pesquisa foi fusionada uma linhagem de mieloma de camundongos (SP2O) com linfócitos presente no baço e nos linfonodos de camundongo previamente imunizado com microcistina-LR conjugada ao mcKLH. Foram selecionados os híbridos para crescimento em meio HAT. Nestas condições, as células de mieloma não fundidas morrem, porque não podem usar a via de salvamento, e as células B não podem viver mais do que uma a duas semanas, porque não são imortalizadas, de modo que só os híbridos poderão crescer. Dentre as características mais importantes da linhagem de célula de mieloma estão a capacidade deste tipo de célula não ser secretora de imunoglobulina e o uso do polietilenoglicol como agente de fusão, por sua maior facilidade técnica. As células fusionadas são então cultivadas, duplicadas e o sobrenadante de cada poco no qual as células estão crescendo é analisado por ELISA para avaliar seu comportamento frente ao antígeno solúvel no qual o camundongo foi imunizado. Uma vez identificados os poços positivos, isto é, os que contêm hibridomas produzindo o anticorpo desejado, as células são clonadas por diluição limitante no mínimo duas vezes, para garantir que em cada poço de cultura contenha somente uma única célula de hibridoma. Os clones que estão produzindo anticorpos monoclonais de especificidade única são então isolados. A fim de serem produzidas grandes quantidades de anticorpos monoclonais, os hibridomas podem crescer em grandes volumes em cultura ou como tumores ascíticos em camundongos singênicos.

### 2.16 Fatores que influenciam a fusão celular

## 2.16.1 Uso do PEG e a importância do seu pH

Os primeiros experimentos da década de 1980 para formação de hibridoma utilizavam o vírus Epstein Baar inativado pelo raio UV (GEFTER *et al.*, 1977). Mas por causa do perigo em contrair mononucleose, pesquisadores introduziram outro fusógeno químico, o PEG (polietilenoglicol 4000, Merk<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha), um agente aglutinante para protoplastos de plantas que leva à fusão celular. Comparado ao vírus inativado, o PEG aumenta o número de híbridos formados porque o vírus tem menos pontos de aglutinação na membrana da célula B (LAU *et al.*, 1977).

Hoje, a maioria das fusões utiliza o PEG esterilizado por filtração ou autoclavagem. A concentração ideal do PEG é em torno de 50%. Já o peso

molecular ótimo para monolayers e célula em suspensão é entre 1000 e 4000 (HARLOW & LANE, 1988).

SCHNEIDERMAN *et al.* (1979) relata que, se houver uma redução nos níveis de cálcio 15 minutos após a fusão com PEG, pode haver aumento nas chances de formação de híbridos viáveis.

A freqüência de hibridização é altamente dependente do pH da solução do PEG e do meio RPMI<sup>+</sup> (SHARON *et al.*, 1980).

Quando a fusão ocorre entre uma célula na metáfase e outra célula na intérfase (metáfase-intérfase), dentro de aproximadamente 30 minutos, dois fenômenos acarretam a formação de células binucleadas: a condensação cromossômica prematura (PCC) do núcleo na célula interfásica e a formação de um envelope nuclear ao redor do cromossoma da célula metafásica. A freqüência em que esses fenômenos podem ou não ocorrer dependem do pH do meio. Em pH de 6,6 a 8,0 a PCC predomina, já em pH de 8,0 a 8,5 predomina a formação do envelope nuclear. Parece que o mesmo pH que inclui a prófase no ciclo celular é o mesmo que favorece a formação da PCC em células metáfase-intérfase. Sob a mesma análise o mesmo pH que inclui a telófase e a formação do envelope nuclear normal também favorece a formação da membrana em células metáfase-intérfase. Por isso, o número máximo de clones é obtido quando a solução do PEG usada na fusão apresenta pH entre 8,0 a 8,2 (OBARA *et al.*, 1973a, b).

A fusão membrana-membrana consiste em dois estágios distintos: (i) aglutinação celular, onde as membranas plasmáticas das células adjacentes são trazidas para as proximidades e (ii) a formação de pontes de citoplasmas entre as células. Esses estágios são seguidos pelo "inchaço" celular osmótico e formação de heterocárion (dois tipos de núcleo presentes em um citoplasma comum) (HARLOW & LANE, 1988).

#### 2.16.2 Influência do DMSO

O acréscimo de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma<sup>®</sup>, EUA) 5 ou 10% ao PEG pode melhorar o número de hibridomas formados. Ele só atua como um fusógeno quando é submetido à incubação prolongada, o mesmo não ocorre em curtos períodos de incubação. Cuidados devem ser tomados quando células são expostas

ao meio contendo DMSO e HEPES, pois o DMSO permite que o tampão entre na célula resultando em morte por toxicidade celular (HARLOW & LANE, 1988).

O inchaço ou protuberância celular observados pode ser explicado porque tanto o PEG quanto o DMSO provocam uma diminuição do potencial de superfície da célula, causando uma neutralização da membrana biológica celular. E o PEG, em soluções aquosas, apresenta carga negativa fraca, tornando-o hidrofílico e levando a água para o interior celular (MAGGIO *et al.*, 1976).

O primeiro minuto após exposição ao PEG os lipídios da parede das células espalham entre si (WOJCIESZYN *et al.*, 1981). Já a mistura das proteínas de membrana não ocorre em todos os sistemas de fusão. A comunicação intercitoplasmática ocorre após quatro minutos de exposição ao PEG, onde se tem a formação de pequenas pontes (observadas somente em microscópio eletrônico). As proteínas citoplasmáticas solúveis em água não se difundem enquanto o PEG não for removido da reação. Essa mistura citoplasmática ocorre à temperatura de 37°C e é intensa nos primeiros 40 minutos pós-fusão, mas só é finalizada após 4 horas. Nos primeiros 30 minutos a membrana celular ainda se encontra "crenada" (MAUL *et al.*, 1976).

Um método também utilizado é a fusão induzida por campo elétrico e tem a vantagem de ser realizada em microscópio (BISCHOFF *et al.*, 1982; VIENKEN & ZIMMERMANN, 1982).

## 2.16.3 Fusão do DNA entre duas células diferentes com formação de um hibridoma

Durante a técnica de produção de hibridomas ocorre fusão célula-célula, isto é, fusão do DNA entre duas células de forma aleatória. A fusão ocorre praticamente ao acaso, independente da etapa do ciclo celular em que a célula se encontra naquele exato momento.

O ciclo celular é uma série de eventos desde um determinado estágio em uma célula até o estágio equivalente em uma célula filha. Por conveniência ele é dividido em vários períodos: M, S, G1 e G2 (**Figura 14**). A mitose (M) é geralmente o período mais curto do ciclo, durando aproximadamente 5 a 10% do ciclo. A síntese de DNA ocorre durante o período S. G1 e G2 são intervalos entre S e M. Juntos, G1, S e G2, constituem a interfase, o período entre as mitoses, antigamente chamada de "período de repouso". O principal ganho da mitose é que cada cromossomo no núcleo se duplica longitudinalmente, e então esta estrutura dupla se divide para se tornar dois cromossomos filhos, cada um indo para um núcleo filho diferente. A mitose produz dois filhos idênticos um ao outro e ao núcleo do qual se originaram (GRIFFITHS *et al.*, 1998). E é isso que garante a monoclonalidade dos hibridomas após clonagem final.



**Figura 14.** Estágios do ciclo celular. M = mitose, S = síntese de DNA, G = intervalo. (il. color. adaptada do livro Introdução à Genética, GRIFFITHS *et al.*, 1998)

Após a fusão celular, o sincronismo da síntese de DNA é essencial para a sobrevivência dos hibridomas, isto é, deve haver um sincronismo entre a mitose e a interfase. A fusão de células mitóticas durante a interfase promove a entrada na mitose precocemente. A cromatina do núcleo na interfase condensa, mas nesta fase os cromossomas não podem ser visualizados. Este fenômeno foi conhecido como condensação cromossômica prematura (PCC). Esta PCC ocorre logo após os primeiros 10 minutos da fusão. Elas também são separadas aleatoriamente para formar as células filhas e/ou permanecem como fragmentos da cromatina no citoplasma, os quais provavelmente são eliminados durante as mitoses subseqüentes. A PCC, que é ocasionada durante a mitose, não é observada após as primeiras 48 da fusão (HARLOW & LANE, 1988).

### 2.16.4 Presença de contaminantes celulares em meio de cultura

Os micoplasmas fazem parte de um grupo incomum de bactéria. Eles são particularmente pequenos, não apresentam parede celular e apresentam esteróis na membrana. Os micoplasmas normalmente não causam mudança no pH e nem na turbidez do meio, portanto são impossíveis de serem detectados visualmente.

Desde que a introdução de antibióticos nos meios de cultura de células minimizou o problema das contaminações bacterianas e fúngicas, os micoplasmas

passaram a ser os contaminantes detectados com maior freqüência em células cultivadas in vitro. O tecido de origem das células, os meios de cultura comercializados usados em cultivo, os soros de origem bovina (SFB), a pessoa quem as repica, assim como o aerosol que se forma, podem ser fontes de contaminação por micoplasma. A sua presença no meio pode acarretar alterações metabólicas relacionadas com alteração cromossômica (uma alteração no gene que codifica para a imunoglobulina, por exemplo). A alta incidência de contaminação nos soros bovinos deve-se principalmente, à falta de assepsia na coleta de sangue e na separação do soro e à esterilização imperfeita. Neste caso, formas viáveis de micoplasma, por serem pleomórficas, podem passar até mesmo pelos poros das membranas filtrantes de 0,22µm, porque estes podem ter seu diâmetro alterado quando grandes volumes são filtrados sob pressão. Entretanto o aquecimento dos soros de origem bovina a 56ºC durante 30 minutos, inativa micoplasma. Uma vez identificadas as culturas celulares contaminadas, sua substituição por outras livres de micoplasma é altamente recomendável, já que seu manuseio, juntamente com culturas não contaminadas, geralmente ocasiona a disseminação deste microorganismo (MIYAKI et al., 1989).

## 2.17 Validação de testes imunológicos

Os conceitos, parâmetros, procedimentos e protocolos utilizados para validação do ensaio ELISA competição utilizando anticorpo policional anti-MCLR*mc*KLH obtido em coelho foram baseadas nas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003), Instituto Nacional de Metrologia - INMETRO (DOQ-CGCRE-008 - Junho/2007), International Conference on Harmonization - ICH, e em trabalhos publicados relacionados ao tema, tais como KARNES *et al.*, 1991; NAGAJARA *et al.*, 1999; UH *et al.*, 2008.

Validação, segundo a norma ANVISA "é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos". O método aqui desenvolvido é considerado não normalizado, isto é, é aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados, como por exemplo métodos publicados em revistas técnicas, métodos de fabricantes de

equipamentos, métodos utilizando conjuntos (kits) de ensaio e instrumentos portáteis.

Segundo a Resolução da ANVISA - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, a validação de um teste imunológico deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, devem ser avaliados os seguintes parâmetros (ou figuras de mérito) especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise. Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente qualificados e calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

Os parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio, como mostra o **Quadro 1**.

	Tipo de ensaio			
Parâmetros	Qualitativo	Determinação	Análise	Propriedades
		do Principal	de	
		Componente	Traços	1 131043
Precisão		X	Х	X
Especificidade /	x	x	x	x
Seletividade	A	~	~	A
Tendência / Recuperação		X	X	X
Robustez	Х	Х	X	X
Sensibilidade /				
Linearidade / Faixa de		Х	Х	X
Trabalho				
Limite de Detecção	X		X	
Limite de Quantificação			X	

Quadro 1. Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

#### 2.17.1 Conceitos de Validação

#### 2.17.1.1 Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Uma amostra, de maneira geral, consiste em analitos a serem medidos, da matriz, e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo.

#### 2.17.1.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 6 concentrações diferentes.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

Os critérios de aceitação da curva de calibração incluem:

 (i) desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação a concentração nominal para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ); (ii) desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;

(iii) no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;

(iv) o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

## 2.17.1.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os Limites de Quantificação Superior e Inferior (LSQ e LIQ, respectivamente) de um método analítico. É estabelecido pela legislação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

## 2.17.1.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em níveis:

(i) Repetibilidade (precisão intra-ensaio): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada uma, ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

(ii) Precisão intermediária (precisão interensaio): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
A precisão de um método analítico pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas, podendo ser calculada segundo a fórmula abaixo, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 15%.

#### 2.17.1.5 Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. Em outras palavras, o limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.

#### 2.16.1.6 Limite de Quantificação (LQ)

(i) Limite Inferior de Quantificação (LIQ) - menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis, não devendo haver variação superior a 20%.

(ii) Limite Superior de Quantificação (LSQ) - maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão.

#### 2.16.1.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

#### Exatidão = <u>concentração média experimental</u> x 100 concentração teórica

A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrida) e em corridas diferentes (exatidão inter-corridas). O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

#### 2.17.1.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações (de pH, de tempo de incubação e de temperatura) dos parâmetros analíticos.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

#### 2.17.1.9 Recuperação

Defini-se como a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

#### 2.17.1.10 Reprodutibilidade

Representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo.

Dentre todas estas definições e fórmulas acima apresentadas, quando o trabalho envolve métodos bioanalíticos, alguns conceitos devem estar claros, tais como:

(i) Amostra: termo geral que abrange: controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas.

(ii) Amostra branco: amostra de uma matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado, utilizada para avaliar a especificidade do método bioanalítico.

(iii) Amostra de Controle de Qualidade (CQ): amostra de matriz biológica adicionada do analito, usada para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual.

(iv) Amostra processada: extrato final (anterior à análise instrumental) de uma amostra que foi submetida a várias manipulações (ex.: diluição, extração, concentração).

(v) Amostra desconhecida: amostra biológica que é objeto de análise.

(vi) Validação parcial: modificação no método bioanalítico validado que não requer a necessidade de uma revalidação total. (vii) Validação total: estabelecimento de todos os parâmetros de validação de um método bioanalítico, aplicáveis à análise das amostras.

## x<sup>h</sup> + Sext x h & + + + + + + + + + + + + + = 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um kit de imunoensaio para detecção de microcistina e suas variantes em amostras ambientais. Durante estes quatro anos foram obtidos tanto anticorpos monoclonais quanto policionais anti-MCLR. O ensaio ELISA competição indireto, padronizado e validado, foi fundamentado no anticorpo policional anti-MCLR obtido (**ANEXO II**).

#### 3.2 Objetivos específicos

#### 3.2.1 Análises cromatográficas

- Isolar microcistina-LR e algumas variantes de cepas algais mantidas em cultura ou de florações algais;
- Padronizar um método cromatográfico por LC-MS para análise de toxinas presentes no ambiente aquático;

#### 3.2.2 Anticorpo monoclonal anti-MCLR

- Realizar conjugação da toxina MCLR com proteínas carreadoras, tais como mcKLH e cBSA;
- Imunizar camundongos com o antígeno obtido (toxina conjugada);
- Padronizar um ensaio ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG em soro de camundongos imunizados e em sobrenadante de meio de cultura;
- Produzir hibridomas por fusão dos linfócitos (extraídos do linfonodo poplíteo e baço de camundongo imunizado) com as células de mieloma SP20;
- Clonar os linfócitos secretores de imunoglobulina (IgG) pela técnica de diluição limitante;
- Determinar os isótipos dos anticorpos monoclonais;
- Avaliar a estabilidade dos clones (congelamento/descongelamento);

- \* Purificar esses anticorpos por cromatografia de afinidade;
- Caracterizar e analisar a reatividade dos anticorpos monoclonais obtidos frente às variantes de microcistina;
- Delinear os anticorpos monoclonais mais relevantes;

#### 3.2.3 Anticorpo policional anti-MCLR

- \* Imunizar coelho com MCLR conjugada ao mcKLH;
- Avaliar a resposta imunológica do animal imunizado por ELISA, através da titulação de anticorpos IgG anti-MCR em soro de coelho por ELISA;
- Purificar soro do animal imunizado;
- \* Titular o anticorpo policional;
- Avaliar a especificidade do anticorpo obtido frente às variantes de microcistinas;
- Padronizar e validar um método por ELISA competição indireto para detecção e quantificação de microcistina e/ou nodularina em amostras de água;
- Avaliar os parâmetros de validação, tais como Limite Inferior de Quantificação, Especificidade e Seletividade, Recuperação, Linearidade, Precisão e Exatidão, Robustez.
- Determinar a presença de variantes de microcistina e/ou nodularina em amostras de água para consumo humano, amostras ambientais e de meio de cultura;
- Comparar resultados obtidos de quantificação de toxinas algais utilizando dois kits ELISA competição, kit validado em nosso trabalho e kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA.

#### 4.1 Obtenção da microcistina

\*\*\* あまなからななない

A MCLR foi obtida a partir de três fontes: padrão Sigma<sup>®</sup> (EUA), meio de cultura e amostras de floração. Culturas de *Microcystis panniformis* (cepa BCCUSP 100) foram mantidas no laboratório da Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (Departamento de Bioquímica da ESALQ-USP). A produção desta toxina pela referida cepa, já foi comprovada por ensaios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2005). As microcistinas obtidas de meio de cultura demandaram tempo de crescimento e pouco rendimento. Por isso, buscamos alternativas para aumentar a obtenção de toxina, como por exemplo, em florações que continham MCLR. Além destas culturas, juntamente com a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-SP) e outras colaborações como o Projeto Barco Escola da Natureza (Americana-SP) e Praia de Sales (Sales-SP) foram realizadas coletas de microalgas durante a ocorrência de florações.

#### 4.1.1 Manutenção da cepa BCCUSP 100 em meio de cultura BG11

O meio de cultura BG11 foi preparado segundo RIPPKA *et al.* (1979) com algumas modificações, como mostra a **Tabela 1**. A cepa BCCUSP 100 foi mantida em meio de cultura pH 7,4 em incubadora refrigerada (modelo TE-401 - Tecnal<sup>®</sup>, Brasil), fotoperíodo com intervalo de 12 horas claro/escuro, intensidade luminosa de 30 a 50µmol de luz e temperatura de trabalho de 22°C.

Tabela 1. Componentes do Meio BG11		
Flementos	Concentração	
Liementos	final (g/L)	
EDTA	0,001	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,006	
NaNO <sub>3</sub>	1,500	
$KH_2PO_4.3H_2O$	0,040	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	
Ácido Cítrico	0,006	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,020	
Solução de Oligoelementos	0,001	

4.1.2 Extração de microcistina-LR a partir do meio de cultura BG11

Um volume de 20L de cultura de Microcystis panniformis, obtido na ESALQ (Departamento de Ciências Biológicas - USP Piracicaba) foi centrifugado (12857g, 20min, 4°C) e o sedimento foi congelado para posterior extração na FCF-USP (BARCO et al., 2005). A partir de 24,5g de extrato úmido, as microcistinas foram extraídas em balão volumétrico com 200mL de MeOH:TFA 0,1% (v:v) pH 7,4 em ácido acético. O material foi sonicado (20kHz) em banho de gelo por 90min com homogeneização a cada 10min. O extrato foi centrifugado (4629g, 10min, 4°C) e o sedimento foi re-extraído de acordo com o procedimento descrito acima. O sobrenadante foi evaporado em rota-evaporador e em SpeedVac<sup>®</sup> (BocEdwards, Brasil), para retirada do MeOH:TFA e da água, respectivamente. O material seco foi ressuspendido em 3mL de acetato de etila e aplicado em uma coluna previamente empacotada com sílica (20x5cm, Sílica Gel Keiselgel 60, Merk®, Darmstadt, Alemanha). A coluna foi equilibrada com acetato de etila e os passos de eluição foram: 120mL de acetato de etila, 40mL de acetato de etila:MeOH (1:1), 120mL MeOH 100% e 450mL de MeOH 50%. A fração MeOH 100% foi seca (utilizando equipamentos acima descritos) e ressuspensa em 1mL da fase móvel e depois repurificados por HPLC equipado com bombas LC-10AD, detector PDA-SPD 10AV e controlador de sistema SCL-10Avp (Shimadzu Corporation<sup>®</sup>, Japão). 500µL da amostra foi injetada em HPLC composto pela coluna semi-preparativa (Phenomenex, Luna C<sub>18</sub>, 5µm, 250x10mm). A fase móvel utilizada foi tampão acetato de amônio 20mM (pH=5)/ACN (27% em acetonitrila). A corrida isocrática teve 30min de corrida, em fluxo de 4,7mL.min<sup>-1</sup>. A detecção foi fixada em  $\lambda$  = 238 nm com o detector PDA. As curvas de calibração foram obtidas com o padrão de MCLR (Sigma<sup>®</sup>, EUA) e com a toxina isolada da cepa de *M. panniformis* BCCUSP 100 (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

#### 4.1.3 Extração de microcistina-LR a partir de florações

Análises de amostras de florações foram feitas para identificação e posterior concentração da MCLR. As microcistinas foram extraídas 3 vezes com 8mL de metanol acidificado (MeOH: ácido acético 0,1%, v:v) e submetidas à probe ultrassônica por 1min a 4°C (20kHz). O extrato foi centrifugado (3214g, 10min) e o sobrenadante foi evaporado em SpeedVac<sup>®</sup> (BocEdwards, Brasil). O precipitado foi ressuspendido em 1mL de água e eluído em cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters Technologies Corporation<sup>®</sup>, Massachusetts, EUA). Os passos de précondicionamento incluem ativação e lavagem com MeOH (3mL) e H<sub>2</sub>O (3mL) e os passos de eluição foram (i) 3mL de MeOH 25% e (ii) 3mL de MeOH. As microcistinas foram encontradas na fase hidroalcoólica (passo i). Esta fração foi evaporada e o precipitado ressuspendido em 500µL de MeOH 50% (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2005).

As curvas de calibração foram obtidas a partir dos padrões de microcistina (Sigma<sup>®</sup>, EUA).

## 4.2 Desenvolvimento de um multi-método para determinação de microcistina-RR, YR, LR e LA por Espectrometria de Massas

Quando são analisadas toxinas purificadas por HPLC (comparação entre o tempo de retenção do padrão e o espectro característico das microcistinas em  $\lambda$  = 238nm) faze-se necessário uma análise por Espectrometria de Massas, que é o método confirmatório da presença ou ausência de determinado composto, em quantidades suficientes, caracterizado pelo padrão de fragmentação. Só que, ao

serem realizadas extrações de amostras provenientes de florações ou de meio de cultura, a variante de microcistina presente pode ser desconhecida. Entretanto, foi realizado um pool das quatro microcistinas disponíveis em laboratório (MCRR, YR, LR e LA) a partir de concentrações pré-definidas (1µg/L). Visando identificar as variantes de microcistina em conjunto e, não isoladamente, um multi-método foi trabalhado. Isso, além de acelerar o processo de análises de amostras, evitaria o uso em excesso de reagentes e do padrão das toxinas, visto que este último é de difícil obtenção e apresenta alto custo. Ainda assim, uma análise por LC-MS poderia auxiliar na identificação de novas variantes de toxinas produzidas por cianobactérias, porém dependeria da concentração desta nova variante, seguido de uma caracterização pelo espectro de fragmentação da mesma e posterior curva de calibração.

Tendo em vista a necessidade de desenvolver um método por Espectrometria de Massas para avaliarmos, além da quantificação da toxina, o grau de pureza da amostra através da análise da formação dos íons gerados, um multi-método foi padronizado. Quando uma técnica de separação (HPLC) é acoplada a um método de ionização (ESI - *ElectroSpray Ionisation*) torna-se possível a análise detalhada de peptídeos, como é o caso das toxinas em estudo. Para este tipo de ionização são gerados íons protonados [M+H]<sup>+</sup> em decorrência da reação ácido/base ocorrida dentro do capilar (MILLER *et al.*, 2006).

Na tentativa de padronizar um método de quantificação de microcistinas em amostras de água e florações, um estudo de extração em fase sólida das toxinas foi realizado. Para isso, o cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters Technologies Corporation<sup>®</sup>, Massachusetts, EUA) foi submetido a diferentes condições de *clean-up*, variando-se o solvente de extração e a quantidade de amostra a ser extraída.

Resumidamente, uma alíquota de 10mL de água contaminada com os padrões das MCRR, YR, LR e LA (Sigma<sup>®</sup>, EUA) em uma concentração final de 1 µg/L, foi submetida à probe ultrassônica por 1min a 4°C (20kHz). O material foi centrifugado (3214g, 10min) e o sobrenadante aplicado em cartucho C18, o qual foi précondicionado com MeOH (3mL) e H<sub>2</sub>O (3mL). Os passos de lavagem e eluição incluem a passagem seqüencial de (i) 3mL de H<sub>2</sub>O, (ii) 3mL de MeOH 30% e (iii) 3mL de MeOH. Todas as frações foram evaporadas por arraste em nitrogênio gasoso ou SpeedVac<sup>®</sup> (BocEdwards, Brasil), ressuspendidas em 200µL de MeOH 50% e analisadas por LC-ESI-MS. O sistema de LC-MS utilizado é composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) modelo LC-20AD (Shimadzu Corporation<sup>®</sup>, Japão) e um Espectrômetro de Massas modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics Inc<sup>®</sup>, EUA) dotado de fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A separação cromatográfica das toxinas foi obtida em coluna tipo Fusion-RP (4µm, 150x2,0mm, Phenomenex) em fluxo de 0,2mL/min e utilizando-se o seguinte gradiente: 0-10min: 30 a 50% B; 10-15min: 50 a 90% B; 15-17min: 90% B; 17-18min: 90 a 30% B; 18-25min: 30% B, onde A corresponde a H<sub>2</sub>O e B a ACN 90%, ambas contendo 1mM formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico.

O Espectrômetro de Massas foi operado no modo positivo (ESI+) monitorando-se os íons correspondentes a cada toxina, a saber: MCRR m/z 520 [M+2H]<sup>2+</sup>, MCYR m/z 1045 [M+H]<sup>+</sup>, MCLR m/z 995 [M+H]<sup>+</sup> e MCLA m/z 910 [M+H]<sup>+</sup>, onde m/z corresponde à relação massa/carga de cada toxina.

#### 4.3 Conjugação da microcistina-LR

#### 4.3.1 Ao cBSA (soro albumina bovina cationizado) via carbodiimida

Esta conjugação foi realizada segundo kit comercial Pierce<sup>®</sup> (Pierce Chemical Company<sup>®</sup>, EUA). Inicialmente, 1,0mg da proteína carreadora (cBSA) e 0,450mg do hapteno MCLR foram reconstituídos em 100µL de água destilada e em 250µL de tampão de conjugação (pH 4,7), respectivamente, na ausência de agitação e aquecimento. As duas soluções foram misturadas e acrescidas em um vial contendo 5mg de EDC (1-Etil-3-[3-Dimetilaminopropil]carbodiimida Hidroclorido) dissolvido em água destilada. Este vial foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente sob homogeneização lenta. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada (154g, 5min). Após o condicionamento da coluna de gel filtração (D-Salt<sup>™</sup> Cross-linked Dextran Gel Filtration Column, 10 x 5mL) com 20mL do tampão de purificação (remove o EDTA presente na reação de conjugação e evita que este anti-coagulante seja injetado em animais experimentais), o sobrenadante (hapteno-carreador) foi aplicado no centro superior da coluna. Foram aplicadas alíquotas de 500µL do tampão de purificação a cada fração foi coletada em tubos separados. A medida da absorbância em  $\lambda$  = 280nm foi realizada em cubetas de quartzo para encontrar a fração que contém o conjugado. O conjugado hapteno-carreador (cBSA) esta presente na fração em que observa um pico na absorbância. A partir da densidade óptica crescente entre os tubos 4 a 9 foi feito um pool destas frações (volume final de 3,7mL). Este volume foi combinado com o precipitado formado na última centrifugação. Segundo o protocolo do kit, a concentração de conjugado é calculada com base na quantidade de proteína carreadora, pois não se sabe ao certo a quantidade de hapteno conjugado, mas sim, somente a quantidade de cBSA utilizada na reação. Como não foram realizadas análises confirmatórias de conjugação por Espectrometria de Massas (devido ao alto custo e de equipamento específico), não foi quantificado o excesso de proteína carreadora não ligada.

# 4.3.2 Ao *mc*KLH ("*Megathura crenulata* Keyhole Limpet Hemocyanin") via carbodiimida

Esta conjugação foi realizada segundo kit comercial Pierce<sup>®</sup> (Pierce Chemical Company<sup>®</sup>, EUA), como descrito no item 4.3.1, com algumas diferenças. Partindo-se de uma concentração de 1,0mg da proteína carreadora (*mc*KLH), 0,500mg do hapteno MCLR, o volume final de reação foi de 3,0mL e os tubos que apresentaram leitura de absorbância foram entre os tubos 6 a 10.

#### 4.3.3 Ao KLH ("Keyhole Limpet Hemocyanin") via glutaraldeído

Esta conjugação foi baseada segundo protocolo descrito por HARLOW & LANE (1988). Inicialmente, foi realizada uma mistura de 200µL de KLH (5,0mg/mL), 200µL de MCLR (3,6mg/mL) (proveniente da cepa BCCUSP 100 mantida em cultivo no meio BG11 e purificada por HPLC) e 400µL de glutaraldeído 0,2%. Este combinado foi deixado sob homogeneização por 1 hora a temperatura ambiente. Após incubação, foi acrescida à reação, glicina para uma concentração final de 0,2M. A homogeneização foi repetida e a concentração do conjugado foi calculada com base na quantidade de KLH utilizada na reação.

#### 4.3.4 À partícula de látex ou PLL ("Poli-I-lisina")

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Dr. Nilton Lincopan, (Instituto de Química IQ-USP-SP). O látex (usado como adjuvante e para aumentar o

tamanho do peptídeo) foi preparado com poliestireno sulfato/brometo de dioctadecildimetilamônio (PSS/DDA). Essas partículas podem ser fagocitadas por células competentes do sistema imune e induzir à resposta celular e humoral (GAMVRELLIS *et al.*, 2004). Diferentes concentrações do antígeno MCLR (0 a 25µg/mL), foram adsorvidos em PSS/DDA durante 1h, a temperatura ambiente.

#### 4.4 Imunização de camundongos Balb/c

Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEIA-FCF/USP) em agosto/2005 - Processo Nº 84 (ANEXO III).

A MCLR é altamente tóxica, quando comparada com outras variantes, como a MCLA, RR e YR. A LD<sub>50</sub> pode variar de acordo com a via de administração em camundongos, tais como (ITO *et al.*, 1997; SIVONEN & JONES, 2003):

(i) Via intraperitoneal: 50 a 120 μg.kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo);

(ii) Via oral (gavagem): 5000 μg.kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo);

(iii) Outras vias (subctânea): 10,9 μg.kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo).

E, a partir destas doses as imunizações foram realizadas utilizando diversas vias.

#### 4.4.1 Via sub-dorsal (implante de membrana)

A partir de um processo cirúrgico, dois camundongos Balb/c (grupo G1) foram submetidos a um implante de membrana de nitrocelulose (0,20µm, BioAgency, Brasil) contento a toxina MCLR (Sigma<sup>®</sup>, EUA) adsorvida. Para isso, a MCLR foi diluída em água estéril (5µg/mL) e aplicada em membrana de nitrocelulose (2,5µg antígeno/membrana) previamente saturada BSA com (125µg BSA/membrana). Após secagem a 37°C estas membranas foram implantadas na região sub-dorsal do camundongo (1 membrana/camundongo). Após 30 dias uma segunda dose foi administrada via intra-peritoneal (0,75µg MCLR/camundongo) em adjuvante incompleto de freund (AIF). A sangria foi realizada pelo plexo oftálmico e a cinética de produção de anticorpos de classe IgG foi determinada através da técnica ELISA. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30, 50 e 60 dias após imunização.

#### 4.4.2 Via sub-plantar

Pela via subcutânea no coxin plantar, 4 grupos de camundongos Balb/c foram imunizados com diferentes imunógenos e sistemas adjuvantes.

Um primeiro grupo de 4 camundongos (grupo G2) foi imunizado com a toxina conjugada à partícula de látex (0,3µg MCLR-Ltx/camundongo) emulsificada com adjuvante completo de freund (ACF) v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v após 15 dias da primeira imunização. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após imunização.

Paralelamente, um segundo grupo de 2 camundongos Balb/c (grupo G3) recebeu uma dose da toxina conjugada somente ao látex (0,3µg MCLR-Ltx/camundongo) diluída em solução salina 0,1mM. Como adjuvante foi utilizado o Hidróxido de alumínio. Um terceiro grupo (grupo G4) recebeu uma dose da toxina conjugada à partícula de látex e ao BSA (0,3µg MCLR-BSA-Ltx/camundongo) emulsificada com ACF. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após imunização. Os grupos G3 e G4 receberam mais duas doses reforço posteriormente.

O quarto grupo composto por 4 camundongos (grupo G5) foi imunizado via subplantar com a toxina conjugada ao BSA (0,3µg MCLR-BSA/camundongo) emulsificada com ACF v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v nas outras duas imunizações, com intervalo de 15 dias após a ultima dose. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após imunização.

#### 4.4.3 Via intra-peritoneal

Utilizando esta via, somente um camundongo foi imunizado (grupo G6) devido à grande quantidade de toxina exigida. Portanto este animal foi tratado com a toxina conjugada à partícula de látex (0,75µg MCLR-Ltx/camundongo) emulsificada com ACF v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v nas outras duas imunizações com intervalo de 15 dias após a ultima dose. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após imunização.

#### 4.4.4 Via sub-dorsal

Utilizando esta outra importante via, camundongos Balb/c foram divididos em três grupos de 4 animais.

O primeiro grupo (grupo G7) foi imunizado via sub-dorsal com a toxina conjugada ao BSA (0,3µg MCLR-BSA/camundongo) emulsificada com ACF v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v nas outras três imunizações, com intervalo de 15 dias após a ultima dose. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após imunização.

Já o segundo e terceiro grupos de camundongos foram imunizados com a toxina pura conjugada ao KLH via glutaraldeído (40µg MCLRpadrão-KLH/camundongo) e com a toxina purificada de meio de cultura (50µg MCLRbruta-KLH/camundongo). Estes grupos foram nomeados como grupos G8 e G9, respectivamente. Este conjugado foi emulsificado com ACF v/v na primeira inoculação. O sangue foi coletado somente no tempo zero.

#### 4.4.5 Via sub-plantar e sub-dorsal

Um grupo de 4 camundongos (grupo G10) foi imunizado com a toxina conjugada ao *mc*KLH cationizado (50µg MCLR-*mc*KLH/camundongo) emulsificada com ACF v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v nas outras três imunizações, com intervalo de 15 dias após a ultima dose. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após a imunização.

O grupo (grupo G11) foi imunizado com a toxina conjugada ao BSA cationizado (24,3 μg MCLR-cBSA/camundongo) emulsificada com ACF v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v nas outras três imunizações com intervalo de 15 dias após a ultima dose. O sangue foi coletado no tempo zero e 15, 30 e 50 dias após imunização.

Utilizando estas duas vias de imunização, foi aplicado um pequeno volume de antígeno conjugado na região sub-plantar (média de 25 μL) e o restante foi inoculado via sub-dorsal. Este procedimento foi realizado, pois linfonodos poplíteos enfartados seriam utilizados para realização da fusão. Em todas as vias de imunização, para separação do soro o sangue foi mantido em repouso por 2 horas e, em seguida foi centrifugado a 1500g por 5 minutos a temperatura ambiente. Os soros foram estocados a -20°C até o momento do uso.

A **Tabela 2** apresenta um resumo mais detalhado do protocolo de imunização a fim de facilitar a análise das diferentes vias utilizadas, dos diversos antígenos e adjuvantes.

Via de imunização	Antígeno	Adjuvante	N° de imunização	Doses (µg/camundongo)
Implante sub- dorsal	MCLR <b>(G1)</b>	Membrana de nitrocelulose	2	2,5 e 0,75
	MCLR-Ltx (G2)	ACF	2	0,3
Sub-plantar	MCLR-Ltx <b>(G3)</b>	Hidróxido de alumínio	3	0,3
	MCLR-BSA-Ltx <b>(G4)</b>	ACF	3	0,3
	MCLR-BSA (G5)	ACF	3	0,3
Intra-peritoneal	MCLR-Ltx (G6)	ACF	3	0,75
	MCLR-BSA (G7)	ACF	4	0,3
Sub-dorsal	MCLRpadrão-KLH <b>(G8)</b>	ACF	1	40,0
	MCLRbruta-KLH (G9)	ACF	1	50,0
Sub-plantar e sub-	MCLR-cBSA (G10)	ACF	4	24,3
dorsal	MCLR-mcKLH (G11)	ACF	4	50,0

**Tabela 2.** Resumo do protocolo de imunização em camundongos machos, Balb/c, 2 meses,30 gramas.

(MCLR - microcistina-LR; Ltx - partícula de látex ou PLL - Poli-I-lisina; BSA - soro albumina bovina; cBSA - soro albumina bovina cationizado; *mc*KLH - mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin; ACF-adjuvante completo de freund)

4.5 Padronização de um método imunoenzimático para determinação da produção de anticorpos IgG por ELISA "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" em soro de animal e/ou sobrenadante de cultura celular

4.5.1 ELISA para controle da adsorção da microcistina-LR, utilizando componentes do kit comercial Abraxis<sup>®</sup>

Primeiramente, a placa de ELISA Corning<sup>®</sup> high binding (EUA) foi sensibilizada com 0,5µg MCLR/poço diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M, pH 9,6. Esta placa foi incubada a 37°C por duas horas e depois *overnight* a 4°C. Após 3 lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05%, foi bloqueada com 200µL de leite desnatado 1% (Molico, Nestle<sup>®</sup>, Brasil) por uma hora a 37°C. Após incubação foram repetidas as lavagens e, a partir daí utilizamos os reagentes do kit Abraxis<sup>®</sup>, EUA, como mostra o **Esquema 1** abaixo:

Ροçο	0,5µg MCLR/poço		Tampao carb/bicar.	
	Controle	Controle	Controle	Controle
Reagentes (µL)	positivo	negativo	positivo	negativo
Controle positivo	-	-	-	-
Diluente	50	100	50	100
Solução de Anticorpo	50	-	50	-
Incubar 90 min – temperatura a	ambiente			
Lavar 3x com solução de lavag	em (250 µL/poço	o) e secar		
Solução de Conjugado	100	100	100	100
Incubar 30 min – temperatura ambiente				
Lavar 3x com solução de lavag	em (250 µL/poço	o) e secar		
Solução de Substrato	100	100	100	100
Incubar 30 min ao abrigo da luz - temperatura ambiente				
Solução Stop	50	50	50	50
Ler em $\lambda$ = 450 nm				

Esquema 1. Esquema do ensaio ELISA referente ao kit comercial Abraxis<sup>®</sup> com adaptações

Os componentes do kit Abraxis<sup>®</sup>, EUA, constam de:

- (i) Solução de anticorpo (Controle Positivo) anticorpo IgG anti-microcistina;
- (ii) Solução de conjugado anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase;
- (iii) Solução de substrato TMB (3,3,5,5-tetrametilbenzidina)

(iv) Solução stop - ácido sulfúrico diluído

(v) Solução de lavagem

#### 4.5.2 Padronização do ensaio ELISA indireto

Na padronização do ensaio de ELISA foram avaliadas as seguintes condições:

(i) concentração de toxina conjugada (0,3 e 0,5μg MCLR-cBSA/poço) e não conjugada (0,25; 0,5 e 1,5μg MCLR/poço) fixada à placa de ELISA;

(ii) tipos de placa de ELISA: NUNC (PolySorp Immuno<sup>™</sup>Plates, Dinamarca);
Corning<sup>®</sup> high e medium binding (EUA);

(iii) temperatura de sensibilização da placa de ELISA: temperatura ambiente e geladeira (4°C)

(iv) reagentes de bloqueio: leite desnatado 1 e 5% (Molico, Nestle<sup>®</sup>, Brasil); caseína 2,5% (Sigma<sup>®</sup>, EUA); gelatina 1 e 2% (gelatina para Microbiologia, Merk<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha);

(v) conjugados: anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma<sup>®</sup>, EUA) na diluição 1:2000; anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com biotina nas diluições 1:4000, 1:6000 e 1:8000 (BioGen<sup>®</sup>, Brasil) e amplificado com estreptavidina-biotina nas diluições 1:4000, 1:6000 e 1:8000 (Amersham Biosciences<sup>®</sup>, Inglaterra);

(vi) sistema revelador de reação: 3,3,5,5-tetrametilbenzidina (TMB, Merk<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) e orto-feniletilenodiamina (OPD, Sigma<sup>®</sup>, EUA).

As condições ideais do teste de ELISA indireto para determinação da cinética foram as seguintes. Inicialmente, as placas de microtitulação de 96 cavidades (Corning<sup>®</sup> high binding, EUA) foram sensibilizadas com o antígeno MCLR-cBSA (toxina microcistina-LR conjugada a soro albumina bovina cationizada) (0,5µg/poço) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e então, incubadas a 37°C por duas horas e *overnight* a 4°C, consecutivamente. Após esta sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05%. O bloqueio foi feito com 200µL de uma solução de caseína 2,5% por uma hora a 37°C. Após lavagens adicionou-se 100µl de soro de camundongos diluídos a 1:200 em solução

diluente (caseína 0,5% em PBS) ou 100µl de sobrenadante de cultura celular. Após duas horas a 37°C, as lavagens foram repetidas e 100µL do conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma<sup>®</sup>, EUA) diluído a 1:2000 foi incubado por uma hora a 37°C. Depois de 3 lavagens, a reação foi revelada com 100µL da solução cromógena OPD contendo substrato (proporção de 10mg de OPD, 10µl de peróxido de hidrogênio e 10mL de tampão citrato/fosfato 0,2M, pH 5,0) durante 10 minutos a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com adição de 100µl de ácido sulfúrico a 4N. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro (SLT spectra, SLT Labinstruments, Áustria) em comprimento de onda 492nm.

#### 4.6 Obtenção de Anticorpos Monoclonais

# 4.6.1 Obtenção das células dos órgãos linfóides: linfonodos poplíteos, linfonodos abdominais e baço

Foi utilizado 1 camundongo (o que apresentou maior produção de IgG frente ao antígeno específico) de cada grupo para cada fusão celular. Uma semana antes da fusão celular, foi dado o reforço ("*booster*") contendo a mesma dose (32,1µg MCLR-*mc*KLH/camundongo) em adjuvante incompleto freund. Os linfonodos poplíteos, abdominais e o baço dos camundongos imunizados foram retirados assepticamente (limpar região abdominal com álcool 70%). Em seguida retirou-se o excesso de gordura do órgão, enfartou-se com meio RPMI<sup>-</sup> (meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino) e macerou-se com bastão de vidro sobre peneira metálica de malha fina com meio de cultura RPMI<sup>-</sup>. Este meio RPMI<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) foi suplementado com L-glutamina<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) 1%, Piruvato de sódio<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) 2%, MEM não essenciais<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) 1%, Gentamicina<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) 0,1% e Hepes<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) 1,5%. Os linfócitos, tanto do baço quanto do linfonodo, foram reservados para a técnica de fusão celular.

#### 4.6.2 Cultivo das Células de Mieloma

Vinte dias antes da fusão celular, as células de mieloma SP2O foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e passadas para freezer -80°C,

seqüencialmente, e rapidamente descongeladas a 37°C, transferindo-se em seguida para um tubo cônico contendo 15mL de meio RPMI<sup>+</sup> (meio RPMI 1640 acrescido de soro fetal bovino 10%). As células foram centrifugadas a 395g durante 5min a temperatura ambiente e, em seguida, transferidas para uma garrafa de 25cm<sup>2</sup> TPP<sup>®</sup> e, expandidas para garrafas de 75cm<sup>2</sup> TPP<sup>®</sup> (estéril, vent cap 0,2µm, Inforlab, Brasil) contendo meio RPMI<sup>+</sup>. As garrafas foram incubadas a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub> a 5%, e expandidas, de modo a ficar em fase logarítmica de crescimento um dia antes da fusão (ajustando a concentração para 5 x 10<sup>4</sup> células/mL).

#### 4.6.3 Preparo do "Feeder Layer"

Um dia antes da fusão celular foi obtido o "feeder layer", injetando 10mL de meio RPMI<sup>+</sup> no peritônio de um camundongo Balb/c sob massagem abdominal. Em seguida, o meio injetado foi aspirado com auxílio de uma seringa. O lavado peritoneal foi então diluído em 45 mL do mesmo meio, e distribuído em placas de cultura estéreis de 96 cavidades. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de  $CO_2$  a 5%.

#### 4.6.4 Obtenção dos hibridomas (Fusão celular)

A fusão celular esquematizada na **Figura 15** foi realizada de acordo com KÖHLER & MILSTEIN (1975) e ESPÍNDOLA *et al.* (2002), com algumas modificações.



Figura 15. Modelo esquemático da obtenção de anticorpos monoclonais. Fusão das células de mieloma com células linfóides provenientes do linfonodo e do baço. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

Os linfócitos, provenientes do baço e do linfonodo, e as células mielomatosas foram lavados separadamente em meio RPMI<sup>-</sup> por centrifugação durante 5 minutos a 395g. Foi descartado o sobrenadante e adicionado 10mL do mesmo meio, tanto nos linfócitos quanto nas células de mieloma. Foi realizada a contagem, em câmara de neubauer, das células diluídas a 1:2 em solução de Tripan Blue<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) a 10%. As células foram misturadas na proporção 2:1 (proporção de células linfóides provenientes do linfonodo:mieloma) ou 1:1 (proporção de células linfóides provenientes do baço:mieloma). Após nova centrifugação foi realizada a fusão celular com o sedimento na presença de PEG. Esta solução, previamente autoclavada, continha 0,5g de PEG 4000 diluído em 0,7mL de PBS (tampão fosfato salina 0,14M, pH 7,2) e 50µL de DMSO. A solução PEG (solução viscosa) foi acrescida gota a gota por 1 min a 37 °C. Na seqüência, as células foram mantidas em repouso por 1min e 30seg a 37°C, e adicionado 1mL de meio RPMI<sup>-</sup>, gota a gota por 1min a 37°C, e mais 20mL do RPMI<sup>-</sup>, gota a gota por 4min a 37°C. As células foram então mantidas em repouso por mais 4min a 37ºC. Em seguida foram centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI<sup>+</sup>, contendo solução HAT<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil) a 2%. Após 2 horas de incubação a 37ºC, as células foram distribuídas em volume de 100µL por cavidade em placas contendo "feeder layer".

Após o plaqueamento das células pós-fusão, as placas foram mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Neste período (primeiras 48 horas), a abertura da porta da estufa foi evitada, pois uma alteração no pH pode fazer com que o meio enriquecido com HAT ocasione um retardo no crescimento celular (BISCHOFF *et al.*, 1982).

A primeira troca de meio foi realizada após 3 dias e as subseqüentes a cada 2 dias. Na primeira semana foi utilizado meio RPMI<sup>+</sup> acrescido de HAT. Nas duas semanas subseqüentes, o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT<sup>®</sup>, Invitrogen, Brasil) a 1%. A partir daí, passou-se a utilizar meio RPMI<sup>+</sup>. A seleção dos clones por ELISA foi iniciada 14 dias após a fusão celular, quando os hibridomas já se apresentavam com bom crescimento celular (ocupando 1/3 do poço). Para seleção dos clones foi realizado o ensaio ELISA indireto padronizado no item 4.5.2. Para a seleção foi utilizado conjugado anti-IgG de camundongo pelo maior interesse em obter anticorpo monoclonal do isótipo IgG.

#### 4.6.5 Clonagem dos hibridomas

Os hibridomas obtidos da fusão celular (k<sub>o</sub>) a partir de animais imunizados com o antígeno MCLR-*mc*KLH, que apresentaram reatividade por ELISA indireto foram clonados pela metodologia Diluição Limitante. Inicialmente, os hibridomas foram corados com tripan blue 10%, e posteriormente contados numa diluição 1:2 (v/v). Na seqüência, as células foram diluídas em tubos contendo RPMI<sup>+</sup> nas concentrações de 500, 50 e 5 células/mL, respectivamente. Logo em seguida, o último tubo foi distribuído em alíquotas de 200µL/poço em uma placa de 96 cavidades, finalizando uma proporção de 1 célula/poço (**Figura 16**).



Figura 16. Esquema de clonagem pela metodologia Diluição Limitante.

Após distribuição das células em placa de cultura estéril, a mesma foi deixada em repouso em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após período de 1 hora os hibridomas foram observados em microscópio óptico, e foram selecionados apenas os poços que apresentavam 1 célula/poço. Depois, uma camada de "feeder layer" foi adicionada sob a clonagem para favorecer o crescimento celular. Os ensaios por ELISA foram realizados quando as células clonadas atingiram um crescimento exponencial (aproximadamente 8 dias).

De cada hibridoma clonado, o poço que apresentou maior densidade óptica por ELISA foi selecionado para ser re-clonado (k<sub>1</sub>), e esta segunda clonagem foi calculada de modo que as células ficassem distribuídas na proporção 0,5célula/poço nas placas de 96 cavidades. As células selecionadas na re-clonagem (k<sub>2</sub>) foram expandidas *in vitro* e isotipadas.

#### 4.6.6 Expansão dos hibridomas clonados

Os hibridomas não clonados ( $k_0$ ) e clonados ( $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$ ) foram expandidos seqüencialmente em placas de 24 cavidades, garrafas de 25cm<sup>2</sup> e de 75cm<sup>2</sup> TPP<sup>®</sup>, respectivamente.

Os hibridomas da última clonagem foram novamente avaliados pelo método de ELISA padronizado (item 4.5.2). O crescimento foi realizado em cultura *in vitro*. A expansão das células foi executada através da transferência dos hibridomas para um grande volume de meio, com o cuidado de manter um crescimento exponencial de até 10<sup>7</sup> células/mL, para que pudessem ser congelados posteriormente.

#### 4.6.7 Congelamento dos hibridomas e células de mieloma

Após a clonagem das células híbridas, houve a necessidade de ter uma quantidade elevada de células, ou seja, um crescimento exponencial para que pudéssemos armazená-las por congelamento ou para obtermos os anticorpos monoclonais em maior quantidade.

Durante cada etapa de clonagem dos hibridomas ( $k_1$ ,  $k_2$  e/ou  $k_3$ ), as células foram congeladas numa quantidade de  $10^7$  hibridomas por frasco de criopreservação. As células foram centrifugadas a 395g durante 5min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado.

Um volume de 1 a 2mL da Solução de Congelamento contendo 10% de DMSO foi preparado em soro fetal bovino (SFB, Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil), previamente ambientado em banho de gelo. Esta solução foi adicionada gota a gota ao sedimento de células. Estas foram ressuspensas e rapidamente transferidas pra o tubo de criopreservação, também em banho de gelo. As células foram congeladas a -80°C, e no dia seguinte foram transferidas para o nitrogênio líquido (-185°C).

O processo de congelamento das células de mieloma SP2O foi muito semelhante ao processo de congelamento dos hibridomas, com exceção da solução de congelamento que foi preparada em meio RPMI<sup>+</sup> contendo 7,5% de DMSO.

#### 4.6.8 Descongelamento dos hibridomas

Neste processo as células foram retiradas do nitrogênio líquido e transferidas para o freezer -80°C um dia antes do descongelamento celular. O frasco de criopreservação foi rapidamente descongelado em banho-maria a  $37^{\circ}$ C e, em seguida os hibridomas foram lavados em meio RPMI<sup>+</sup> por centrifugação a 395g por 5min, com posterior incubação em meio de cultura enriquecido e, em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> a  $37^{\circ}$ C. Após 1 a 2 dias foi observado se houve morte celular e uma nova avaliação da produção de anticorpos IgG por ELISA (item 4.5.2) foi realizada.

#### 4.6.9 Isotipagem dos anticorpos monoclonais obtidos

Os isótipos dos anticorpos monoclonais foram determinados segundo Kit de captura (Sigma<sup>®</sup>, EUA). Placas Corning<sup>®</sup> high binding (EUA) foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo anti-isótipo específico IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM de camundongo diluídos 1:1000 em PBS e incubadas por 1h a 37°C. Na seqüência, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 100µL de sobrenadante de cultura de cada clone foi incubado. Após 1 hora a 37°C foram repetidas as lavagens e adicionado 100µL do conjugado anti-IgG de camundongo Fab específico marcado com peroxidase na diluição 1:600 em PBS. Após 30min a temperatura ambiente, novas lavagens foram realizadas, e a reação foi revelada com 100µL da solução cromógena OPD, contendo substrato (10mg de OPD, 10µl de peróxido de hidrogênio e 10mL de tampão citrato/fosfato 0,2M, pH 5,0) durante 10min a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com 100µl de ácido sulfúrico a 4N. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro em 492 nm.

## 4.7 Tratamento celular dos clones secretores de anticorpo anti-MCLR utilizando os antibióticos BMCyclin 1 e 2, e Ciprofloxacina.

Esta etapa de análise de micoplasma nos clones tratados foi realizada no Laboratório de Bactérias Oportunistas - Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo sob responsabilidade do Prof. Ass. Jorge Timenetsky.

Foram realizadas análises do sobrenadante celular dos clones tratados em meio de cultivo específico para Micoplasma (SP4) e por PCR (método por Biologia Molecular - Reação em Cadeia da Polimerase).

#### 4.7.1 Obtenção dos antibióticos

#### 4.7.1.1 Ciprofloxacina

A solução injetável de Ciprofloxacina (2mg/mL, Ciprofloxan<sup>®</sup>, Hipolabor, Brasil) foi diluída até uma concentração final de 10µg/mL em tampão PBS estéril pH 7,2. Esta solução foi aliquotada em tubo tipo ependorf plástico âmbar, mantida a temperatura ambiente e acrescida em cada garrafa de meio de cultura (25cm<sup>2</sup>, estéril, vent cap 0,2µm).

#### 4.7.1.2 BM Cyclin 1 e 2

Os antibióticos liofilizados BM Cyclin 1 e 2 (Roche Applied Science<sup>®</sup>, Alemanha) foram ressuspensos em 10mL e 12,5mL de tampão PBS estéril pH 7,2, resultando em uma concentração final de 10 e 5µg/mL, respectivamente. As soluções foram imediatamente aliquotadas em tubo tipo ependorf âmbar, envolto em papel alumínio, mantidos a -20°C até o momento do uso e acrescidas em cada garrafa de meio de cultura (25cm<sup>2</sup>, estéril, vent cap 0,2µm).

#### 4.7.2 Ciclos de tratamento celular

#### 1<sup>a</sup> ETAPA - Descongelamento celular

Os clones  $k_29$ ,  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$  e  $k_2232$  foram descongelados em meio de cultura RPMI contendo 20% de soro fetal bovino (Invitrogen<sup>®</sup>, Brasil). Ao atingir crescimento exponencial, as células foram submetidas ao tratamento em cultivo a  $37^{\circ}$ C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### $2^a$ ETAPA - Tratamento BM Cyclin $\rightarrow$ Ciprofloxaxina

Como esquematizado na **Figura 17** as células foram submetidas ao tratamento com BM Cyclin 1 durante 2 dias e depois por 1 dia. As células foram

lavadas com tampão PBS estéril pH 7,2 e submetidas ao tratamento com BM Cyclin 2 durante 2 dias consecutivos. O tratamento com BM Cyclin foi repetido 3 vezes. Após lavagem em tampão PBS, as células foram submetidas ao tratamento com Ciprofloxacina durante 12 dias, com troca de meio a cada 2 dias. É importante ressaltar que a cada troca de antibiótico a garrafa foi trocada.



Figura 17. Esquema de tratamento celular BM Cyclin seguido de Ciprofloxacina (Cipro), sendo o tempo em dias

#### 3<sup>a</sup> ETAPA - Tratamento Ciprofloxaxina $\rightarrow$ BM Cyclin

Como esquematizado na **Figura 18** as células foram submetidas ao tratamento com Ciprofloxacina durante 12 dias, com troca de meio a cada 2 dias. Após tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS estéril pH 7,2 e submetidas ao tratamento com BM Cyclin 1 durante 2 dias e depois por 1 dia. As células foram lavadas novamente e submetidas ao tratamento com BM Cyclin 2 durante 2 dias consecutivos. O tratamento com BM Cyclin foi repetido 3 vezes. É importante ressaltar que a cada troca de antibiótico a garrafa foi trocada.



Figura 18. Esquema de tratamento celular de Ciprofloxacina (Cipro) seguido de BM Cyclin, sendo o tempo em dias

## 4.8 Obtenção de anticorpos monoclonais por expansão dos hibridomas em ascite

A obtenção de anticorpos monoclonais por expansão dos hibridomas e, purificação dos mesmos em coluna de proteína-A, foi realizada segundo ESPÍNDOLA *et al.* (2002), com algumas modificações.

Os hibridomas clonados ( $k_29$ ,  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$  e  $k_2232$ ) foram expandidos seqüencialmente em placas de 24 orifícios TPP<sup>®</sup>, garrafas de 25cm<sup>2</sup> e de 75 cm<sup>2</sup> TPP<sup>®</sup>, seqüencialmente. Logo em seguida foram centrifugados (395g, 5min), ressuspensos em 200µL de salina estéril e, injetados intraperitoneal (i.p.) em camundongo Balb/c para produção de ascite. Foi utilizado cerca de 10 animais por clone. Esses animais foram previamente tratados com 300µL de AIF i.p. 20 dias antes da inoculação. O crescimento das células proporcionou aumento do peritônio do animal, e quando atingiu um bom crescimento (aproximadamente 13 dias), os animais foram sacrificados e, o líquido ascítico foi retirado e centrifugado a 1677g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi congelado a -20°C até sua purificação.

#### 4.9 Purificação dos anticorpos monoclonais por cromatografia de afinidade

#### 4.9.1 Remoção de lípides do liquido ascítico

O processo de purificação dos anticorpos monoclonais foi baseado segundo técnicas descritas por HARLOW & LANE (1988). Inicialmente o líquido ascítico foi tratado para remoção dos lipídeos, através da adição de 20µL de uma solução de sulfato de dextran a 10% e 100µL de cloreto de cálcio a 1M por mL de ascite, sob agitação por 20min a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 604g por 10min. O sobrenadante foi filtrado (filtro Whatman<sup>®</sup>, 1Chr cat. nº 3001917, EUA) e dializado em membrana de diálise (membrana - cel TMMD34 - 14 kDa) previamente hidratada em água (Milli-Q<sup>®</sup>, EUA) contra tampão borato-salina (tampão borato:ácido bórico 0,1M, tetraborato de sódio 0,1M e cloreto de sódio 1M, pH 8,5 diluído 1:20 em NaCl 0,15M) por 48 horas.

Os anticorpos monoclonais dos fluidos ascíticos deslipidados foram purificados por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de proteína A (Sigma<sup>®</sup>, EUA).

#### 4.9.2 Empacotamento da coluna de proteína A

5 mg da proteína A-sepharose (*Staphylococcus aureus*, Sigma<sup>®</sup>, EUA) foi ressuspensa lentamente em 50mL de tampão salina-borato pH 8,5. Esta suspensão foi mantida em repouso durante 30min a temperatura ambiente (até "inchar" completamente). Esse material foi transferido para uma coluna (7371522, GE Health Care<sup>®</sup> - Pharmacia, EUA) e a mesma foi lavada em tampão salina-borato por no mínimo 1 hora em baixo fluxo. Ao terminar o empacotamento, a coluna de proteína-A foi guardada a 4ºC em azida sódica 0,02%.

#### 4.9.3 Purificação do anticorpo em coluna de proteína A

O líquido ascítico foi novamente filtrado antes de ser aplicado na coluna de proteína A, a qual apresenta afinidade pela porção Fc de IgG.

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com tampão borato-salina durante 20min, e na seqüencia foram aplicados 5mL do líquido ascítico. Após 15 minutos, a coluna foi lavada com o mesmo tampão até a saída total do primeiro pico. O tampão Glicina (glicina 0,2M e cloreto de sódio 0,15M, pH 2,8) foi utilizado para eluição das moléculas de IgG que se ligaram a proteína A. Após a coleta desse segundo pico, a coluna foi novamente equilibrada em tampão salina-borato. As amostras coletadas com o tampão Glicina foram imediatamente neutralizadas com Tris 1M. Os eluatos foram concentrados ao volume inicial utilizando membrana de celulose (Molecular/Por<sup>®</sup>Ultrafiltration Membrane Cellulose, 43mm diâmetro, PM 20kDa, Spectrum tipo C<sup>®</sup>, EUA) e concentrador Célula de Agitação (modelo 8050, 50mL, Millipore<sup>®</sup>, EUA) em gelo.

O material concentrado foi dializado em tampão borato-salina durante 24 horas a 4ºC.

A concentração das proteínas (unidade em µg/mL) em cada tubo coletado foi quantificada por leitura em espectrofotômetro (DU 640 spectrophotometer, Beckman, CA, USA) e pode ser expresso pela relação abaixo:

#### DO x 625 x FD

onde, DO é a densidade óptica lida em 280nm, 625 é o fator de correção para anticorpo de camundongo e, FD é o fator de diluição da amostra.

Todo o material contendo o anticorpo purificado foi aliquotado e congelado a - 20ºC até o momento do uso.

#### 4.10 Reatividade dos anticorpos monoclonais

Para avaliar a reatividade dos anticorpos monoclonais purificados frente às quatro variantes de microcistina foi realizado ensaio ELISA indireto.

Diferenciando-se do método padronizado e descrito no item 4.5.2, as placas de ELISA foram sensibilizadas com as quatro variantes de microcistina sem conjugação prévia. Além disso, como solução diluente de amostra foi utilizado tampão salina-borato pH 8,5 (tampão de equilíbrio da coluna de proteína A). Todos os controles de reação foram realizados para avaliar a especificidade do anticorpo pelo antígeno e para assegurar a ausência de ligação inespecífica.

#### 4.11 Caracterização dos anticorpos purificados por SDS-PAGE

Os anticorpos monoclonais purificados em coluna de proteína-A foram fracionados por SDS-PAGE em gel gradiente de 5 a 20% com posterior coloração pelo Coomassie Blue (Amersham Biosciences<sup>®</sup>, Inglaterra), segundo LIU *et al.* (2007) com algumas modificações.

## 4.11.1 Preparo dos reagentes necessários para realização do ensaio SDS-PAGE

#### 4.11.1.1 Preparo do tampão de amostra (5X)

O tampão de amostra 5X concentrado foi preparado de acordo com a **Tabela 3** abaixo.

Reagente	Conc. Mãe	Vol. Final (10 mL)	Conc. Final
Trizma	1M	0,598 mL	60mM
Glicerol	99,5%	2,512 mL	25%
SDS	20%	1,0 mL	2%,
Azul de Bromofenol	1%	1,0 mL	0,1%
água Milli-Q <sup>®</sup>	-	4,4 mL	-

Tabela 3. Preparo do tampão de amostra 5X - SDS-PAGE

O tampão de amostra sem agente redutor foi aliquotado em tubo tipo ependorf e mantido a -20°C até o momento do uso.

#### 4.11.1.2 Preparo do tampão de corrida

O tampão de corrida foi preparado de acordo com a **Tabela 4** abaixo e, mantido a 4ºC até o momento do uso.

Reagente	Massa (g)
Trizma 25mM	3,0275
Glicina 192mM	14,413
SDS 0,1%	1
qsp água Milli-Q <sup>®</sup> para 1000mL	1000 mL

Tabela 4. Preparo do tampão de Corrida - SDS-PAGE.

#### 4.11.1.3 Preparo da solução vedante

Como solução vedante foi utilizada agarose 2% diluída em água Milli-Q<sup>®</sup>. Esta solução foi aquecida (2 minutos em microondas) até dissolução dos grumos.

#### 4.11.1.4 Preparo do gel de separação

#### Solução A:

Tabela 5. Solução A - Gel de separação DSD-PAGE

Reagente	Massa (g)
Acrilamida PAGE 30%	30
Metilenebisacrilamida 0,8%	0,8
qsp água Milli-Q <sup>®</sup> para 100mL	100 mL

A solução descrita na **Tabela 5** foi aquecida a 56°C, filtrada e guardada em frasco âmbar a 4°C.

#### Solução B:

Tabela 6. Solução B - Gel de separação DSD-PAGE

Reagente	Massa (g)
Trizma Base 1,5M (pH 8,8)	18,17
SDS 0,4%	0,4
qsp água Milli-Q <sup>®</sup> para 100mL	100 mL

A solução descrita na Tabela 6 foi aquecida a 56°C, filtrada e guardada em frasco âmbar a 4ºC.

#### Solução C:

<b>Fabela 7.</b> Solução C - Gel de separação DSD-PAGE			
	Reagente	Massa (g)	
	Trizma Base 0,5M (pH 6,8)	18,17	
	SDS 0,4%	0,4	
	qsp água Milli-Q <sup>®</sup> para 100mL	100 mL	

A solução descrita na Tabela 7 foi aquecida a 56°C, filtrada e guardada em frasco âmbar a 4ºC.

#### 4.11.1.5 Preparo do persulfato de amônio

Tabela 8. Preparo de Persulfato de Amônio	
Reagente	Massa (g)
Persulfato de amônio 10%	0,5
qsp água Milli-Q <sup>®</sup> para 5mL	5 mL

Tabela 8. Preparo de Persulfat	o de Amônio
Reagente	Massa (g)

A solução descrita na Tabela 8 foi aliquotada em tubo tipo ependorf e mantida a -20°C até o momento do uso.

#### 4.11.1.6 Preparo do agente redutor, gel de separação e gel de empilhamento

O DTT (Ditiotreitol, Amercham Bioscinces<sup>®</sup>, Inglaterra, Londres) foi preparado até uma concentração final de 6mM.

O gel de poliacrilamida (gel de separação gradiente 5 a 20%) foi preparado de acordo com a Tabela 9.

rapera 9. Preparo do ger de separação - ger de pollacitantida			
Soluções para 10 mL	5%	20%	
Água milli-Q <sup>®</sup> (mL)	5,8	0,8	
Solução A (mL)	1,7	6,7	
Solução B (mL)	2,5	2,5	
Persulfato de Amônio (µL)	50	50	
TEMED (µL)	10	5	

Tabola O Drenaro do del de senaração - del de poliacrilamida

Após preparo, o gel de separação foi imediatamente aplicado nas placas de vidro até sua completa polimerização a temperatura ambiente. Em seguida, o gel de empilhamento foi preparado e aplicado, como mostra a **Tabela 10**.

Tabela 10. Preparo do gel de empilhamento		
Água milli-Q <sup>®</sup>	4,6 mL	
Solução A	1,34 mL	
Solução C	2 mL	
Persulfato de Amônio	60 µL	
TEMED	10 µL	

As amostras foram então preparadas e aplicadas, a fim de que se pudesse analisar o perfil eletroforético de cada uma, ou seja, de cada anticorpo frente ao agente redutor.

#### 4.11.1.7 Preparo do corante Coomassie Blue

Este corante foi preparado como descrito na Tabela 11.

Tabela 11. Freparo do Corante Coomassie Blue	
Reagente	Quantidade
Coomassie Blue	1 g
Metanol	450 mL
Água milli-Q <sup>®</sup>	450 mL
Ácido Acético Glacial	100 mL

Tabela 11. Preparo do corante Coomassie Blue

Esta solução foi mantida em frasco de vidro âmbar a temperatura ambiente. A coloração foi realizada *overnight* a temperatura ambiente e depois descorada com soluções decrescentes de ácido acético glacial 70% até água pura.

#### 4.11.2 Ensaio SDS-PAGE utilizando DTT como agente redutor

Para realização deste ensaio quatro clones foram analisados, tais como  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$  e  $k_2232$ .

Todos os géis foram preparados a uma concentração protéica de 6µg anticorpo/poço, tratado ou não com agente redutor DTT e, mantidos 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. No Gel 1, amostras de cada anticorpo, sem tratamento com agente redutor, foram aplicadas no gel gradiente.

No Gel 2 amostras de cada anticorpo foram tratadas com o agente redutor DTT 6mM e aplicadas no gel gradiente.

#### 4.12 Obtenção dos Anticorpos Policionais

#### 4.12.1 Imunização do coelho

Para obtenção de anticorpos policionais, foi utilizado um coelho fêmea pertencente à linhagem NZB (Nova Zelândia), com idade aproximada de 2 meses e peso corpóreo médio de 2,2 kg. Este animal foi alocado em uma gaiola individual (60x60x60cm) com alimentação comercial específica para coelhos (ração Sonutri<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), com livre acesso à água.

A MCLR conjugada ao KLH cationizado (MCLR-*mc*KLH), segundo kit comercial Pierce<sup>®</sup> (Pierce Chemical Company<sup>®</sup>, EUA), foi o antígeno utilizado para realizar a imunização do coelho e, conseqüentemente obter os anticorpos policionais.

Antes do início do ciclo de imunizações, foi colhido 1 mL de sangue pela veia marginal da orelha do coelho (tempo zero). Este animal foi submetido a 4 doses do antígeno (200µg MCLR-*mc*KLH) via sub-cutânea dorsal, em diferentes sítios, emulsificado em ACF v/v na primeira inoculação, e com AIF v/v nas outras três imunizações com intervalo de 15 e/ou 17 dias. O sangue foi coletado pela veia marginal da orelha do animal no tempo zero e 15, 30, 47 e 62 dias após imunização. A dose para imunização foi baseada em dados escritos por HARLOW & LANE (1988), a qual varia de 50 a 1000 µg.kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo).

Após avaliação da cinética (que será descrito no item 4.12.2) de produção de anticorpos IgG no soro do animal foi realizada a sangria total por punção cardíaca.

Esta parte do experimento foi realizada na Empresa Paulistec - Comércio e Criação de Pequenos Animais LTDA-SP, pois a mesma dispunha de biotério e material adequados, e técnico qualificado para realizar a imunização e sangria de animais de pequeno porte.

# 4.12.2 Padronização de um método de imunoensaio para determinação da produção de anticorpos IgG por ELISA "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" em soro de coelho

As condições ideais do teste de ELISA indireto para determinação da cinética foram as seguintes. Inicialmente, as placas de microtitulação de 96 cavidades (Corning<sup>®</sup> high binding, EUA) foram sensibilizadas com o antígeno MCLR-cBSA e MCLR (0,5µg antígeno/poço) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e então, incubadas a 37ºC por duas horas e overnight a 4ºC, consecutivamente. Após sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05%. O bloqueio foi feito com 200µL de uma solução de caseína 2,5% por uma hora a 37°C. Após lavagens adicionou-se 100µl de soro de coelho diluídos (1:100 e 1:200) em solução diluente (caseína 0,5% em PBS). Após duas horas a 37°C, as lavagens foram repetidas e 100µL do conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma<sup>®</sup>, EUA) diluído 1:10000 foi incubado por uma hora a 37ºC. Depois de 3 lavagens a reação foi revelada com 100µL da solução cromógena OPD, contendo substrato (proporção de 10mg de OPD, 10µl de peróxido de hidrogênio e 10mL de tampão citrato/fosfato 0,2M, pH 5,0) durante 10min a 37ºC. A reação enzimática foi interrompida com adição de 100µl de ácido sulfúrico a 4N. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda 492 nm.

## 4.12.3 Purificação de soro de coelho imunizado com MCLR-*mc*KLH (Precipitação em Sulfato de Amônio)

A purificação do soro do coelho foi realizada segundo protocolo descrito por McKINNEY & PARKINSON (1986), com algumas modificações.

Após diluição do soro 1:5 em tampão acetato de sódio 60mM pH 4,0, foi ajustado o pH para 4,5 com hidróxido de sódio 1M. Lentamente e sob homogeneização, foi acrescido 25µL de ácido caprílico por mL de amostra. Todo este volume foi mantido sob agitação por 30min a temperatura ambiente. Logo em seguida foi submetido à centrifugação a 12857g durante 30min a 4°C. Foi aferido o volume final de sobrenadante filtrado em gaze. Após acrescentarmos PBS 10X ao sobrenadante na proporção 1:10 (1 parte de PBS concentrado 10 vezes para 10 partes de sobrenadante), ajustou-se novamente o pH para 7,4 com hidróxido de

sódio 1N. Ao resfriar todo o volume até atingir a temperatura de 4°C, adicionou-se lentamente sulfato de amônio na proporção 0,277g/mL. Deixou-se sob agitação por 30min a 4°C e centrifugamos a 12857g durante 15min sob refrigeração de 4°C. Ao precipitado foram acrescidos 10% de PBS comparado ao volume inicial. Dializou-se em membrana de 40KDa (Spectrapor<sup>®</sup> Membrane, EUA) por 2 dias em PBS a 4°C, realizando trocas de no mínimo 3 vezes ao dia. Logo após aquecimento de 50 a 52°C por 20min, o volume resfriado foi centrifugado a 3214g durante 20min. Uma alíquota diluída 1:10 em PBS foi submetida à leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 280 nm em cubeta de quartzo. Todo o material contendo o anticorpo purificado foi aliquotado e congelado a -20°C até o momento do uso.

A concentração das proteínas (unidade em µg/mL) foi quantificada por leitura em espectrofotômetro e pode ser expresso pela relação abaixo:

#### DO x 725 x FD,

onde, DO foi a densidade óptica lida em 280nm, 725 o fator de correção para anticorpo de coelho e, FD o fator de diluição da amostra.

4.13 Padronização e validação do método de ELISA competição para detecção e quantificação de microcistina e nodularina utilizando anticorpos policlonais anti-MCLR-*mc*KLH obtido em coelho

4.13.1 Padronização do ensaio ELISA competição

## 4.13.1.1 Determinação da concentração e do antígeno de sensibilização ideais ao ensaio ELISA competição

Este ensaio foi realizado por ELISA indireto padronizado no item 4.5.2, com algumas modificações.

As concentrações de toxina conjugada ou não, avaliadas na etapa de sensibilização foram as seguintes:

(i) 0,0315; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0µg MCLR-cBSA/poço

(ii) 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0µg MCLR/poço
# 4.13.1.2 Determinação da diluição do anticorpo policional ideal ao ensaio ELISA competição

As diluições do anticorpo policional obtido (anticorpo primário) avaliadas foram as seguintes:

(i) placa sensibilizada com toxina conjugada (MCLR-cBSA): 1:1000 a 1:14000;

(ii) placa sensibilizada com toxina (MCLR): 1:100 a 1:1600.

### 4.13.1.3 Determinação da região linear da curva dose-resposta de MCLR préincubada com o anticorpo policional obtido no ensaio ELISA competição

As concentrações de toxina avaliadas foram de 2µg a 61pg MCLR/mL, enquanto que as diluições de anticorpo policional foram de 1:800 a 1:5000. Este ensaio de ELISA competição foi realizado como descrito no próximo item 4.13.1.4.

Após a obtenção da curva dose-resposta, calculamos o Índice de Reatividade de cada ponto, de acordo com a fórmula abaixo:

Índice de  
Reatividade (%) = 
$$\frac{(Abs SEM COMPETIÇÃO - Abs AMOSTRA)}{Abs SEM COMPETIÇÃO} \times 100$$

onde,

Abs SEM COMPETIÇÃO refere-se à reação sem adição de antígeno MCLR.

# 4.13.1.4 Método enzimático por ELISA competição otimizado para determinação e quantificação de microcistina e nodularina em amostras ambientais

As condições ideais do teste de ELISA competição para determinação de microcistina e nodularina foram as seguintes. Inicialmente, as placas de microtitulação de 96 cavidades (Corning<sup>®</sup> high binding, EUA) foram sensibilizadas com o antígeno MCLR (0,5µg/poço) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e então, incubadas a 37°C por duas horas e *overnight* a 4°C, consecutivamente. Após esta sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05%. O bloqueio foi feito com 200µL de uma solução

de caseína 2,5% por uma hora a 37°C. Em um tubo de ensaio a parte, pré-incubouse 100µL MCLR (0,25 a 2ng/mL) diluída em água (Milli-Q<sup>®</sup>, EUA) autoclavada, com 100µL de anticorpo policlonal anti-MCLR-*mc*KLH diluído 1:3200 em caseína 0,5% em PBS, por 20 minutos a 37°C, para formação de imunocomplexo. Um volume de 100µl desta mistura foi adicionado à microplaca bloqueada e lavada. Após uma hora a 37°C, as lavagens foram repetidas e 100µL do conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma<sup>®</sup>, EUA) diluído 1:10000 foi incubado por uma hora a 37°C. Depois de 3 lavagens a reação foi revelada com 100µL da solução cromógena OPD, contendo substrato (proporção de 10mg de OPD, 10µl de peróxido de hidrogênio e 10mL de tampão citrato/fosfato 0,2M, pH 5,0) durante 13 minutos a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com adição de 100µl de ácido sulfúrico a 4N. A leitura da reação foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda 492 nm.

#### 4.13.2 Validação do ensaio ELISA competição

Para validação do ensaio ELISA competição os seguintes parâmetros foram avaliados experimentalmente, LIQ, especificidade, seletividade, recuperação, linearidade, precisão, exatidão, e robustez. Todos esses ensaios foram baseados nas normas da ANVISA e do INMETRO, como explicado no item 2.17 da Revisão da Literatura.

#### 4.13.2.1 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

Sabendo-se que o LIQ pode apresentar uma variação de até 20% (NAGAJARA *et al.*, 1999; KARNES *et al.*, 1991; UH *et al.*, 2008), para este parâmetro foram realizadas uma curva de calibração em simplicata e três sextuplicatas do primeiro ponto da curva (0,25ng/mL). Para diluição das amostras foi utilizada água Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada e batizada para uma concentração de 0,25ng/mL.

#### 4.13.2.2 Especificidade e Seletividade

Neste parâmetro foram realizados ensaios com amostras Verdadeiro Negativas, ou seja, em amostras negativas para microcistina e/ou nodularina confirmadas por Espectrometria de Massas, como descrito no item 4.2 deste trabalho, com algumas modificações. Um total de 9 amostras negativas foram ensaiadas em duplicata em um mesmo dia.

Através dessas análises foi possível determinar o Limite para Aprovação da Amostra Negativa, através do cálculo abaixo:

$$LA_{AN}$$
 (%) =  $IR_{LQ} \times 0.2$ 

onde,

 $LA_{AN}$  refere-se ao Limite de Aprovação da Amostra Negativa (%); IR<sub>LQ</sub>(%) refere-se ao Índice de Reatividade referente ao LQ (%).

A amostra foi considerada APROVADA pelo método ELISA competição quando o Índice da amostra era inferior à 20% do LIQ, ou seja, quando o Índice da amostra for menor ou igual ao Índice do menor ponto da curva de calibração (0,25ng/mL) x 0,2. Sob essas condições a amostra também foi considerada Verdadeiro Negativa. Esse conceito é apresentado nas normas, onde o LIQ deve distinguir-se de uma amostra negativa por um fator de cinco vezes (20%).

#### 4.13.2.2.1 Influência do metanol no ensaio ELISA competição

Amostras de água Milli-Q<sup>®</sup> autoclavadas foram contaminadas separadamente com o padrão de MCLR (Sigma<sup>®</sup>, EUA), padrão nodularina (Sigma<sup>®</sup>, EUA) e metanol em diversas concentrações.

Essas amostras foram ensaiadas de acordo com o método aqui desenvolvido com Caseína (metodologia descrita no item 4.13.1.4) e com o kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA. Vale lembrar que, mesmo o kit comercial apresentando calibradores e controles próprios, o padrão Sigma<sup>®</sup> (EUA) MCLR foi avaliado no mesmo ensaio.

Após obtenção da absorbância das amostras foram obtidos o Índice de Reatividade (como descrito no item 4.13.1.3) e, a concentração calculada das amostras a partir de uma curva de calibração construída utilizando modelo matemático logarítmico.

### 4.13.2.2.2 Protocolo kit comercial Abraxis<sup>®</sup> - ELISA competição indireto

Inicialmente, em poços previamente sensibilizados com o antígeno OVA-ADDA ou BSA-ADDA (proteína carreadora acoplada ao grupamento ADDA), foram incubados (em simplicata) 50µL dos controles, calibradores e amostras e, 50µL da solução anticorpo do kit (anticorpo IgG anti-MCLR), respectivamente. Após incubação a temperatura ambiente durante 90min os poços foram lavados 3 vezes com a solução de lavagem do kit e, posteriormente foi adicionado 100µL da solução conjugado (anticorpo anti-Fc de IgG marcado com peroxidase). Após 30min de incubação a temperatura ambiente, foram repetidas as lavagens e acrescido 100µL da solução substrato do kit (solução cromógena TMB). Os poços foram incubados a temperatura ambiente durante 20 a 30min, sob proteção da luz e, em seguida foi acrescido 50µL da solução stop do kit (ácido sulfúrico diluído). A leitura da reação foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda 450 nm.

#### 4.13.2.3 Recuperação

#### 4.13.2.3.1 Processo de extração

Amostras de água (água Milli-Q<sup>®</sup>, EUA) autoclavadas ou amostra da natureza Verdadeiro Negativa) foram submetidas ao seguinte processo de extração:

(i) adição ou não de uma concentração conhecida de MCLR (padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA);

(ii) sonicação da amostra por 30seg em gelo, utilizando probe ultrasônica (VirSonic<sup>®</sup>, EUA), 20kHz;

(iii) filtração da amostra em filtro 0,45µm (filtro Millex HV com membrana PVDF, 13mm diâmetro Millipore<sup>®</sup>, EUA);

(iv) centrifugação da amostra durante 5min em centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5804 (BioResearch do Brasil<sup>®</sup>, Brasil), 154g, 4°C;

(v) separação do sobrenadante e realização dos experimentos.

### 4.13.2.3.2 Amostra em Solução, Amostra em Matriz Extraída e Amostra em Matriz

Para esta figura de mérito, as amostras foram divididas em três tipos de grupos:

(i) amostra preparada em solução (SÇÃO)

(ii) amostra em matriz extraída (EXT)

(iii) amostra em matriz (MTZ)

A curva de calibração foi realizada em simplicata e, cada controle (alto, médio e baixo) em sextuplicata, para cada grupo, em um mesmo dia.

No grupo SÇÃO, uma amostra de água Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada foi batizada com concentrações conhecidas do padrão MCLR, mas não foram submetidas ao processo de extração.

No grupo EXT, após uma amostra da natureza Verdadeiro Negativa ter sido aliquotada e batizada com concentrações conhecidas de MCLR (controles alto, médio e alto), cada uma foi submetida ao processo de extração descrito no item 4.13.2.3.1.

No grupo MTZ, após uma amostra Verdadeiro Negativa da natureza ter sido submetida ao processo de extração, a mesma foi aliquotada e batizada com concentrações conhecidas de MCLR (controles alto, médio e alto).

Posteriormente a estes três experimentos, cada amostra foi ensaiada pelo método ELISA competição e, a partir da média dos Índices de Reatividade (%) de cada grupo de controle, foram calculadas a Recuperação Absoluta (%), Recuperação Relativa (%) e Efeito Matriz (%), conforme as equações abaixo:

Rec. Absoluta (%) = 
$$\left(\frac{\text{Média IR EXT}}{\text{Média IR SÇÃO}}\right) \times 100$$
  
Rec. Relativa (%) =  $\left(\frac{\text{Média IR EXT}}{\text{Média IR MTZ}}\right) \times 100$   
Efeito Matriz (%) =  $\left(\frac{\text{Média IR MTZ}}{\text{Média IR SÇÃO}}\right) \times 100$  - 100

onde, IR corresponde ao Índice de Reatividade (%) de cada controle.

#### 4.13.2.4 Linearidade

Costuma-se considerar que a linearidade do método refere-se a resposta do método como um todo, de forma que a análise de uma amostra de concentração conhecida e certificada dentro da faixa de concentração do método deve produzir respostas equivalentes, independentemente da concentração. Por exemplo, se a concentração da amostra é 1ng/mL a resposta do método deve ser igual a 1ng/mL, se for 10ng/mL a resposta deve ser 10ng/mL, e assim sucessivamente.

A linearidade da resposta do instrumento ou da análise instrumental ou da metodologia analítica não precisa ser necessariamente linear, desde que o modelo matemático corrija os valores, de modo que o método como um todo seja linear (UH *et al.*, 2008).

Para a curva de calibração, foram escolhidos 8 pontos distribuídos de forma equidistantes, tendo como base a concentração de interesse (1ng/mL). A curva foi construída a partir de amostras de água Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada e batizadas nas seguintes concentrações de MCLR 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 e 2,0ng/mL (padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA).

O estudo da linearidade da metodologia analítica incluiu a análise de 9 curvas de calibração e cálculo do Desvio do Valor Nominal (Des (%)) em função logarítmica (In) de cada ponto da curva de calibração (ver item 4.13.2.5). A partir daí, foi elaborado um gráfico do tipo dispersão e, realizada a análise da Distribuição dos Resíduos com Relação à Concentração Nominal de MCLR em função log.

O estudo da linearidade do método relacionou a concentração nominal dos controles alto, médio e alto, com a Recuperação Absoluta (%), previamente calculada no item 4.13.2.3.2. A partir daí, foi elaborado um gráfico do tipo dispersão e realizada a análise da Distribuição dos Resíduos com Relação à Concentração Nominal de MCLR calculados seguindo o modelo matemático de regressão linear. Também foi adicionada uma linha de tendência e calculado o quadrado do coeficiente de correlação linear (R<sup>2</sup>).

A qualidade do resultado de um método analítico é altamente dependente da qualidade da curva de calibração, já que a concentração do composto de interesse numa amostra desconhecida á calculada a partir dos resultados de análise de regressão obtidos da curva de calibração (ALMEIDA *et al.*, 2002). Por isso, tendo em vista a relevância de uma curva de calibração ideal ao método, foi aplicado o teste de homocedasticidade ao método ELISA competição padronizado. No modelo de regressão linear dos mínimos quadrados pressupõe-se uma igualdade de variâncias entre todos os pontos da curva (homocedasticidade). No entanto, este modelo é mais influenciado pelo desvio padrão das concentrações mais altas da curva do que pelo desvio padrão das concentrações mais baixas, provocando uma redução da precisão nas concentrações mais baixas (ALMEIDA *et al.*, 2002). Para contrabalancear este ponto indesejável, principalmente para métodos que usualmente determinam concentrações baixas do analito nas amostras, foi escolhido o melhor modelo matemático que descreva a resposta do ensaio de ELISA competição, ou seja, do modelo que apresentou uma melhor distribuição dos desvios.

#### 4.13.2.5 Precisão e Exatidão

Para avaliar este parâmetro, primeiramente definiu-se os controles à serem utilizados. Determinou-se que o controle baixo fosse até três vezes superior ao LIQ. O controle alto variaria entre 75 a 85% do LMQ (Limite Máximo de Quantificação), porém o ideal foi de 80% do LMQ. Já, o controle médio corresponderia ao ponto médio da curva, mas não um dos pontos da curva.

Além disso, é importante ressaltar que todos os cálculos de diluição foram realizados à partir de uma solução padrão de MCLR (Sigma<sup>®</sup>, EUA) 10X concentrada (20ng/mL).

Portanto, foram realizados três ensaios em paralelo, em dois dias diferentes: (i) uma curva de calibração;

(ii) octuplicata de cada controle alto (1,6ng/mL), médio (1,2ng/mL) e baixo (0,6ng/mL) para cada curva.

Para cada controle e para cada ponto da curva de calibração foram calculados os Índices de Reatividade (%) e suas respectivas concentrações, correlacionando-se, portanto, a concentração nominal com a concentração calculada. Além disso, também foi calculado o Desvio do Valor Nominal (Des (%)) de cada controle (alto, médio e baixo), pela fórmula abaixo. Aqueles que não estavam

dentro do intervalo (± 15%) não foram selecionados. O Índice de Reatividade foi calculado conforme explicado no item 4.13.1.3.

$$Des (\%) = \left( \frac{Concentração Calculada (ng/mL)}{Concentração Nominal (ng/mL)} \times 100 \right) - 100$$

Após o cálculo do Des (%) de cada controle (de cada duplicata/ensaio/dia) foram selecionadas 8 concentrações calculadas de cada controle e, avaliadas a Precisão e a Exatidão, intra e inter-dias, intra e interensaio. As fórmulas utilizadas estão descritas abaixo:

$$Precisão (CV\%) = \left( \begin{array}{c} \underline{DESVPAD (Concentração Calculada)} \\ Média da Concentração Calculada (ng/mL) \end{array} \right) x 100$$
$$Exatidão (\%) = \left( \begin{array}{c} \underline{Média da Concentração Calculada (ng/mL)} \\ Concentração Nominal (ng/mL) \end{array} \right) x 100$$

Os parâmetros de Precisão e Exatidão foram avaliados a partir do Coeficiente de Variação (CV%), sendo que, para um método ser considerado preciso e exato (APROVADO), este deve estar abaixo de 15% e acima de 85%, respectivamente.

#### 4.13.2.6 Robustez

Os experimentos referentes à este parâmetro foram realizados em paralelo ao ensaio de recuperação.

# 4.14 Descrições das amostras analisadas quanto à sua origem, coleta, armazenamento, transporte e processo de extração

Um total de 62 amostras de água foram analisadas utilizando dois kits de ELISA competição, ensaio padronizado em caseína (descrito no item 4.13.1.4) e kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA (descrito no item 4.13.2.2.2).

As amostras incluem (i) meios de cultura mantidos em nosso laboratório (FCF-USP), (ii) amostra das represas Billings-SP, Guarapiranga-SP, Cotia-SP, Americana-SP, Jucazinho-PE, Recife-PE, Natal-RN, (iii) amostra do lago de

Piracicaba na ESALQ-USP e, (iv) amostras dos bebedouros dos blocos da FCF-USP.

As amostras de superfície dispensaram o uso de equipamentos específicos para sua coleta. Portanto, foram utilizados baldes para realizar a coleta a 20cm abaixo da superfície da água. Em outros casos, para filtrar grandes volumes de água e para concentrar a amostra, foi utilizada uma rede de fitoplâncton de náilon (20µm de malha, 50cm de diâmetro) com um coletor (copo) na extremidade. Com isso foi possível obter informação fitoplanctônica de toda coluna d'água. Quando possível, as amostras foram preservadas com lugol 0,3% ou formol 2% e depois mantidas sob refrigeração, evitando o excesso de luminosidade, até o momento da análise.

Todas as amostras foram submetidas ao processo de extração descrito previamente no item 4.13.2.3.1 (etapas ii a v) e quantificadas de acordo com a curva de calibração construída utilizando modelo matemático logarítmico (In).

Essas amostras também foram analisadas pelo sistema LC-MS descrito no item 4.2, com algumas modificações.

# 4.15 Métodos de detecção e quantificação de variantes de microcistina e/ou nodularina

Dentre os vários métodos existentes para detectar e/ou quantificar variantes de microcistina e nodularina foram utilizados HPLC, LC-MS e ELISA competição indireto (Kit comercial Abraxis<sup>®</sup> e metodologia padronizada).

Como este trabalho foi desenvolvido em várias etapas, para facilitar o entendimento e interpretação dos resultados, o item "RESULTADOS" foi apresentado seguido ao item "DISCUSSÃO"

### 

#### 5.1 Análise da obtenção da microcistina-LR

#### 5.1.1 Análise da manutenção da cepa BCCUSP 100 em meio de cultura BG11

Algumas células quando mantidas em meio de cultura, contendo algum nutriente específico, podem apresentar características próprias, diferindo-se da mesma célula presente em florações.

Foi observado em algumas análises microscópicas (aumento de 40x) a presença de diferentes gêneros de *Microcystis sp*. Foi possível verificar também a presença de mucilagem característica em amostras de florações (**Figura 1C**), as quais não foram identificadas em amostras de *Microcystis sp* de meio de cultura.

Situação semelhante ocorreu em amostras que continham gêneros de *Anabaena sp.* Na natureza, estas células apresentam aparência espiralada, enquanto que em meio de cultura, as mesmas perdem essa característica e ficam com aspecto filamentoso. Nessas amostras foram observados heterocitos, que são células diferenciadas com parede esquelética dupla, formada externamente por polissacarídeos e internamente por glicolipídios e desprovida de pigmentação algal, cuja função é fixar o nitrogênio atmosférico. Estes tipos celulares também apresentaram acinetos, que são células diferenciadas com função de armazenamento de nutrientes (HROUZEK *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi utilizado meio BG11, que é um meio enriquecido com fósforo e nitrogênio em concentrações ideais para o bom crescimento da alga. Quando este meio é desprovido destes compostos, ocorre a inibição do crescimento do gênero *Microcystis sp.* Estes gêneros, que fazem parte da família *Microcystaceae*, apesar de não desenvolver heterocito e acineto, apresentam aerótopos, que são células especiais que se enchem de ar e têm a função de auxiliar na flutuação da alga de acordo com a presença/ausência de luz solar. Portanto, como estas cianofíceas têm uma capacidade dificultada em metabolizar o nitrogênio atmosférico, o meio deve ser acrescido de nitrato (SOUZA & CARVALHO, 2006).

A manutenção desta cepa e a busca de uma floração contendo a alga que produz a toxina microcistina tem se tornado uma rotina em nosso laboratório (FCF-USP), pois isto, além de padronizar o desenvolvimento de um multi-método de extração de toxinas algais já conhecidas, reduziriam os gatos referentes à compra de padrões de MCLR, as quais apresentam alto custo e demora no prazo de entrega.

Como um dos nossos objetivos foi o de imunizar camundongos utilizando diferentes vias de imunização e diferentes adjuvantes e antígenos (purificado e não purificado), quantidades suficientes de toxina com alto grau de pureza, cerca de 95%, foram obtidas e submetidas à conjugação com KLH para posterior imunização via glutaraldeído. Até o momento, algumas variantes de MCLR têm sido isoladas a partir desta cepa, entre elas a MCLR e a [Asp<sup>3</sup>]-MCLR (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2005).

#### 5.1.2 Análise da extração de microcistina-LR a partir do meio de cultura BG11

A partir da comparação entre o tempo de retenção do padrão e o espectro do composto absorvido em  $\lambda$  = 238 nm, a MCLR proveniente da cepa BCCUSP 100 foi purificada por HPLC-PDA em coluna preparativa e concentrada (719 µg) pela coleta sucessiva de picos. Os cromatogramas e espectros de absorção obtidos, conforme metodologia descrita no item 4.2, estão apresentados nas **Figuras 19 a 21**. Posteriormente, a presença desta variante foi confirmada por Espectrometria de Massas, conforme apresentado nas **Figuras 22 a 26**.



Figura 19. Cromatograma e espectro de absorção em 238 nm da microcistina-LR obtidos por HPLC-PDA referentes ao padrão Sigma<sup>®</sup>



Figura 20. Cromatograma e espectro de absorção em 238nm da microcistina-YR obtidos por HPLC-PDA referentes ao padrão Sigma<sup>®</sup>



Figura 21. Cromatograma e espectro de absorção em 238nm referentes à cepa BCCUSP 100 obtidos por HPLC-PDA



**Figura 22.** Espectro de Massas obtido por MS-ESI referente à infusão direta da MCLR presente na cepa BCCUSP 100 em Scan *m/z* 200-1050 [M+H]<sup>+</sup>



Figura 23. MS/MS do íon m/z 995.4 mostrando a fragmentação característica da MCLR



**Figura 24.** MS/MS do íon de m/z 509.5. A fragmentação mostra que se trata de um íon dupla carga [M+Na+H]<sup>+</sup> da MCLR. Chamam a atenção os íons m/z 995.3 [M+H]<sup>+</sup> e m/z 135 (Adda)



Figura 25. Ampliação de espectro mostrando a abundância isotópica característica de íons dupla carga: picos separados por *m/z* 0,5



**Figura 26.** Distribuição isotópica de íons com uma carga apenas: separação dos picos por m/z 1, e não m/z 0,5 como na figura anterior.

O pico obtido em análise por HPLC-PDA referente à MCLR foi coletado e utilizado como hapteno para conjugação e imunização, respectivamente. Vale lembrar que a purificação nem sempre é 100%. Todavia, os restos de pigmentos e parede celular presentes no extrato algal serviram como adjuvantes para induzir uma resposta imune, pois o mesmo não apresentou toxicidade.

A partir do Espectro de Massas obtido por MS-ESI referente à infusão direta da MCLR presente na cepa BCCUSP 100 em Scan m/z 200-1050 [M+H]<sup>+</sup> (**Figura 22**) foi possível observar a presença da MCLR pela intensidade do íon m/z 995.4 [M+H]<sup>+</sup>. E para confirmarmos a presença desta toxina, foi realizada uma fragmentação deste íon, ou seja, foi feito um MS/MS do íon m/z 995,4 [M+H]<sup>+</sup> mostrando a fragmentação característica da MCLR, o qual é muito semelhante à fragmentação do padrão Sigma<sup>®</sup> (EUA) pela intensidade dos íons m/z 599.3, 553.2 e 977.4 [M+H]<sup>+</sup> (**Figura 23**).

Ao mesmo tempo, foi notável a intensidade isotópica de outro íon de m/z 509.5 [M+H]<sup>+</sup> que não esteve presente na fragmentação característica do padrão de MCLR. Para esclarecermos esta dúvida foi realizado um MS/MS do íon de m/z 509.5 (**Figura 24**). A fragmentação nos mostrou que se tratava de um íon dupla carga [M+Na+H]<sup>+</sup> de MCLR, chamando a atenção para os íons m/z 995.3 [M+H]<sup>+</sup> e m/z 135.1 (Adda).

Ampliando este espectro de fragmentação (Figura 25) observou-se em detalhes a abundância isotópica característica citada acima de íons dupla carga,

onde os picos foram separados por m/z 0,5. Quando se tem uma distribuição isotópica de íons com uma carga apenas (**Figura 26**), a separação dos picos ocorre por m/z 1, e não m/z 0,5.

A **Figura 27** apresenta um esquema da fragmentação característica da MCLR, enfatizando a origem dos íons m/z 599.3 e 135.1 [M+H]<sup>+</sup> formados, sendo que estes íons representam os aminoácidos 3 a 6 (Asp-Arg-Adda-Glut) e uma parte do aminoácido Adda, respectivamente.

Dentre esses resultados concluímos que, foi obtido um pool de MCLR (*m/z* 995.3 [M+H]<sup>+</sup> a partir de uma amostra purificada de meio de cultura BG11. Esse material foi utilizado para (i) realização de conjugação com KLH via glutaraldeído e, posterior imunização de animais experimentais, (ii) como padrão de fragmentação em análises por LC-MS e, (iii) como controle positivo nos ensaios imunoenzimáticos.



**Figura 27.** Padrão de fragmentação da MCLR, enfatizando os íons *m/z* 599.3 e *m/z* 135,08, onde este último refere-se ao grupamento Adda

#### 5.1.3 Análise da extração de microcistina-LR a partir de florações

Paralelamente à obtenção de extratos algais provenientes de meio de cultura, foram realizadas análises de amostras de florações que continham toxinas novas e importantes e que pudessem ser concentradas como explicado anteriormente.

As análises por HPLC de microcistina extraída de florações (extração realizada de acordo com o item 4.1.3) foram realizadas de acordo com o método descrito e são mostradas nas **Figuras 28 e 29**.



Figura 28. Cromatograma e espectro de uma amostra positiva para microcistina proveniente de Pernambuco-PE



Figura 29. Cromatograma e espectro de uma amostra positiva para microcistina proveniente de Natal-RN

Conforme observado nas **Figuras 28 e 29**, as florações foram abundantes em variantes de microcistina. Esse extrato algal foi analisado pelo nosso grupo quanto à sua atividade biológica em neutrófilos de humanos (KUJBIDA *et al.*, 2006) e quanto ao seu potencial em induzir uma resposta imune. De forma semelhante ao extrato algal obtido de meio de cultura, foi também realizado um pool do extrato algal originado dessas florações com as mesmas finalidades de análise.

Toxinas provenientes de extratos algais foram purificadas e quantificadas por LC-MS, para que pudessem ser utilizadas como hapteno para ser conjugado com uma proteína carreadora, servindo, portanto, como um antígeno bruto. É sabido que, por mais que extraiamos as toxinas de uma amostra, seja ela proveniente de meio de cultura ou de floração, teremos em pequena quantidade de restos de parede celular, clorofila-a, ficocianina entre outros pigmentos. Ou seja, ela não será totalmente pura.

Sob o ponto de vista imunológico, imunizar um camundongo com antígeno bruto, isto é, não totalmente puro, pode melhorar a resposta imunológica, visto que outras partículas podem funcionar como moléculas adjuvantes, desde que as mesmas não sejam tóxicas. Por outro lado, dificultaria a obtenção de clones positivos pelo excesso de reações cruzadas, processo este que seria resolvido pela triagem dos hibridomas com o antígeno puro (padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA).

## 5.2 Análise do desenvolvimento de um multi-método para determinação de microcistinas e algumas de suas variantes por Espectrometria de Massas

A **Figura 30** abaixo apresenta um cromatograma obtido da fração metanólica de uma amostra de água contaminada e processada como descrito no item 4.2. Nas demais frações eluídas (H<sub>2</sub>O e MeOH 30%) não foi verificada a presença das toxinas.



padrões de microcistina na concentração de 1µg/L

As **Figuras 31 a 34** apresentam o Espectro de Massas obtido por LC-MS-ESI referente aos padrões de MCRR, YR, LR e LA, respectivamente, de acordo com a relação massa/carga específica de cada toxina (m/z).





1045 [M+H]+



Figura 33. Espectro de Massas obtido por LC-MS-ESI referente ao padrão de MCLR m/z . 995 [M+H]⁺



A partir da padronização deste multi-método algumas amostras de florações foram analisadas, como mostram as **Figuras 35 e 36**.



Figura 35. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na Praia de Sales-SP



Figura 36. Cromatograma obtido por LC-MS a partir da análise de uma floração ocorrida na Barragem do Rio Areia-RS

#### 5.3 Análise da conjugação da microcistina-LR

Apesar do uso de espaçador ser recomendado, pois tornaria o conjugado maior, não foi utilizada esta estratégia, pois aumentaria também a formação de resposta imune inespecífica.

Nos processos de conjugação, o procedimento *zero-length cross-linking* mediado pelo EDC foi o utilizado. Para maiores esclarecimentos, peptídeos ricos em Lis, Glu, Arg, His ou Asp, a ligação do hapteno ao carreador pode ser de difícil entendimento, visto que pode ocorrer uma mudança estrutural da substância imunogênica formada, levando à polimerização do peptídeo na superfície do carreador, o que pode por outro lado, aumentar a imunogenicidade da partícula, amplificando a resposta imunológica esperada.

#### 5.3.1 Via carbodiimida

A reação de conjugação foi realizada seguindo o modelo esquematizado na **Figura 37**. A diimina presente no EDC reagiu primeiramente com a carbonila do peptídeo, formando um intermediário ativo instável acilisouréia, que por sua vez interagiu com os grupamentos amina livres fornecidos pelo cBSA ou *mc*LKH, resultando em uma ligação amida e liberação do mediador EDC como produto solúvel isouréia (HERMANSON, 1996).



Figura 37. Modelo esquemático da conjugação MCLR-cBSA via carbodiimida

Um dos primeiros desafios deste trabalho referiu-se a indução da resposta imune em camundongos para que a produção de anticorpos de classe IgG pudesse ser detectada por um método de imunoensaio (ELISA, por exemplo). Mas para isso, os primeiros esforços foram concentrados em fazer com que o peptídeo (toxina microcistina-LR) se tornasse imunogênico e, para isso, uma conjugação foi realizada. Quanto à sinalização intracelular e os mecanismos pelo qual um antígeno (conjugado peptídeo-proteína carreadora) foi fagocitado, processado por uma APC e apresentado ao sistema imune (**APÊNDICE II**) tem-se que, dependendo da característica da molécula (hidrofobicidade, por exemplo), uma região do conjugado será mais ou menos exposta na célula APC.

Em outras palavras, isto significa que a maioria dos aminoácidos alifáticos (leucina, valina, alanina e glicina) e aromáticos (triptofano e fenilalanina) hidrofóbicos freqüentemente está localizada no interior das moléculas protéicas ou em áreas que interagem com estruturas apolares, como os lipídeos (**Figura 38**). Eles formam a região mais hidrofóbica da célula que não são muito solúveis em água ou outras moléculas hidrofílicas. Por outro lado, aminoácidos de caráter mais hidrofílico (ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e treonina) estão mais localizados próximo ou ligado à superfície celular, onde eles podem ser hidratados com o ambiente aquoso que envolve o ambiente (HERMANSON, 1996).





**Figura 38.** Distribuição esquemática dos aminoácidos no interior celular quanto à sua hidrofobicidade. Os aminoácidos de caráter hidrofóbico (**0**) ou hidrofílico (**•**) se localizam mais próximo ao núcleo ou à parede celular, respectivamente.

#### 5.3.1.1 Ao cBSA

As leituras das absorbâncias obtidas em  $\lambda$  = 280nm estão apresentadas na **Tabela 12** abaixo.

Tubo	Abs. 280 nm			
Branco	0,001			
1	0,047			
2	0,052			
3	0,052			
4	0,328			
5	0,465			
6	0,496			
7	0,695			
8	0,208			
9	0,253			
10	0,157			

**Tabela 12.** Leitura da absorbância em  $\lambda$  = 280nm do eluato obtido a partir da coluna de gel filtração após conjugação MCLR-cBSA

Como pode ser detalhado no item 4.3.1 várias frações foram coletadas em tubos separados. Analisando a crescente densidade óptica ( $\lambda$  = 280nm) obtida, um pool do eluato (volume final de 3,7mL) foi feito entre os tubos 4 a 9. Este material foi aliquotado e utilizado para imunizar camundongos Balb/c.

A concentração final de conjugado foi baseada na quantidade de proteína carreadora utilizada no experimento e no volume final de reação. Considerando-se uma perda de 10% a partir de 1mg de cBSA, a concentração inicial desta proteína carreadora foi de 900µg. E por regra matemática de três simples, tem-se que:

900 μg (cBSA) - 3,7 mL (Volume final de reação) X - 1 mL X = 243μg conjugado/mL

A partir desta concentração final (243µg conjugado/mL), realizou-se uma série de imunizações de quatro doses em 5 camundongos via sub-cutânea dorsal (grupo G9).

#### 5.3.1.2 Ao mcKLH

As análises desta conjugação foram muito semelhantes à conjugação utilizando cBSA, pois a mesma via EDC de conjugação foi utilizada. As leituras das absorbâncias obtidas em  $\lambda$  = 280nm estão apresentadas na **Tabela 13** abaixo.

Tubo	Abs. 280 nm
1	0,002
2	0,010
3	0,016
4	0,041
5	0,086
6	0,133
7	0,280
8	0,189
9	0,142
10	0,099
11	0,042

**Tabela 13.** Leitura da absorbância em  $\lambda$  = 280nm do eluato obtido a partir da coluna de gel filtração após conjugação MCLR-*mc*KLH

Como pode ser detalhado no item 4.3.2 várias frações foram coletadas em tubos separados. Analisando os picos das densidades ópticas obtidas em  $\lambda$  = 280nm, um pool do eluato (volume final de 3,0mL) foi feito entre os tubos 4 a 10, o qual foi aliguotado para imunizar camundongos Balb/c.

A concentração final de conjugado foi semelhante ao descrito no item anterior (5.3.1.1), diferindo-se apenas pelo volume final de reação (3mL). E por regra matemática de três simples, tem-se que:

900 μg (KLH) - 3,0 mL (Volume final de reação) X - 1 mL X = 300μg conjugado/mL A partir desta concentração final (300µg conjugado/mL), foram realizadas uma série de imunizações de quatro doses em 5 camundongos via sub-cutânea dorsal (grupo G8).

#### 5.3.2 Via glutaraldeído

#### 5.3.2.1 Ao KLH

Visto que o KLH é uma proteína altamente imunogênica, tanto a toxina MCLR purificada do meio de cultura BG11 quanto a toxina comercial (padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA) foram conjugadas ao KLH utilizando duas vias, EDC e glutaraldeído.

A conjugação pela via glutaraldeído envolveu uma reação entre a carbonila terminal do glutaraldeído e a amina primária do hapteno, formando um intermediário diimina (base Schiff), que na presença de cianoboroidreto e glicina, foi reduzido a uma amina secundária. Este glutaraldeído acoplado ainda pôde reagir com o grupamento amina de outra molécula ou de outra base Schiff (**Figura 39**).

A solução de glutaraldeído foi preparada no momento do uso, pois quando fora do prazo de validade ou o mau condicionamento deste reagente, pode levar à sua polimerização, promovendo a formação de conjugados indeterminados (HERMANSON, 1996).



Figura 39. Modelo esquemático da conjugação MCLR-KLH via glutaraldeído

Durante a reação de acoplamento da MCLR purificada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) ao KLH, após adição de glutaraldeído observou-se inicialmente uma turvação da reação e, ao ser adicionada a glicina ocorreu uma mudança de cor, de amarelo para marrom (GULLICK, 1994).

A concentração final de conjugado foi baseada na quantidade de proteína carreadora utilizada no experimento e no volume final de reação. Considerando-se uma perda de 10% a partir de 1mg de KLH, a concentração inicial desta proteína carreadora foi de 900µg. E por regra matemática de três simples, tem-se que

900 μg (cBSA) - 0,960 mL (Volume final de reação) X - 1 mL X = 937μg conjugado/mL

A partir desta concentração final (937µg conjugado/mL), realizou-se uma imunização de uma dose em 5 camundongos via sub-cutânea dorsal (grupos G8 e G9).

Neste trabalho a via de conjugação MBS, exemplificada no item 2.9 deste trabalho, não foi utilizada, pois a toxina MCLR não apresenta grupamento tiol em sua estrutura.

Apesar de não ter sido analisado o índice de conjugação entre peptídeo e proteína carreadora (livre e/ou conjugado), onde o calculo de conjugação foi baseado somente no modelo matemático por regra de três simples, não foi observada uma presença considerável de toxina livre. Esta afirmação foi fundamentada no fato de que, a imunização dos camundongos com o conjugado cationizado não resultou em óbito dos animais.

A análise do soro de animais imunizados via subcutânea foi realizada paralelamente à padronização de um método imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG anti-MCLR. O controle positivo comercial, anticorpo monoclonal anti-MCLR (MC10E7 - Alexis<sup>®</sup>, BioAgency, Brasil) foi utilizado como controle de adsorção da toxina microcistina à placa de ELISA (**APÊNDICE III**).

Na seqüencia grupos de animais foram imunizados com MCLR-*mc*KLH e, placas de ELISA foram sensibilizadas com MCLR-cBSA.

Antes de cada imunização foi realizada sangria pelo plexo oftálmico e a produção de anticorpos de classe IgG foi avaliada através da técnica ELISA indireto padronizada para verificar a resposta do camundongo frente ao antígeno.

5.4 Análise da padronização de um método de imunoensaio para avaliação da produção de anticorpos IgG por ELISA indireto "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"

#### 5.4.1 ELISA indireto

Os ensaios de padronização de imunoensaio foram realizados paralelamente às imunizações.

O resultado do controle positivo do kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA, apresentou uma leitura de absorbância de 0,938 (8,3 vezes maior que o controle negativo do kit), confirmando que a MCLR, mesmo sendo um hapteno, é bem adsorvida em uma superfície inerte.

Dentre as variantes analisadas na padronização do ensaio imunoenzimático os seguintes resultados foram obtidos:

(i) Apesar da maior diferença de leitura de absorbância entre os soros de tempo 50 dias ( $T_{50}$ ) e tempo zero ( $T_0$ ) ter sido observada quando a placa de ELISA foi sensibilizada com 1,5µg MCLR-cBSA/poço, a concentração de 0,5µg MCLR-cBSA/poço foi escolhida para sensibilizar a placa de ELISA. A diferença de leitura entre essas duas concentrações não foi muito significativa. Além disso, antígenos para realização de ensaios posteriores seriam economizados (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Diferença de absorbância entre os soros nos tempos T<sub>50</sub> e T<sub>0</sub>, em poços sensibilizados com diferentes concentrações de Microcistina-LR conjugada ao cBSA (0,25, 0,5 e 1,5μg MCLR-cBSA/poço)

Conc.									
MCLR-	0,25 μg		0,5 μg		1,5 μg				
cBSA/poço									
Poço	В	T <sub>0</sub>	T <sub>50</sub>	В	T <sub>0</sub>	T <sub>50</sub>	В	T <sub>0</sub>	T <sub>50</sub>
Abs.	0,040	0,113	1,651	0,048	0,101	2,199	0,051	0,105	2,297
$T_{50} - T_0$		1,035			2,098			2,192	

(ii) O fato da placa Corning<sup>®</sup> high binding (EUA), como o próprio nome já diz ser de alta ligação, propiciou que o complexo MCLR-cBSA fosse melhor adsorvido à placa, diminuindo a possibilidade de ser removido durante as lavagens. Os outros modelos apresentaram uma reatividade menor, com formação de "reação de fundo". Os poços sensibilizados somente com tampão carbonato/bicarbonato 0,5M pH 9,6, não apresentaram leitura, o que era esperado devido à ausência do antígeno. Porém esta análise foi realizada para que pudesse ser excluída a hipótese de alta afinidade de ligação dos anticorpos de classe IgG presente na amostra pela placa e, ao mesmo tempo pudesse ser confirmada a sua alta especificidade somente pelo peptídeo.

O teste de enzimaimunoensaio detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou de anticorpos, podendo ter elevada precisão, se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. Com relação à fase sólida, algumas propriedades podem variar de acordo com a composição. As interações nãocovalentes entre o peptídeo e a placa dependem do plástico utilizado. Dos materiais plásticos disponíveis para essa finalidade, o polivinil é o que tem maior capacidade de ligação não-covalente ao peptídeo. O polipropileno tem baixa capacidade de ligação, sendo raramente utilizado, apesar disto ela é adequada para outros tipos de ensaio.

Um fato importante considerado foi que, a proteína carreadora utilizada na etapa de sensibilização foi diferente da proteína carreadora utilizada durante a imunização dos animais (camundongos e coelho). Esta análise evitou a obtenção de uma resposta imune inespecífica (reação cruzada) frente à toxina de interesse. Portanto, isso justifica a sensibilização da placa no ensaio ELISA indireto utilizando o peptídeo conjugado. (iii) A temperatura padronizada para sensibilização foi de 37°C por duas horas, seguida de uma incubação *overnight* a 4°C. Ao ser realizada a segunda incubação a temperatura ambiente (ao invés de 4°C), observou-se uma queda na absorbância. O fato da toxina em estudo ser termoinstável (MSAGATI *et al.*, 2006), faz com que ela perca parcialmente sua conformação padrão, modificando o epítopo a ser reconhecido pelo anticorpo anti-MCLR, resultando em uma baixa leitura.

(iv) Sob o ponto de vista teórico, a proteína carreadora cBSA, previamente ligada à MCLR (epítopo livre da reação), se ligou aos sítios reativos da placa, mas não a todos. Para minimizar os sítios reativos livres, o bloqueio da reação foi realizado com uma solução altamente protéica inerte. A solução de bloqueio selecionada na padronização foi caseína 2,5%, pois dentre todos os outros reagentes, este foi o que apresentou menor coloração inespecífica entre soros nos tempos T<sub>50</sub> e T<sub>0</sub>. A **Tabela 15** apresenta os resultados referentes à diferença de leitura entre poços sensibilizados com e sem MCLR-cBSA.

	Reagente de Bloqueio								
Poco	Gelatina 1%		Gelatina 2%		Leite 5%		Caseína 2,5%		
. eşe	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	
	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	Ag	
Branco	0,208	0,182	0,111	0,100	0,278	0,217	0,049	0,047	
T <sub>50</sub>	1,815	0,814	1,420	0,812	1,043	0,541	2,085	0,189	
T <sub>0</sub>	0,419	0,349	0,516	0,516	0,339	0,306	0,154	0,148	
(c/ Ag) T <sub>50</sub> - T <sub>0</sub>	1,3	1,396 0		0,904		0,704		1,931	
c/ Ag - s/ Ag (T <sub>50</sub> )	1,001		0,608		0,502		1,896		

**Tabela 15.** Absorbância dos soros de em T<sub>50</sub> e T<sub>0</sub>, em poços sensibilizados ou não com toxina conjugada (MCLR-cBSA), frente a diversos reagentes de bloqueio.

O bloqueio com solução de caseína 2,5% foi o que apresentou maior diferença de leitura entre esses poços sensibilizados ou não, bem como entre os soros nos tempos  $T_{50}$  e  $T_0$ . O controle do conjugado (Branco) apresentou baixa leitura (DO = 0,049 em 492nm) quando bloqueado com caseína 2,5%, o que demonstra uma maior interferência tanto da gelatina quanto do leite na reação de ELISA.

(v) Dentre os dois métodos realizados, método indireto (anticorpo marcado com peroxidase) e o sistema avidina-biotina, o primeiro foi o que apresentou menor

interferência no controle do conjugado (Branco da reação). Em outras palavras, o sistema avidina-biotina reduziu a reprodutibilidade do controle do conjugado. Apesar deste sistema amplificar a reação e tornar o ensaio mais sensível, ele reduz a especificidade do teste (ver item 5.4.2). E isso justifica a utilização de um conjugado anti-IgG de camundongo e/ou coelho marcado com peroxidase. Além disso, uma etapa de incubação durante a reação foi eliminada.

(vi) Dentre os dois sistemas reveladores de reação, TMB e OPD, o ensaio utilizando OPD foi o escolhido. Apesar do TMB não ser cancerígeno e ser mais sensível, o OPD é de mais fácil preparo. O TMB pode "flocular" durante o preparo, acarretando erros ou perda da reação.

Quanto às lavagens foi utilizado o detergente não-iônico Tween 20 a 0,5%. Assim como o Tween, o acréscimo de proteína na solução diluente (caseína, leite desnatado, albumina bovina, gelatina, soro fetal bovino, etc.), reduziu a adsorção não específica de componentes da amostra na placa, pela dissociação das ligações mais fracas.

Por fim, a melhor padronização do ensaio de ELISA indireto foi a que utilizou a placa Corning<sup>®</sup> high binding (EUA), sensibilizada com 0,5µg MCLR-cBSA/poço, bloqueada com caseína 2,5%, utilizando anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase, revelada com ODP e, lida em  $\lambda$  = 492nm. A **Figura 9** (item 2.12.1) apresenta um esquema do ensaio de ELISA indireto padronizado.

# 5.4.2 "Teste de Oxidação" do OPD (controle de reação) frente a todos os reagentes da reação de ELISA indireto no sistema avidina-biotina

Para esclarecer a causa da inespecificidade, vários controles de reação foram testados. Como segunda tentativa, a sensibilização da placa com MCLR-cBSA foi mantida e o sistema avidina-biotina foi substituído pelo conjugado anti-IgG marcado com peroxidase, o que levou a um resultado conclusivo do melhor protocolo de reação de ELISA indireto, com baixa reação de fundo e leitura reprodutível dos controles, o qual foi descrito no item 4.5.2 deste trabalho. Esses controles foram realizados adicionando-se ao substrato, somente o componente da reação cuja especificidade se queria determinar, tais como (i) placa de polipropileno, (ii) tampão

de sensibilização (tampão carbonato bicarbonato pH 9,6), (iii) toxina MCLR isolada ou conjugada à proteína carreadora cBSA, (iv) proteína carreadora cBSA isolada, (v) toxina isolada e/ou conjugada na presença do conjugado (anti-IgG camundongo biotinilado diluído 1:5000) e streptavidina marcada com peroxidase (diluída 1:8000) e (v) toxina isolada e/ou conjugada na presença da streptavidina marcada com peroxidase, sem o conjugado biotinilado. Após adição do OPD ou conjugado mais OPD, a ausência da coloração comprovou que este componente não interferiu na oxidação do OPD e que, a presença de coloração mostrou uma interferência junto ao conjugado ou ao substrato.

A Figura 40 abaixo esquematiza os controles da reação realizados.

Os testes realizados demonstraram que a coloração ocorria nos seguintes controles:

(i) toxina conjugada ao cBSA na presença do conjugado (anti-IgG camundongo biotinilado) e streptavidina marcada com peroxidase e,

(ii) toxina conjugada ao cBSA na presença da streptavidina marcada com peroxidase, sem o conjugado biotinilado.

Entretanto, a coloração não foi observada quando a placa foi sensibilizada somente com a toxina. Concluiu-se, portanto, que a coloração inespecífica era oriunda da reação entre BSA e a streptavidina.

Dessa forma, a utilização do conjugado avidina-biotina foi abandonada.

Componentes da Reação	Esquema da Reação	Componentes da Reação
Tampão Carbonato Bicarbonato pH 9,6 + ODP	Tampão carbonato - bicarbonato pH 9,6 + fifini fification Ausência de Absorbância	
PlacaCorning+ODP	<b>Ausência de Absorbância</b>	
cBSA+ODP	Ausência de Absorbância	
MCLR + ODP	Ausência de Absorbância	
MCLR-cBSA+ODP	Ausência de Absorbância	
MCLR + conjugado anti-IgG mouse biotinilado + OPD		MCLR-cBSA + conjugado anti-IgG mouse biotinilado + OPD
Ausência de Al	bsorbância Ausência	de Absorbância
E	streptavidina Estreptavidin peroxidase peroxidase	a NOLE EQ.
MCLR + conjugado anti-IgG mouse biotinilado + estreptavidina-peroxidase + OPD		MCLR-cBSA + conjugado anti-IgG mouse biotinilado + estreptavidina-peroxidase + OPD
Ausência de Abs	sorbância Absorbânci	ia = 1,784
Est MCLR + <sup>p</sup> estreptavidina- peroxidase + OPD 700 Ausência de Abs	treptavidina eroxidase + CONTINUATION sorbância	<ul> <li>MCLR-cBSA +</li> <li>estreptavidina-</li> <li>peroxidase + OPD</li> <li>ia = 1,936</li> </ul>

Figura 40. Teste da Oxidação do OPD, como controle da reação, frente a todos os reagentes do ensaio ELISA sistema Avidina-Biotina.

Após repadronização do ensaio ELISA indireto, foi possível reavaliar a resposta dos camundongos imunizados com MCLR-*mc*KLH. Esses animais apresentaram considerável produção de IgG em torno do 45º dia.

### 5.5 Análise da cinética da produção de anticorpos IgG em animais imunizados utilizando diferentes vias, antígenos e adjuvantes

Vários métodos de conjugação da MCLR foram testados na tentativa de induzir uma resposta imunológica contra a toxina, visto que esta não é imunogênica, ou seja, sozinha não é capaz de induzir uma resposta imune, mas sim, acoplada à uma proteína carreadora (SHENG *et al.*, 2006).

Dentre todas as imunizações, a MCLR conjugada ao *mc*KLH, utilizando a região sub-cutânea dorsal e plantar como via de imunização, foi a que induziu uma resposta imune detectável pelo método de ELISA indireto padronizado.

Durante toda a execução do experimento, como a quantidade de toxina sempre foi um fator limitante, as imunizações e análises da produção de IgG foram realizadas por etapa, ou seja, por grupo de animais imunizados (**Figura 41**). Grupos de animais que não apresentavam produção de IgG detectável pelo método ELISA indireto padronizado foram sacrificados por deslocamento cervical. Vale lembrar que animais imunizados com antígeno que continha BSA (cationizado ou não) na emulsão, para a etapa de sensibilização da placa de ELISA foi utilizado MCLR-*mc*KLH. Em contraposição, animais imunizados com antígeno que sensibilização da placa de ELISA foi utilizado MCLR-*mc*KLH. Em contraposição, para a etapa de sensibilização da placa de sensibilização da placa de ELISA foi utilizado MCLR-*c*ESA. Esta análise foi realizada a fim de detectar qualquer reação cruzada ou inespecífica dos anticorpos IgG presente no soro com as soluções utilizadas para execução da reação.


Figura 41. Avaliação da produção de anticorpos IgG pelo método ELISA indireto utilizando soro coletado de animais 50 dias após a primeira imunização

Animais imunizados com a MCLR aderida à membrana de celulose (G1) inicialmente via sub-dorsal e intra-peritoneal posteriormente, não apresentaram produção de IgG considerável na reação de ELISA padronizada, apesar da membrana de nitrocelulose ser um adjuvante. Além disso, não podemos confirmar a real quantidade de MCLR foi adsorvida à membrana.

Animais imunizados com MCLR-Ltx (G2 e G3) (utilizando ACF e/ou Hidróxido de Alumínio), MCLR-BSA-Ltx (G4), MCLR-BSA (G5), via sub-plantar também não apresentaram produção de IgG suficiente. Um fato importante observado foi que os animais imunizados com a toxina conjugada à partícula de látex, direta ou indiretamente, apresentaram uma leitura da reação similar tanto em poços sensibilizados com antígeno quanto nos poços sem antígeno. Uma explicação para esse fato poderia ser uma reatividade cruzada entre a partícula de látex e o poestireno. Portanto, este grupo de animais imunizados foi excluído. Como a ligação da toxina à partícula de látex ainda não é muito estudada em peptídeos, o processo

não pode ser elucidado. Portanto, sabe-se que este tipo de conjugação não foi suficiente para induzir a uma resposta imune, seja pelo tamanho do peptídeo, pela afinidade de ligação ou mesmo, pelos poucos aminoácidos disponíveis para realizar uma conjugação de sucesso.

Animais imunizados com MCLR-Ltx (G6), via intra-peritoneal, também não apresentaram produção de IgG detectável.

Animais imunizados com MCLR-BSA (G7), via sub-dorsal não apresentaram resposta imunológica do tipo IgG contra a toxina MCLR. Todavia, mesmo no poço sensibilizado somente com a toxina MCLR não foi observada leitura, ao contrário dos animais imunizados com MCLR-BSA-Ltx, o qual foi observada leitura no poço sensibilizado com a toxina somente.

Animais imunizados, via sub-dorsal com MCLRpadrão-KLH e MCLRbruta-KLH (G8 e G9, respectivamente), via glutaraldeído, vieram a óbito duas horas após imunização. Não foram encontrados dados bibliográficos que justificassem esse fato. Entretanto, para este tipo de conjugação utilizando peptídeos cíclicos (componentes tóxicos), para que se tenha uma interação forte entre o peptídeo e a proteína carreadora, esta última deve ser cationizado, obrigatoriamente. Provavelmente a morte desses animais ocorreu pela ação da toxina não conjugada ou rompida durante o processo de conjugação, visto que no protocolo utilizado não inclui uma etapa de purificação e detecção de toxinas livres.

Em contraposição, animais imunizados com MCLR-*mc*KLH (G10) e MCLRcBSA (G11) via sub-plantar e dorsal apresentaram uma produção de anticorpos de classe IgG detectável pelo ensaio de ELISA indireto.

Um fato importante também foi observado nas análises dos soros do grupo de animais imunizados com MCLR-cBSA (G11). Este grupo apresentou uma relativa produção de IgG, utilizando placas sensibilizadas com a toxina MCLR-cBSA (o que se justifica pela presença do BSA tanto na imunização quanto na sensibilização da placa de ELISA) e/ou MCLR somente. Quase nenhuma produção de IgG foi observada quando placas foram sensibilizadas com MCLR-*m*CKLH. Apesar da proteína carreadora *m*cKLH ser um excelente imunógeno, a reatividade da MCLR ficou baixa quando utilizamos MCLR-*m*cKLH como antígeno de sensibilização. Talvez, ao ser utilizada para sensibilizar a placa de ELISA, a proteína carreadora KLH altera sua conformação, na presença do tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6

(tampão de sensibilização), "inibindo" a expressão da toxina como epítopo na placa, impedindo que a mesma seja reconhecida pelo anticorpo presente na amostra.

Como a conjugação da MCLR ao cBSA e ao *mc*KLH foi realizada segundo protocolo do kit Pierce<sup>®</sup> (Pierce Chemical Company<sup>®</sup>, EUA), foi possível obter um melhor controle (leitura de absorbância/cálculo da concentração de antígeno conjugado) da reação de conjugação, o que não aconteceu com as outras conjugações. Quando carregada positivamente, a proteína carreadora (cBSA ou *mc*KLH) se ligará preferencialmente à região negativa do peptídeo. Logo, podemos ter uma noção de qual parte do hapteno será apresentada para o sistema imune. Além disso, a alta carga positiva do *mc*KLH aumenta o potencial imunogênico da molécula. O KLH cationizado é uma proteína carreadora de alto peso molecular e isso pode favorecer uma melhor indução da resposta imune, que é um dos primeiros passos para a produção de anticorpos monoclonais e realização da fusão celular.

Dentre os diversos problemas enfrentados durante o experimento, um deles foi referente à conjugação propriamente dita. Uma vez que não podia ser julgada a eficiência da reação de conjugação e, que os cálculos das doses para posterior imunização eram baseados na concentração de proteína carreadora, um grande tempo foi necessário até que se chegasse a uma dose imunogênica e, não letal. Mesmo seguindo protocolos de kits e experiências de profissionais de outros laboratórios, não foi encontrada na literatura uma metodologia padronizada que avaliasse a eficiência da reação de conjugação, exceto a confirmação por Espectrometria de Massas, equipamento específico que analisa fragmentação de proteínas, indisponível em nosso laboratório.

#### 5.6 Obtenção de Anticorpos Monoclonais

Como foi explicado na Revisão da Literatura deste trabalho, a utilização de anticorpos monoclonais com especificidade definida (reconhecem um epítopo desejado) seria uma potente ferramenta e ótima opção na detecção de microcistinas produzidas pelas cianobactérias (PYO *et al.*, 2005), visto que todos os anticorpos produzidos pelo mesmo hibridoma descendente são idênticos (HARLOW & LANE, 1988). Algumas das aplicações mais comuns dos hibridomas e de anticorpos monoclonais incluem (i) identificação de marcadores fenotípicos para tipos celulares individuais, (ii) imunodiagnóstico em doenças infecciosas e sistêmicas, (iii)

diagnóstico e terapia de tumores, (iv) análise funcional de moléculas da superfície celular e das secretadas e, (v) purificação de proteínas ou peptídeos através de coluna (Sepharose 4B).

Uma vantagem única da produção de hibridomas é que antígenos impuros podem ser usados para produzir anticorpos específicos, ou seja, um pool de antígenos pode ser utilizado na imunização de camundongos e obtenção de anticorpos específicos que reconhecem um epítopo desejado. Essa mistura de antígenos pode aumentar a imunogenicidade, funcionando como um adjuvante, assim como a proteína carreadora acoplada ao peptídeo.

A produção de anticorpos monoclonais pode ser tanto por hibridização somática entre mieloma e linfócitos, gerando hibridomas, como por biologia molecular.

A preferência em utilizar anticorpo monoclonal se justifica por se tratar de imunoglobulinas com especificidade única, e como tal representa um excelente instrumento na identificação de estruturas. Quando são utilizadas misturas de diferentes anticorpos, muitas vezes a aplicação é limitada, devida à múltipla especificidade para diferentes epítopos antigênicos e heterogeneidade da resposta imune humoral. O soro policlonal contém muitos tipos diferentes de anticorpos, produzidos por vários clones de linfócitos B (anticorpos policlonais), específicos para diferentes antígenos, ou seja, para diversas variantes de microcistina, tais como MCLR, MCLA, MCRR e MCYR.

Os anticorpos monoclonais possuem três características fundamentais, tais como (i) especificidade de ligação, (ii) homogeneidade e (iii) habilidade para ser produzido em quantidades ilimitadas. Como ferramenta de diagnóstico, os anticorpos policlonais obtidos foram aplicados na pesquisa de toxinas liberadas por algas.

A avaliação comparativa da pesquisa de microcistina em água utilizando paralelamente anticorpos mono e policional, tem mostrado uma maior sensibilidade com o anticorpo monocional (PYO *et al.*, 2004; SHENG *et al.*, 2006), fazendo dessas proteínas as de escolha no auxílio à pesquisa e estudos de triagem de microcistinas.

Assim como a reação cruzada determinada por aminoácidos comuns entre as toxinas algais (principalmente aquelas produzidas pela cepa *Microcystis aeruginosa*) pode auxiliar na triagem, ela pode dificultar a liberação diferencial de resultados em amostras contaminadas, principalmente na água para consumo humano e animal.

Levando em consideração esta gravidade e a dificuldade em obter a toxina por extração algal ou em florações, foram produzidos 8 anticorpos monoclonais a partir de órgãos linfóides (linfonodos e baço) de camundongos Balb/c imunizados com a toxina MCLR-*mc*KLH.

#### 5.6.1 Escolha do animal para realização da fusão

A melhor resposta imunológica foi obtida (maior produção de anticorpos de classe IgG) pelos camundongos imunizados com MCLR-*mc*KLH, grupo G10. Portanto, através do ensaio ELISA indireto padronizado avaliou-se a produção e especificidade de anticorpos IgG de cada camundongos Balb/c imunizado. Aquele que apresentou maior índice de reconhecimento pela toxina foi o selecionado para posterior "booster" e retirada dos órgãos linfóides.

### 5.6.2 Obtenção de células linfóides: Linfonodos Poplíteos, Linfonodos Abdominais e Baço

Uma semana antes da fusão foi realizado um "booster" no camundongo que apresentou melhor resposta imunológica, na mesma dose e via administrada anteriormente. Este procedimento foi realizado na tentativa de "enfartar" os linfonodos, já que são de difícil visualização quando não muito estimulados. Nos linfonodos que drenam os sítios de administração do antígeno, a primeira alteração ocorre algumas horas depois da exposição ao antígeno. O fluxo sanguíneo através do linfonodo aumenta, permitindo que o maior número de células T virgens tenha acesso ao local onde se encontra o antígeno. Ao mesmo tempo tem-se uma diminuição do efluxo de células no linfonodo, ou seja, há uma retenção de células específicas ao antígeno no linfonodo. Essas alterações são, provavelmente, devidas a uma reação inflamatória aos adjuvantes associados ao antígeno ou devidas às citocinas inflamatórias produzidas em decorrência da entrada do antígeno (ABBAS, 2000).

A **Figura 42** apresenta as fotos dos órgãos linfóides infartados que foram retirados do camundongo no dia da realização de uma das fusões.



Figura 42. Fotos de órgãos linfóides de camundongo Balb/c retirados no dia da realização da fusão (vista lateral direita). A) Linfonodo poplíteo. B) Linfonodo Inguinal. C) Baço (ponta da seta). (Fotos de Autoria própria)

#### 5.6.3 Cultivo das Células de Mieloma

Alguns dias antes da fusão, as células de mieloma foram descongeladas e lavadas em meio RPMI<sup>+</sup> para que fosse removido o excesso de SFB e DMSO que é tóxico para a célula. A presença de SFB no meio pode acarretar uma diminuição na adesão celular (HARLOW & LANE, 1988). Vale lembrar que esta etapa foi muito importante e teve que ser realizada com cuidado para que não houvesse nenhum tipo de contaminação, principalmente por micoplasma.

#### 5.6.4 Preparo do "Feeder Layer"

Após fusão celular as células foram distribuídas em placa de 96 cavidades contendo "feeder layer", que nada mais é do que um lavado peritoneal em meio RPMI<sup>+</sup> contendo células secretoras de interleucinas e citocinas, como os macrófagos, que estimulam o crescimento dos hibridomas. Nesta etapa de pósfusão mediada pelo PEG as células estão sensíveis pela fragilidade da membrana. Este conceito foi baseado em conhecimentos já previamente descritos. É sabido que a hematopoiese (geração de células sanguíneas) durante a vida fetal, ocorre inicialmente no saco vitelino, fígado, baço e medula óssea, respectivamente. A proliferação e maturação das células precursoras na medula óssea são estimuladas por citocinas, também chamadas de fatores estimulantes de colônias (FERNANDES & ESPÍNDOLA, 2007). Por isso, ao invés de citocinas serem acrescidas ao meio de cultura, as quais apresentam alto custo, o lavado peritoneal ou "feeder layer" foi realizado como uma boa alternativa.

#### 5.6.5 Obtenção dos hibridomas (Fusão Celular)

Resumidamente, a técnica para obtenção de anticorpo monoclonal baseou-se no fato de que cada linfócito B isolado do animal previamente imunizado produz anticorpo de especificidade única quando fusionadas com uma célula imortal, não secretora de anticorpo como as células de mieloma SP2O, um tipo de tumor de linfócito B. Os hibridomas formados foram mantidos *in vitro* indefinitivamente e serão estáveis quanto à produção de imunoglobulina com especificidade definida. Os anticorpos produzidos por esses hibridomas são derivados de um único clone e por isso são chamados de anticorpos monoclonais.

A **Figura 43** apresenta algumas fotos seqüenciais de uma das fusões realizadas. Em A, observa-se a cavidade antes da fusão contendo somente o "feeder layer", com destaque para alguns macrófagos espraiados. Em B, logo após a primeira semana da fusão, essa cavidade não apresentou nenhum clone em crescimento e, por isso, este poço não foi selecionado para realização de ensaio de triagem (pesquisa de anticorpos anti-MCLR). Ao contrário, em C foi possível observar o desenvolvimento de alguns clones, que após crescimento (D) até ocupar mais ou menos 1/3 da cavidade (E) foram selecionados para realização do ensaio ELISA indireto padronizado.



Figura 43. Fotos obtidas em diferentes períodos de fusão entre células linfóides retiradas de camundongo imunizado com MCLR-*mc*KLH e célula de mieloma SP2O. A) Feeder Layer contendo alguns macrófagos. B) Campo negativo. C) Crescimento de "dois" clones após a 1<sup>a</sup> semana. D) Expansão dos "dois" clones após 2<sup>a</sup> semana. E) Crescimento dos clones após 3<sup>a</sup> semana. (Aumentos de 100X e 400X. Fotos de autoria própria)

No total foram realizadas 8 fusões, com formação de 1363 hibridomas. E dentre estes hibridomas formados, somente 9 foram reativos para MCLR e o restante (1354 hibridomas) foram não reativos para o mesmo peptídeo. E dentre os hibridomas positivos, 8 clones foram estáveis quanto à produção de anticorpo anti-MCLR e somente 1 se mostrou instável.

Todos os anticorpos monoclonais foram testados quanto à sua reatividade (pelo ensaio ELISA indireto padronizado no item 4.5.2) frente à MCLR utilizada na imunização dos animais. Foi considerado como reativo o anticorpo monoclonal que apresentasse absorbância  $\geq$  0,500, e no mínimo equivalente a 3x a absorbância do controle negativo.

A **Tabela 16** abaixo apresenta os clones produzidos anti-MCLR e a reatividade dos anticorpos monoclonais por ELISA utilizando a toxina MCLR.

AcMo obtidos	Reatividade (ELISA)	Isótipo
Clone 9	1,139	lgG1
Clone 10	0,911	lgG1
Clone 17	0,765	lgG1
Clone 48	1,181	lgG1
Clone 84	1,965	lgG2a
Clone 90	0,960	lgG1
Clone 161	0,900	lgG1
Clone 226	1,193	lgG1
Clone 232	1,804	lgG1

**Tabela 16.** Anticorpos monoclonais (AcMo) anti-MCLR obtidos, sua reatividade por ELISA e seu isótipo.

Analisando a **Tabela 16**, a partir de diferentes clones secretores de anticorpos monoclonais para o mesmo antígeno (MCLR-*mc*KLH), foram obtidos isótipos variados e com reatividade distinta. As absorbâncias (amostras de meio de cultura) variaram de 0,765 a 1,965, correspondentes aos clones 17 e 84. Além disso, um clone (clone 84) apresentou isótipo diferente entre os demais.

Todos os híbridos positivos no ensaio por ELISA indireto foram selecionados para realização da clonagem.

#### 5.6.6 Clonagem dos hibridomas pela técnica de diluição limitante

A metodologia diluição limitante utilizada para efetuar a clonagem garante a monoclonalidade dos hibridomas, pois muitas cavidades positivas podem apresentar diversos clones originados de células diferentes, secretando anticorpos em diferentes estágios (AZMI *et al.*, 1994). Por isso, clonagens dos hibridomas foram realizadas para separar individualmente cada célula.

A clonagem foi feita no mínimo duas vezes para aumentar a probabilidade de que os hibridomas obtidos originaram de um único clone. Ressaltamos que, frente a qualquer erro técnico durante a clonagem, foi realizada nova re-clonagem, ou seja, um cuidado especial foi dado no momento de expansão celular entre os clones  $k_0$ ,  $k_1$ e  $k_2$ . Uma contaminação entre essas diferentes etapas de clonagem ou entre diferentes clones pode nos conduzir a um resultado errôneo.

Na diluição limitante, após a distribuição das células em placas contendo 96 poços, foi feito um acompanhamento para verificar quantos poços apresentaram apenas um clone. Sendo assim, em cada placa foram contadas e marcadas as cavidades com clones. Com base na análise estatística descrita por COLLER & COLLER (1983), foi demonstrado que, se 37% dos poços não apresentarem crescimento celular após a 1<sup>a</sup> clonagem, e se após a 2<sup>a</sup> clonagem obtivermos menos de 32% dos poços sem crescimento, pode-se considerar que houve 94% de possibilidade de ter ocorrido clonagem. E, segundo esse mesmo pesquisador, se mais que 94% dos poços não apresentarem crescimento celular após a clonagem de apresentarem crescimento celular após a de poços não apresentarem crescimento celular após a clonagem. E, segundo esse mesmo pesquisador, se mais que 94% dos poços não apresentarem crescimento celular após a clonagem, pode-se assegurar ter ocorrido clonagem adequada com 99% de probabilidade.

Quando os poços contados apresentaram clones que cresceram atingindo 1/3 da cavidade, os mesmos foram testados quanto à reatividade por ELISA indireto padronizado. A cavidade correspondente à maior absorbância (k<sub>1</sub>) foi selecionado para ser reclonado (k<sub>2</sub>), e assim sucessivamente.

Eficientes clonagens têm sido observadas na presença de "feeder layer", o qual fornece fatores de crescimento apropriados à proliferação celular (BAZIN & LEMIEUX, 1987; KOLBERG & SLETTEN, 1996). Usualmente ao iniciar o processo de clonagem, ocorre uma dificuldade de crescimento celular pela baixa densidade de células existentes durante o processo de diluição. E por isso, a clonagem foi realizada na presença de "feeder layer", usando células obtidas de lavado peritoneal de camundongos (como especificado no item 4.6.3) para evitar a inibição de crescimento celular.

#### 5.6.7 Expansão dos hibridomas clonados

De forma geral, quando a concentração ultrapassou 10<sup>6</sup> células/mL, os hibridomas foram expandidos com meio fresco para um frasco maior (duplicado), ou seja, as células foram expandidas na seguinte seqüência: placa de 96 cavidades, placa de 24 cavidades, garrafa de 25mm<sup>2</sup>, garrafa de 75mm<sup>2</sup>, respectivamente. As células raramente precisaram ser contadas em câmara de Neubauer, e o tempo correto para expandir essas células foi determinado ao microscópio. Um dos itens avaliados microscopicamente (aumento de 400X) foi a integridade da parede celular, que não pode estar granulada, mas sim lisa.

Quando as células foram expandidas de placas para garrafas até atingir uma concentração ideal de congelamento, ensaios por ELISA em paralelo foram realizados para avaliar a contínua produção de anticorpos pelos hibridomas formados.

#### 5.6.8 Congelamento dos hibridomas e células de mieloma

Quando as células chegaram à escala logarítmica de crescimento após expansão em garrafas de cultura (na ordem de 10<sup>7</sup> células/mL) elas foram submetidas ao congelamento à -80 e depois a -185°C. A solução de congelamento foi composta de uma solução contendo nutrientes apropriados, como o SFB e um reagente crioprotetor, como o DMSO (HARLOW & LANE, 1988).

Após a expansão celular, os hibridomas foram congelados para fins de armazenamento. A eficiência do processo de congelamento foi avaliada através da viabilidade celular após o descongelamento.

#### 5.6.9 Descongelamento dos hibridomas

O descongelamento das células foi feito na ordem inversa, ou seja, de -185 para -80°C. A seguir foi submetida à temperatura de 37°C e em seguida, lavada em meio RPMI<sup>+</sup>, para a retirada do reagente crioprotetor DMSO, que é altamente tóxico

para célula. Um dia após o descongelamento celular observamos um grande número de células mortas, em função do sofrimento celular, principalmente pela fragilidade da membrana, mas essa morte celular foi esperada. Por isso, vários lotes de cada clone, inclusive de cada clonagem, foram realizados em diferentes datas, para garantir todo o estoque.

Esta etapa de congelamento/descongelamento do clone secretor de anticorpo anti-MCLR foi muito importante por dois motivos. Um deles foi o de ter o clone congelado para que pudéssemos utilizá-lo mais tarde (imortalidade do clone) e, o outro, para avaliar a estabilidade do clone. Mesmo depois de descongelado o hibridoma foi capaz de manter a secreção da imunoglobulina de interesse estável.

Essa estabilidade celular foi avaliada em duas etapas: (i) quando expandimos o hibridoma e (ii) quando o descongelamos. O clone foi considerado estável porque ele manteve a produção de anticorpo mesmo quando submetido ao stress (expansão e congelamento/descongelamento). Neste experimento vários ensaios de ELISA foram realizados até confirmarmos que os clones secretores de anticorpos monoclonais obtidos eram estáveis. Dos 9 clones obtidos ao final de todo o processo, 8 se mostraram estáveis, pois mantiveram a mesma absorbância (produção de anticorpos) medida no ensaio imunoenzimático padronizado.

#### 5.6.10 Isotipagem dos anticorpos monoclonais obtidos

Este ensaio de ELISA competição (Kit Sigma<sup>®</sup>, EUA) foi realizado a fim de isotipar o anticorpo monoclonal produzido por cada clone. Neste ensaio a fase sólida foi sensibilizada com anticorpo anti-IgG específico para cada subclasse. Os sobrenadantes contendo os anticorpos foram incubados, ocorrendo a captura de IgG de isótipo específico. A seguir incubou-se o conjugado anti-IgG Fab específico de camundongo marcado com peroxidase e, após revelação com substrato específico, a reação foi lida em comprimento de onda 492nm (**Figura 44**). Os resultados foram mostrados na **Tabela 16**.



Figura 44. Esquema do ensaio de ELISA captura (segundo kit Sigma<sup>®</sup>) para pesquisa do isótipo de IgG específico de cada clone obtido

A isotipagem de cada clone secretor de anticorpo monoclonal anti-MCLR foi importante, pois as cadeias pesadas determinam a classe ou isótipo das imunoglobulinas e são responsáveis pelas funções efetoras dos anticorpos IgG, como a ligação com diferentes receptores de superfície celular, podendo estar relacionadas à opsonização, ativação do complemento, citotoxicidade, etc.

A reatividade desses anticorpos (item 5.6.13) produzidos por diferentes clones frente as variantes de microcistinas, tais como MCRR, MCLR, MCYR e MCLA, foram estudadas após expansão dos hibridomas em ascite, com respectiva purificação e quantificação dos anticorpos (5.6.12).

#### 5.6.11 Análise dos clones submetidos ao tratamento com antibiótico

Quando ocorre uma contaminação por micoplasma, em alguns casos a produção de anticorpos se torna inconstante. Isto ocorre porque este tipo especial de bactéria intracelular pode se inserir na região gênica responsável pela produção de anticorpos, tornando-a variável e inviabilizando a utilização do clones em ensaios futuros.

Como apresentado no **ANEXO IV** cinco clones secretores de anticorpos monoclonais anti-MCLR foram analisados quanto à presença de micoplasma nas células. Dois tipos de ensaios foram realizados, tanto uma triagem em meios de cultura (SP4) líquido e sólido, quanto ensaios por biologia molecular (PCR). O ensaio

por PCR identifica diferentes gêneros dentro da classe Mollicutes, através do uso de primer genérico.

Todos os resultados foram negativos para ambos os ensaios e isso nos garantiu que os clones, livres de micoplasma, são estáveis quanto à produção de anticorpos. Além disso, esta etapa é um dos pontos de análise para patentear clones secretores de anticorpos monoclonais. A presença deste contaminante anularia uma solicitação.

Logo após o tratamento celular, um ensaio por ELISA indireto, conforme descrito no item 4.5.2, foi realizado. Todos os clones apresentaram reatividade semelhante antes e após o tratamento, como mostra a **Tabela 17** abaixo. Isto nos confirma que não houve alteração quanto à produção de anticorpos pelos clones.

Clone	Antes tratamento	Após tratamento
K <sub>2</sub> 9	0,924	1,141
K₃17	0,697	0,765
K <sub>2</sub> 48	1,237	1,120
K <sub>2</sub> 84	1,947	1,965
K <sub>2</sub> 232	1,621	1,462

Tabela 17. Reatividade dos anticorpos antes e após tratamento com antibióticos

## 5.6.12 Análise do rendimento dos anticorpos monoclonais obtidos por expansão dos hibridomas em ascite

Os camundongos Balb/c apresentaram volume ascítico considerável e, após purificação em coluna de proteína-A, os anticorpos monoclonais foram quantificados em espectrofotômetro (280nm), como mostra a **Tabela 18**.

Clone	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)
K <sub>2</sub> 9	12,5	2,3
K₃17	24	2,0
K <sub>2</sub> 48	25,5	1,6
K <sub>2</sub> 84	24	1,8
K₂232	29	3,6

Tabela 18. Volume de líquido ascítico e concentração de anticorpo de cada clone

A partir destes resultados preliminares observamos que o clone k<sub>2</sub>232 foi o clone com maior capacidade de produção de anticorpos anti-MCLR, ou seja, foi o clone que apresentou maior rendimento em mg/mL. Apesar dos outros clones terem

apresentado um comportamento de produção de anticorpo semelhante, o ideal é analisarmos a reatividade de cada hibridoma frente às quatro variantes de microcistina.

#### 5.6.13 Reatividade dos anticorpos monoclonais

Na realidade todos os clones foram semelhantes entre si, ou seja, todos eles poderiam ser utilizados em experimentos futuros. As curvas dose-resposta também apresentaram perfis semelhantes.

Para este ensaio utilizamos o tampão salina-borato pH 8,5 como diluente de amostra, pois foi o diluente que não apresentou interferência entre a ligação do anticorpo presente na amostra e o antígeno adsorvido a placa. Todos os controles (semelhante ao realizado no item 5.4.2) de reação asseguraram alta especificidade dos ensaios realizados, não mostrando nenhuma ligação inespecífica.

Como mostram as **Figura 45 e 46**, o clone 17 (k<sub>3</sub>17) foi considerado o melhor clone, pois foi o que apresentou melhor resposta à variação na diluição seriada do anticorpo. A curva referente a este clone apresentou uma queda linear ao longo de sua diluição frente às quatro microcistinas analisadas. Para cada ponto de diluição, o anticorpo reconheceu com muita semelhança cada variante. Em outras palavras, este anticorpo reconheceu de forma homogênea as quatro variantes de microcistina mais comumente encontradas no ambiente aquático.

O clone 48 (k<sub>2</sub>48) apresentou comportamento semelhante ao clone anterior, com exceção da variante MCYR, onde se observou uma queda acentuada após a primeira diluição. Apesar da curva ter se mostrado linear ao longo das diluições seriadas dos anticorpos, no geral a reatividade foi menos intensa quando comparada aos outros clones. Apesar da concentração protéica do clone 48 ter sido inferior ao clone 17, a diferença de reatividade entre os dois clones nas diferentes diluições foi bastante acentuada.



**Figura 45.** Curva de titulação dos anticorpos monoclonais anti-MCLR, secretados pelos clones k<sub>3</sub>17 (200μg/100μL) e k<sub>2</sub>48 (160μg/100μL), frente às variantes microcistina. Ensaio realizado por ELISA indireto. Diluição seriada de 1:1 até 1:256.

O comportamento do clone ( $k_2$ 84) apresentado na **Figura 46** foi semelhante ao clone 17 ( $k_3$ 17), por isso foi considerado um excelente clone. O que inviabiliza sua aplicação em um ensaio imunoenzimático foi o fato de sua isotipagem pertencer à classe IgG2a, pois anticorpos deste isótipo apresentam atividade biológica restrita.

O clone 232 (k<sub>2</sub>232) também foi considerado um bom clone, mostrando-se linear ao longo das diluições seriadas. Este clone foi o que apresentou maior capacidade de produção de anticorpo, ou seja, apresentou maior rendimento, que é uma característica considerável em sua aplicação em kits de imunoensaio.

A reatividade dos clones 17 e 232 nas diferentes diluições seriadas foram bastante semelhantes, apesar da concentração protéica do clone 232 (180µg/100µL) ser próxima ao dobro do observado no clone 17 (100µg/100µL). Como os dois clones apresentaram alto grau de pureza (**Figuras 47 e 48**) uma possível explicação para tal ocorrência seria a da maior reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais secretados pelo clone 17 ao antígeno.



**Figura 46.** Curva de titulação dos anticorpos monoclonais anti-MCLR, secretados pelos clones k<sub>3</sub>84 (180μg/100μL) e k<sub>2</sub>232 (360μg/100μL), frente às variantes microcistina. Ensaio realizado por ELISA indireto. Diluição seriada de 1:1 até 1:256.

A partir destes resultados e análises, ensaios futuros poderão ser realizados utilizando tanto o anticorpo secretado pelo clone 17 (k<sub>3</sub>17) como pelo clone 232 (k<sub>2</sub>232), pois foram clones que apresentaram reatividade e estabilidade semelhantes frente ao antígeno analisado MCLR. Entre esses ensaios futuros encontram-se (i) a padronização de um ensaio ELISA competição utilizando o anticorpo monoclonal secretado e, (ii) imunolocalização da toxina na célula algal. Um perfil comparativo (sensibilidade, especificidade, reatividade, etc.) entre os ensaios de ELISA competição utilizando anticorpos monoclonal anti-MCLR também poderão ser avaliados.

Para assegurar que não houve perda e que a integridade dos anticorpos monoclonais secretados pelos clones foi mantida, uma análise em Gel SDS-PAGE foi realizada. Vale ressaltar que o grau de pureza destes anticorpos é muito importante para avaliar o índice de conjugação do anticorpo a outra partícula protéica.

#### 5.6.14 Caracterização dos anticorpos purificados por SDS-PAGE

A utilização de anticorpo marcado pode ser muito útil, principalmente quando se trabalha com detecção de peptídeos. Mas para que seja realizado este procedimento, o anticorpo deve estar puro, para que (i) sejam reduzidos os interferentes da conjugação e para que (ii) possam ser realizadas análises confirmatórias da conjugação por Espectrofotometria de Massas. Sendo assim, avaliamos o grau de pureza dos anticorpos e, se os mesmos são estáveis frente ao agente redutor DTT (ditiotreitol). Através destas análises podemos afirmar que, mesmo passando por diferentes etapas de tratamento com agentes redutores, os anticorpos são capazes de se manter íntegros.

Para realização deste ensaio quatro clones foram analisados, k<sub>3</sub>17, k<sub>2</sub>48, k<sub>2</sub>84 e k<sub>2</sub>232. É importante ressaltar que as proteínas migram no gel de acordo com a massa molecular aparente e carga, próprios de cada molécula.

Antes de realizarmos as análises dos perfis eletroforéticos da molécula de imonoglobulina de classe IgG, observamos os principais pontos de quebra no anticorpo (LIU *et al.*, 2007) frente ao agente redutor DTT, o qual quebra pontes dissulfeto (S-S).

Proteínas na presença da substância redutora DTT foram aplicadas no gel. Nessas condições, as substâncias redutoras rompem as pontes dissulfídicas das proteínas (anticorpos) como esquematizadas na **Figura 48**, desnaturando-as ou dissociando-as em subunidades individuais, enquanto que o SDS liga-se ao longo das cadeias polipeptídicas reduzidas. Quando um campo elétrico é aplicado, as subunidades de anticorpos que se encontram carregadas negativamente migram do gel de empilhamento para o gel se separação, formando uma zona nítida. Desta maneira, como as subunidades de proteínas têm igual proporção entre carga e massa, elas atravessam as porosidades do gel de acrilamida de acordo com o seu tamanho molecular.

De acordo com a Figura 47 temos o seguinte esquema:

A) Padrão de alto peso molecular (130 a 15 kDa)

- C) Clone 17 sem agente redutor
- D) Clone 48 sem agente redutor
- E) Clone 84 sem agente redutor
- F) Clone 232 sem agente redutor



Figura 47. Scan do Gel SDS-PAGE (5 a 15%) dos anticorpos monoclonais corados pelo coomassie blue sem agente redutor. Foram aplicados 1μg/mm (6 μg/poço). Perfil eletroforético do padrão de massa molecular (A) e dos clones k<sub>3</sub>17 (B), k<sub>2</sub>48 (C), k<sub>2</sub>84 (D) e k<sub>2</sub>232 (E) sem agente redutor.

A partir deste perfil eletroforético (**Figura 47**) concluímos que os clones 17, 48, 84 e 232 (**poços B a E**) encontram-se íntegros, ou seja, apresentam perfil eletroforético em 150kDa.

Outro ponto a ser observado foi uma discreta diferença no perfil eletroforético do clone 84 (**poço D**) com relação aos outros clones, devido ao fato de seu isótipo pertencer à subclasse IgG2a, e não IgG1 como aos dos outros anticorpos. Esta diferença talvez tenha sido decorrente da mudança de carga distribuída (pI) neste tipo de molécula e da posição das pontes dissulfeto nela distribuídas.

Ainda assim, para observarmos a fragmentação do anticorpo, realizamos uma redução frente ao DTT 60mM.

A Figura 48 apresenta um scan do Gel 2, onde temos que:

- A) Padrão de alto peso molecular (220 a 14,4 kDa)
- B) Padrão de alto peso molecular (220 a 15 kDa)
- C) Clone 17 tratado com agente redutor DTT
- D) Clone 48 tratado com agente redutor DTT
- E) Clone 84 tratado com agente redutor DTT
- F) Clone 232 tratado com agente redutor DTT

A partir deste perfil eletroforético três bandas foram identificadas, tais como 75kDa (massa molecular aparente da molécula reduzida ao meio, ou seja, uma cadeia pesada e uma cadeia leve), 50kDa (cadeia pesada) e 25kDa (cadeia leve).



**Figura 48.** Scan do Gel SDS-PAGE (5 a 20%) dos anticorpos monoclonais corados pelo coomassie blue e tratados com agente redutor. Foram aplicados 1µg/mm (6 µg/poço). Perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (**A e B**) e dos clones  $k_317$  (**C**),  $k_248$  (**D**),  $k_284$  (**E**) e  $k_2232$  (**F**) com agente redutor DTT.

Portanto, vimos que, os anticorpos secretados pelos clones 17, 48, 84 e 232 apresentaram uma fragmentação de acordo com o esperado, bem como um alto grau de pureza. Os anticorpos secretados pelos seus respectivos clones foram considerados estruturalmente estáveis, ou seja, mantiveram a sua integridade molecular mesmo após submissão à vários processos de purificação e estres.

Levando em consideração diversos fatores tais como, (i) maior quantidade de anticorpo secretado pelo clone, (ii) linearidade da curva nos ensaios dose-resposta e, (iii) estabilidade molecular do anticorpo frente às diferentes condições de purificação, escolheu-se o anticorpo secretado pelo clone 17 (k<sub>3</sub>17) ou pelo clone 232 (k<sub>2</sub>232) para ser utilizado na padronização de um ensaio por ELISA competição futuramente.

#### 5.7 Obtenção de Anticorpo Policional

O antígeno utilizado na imunização do coelho (MCLR-*mc*KLH) corresponde a uma proteína ligada a vários peptídeos. Quando este antígeno foi reconhecido pelo sistema imune do animal, os anticorpos policionais produzidos reconheceram os peptídeos e as diferentes regiões da proteína carreadora. Os peptídeos podem estar expressos de diferentes maneiras, pois a microcistina foi ligada à superfície da proteína carreadora de forma aleatória (**Figura 49**).



Figura 49. Esquema da distribuição aleatória da microcistina-LR na superfície da proteína carreadora *mc*KLH.

Esse antígeno multivalente possui múltiplos determinantes antigênicos idênticos na mesma molécula. A estrutura espacial, a hidrofobicidade, a distribuição de cargas, entre outros fatores, podem influenciar na afinidade, facilitando ou reduzindo a quantidade de complexos formados. E em decorrência desta distribuição aleatória esquematizada na **Figura 49**, o conjugado MCLR-*mc*KLH pôde induzir à formação de diferentes anticorpos com diferentes especificidades, dependendo da região mais ou menos imunogênica exposta ao sistema imune do coelho.

### 5.7.1 Avaliação da produção e especificidade de anticorpos IgG em coelho, por ELISA indireto padronizado

Através do ensaio por ELISA indireto padronizado no item 5.7.1 realizou-se a cinética de produção de anticorpos IgG no soro do coelho (não purificado e diluído

1:200) imunizado com MCLR-mcKLH, utilizando dois tipos de sensibilização da placa, só o peptídeo MCLR e o peptídeo conjugado MCLR-cBSA (Figura 50)

Como pôde ser observado, o anticorpo policional (soro não purificado) obtido reconheceu a toxina MCLR tanto isolada quanto conjugada à proteína carreadora fixados à placa. Porém, o soro não purificado reconheceu com uma maior reatividade o antígeno conjugado (maior absorbância) adsorvido à placa, provavelmente devido à melhor exposição e acessibilidade do antígeno ao anticorpo presente no soro do coelho imunizado.



Figura 50. Cinética da produção de anticorpos IgG em coelho imunizado com MCLRmcKLH por ELISA indireto frente a dois antígenos de sensibilização

# 5.7.2 Purificação de soro de coelho imunizado com MCLR-*mc*KLH (Precipitação em Sulfato de Amônio)

Após confirmação da produção de anticorpos policionais em coelho, foi realizada a sangria total do animal por punção cardíaca (20 dias após a última dose).

Foi obtido anticorpo policional anti-MCLR com bom rendimento. Após purificação de 304mL de soro de coelho imunizado com MCLR-*mc*KLH, obtivemos 40mL de anticorpo policional, em uma concentração final de 10mg/mL.

#### 5.7.3 Curva de titulação do anticorpo policional anti-MCLR

Na **Figura 51** estão os resultados do ELISA indireto, como descrito no item 5.7.1, com o anticorpo policional anti-MCLR-*mc*KLH purificado, em diferentes diluições (diluição seriada 1:200 a 1:819200), frente aos diversos antígenos MCLR-cBSA, MCLR e cBSA (0,5µg/poço) de sensibilização da placa de ELISA Corning<sup>®</sup> high binding (EUA).



Figura 51. Reatividade do anticorpo policional anti-MCLR-*mc*KLH antes e após purificação (10mg/mL) frente a diferentes antígenos de sensibilização

Com base na Figura 51 acima, foram escolhidas na parte linear da curva, as diluições 1:6400 e 1:1600 do anticorpo policional, com placa sensibilizada com

MCLR-cBSA e MCLR, respectivamente, os quais corresponderam a 50% da absorbância máxima observada.

Essas diluições foram escolhidas para que o anticorpo policional em estudo fosse ensaiado por ELISA competição (competir diferentes concentrações de MCLR com o anticorpo policional nas diluições definidas), na faixa de concentração em que a curva dose-resposta apresentasse grande inclinação, ou seja, na região em que pouca variação na concentração de MCLR resultasse em grande aumento da densidade óptica.

#### 5.7.4 Avaliação da reatividade do anticorpo policional anti-MCLR-mcKLH

Paralelamente, foi realizado um ensaio de reatividade do anticorpo policional purificado frente às variantes de microcistina disponíveis em laboratório e comercialmente, tais como MCRR, MCLR, MCYR e MCLA. A metodologia utilizada foi a descrita no item 5.7.1, com modificações (i) na etapa de sensibilização, onde essas quatro variantes foram adsorvidas à placa e, (ii) na diluição seriada do anticorpo policional anti-MCLR-*mc*KLH, 1:100 (0,1mg/mL) a 1:12800 (0,78µg/mL).

Como a conjugação da microcistina-LR à proteína carreadora *mc*KLH ocorre entre o grupamento carboxílico do peptídeo com o grupamento amino da proteína carreadora, o aminoácido arginina do peptídeo provavelmente ficou mais exposto ao sistema imune do coelho, explicando o fato de uma maior reatividade do anticorpo por esse aminoácido presente em outras microcistinas, principalmente pela microcistina-RR, que apresenta duas argininas em sua estrutura. A MCLR apresenta uma leucina e uma arginina, a MCYR apresenta uma tirosina e uma arginina, enquanto que MCLA apresenta uma leucina e uma alanina. Contudo, esta última variante de microcistina foi a que apresentou menor reatividade pelo anticorpo policlonal anti-MCLR-*mc*KLH, em decorrência da ausência de arginina em sua estrutura (**Figura 52**).

Apesar da alta reatividade do anticorpo policional pela MCRR, a MCLR foi utilizada como imunógeno devido ao alto custo da toxina MCRR e, em decorrência do baixo rendimento de extração desta toxina.



**Figura 52.** Absorbâncias resultantes do ELISA indireto, utilizando anticorpo policional purificado anti-MCLR-*mc*KLH em diferentes diluições frente às variantes de microcistina. 1/100 (0,1mg/mL) a 1/12800 (0,78µg/mL).

### 5.7.5 Padronização do ensaio ELISA competição para detecção e quantificação de microcistina e nodularina utilizando anticorpos policionais anti-MCLR*mc*KLH obtido em coelho

Inicialmente, para elaboração do ensaio ELISA competição, foram estabelecidos a concentração e qual antígeno de sensibilização foi o mais ideal, e qual seria a melhor diluição do anticorpo policional. Entretanto, para concluir os dados necessários à padronização deste teste, dados já otimizados para o ELISA indireto, complementaram as análises. Em outras palavras, foi realizada uma titulação em bloco com diferentes concentrações do antígeno adsorvido X diluições do anticorpo policional anti-MCLR-*mc*KLH purificado.

## 5.7.5.1 Titulação em bloco do antígeno de sensibilização X diluição do anticorpo policional anti-MCLR

Como pode ser observado na **Figura 53** abaixo, o ensaio utilizando somente a toxina MCLR para sensibilizar a placa de ELISA competição apresentou maior reatividade, mesmo trabalhando com pequenas variações na concentração de antígeno de sensibilização. Como explicado em itens anteriores, o anticorpo policional reconheceu tanto a toxina MCLR isolada quanto conjugada ao cBSA.

Também, com base na **Figura 53**, foram escolhidas na região linear da curva, as concentrações de antígeno e diluições de anticorpo ideais para determinar uma curva de calibração para quantificação de MCLR (**Tabela 19**).



Figura 53. Absorbâncias resultantes do ensaio ELISA indireto. Titulação da Concentração de Antígeno (MCLR sem conjugação e MCLR conjugada ao cBSA) x Diluição do Anticorpo Policlonal obtido em coelho imunizado com MCLR-*mc*KLH

Concentração de Antígeno	Diluição do		
de Sensibilização (ug/poço)	Anticorpo Policional		
0,0625 ug MCLR-cBSA/poço	1:2000		
0,125 ug MCLR-cBSA/poço	1:8000		
0,50 µg MCLR/poço	1:200		
1,0 µg MCLR/poço	1:400		

 
 Tabela 19. Determinação da concentração ótima de Antígeno de Sensibilização x Diluição ótima do Anticorpo Policional anti-MCLR

A partir destes resultados foram realizados outros ensaios por ELISA competição, utilizando os dados definidos na **Tabela 19** acima.

### 5.7.5.2 Curva de calibração para MCLR para ensaios quantitativos para determinação de MCLR

Após definição de qual antígeno de sensibilização e concentração de anticorpo policional ideais, o ponto em que foi observada uma competição foi avaliado com mais ênfase, através do ensaio ELISA competição definido.

Analisando a **Figura 54**, foram comparadas diferentes diluições do anticorpo policional obtido (1:800 a 1:5000) frente às diluições seriadas da toxina MCLR (2µg a 61pg MCLR/mL).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere que 1µg/L seria a concentração máxima que poderia estar presente na água para consumo humano (SIVONEN & JONES, 2003). Portanto, a concentração de 1µg/L corresponde a 1ng/mL. E, esse ponto (na **Figura 54)** esteve presente nos primeiros pontos da curva, ou seja, ele estava entre as menores concentrações ensaiadas.

A curva referente ao anticorpo policional diluído 1:800 e 1:1600 apresentou o ponto de interesse (1ng/mL) sem muita definição, ou seja, apresentou Índices de Reatividade muito próximos, mesmo variando a concentração de MCLR. Já, o contrário foi observado na curva referente ao anticorpo policional diluído 1:5000, onde pequenas concentrações de MCLR apresentaram distintos Índices de Reatividade. A curva referente ao anticorpo policional diluído 1:2400 e 1:3200 apresentaram Índice de Reatividade intermediários, com curva dose-resposta bem definidas.



Figura 54. Índice de Reatividade da MCLR frente à diferentes diluições de Anticorpo Policional anti-MCLR-*mc*KLH

Na seqüência das análises padronizou-se uma curva de calibração que envolvesse o ponto de interesse (1ng/mL) e que, ao mesmo tempo apresentasse Índice de Reatividade linear. Em outras palavras, foi encontrada a diluição ideal de anticorpo policional que distinguiria pequenas variações nas concentrações de MCLR. Por isso, o erro (R<sup>2</sup>) de cada gráfico foi o dado de escolha nesta etapa experimental (dados mostrados na **Figura 55**).



Figura 55. Índice de Reatividade do Anticorpo Policional anti-MCLR x Concentração de MCLR

Tendo em vista o maior correlação ( $R^2 = 0,9873$ ) e a linearidade da curva definimos que a melhor diluição do anticorpo policional seria 1:3200.

Analisando cada diluição do anticorpo policional especificadamente, em 1:800 não foi possível distinguir pequenas variações na quantidade de MCLR, pois os Índices de Reatividade foram muito próximos. O mesmo foi observado para a diluição 1:1600, pois ambas as diluições não apresentaram boa sensibilidade, com baixo ângulo de inclinação. Em 1:2400 seria possível distinguir essa variação, mas em decorrência do R<sup>2</sup> não ter sido o ideal (0,9514) esta diluição foi descartada. Portanto, a diluição 1:3200 para o anticorpo policional ficou definida, pois esta diluição foi mais linear com maior ângulo de inclinação, comparada à diluição 1:5000.

Ao final destas análises, um protocolo final do método imunoenzimático ELISA princípio competição para determinação e quantificação de microcistina e nodularina em amostras ambientais, foi definido, como foi descrito no item 4.13.1.4.

Como a nodularina tem uma estrutura química muito semelhante à microcistina (**Figura 3**) e também é encontrada na água, realizou-se um ensaio comparativo entre estas duas toxinas, utilizando o método padronizado (CAS - caseína) e o kit comercial Abraxis<sup>®</sup> (EUA), ambos por competição (**Figura 56**).





Figura 56. Dosagem de microcistina e nodularinda utilizando dois kits ELISA competição

A **Figura 56** mostrou que a quantificação de microcistina-LR (MCLR), tanto utilizando o kit comercial Abraxis<sup>®</sup> (Kit), EUA, quanto o método padronizado com caseína (CAS), apresentou uma boa relação entre os Índices de Reatividade. Já quanto à quantificação de nodularina (NOD) o método padronizado CAS apresentou uma melhor distinção entre as diferentes concentrações, principalmente em concentrações elevadas, como 2µg/mL de NOD.

Além disso, este ensaio comprovou que o método padronizado com o anticorpo policional obtido foi compatível e similar com os métodos por ELISA competição para detecção e quantificação de microcistina e nodularina nas condições aqui utilizadas.

## 5.7.6 Validação do ensaio ELISA competição para detecção de microcistina e nodularina em amostras ambientais e em água para consumo humano

As análises para validação de métodos foram baseadas nas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003), Instituto Nacional de Metrologia INMETRO (DOQ-CGCRE-008 - Junho/2007) e International Conference on Harmonization - ICH.

A curva de calibração deste método foi calculada através de uma função do tipo logarítmica (f(x) = ln(x)), pois foi o modelo matemático que melhor descreveu a resposta instrumental.

#### 5.7.6 1 Limite Inferior de Quantificação

A análise de três ensaios em sextuplicata de amostras de água batizadas com MCLR demonstrou que o LIQ de 0,25ng/mL apresentou precisão e exatidão interlistas de 5,2 e 99,4%, respectivamente (**Figura 57**). Esta concentração (0,25ng/mL) foi definida como sendo o LIQ, que normalmente pode apresentar uma variação de até 20%, isto é, este ponto distinguiu bem uma amostra negativa de uma amostra com pequenas concentrações de MCLR. Além disso, este ponto apresentou um Índice de Reatividade diferente do Branco da Reação (ensaio sem competição). Isto é importante, visto que neste ensaio a leitura em absorbância do Branco é alta, tendo que se diferenciar do LIQ. O LQ se distingue do sinal da resposta de uma amostra negativa por um fator maior que 5, como recomendado nas normas.

Conc. Nominal MCLR (ng/mL)	0,250						
Curvas	Curva (i)	Curva (iii)					
	0,241	0,230	0,248				
	0,230	0,233	0,259				
Conc. Obtida	0,254	0,259	0,235				
(ng/mL)	0,256	0,246	0,262				
	0,259	0,243	0,259				
	0,238	0,235	0,285				
Média (ng/mL)	0,246	0,241	0,258				
Precisão (CV %)	4,7	4,4	6,4				
Exatidão (%)	98,5 96,4 103						
Média Inter-ensaio (ng/mL)	0,249						
Precisão Inter- ensaio (CV%)	5,2						
Exatidão Inter- ensaio (%)	99,4						

Figura 57. Definição do LIQ segundo a média da concentração calculada referente ao ponto mais baixo da curva de calibração

O kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA, apresenta LIQ de 0,1ng/mL, ou seja, inferior ao método padronizado (0,25ng/mL). Isso fez com que o kit comercial não diferenciasse muito bem uma amostra negativa de uma amostra positiva.

#### 5.7.6.2 Especificidade e Seletividade

As 9 amostras analisadas tanto por ELISA quanto por Espectrometria de Massas foram consideradas Verdadeiro Negativas, pois o Índice de Reatividade de cada amostra foi inferior à 20% do LIQ, que é critério adotado para negatividade segundo as normas para padronização de métodos.

O Limite para Aprovação da Amostra Negativa foi 1,86%.

Neste experimento concluiu-se que o Índice de cada amostra (%) foi sempre inferior ao LA<sub>AN</sub> 1,86%, portanto o método padronizado foi seletivo para MCLR.

Esses dados estão mostrados na Figura 58 abaixo.

Curva de Calibração para MCLR							
Conc. (ng/mL)	Abs. 492 nm	Indice (%)					
0,25	0,870	9,28					
0,50	0,799	16,68					
0,75	0,741	22,73					
1,00	0,702	26,80					
1,25	0,658	31,39					
1,50	0,628	34,52					
1,75	0,618	35,56					
2,00	0,589	38,58					
sem comp.	0,959						



Limite para aprovação da Amostra Negativa 1,86										
Amostras	Abs. 1	Abs. 2	Média Abs	Índice (%)	Conc. (ng/mL)					
33 - N15B Natal	1,017	1,057	1,037	-8,13	0,12					
44 - ITEP18	0,937	0,950	0,944	1,62	0,19					
48 - LTPNA 03	0,982	0,990	0,986	-2,82	0,15					
49 - LTPNA 04	1,037	1,045	1,041	-8,55	0,11					
59 - Rep. Billings (Poli)	1,078	1,093	1,086	-13,19	0,09					
<u> 60 - Rep. Guarapiranga (Poli)</u>	1,030	1,052	1,041	-8,55	0,11					
Água milli-Q	0,978	0,980	0,979	-2,09	0,16					
Água torneira imuno	1,010	1,005	1,008	-5,06	0,14					
Água bebedouro toxicologia	0,973	0,991	0,982	-2,40	0,16					

### Figura 58. Cálculo do Índice de Reatividade de amostras negativas, para avaliação da Seletividade do método por ELISA

De acordo com o critério acima mencionado, essas amostras foram consideradas Verdadeiro Negativas, para este ensaio padronizado (ELISA competição). Porém amostras que apresentaram resultado negativo não excluíram a hipótese da presença das toxinas estudadas, pois existe a possibilidade das mesmas apresentarem uma concentração inferior ao LIQ.

A limitação do método em relação a esse parâmetro foi o reconhecimento indistinto de microcistina e nodularina, como comprovado com o experimento descrito no item 5.7.5.2 e observado na **Figura 56**.

#### 5.7.6.2.1 Avaliação da influência do metanol no ensaio ELISA competição

Um efeito muito observado com kits semelhantes (kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA) foi a reação cruzada com metanol (METCALf *et al.*, 2000a,b).

A **Figura 59** nos mostrou que, utilizando o método padronizado em Caseína, a concentração calculada para MCLR (através da curva de calibração para MCLR) foi semelhante à concentração nominal da amostra batizada. Porém o mesmo não se aplicou para nodularina, a qual apresentou uma concentração calculada superior à nominal e, como ultrapassou o limite de detecção, a mesma foi diluída e reanalisada.

ELISA COMPETIÇÃO - CASEÍNA											
E	squema placa		Abs 492 nm		s 492 nm Índice de Reatividade (%)			nde (%)	Conc. Calculada (ng/mL)		
MCLR (ng/mL)	NOD (ng/mL)	MeOH (%)	MCLR	NOD	MeOH (%)	MCLR	NOD	MeOH (%)	MCLR	NOD	MeOH (%)
0,125	0,125	0	0,972	0,637	1,836	0,6	34,9	-87,7	0,132	1,911	0,000
0,250	0,250	25	0,900	0,586	1,774	8,0	40,1	-81,4	0,235	2,869	0,000
0,5	0,5	50	0,812	0,495	1,679	17,0	49,4	-71,7	0,474	5,925	0,000
1,0	1,0	75	0,710	0,401	1,430	27,4	59,0	-46,2	1,068	12,532	0,003
2,0	2,0	100	0,632	0,209	0,986	35,4	78,6	-0,8	1,988	57,884	0,118
			sem comp	0 978							



Curva de Calibração para MCLR utilizando Caseína

Figura 59. Avaliação da influência do metanol no ensaio ELISA competição em Caseína. Observar a concentração calculada de amostras batizadas com nodularina (NOD) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações.

O ensaio ELISA competição padronizado neste trabalho não apresentou interferência significativa devido à presença de metanol na matriz, exceto em concentrações próximas a 100% (**Figura 59**). Isto se justifica pela volatilidade do metanol e, pelo pequeno volume incubado na reação a 37°C. É importante relatar neste trabalho que ocorreu uma diferença entre o Índice de Reatividade para MCLR apresentado na **Figura 58 e 59** por causa da abertura de um novo lote de padrão MCLR (Sigma<sup>®</sup>, EUA) no mesmo dia experimental.

Já, o ensaio ELISA competição referente ao kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA, apresentou interferência significativa devido à presença de metanol na matriz, principalmente em concentrações superiores a 50% (**Figura 60**). Outro ponto que deve ser relatado é que, devido o kit comercial apresentar calibradores e controles próprios, foram construídas em paralelo duas curvas de calibração para MCLR, uma utilizando os calibradores do kit e outra utilizando o padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA. A

concentração calculada (ng/mL) foi baseada na equação do gráfico que apresentou melhor R<sup>2</sup>, ou seja, na equação referente à curva construída utilizando MCLR padrão Sigma<sup>®</sup>, EUA (**Figura 59**).

ELISA COMPETIÇÃO - KIT COMERCIAL ABRAXIS											
E	squema placa		Abs 492 nm		Índice de Reatividade (%)			Conc. Calculada (ng/mL)			
MCLR (ng/mL)	NOD (ng/mL)	MeOH (%)	MCLR	NOD	MeOH (%)	MCLR	NOD	MeOH (%)	MCLR	NOD	MeOH (%)
0,125	0,125	0	1,424	1,014	1,510	0,8	29,4	-5,2	0,106	0,415	0,000
0,250	0,250	25	1,150	0,797	1,470	19,9	44,5	-2,4	0,264	0,855	0,000
0,5	0,5	50	1,000	0,561	1,077	30,4	60,9	25,0	0,435	1,876	0,336
1,0	1,0	75	0,735	0,420	0,889	48,8	70,8	38,1	1,051	3,000	0,629
2,0	2,0	100	0,571	0,429	0,683	60,2	70,1	52,4	1,814	2,911	1,249
			sem comp	1 4 3 6							



Figura 60. Avaliação da influência do metanol no ensaio ELISA competição referente ao kit comercial Abraxis<sup>®</sup>. Observar a concentração calculada de amostras batizadas com nodularina (NOD) e metanol (MeOH) em diferentes concentrações.

A semelhança entre os kits foi relacionada ao Índice de Reatividade (%), tanto para MCLR quanto para nodularina. Ambos os kits apresentam IR (%) superior para a toxina nodularina, em comparação com a toxina MCLR.

Portanto, este experimento comprovou a especificidade do método CAS pelas toxinas MCLR e NOD e não pelo metanol que pode estar presente no eluato de amostras extraídas. Geralmente utiliza-se o metanol (máximo 50%) para resuspender o material obtido após extração para ser analisado por LC-MS (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O aumento de ligações inespecíficas com o aumento das concentrações de metanol pode provavelmente, ocorrer devido à remoção, pelo metanol, da MCLR

adsorvida à placa, pois esta toxina é solúvel em metanol, ou pela interferência com os reagentes de bloqueio. Conseqüentemente, para o *screening* de toxinas de cianobactérias, a concentração de metanol deve ser baixa, em torno de 7%. Alguns trabalhos têm relatado que concentrações crescentes de metanol alteram a ligação do anticorpo, diminuindo-a (METCALF *et al.*, 2000a,b).

#### 5.7.6.3 Recuperação

A recuperação de MCLR foi estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo.

Controles	Recuperação Absoluta (%)	Recuperação Relativa (%)	Efeito Matriz (%	
CQB	95,1	96,1	-1,0	
CQM	98,8	98,8	0,0	
CQA	98,8	98,9	-0,1	
Recuperação Global (%)	97,6	98,0	-0,4	

**Figura 61.** Cálculo da Recuperação Absoluta, Relativa e Efeito Matriz. CQB, CQM e CQA correspondem aos Controles de Qualidade Baixa, Média e Alta, respectivamente.

Analisando a **Figura 61** acima, tem-se que tanto a Recuperação Absoluta, quanto a Recuperação Relativa, apresentaram valores superiores a 85%, ou seja, uma média de 97,8%.

Uma Recuperação Absoluta de 97,6%, a qual relaciona Índices de Reatividade entre amostras em solução e amostras extraídas, demonstra que todo o procedimento de extração, que inclui etapas de sonicação, centrifugação e filtração, não ocasiona perdas relevantes da toxina.

Uma Recuperação Relativa de 98,0%, a qual relaciona Índices de Reatividade entre amostras extraídas e efeito matriz, demonstra que além da matriz presente na amostra a ser extraída não influenciar no ensaio ELISA padronizado, também não ocasiona perdas de MCLR durante a extração. Dentre os componentes que podem ocasionar resultados falso positivo ou falso negativo, estão os compostos presentes na água da natureza, sais de meio de cultura, metanol, restos de parece celular de alga, bactérias, pigmentos coloridos como ficocianina, etc. (METCALF *et al.*, 2000).
Um Efeito Matriz de -0,4% (abaixo do erro do método 20%), a qual relaciona Índices de Reatividade entre efeito matriz e amostras em solução, demonstra que os reagentes, matriz da amostra e outros componentes não alteram a sensibilidade do método padronizado (avidez do anticorpo policional anti-MCLR à MCLR presente na amostra ou adsorvida à placa de ELISA). Este erro é praticamente desprezível.

Por conseguinte, esse resultado confirma a robustez do método, pois garante que ao ser extraída uma amostra, não ocorre perda relevante de MCLR.

Além disso, esse resultado conclui que a curva de calibração pode ser realizada sem passar pelo processo de extração (descrito no item 2.8.2.3.1). Um ensaio que será realizado é a estabilidade da curva de calibração, isto é, verificar por quanto tempo a curva de calibração pode ser armazenada sem perder a estabilidade. Através de estudos prévios, em ensaios realizados em dias diferentes, verificou-se que uma solução de microcistina-LR apresentou estabilidade, isto é, com leituras muito semelhantes inter-dias.

#### 5.7.6.4 Linearidade

#### 5.7.6.4.1 Linearidade da Metodologia Analítica

A **Figura 62** apresenta uma análise da distribuição dos resíduos com relação à Concentração Nominal de MCLR calculados com função Logarítmica (In) a partir da curva de calibração.

A **Figura 63** apresenta a análise da distribuição dos resíduos com relação à Concentração Nominal de MCLR calculados com Regressão Linear a partir das mesmas curvas de calibração.

Analisando 9 curvas de calibração calculadas com regressão linear e, comparando com o cálculo em função logarítmica (In), observou-se uma distribuição mais heterogênea na função log e mais homogênea na função linear.

Portanto, o modelo matemático que melhor descreveu a resposta do ensaio de ELISA competição foi a função logarítmica, ou seja, foi o modelo que apresentou distribuição dos desvios heterocedástica.



Figura 62. Análise da Distribuição dos Resíduos com Relação à Concentração Nominal de MCLR calculados com função Logarítmica (In) a partir da Curva de Calibração



Figura 63. Análise da Distribuição dos Resíduos com Relação à Concentração Nominal de MCLR calculados com Regressão Linear a partir da Curva de Calibração

O fato do valor de referência para a Organização Mundial da Saúde (1ng/mL) estar em uma posição mediana da curva minimizou a probabilidade da ocorrência de falso-positivo ou falso-negativo, pois este ponto está dentro da variação permitida pelo método (20%).

Em outras palavras, supondo-se que o LIQ fosse o valor de referência (1ng/mL) e que este variasse 20% (0,8 a 1,2ng/mL), isso prejudicaria uma afirmação contundente se a amostra fosse realmente negativa ou se esta apresentasse pequenas concentrações de MCLR. Um exemplo seria, quando fosse obtida uma concentração calculada de 0,79 ou 0,82, dúvidas relacionadas à concentração real surgiriam. Assim sendo, a possibilidade de ocorrerem resultados falsos (positivo ou negativo) aumentariam.

Levando em consideração essas análises e a legislação, a qual sugere que 1µg/L seria a concentração máxima que poderia estar presente na água para consumo humano (SIVONEN & JONES, 2003), a curva de calibração (com função logarítmica) variou de 0,25 a 2,0ng/mL, como mostra a **Figura 64**.



# Curva de Calibração para Microcistina



#### 5.7.6.4.2 Linearidade do Método

A **Figura 65** apresenta os dados da avaliação da Linearidade do Método, a partir da Variação da Recuperação Absoluta (%), previamente calculado, como mostrado anteriormente na **Figura 61**.

A linearidade do método é a representação gráfica dos limites do método e, nos diz que, por toda a faixa de concentração, o percentual se mantém constante. Em outras palavras, a Recuperação do método tem a mesma porcentagem de recuperação ao longo do intervalo de concentrações do método.

Sabendo que o método pode variar de 85 a 115% (±15%) podemos considerar a recuperação de 95,1% no CQB (Controle de Qualidade Baixo) praticamente desprezível, podendo com segurança quantificar amostra em matriz (MTZ) utilizando curva de calibração preparada em solução (SÇÃO).



Figura 65. Avaliação da Linearidade do Método, a partir da Variação da Recuperação Absoluta (%)

Conforme os resultados obtidos na Recuperação Absoluta (%) (dados apresentados na **Figura 61**) o método utilizado mostrou-se linear na faixa de concentração dos controles avaliada (0,6 a 1,6ng/mL).

A **Figura 65** apresenta a curva de calibração construída a partir do estudo de linearidade pelo método de regressão linear. Esta apresentou um coeficiente de correlação linear  $R^2 = 0,839$ . A equação encontrada para esta curva foi y = 3,893x + 93,18, onde *x* representa a concentração nominal de MCLR em ng/mL e *y* a Variação da Recuperação Absoluta (%).

### 5.7.6.5 Exatidão e Precisão

Para os controles as concentrações definidas foram 0,6; 1,2 e 1,6ng/mL, para os controles baixo, médio e alto, respectivamente.

De acordo com os critérios de validação, o método em estudo foi considerado preciso e exato, pois apresentou Índices de Precisão e Exatidão, intra e inter-dias, intra e interensaio, dentro dos limites permitidos pela legislação, ou seja, Precisão abaixo de 15% e Exatidão acima de 85%. Esses resultados estão mostrados nas **Figuras 66 a 68**.

Resultados de Precisão (Repetitividade) e Exatidão - Controles de Qualidade										
Analito				MCLR						
Controles	Controle Baixo			Controle Médio			Controle Alto			
Conc. Nominal (ng/mL)	0,600			1,2			1,6			
1º Dia	Curva (i)	Curva (ii)	Curva (iii)	Curva (i)	Curva (ii)	Curva (iii)	Curva (i)	Curva (ii)	Curva (iii)	
Conc. Obtida (ng/mL)	0,621	0,556	0,604	1,147	1,130	1,074	1,426	1,463	1,386	
	0,588	0,667	0,648	1,224	1,217	1,128	1,563	1,515	1,471	
	0,597	0,674	0,629	1,212	1,147	1,369	1,540	1,561	1,464	
	0,612	0,630	0,635	1,188	1,211	1,085	1,611	1,569	1,573	
	0,624	0,558	0,671	1,130	1,119	1,151	1,443	1,470	1,396	
	0,591	0,664	0,610	1,218	1,211	1,234	1,571	1,538	1,475	
	0,594	0,677	0,654	1,224	1,152	1,069	1,548	1,553	1,482	
	0,606	0,628	0,635	1,194	1,217	1,140	1,603	1,592	1,596	
Média (ng/mL)	0,604	0,632	0,636	1,192	1,176	1,156	1,538	1,533	1,480	
Precisão (CV %)	2,3	7,9	3,5	3,0	3,6	8,8	4,5	3,0	5,0	
Exatidão (%)	100,7	105,3	106,0	99,4	98,0	96,3	96,1	95,8	92,5	
Média Inter- ensaio (ng/mL)	0,624			1,175			1,517			
Precisão Inter- ensaio (CV%)	4,5			5,1			4,2			
Exatidão Inter- ensaio (%)	104,0			97,9			94,8			

Figura 66. Cálculos de Precisão e Exatidão para validação do método intra-ensaio (azul) e interensaio (verde) no primeiro dia

Resultados de Precisão (Repetitividade) e Exatidão - Controles de Qualidade										
	Analit	0		MCLR						
Controles	C	ontrole Baix	0	Controle Médio			Controle Alto			
Conc. Nominal (ng/mL)	0,6			1,2			1,6			
2º Dia	Curva (i)	Curva (ii)	Curva (iii)	Curva (i)	Curva (ii)	Curva (iii)	Curva (i)	Curva (ii)	Curva (iii)	
Conc. Obtida (ng/mL)	0,591	0,520	0,584	1,086	1,081	1,085	1,366	1,430	1,366	
	0,559	0,513	0,620	1,148	1,144	1,271	1,462	1,437	1,724	
	0,551	0,614	0,659	1,153	1,132	1,090	1,611	1,483	1,396	
	0,610	0,653	0,601	1,194	1,224	1,271	1,373	1,562	1,588	
	0,588	0,525	0,587	1,081	1,075	1,090	1,595	1,475	1,369	
	0,565	0,523	0,623	1,159	1,150	1,265	1,473	1,570	1,737	
	0,557	0,607	0,654	1,159	1,138	1,101	1,603	1,603	1,403	
	0,615	0,657	0,607	1,212	1,224	1,258	1,628	1,437	1,612	
Média (ng/mL)	0,580	0,576	0,617	1,149	1,146	1,179	1,514	1,500	1,524	
Precisão (CV %)	4,3	10,9	4,6	4,0	4,9	7,9	7,2	4,6	10,4	
Exatidão (%)	96,6	96,1	102,8	95,8	95,5	98,2	94,6	93,7	95,3	
Média Inter- ensaio (ng/mL)	0,591			1,158			1,513			
Precisão Inter- ensaio (CV%)	6,6			5,6			7,4			
Exatidão Inter- ensaio (%)	98,5			96,5			94,5			

Figura 67. Cálculos de Precisão e Exatidão para validação do método intra-ensaio (azul) e interensaio (verde) no segundo dia

Controles de Qualidade									
Ana	lito		MCLR						
Controles	Control	e Médio	Controle Alto						
Conc. Nominal (ng/mL)	0	,6	1	,2	1,6				
Dias	1º Dia 2º Dia		1º Dia	2º Dia	1º Dia	2º Dia			
	0,621	0,591	1,147	1,086	1,426	1,366			
	0,588	0,559	1,224	1,148	1,563	1,462			
	0,597	0,551	1,212	1,153	1,540	1,611			
Cono Obtido (na/ml.)	0,612	0,610	1,188	1,194	1,611	1,373			
	0,624	0,588	1,130	1,081	1,443	1,595			
	0,591	0,565	1,218	1,159	1,571	1,473			
	0,594	0,557	1,224	1,159	1,548	1,603			
	0,606	0,615	1,194	1,212	1,603	1,628			
Média (ng/mL)	0,604	0,580	1,192	1,149	1,538	1,514			
Precisão (CV %)	2,3 4,3		3,0	4,0	4,5	7,2			
Exatidão (%)	100,7	96,6	99,4	95,8	96,1	94,6			
Média Inter-dias (ng/mL)	0,592		1,	171	1,526				
Precisão Inter-dias (CV%)	3,3		3	,5	5,8				
Exatidão Inter-dias (%)	98,7		97	7,6	95,4				

Resultados de Precisão (Reprodutibilidade) e Exatidão Inter-dias -

Figura 68. Cálculos de Precisão e Exatidão para validação do método intradia (azul) e interdia (verde)

A média global interensaio referente à precisão (CV%) e exatidão (%) calculadas foram 5,6 e 97,7%, respectivamente. A média global inter-dia referente à precisão (CV %) e exatidão (%) calculadas foram 4,2 e 97,2%, respectivamente.

# 5.8 Determinação de variantes de microcistina e/ou nodularina em amostras de água para consumo humano, amostras ambientais e de meio de cultura, utilizando dois kits ELISA competição

A Figura 69 abaixo apresenta uma lista das amostras analisadas por três ensaios: ELISA competição padronizado (metodologia Caseína), ELISA competição referente ao kit comercial Abraxis®, EUA, e sistema LC-MS, onde este último foi o ensaio confirmatório da presença das toxinas presentes nas amostras.

por diferentes métodos								
NI9	ELISA met.		LC-MS		(ng/mL)		LC-MS	ELISA Kit Abraxis
IN .	Caseína (ng/mL)	HPLC	MCRR	MCYR	MCLR	MCLA	varian.	(ng/mL)
1	3100,65	neg	-	-	0,30	-	+	5880,12
2	774,43	neg	-	-	0,10	-	+	3755,69
3	6,32	neg	-	-	-	-	+	29,34
4	1084,23	neg	-	-	25,40	-	+	5244,71
5	49,52	neg	-	-	0,20	0,70	+	106,79
6	2,24	neg	-	-	-	-	+	6,26
7	3,88	neg	-	-	-	-	+	51,27
8	15,22	neg	-	-	-	-	+	27,84
9	17,92	neg	-	-	1,30	-	+	68,89
10	217,36	neg	-	-	0,20	-	+	170,89
11	46,99	neg	-	-	0,10	-	+	140,38
12	6592,03	traços	-	-	83,30	-	+	21753,27
13	444,99	neg	5,80	1,00	9,00	-	-	4105,17
14	10,87	neg	2,00	0,10	0,40	-	-	477,79
15	113,81	neg	4,60	0,30	2,50	-	+	780,70
16	140,00	neg	5,00	0,40	2,80	-	+	970,38
17	0,69	neg	-	-	0,10	-	-	1,34
18	10666,84	traços	-	0,10	84,40	-	-	41635,68
19	1643,09	neg	3,10	0,50	31,30	0,20	+	6109,97
20	44,87	neg	0,50	0,20	0,50	-	+	131,43
21	23,06	neg	-	-	3,00	-	+	89,09
22	186,86	neg	0,20	0,40	10,80	-	+	582,25
23	55,94	neg	-	-	3,20	-	+	208,02
24	39,37	neg	-	-	2,70	-	+	111,95
25	7,54	neg	-	-	0,30	-	-	11,06
26	29,80	neg	-	-	1,40	-	+	75,80
27	83,36	neg	-	0,10	10,10	-	+	326,00
28	9,44	neg	-	-	0,40	-	-	20,83
29	19,03	neg	-	-	0,70	-	+	79,12
30	1,31	neg	-	-	0,30	-	-	4,94
31	1,07	neg	-	-	0,20	-	-	7,03
22	2,74	neg	-	-	0,30	-	-	0,00
34	0,00	neg	-		- 0.80			0,58
35	372.41	neg			15 10	0.10	+	1719.89
36	1.63	neg	-	-	1.30	-	-	4 24
37	1 13	neg	-	-	0.90	-	-	3.00
38	13 32	neg	0.20	0.10	0,00		+	72.86
39	6.67	neg	0.10	-	0.40	-	-	41.34
40	0.00	neg	-	-	-	-	-	0.10
41	5.62	neg	-	-	0.80	-	-	28.96
42	157.51	nea	-	-	7,10	-	+	536.20
43	0,05	nea	-	-	0,03	-	-	0,17
44	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,22
45	1,36	neg	-	-	0,10	-	-	7,68
46	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,12
47	41,53	neg	5,30	0,20	4,10	-	+	159,28
48	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,07
49	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,38
50	0,69	neg	-	-	0,10	-	-	2,84
51	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,19
52	0,33	neg	-	-	0,31	-	-	0,67
53	40,62	neg	4,10	0,10	2,80	-	+	164,62
54	86,03	neg	8,00	0,10	4,50		+	242,87
55	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,18
56	9,13	neg	0,80	0,20	0,80	-	-	35,29
57	11,48	neg	2,10	0,60	0,70	-	-	291,45
58	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,15
59	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,33
60	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,18
61	0,07	neg	-	-	0,01	-	-	0,67
62	0,00	neg	-	-	-	-	-	0,12

Detecção e Quantificação de variantes de Microcistina e/ou Nodularina em diferentes matrizes

Figura 69. Detecção e quantificação de variantes de microcistina e/ou nodularina em diferentes matrizes. Em verde estão as concentrações referentes ao ensaio ELISA padronizado (met. Caseína-LIQ 0,25ng/mL) e, em azul estão as concentrações referentes ao kit comercial Abraxis<sup>®</sup> (LIQ 0,1ng/mL). De uma forma geral, amostras positivas e quantificadas por ELISA apresentaram uma concentração calculada superior à concentração calculada pelo sistema LC-MS. Isto ocorreu em decorrência da maior sensibilidade do ensaio imunoenzimático e/ou pela detecção de outras variantes de toxina não detectadas pelo multi-método LC-MS, como a nodularina por exemplo. O ensaio por ELISA detecta concentrações da ordem de grandeza em pg, enquanto que o sistema LC-MS detecta concentrações da ordem em ng. Por isso, amostras positivas por ELISA ultrapassaram o limite de detecção do método e foram diluídas para serem quantificadas (por exemplo, amostras 4, 12, 18, 19, 22 e 27).

Algumas amostras negativas (ou com baixas concentrações da toxina) analisadas tanto por LC-MS quanto pelo ensaio ELISA padronizado (Caseína) apresentaram resultados positivos pelo kit Abraxis<sup>®</sup>, EUA, indicando que alguns interferentes presentes na amostra levaram a um resultado falso positivo pelo kit comercial (por exemplo, amostras 33, 49 e 59).

Algumas amostras negativas por LC-MS foram positivas em ambos os ensaios por ELISA. Uma análise mais detalhada destas amostras confirmou a presença de outras variantes de microcistina (por outro equipamento LC-MS), como por exemplo, a toxina [D-Asp<sup>3</sup>]MCLR presente na amostra 6. Como o equipamento utilizado no multi-método padronizado por LC-MS (item 4.2) limita-se à detecção das quatro variantes de microcistina mais comuns (MCRR, MCYR, MCLR e MCLA), foi realizada a análise de algumas amostras de "concentração duvidosa" em outro equipamento LC-MS mais sensível (Triplo Quadrupolo Híbrido com Ion Trap, AB Applied Biosystems<sup>®</sup> MDS SCIEX, California, EUA) com algumas mudanças nas fases móvel e estacionária do equipamento. Este estudo confirmou a presença de outras variantes, como a citada acima e mostrada na **Figura 70**.

Neste outro equipamento foi possível realizar uma análise confirmatória da presença de outra variante de toxina, [D-Asp<sup>3</sup>]MCLR de PM = 980.5. Assim, o equipamento fez uma busca no modo "Precursor Ion" (**Figura 70A**) se existiam compostos, numa faixa de massa entre 981.0 a 982.0, que gerariam íons de m/z 135 (ver Figura 27). Na seqüência foi analisado o espectro referente aos "íons pai" (que geraram o íon m/z 135) dentro da faixa determinada no modo "Enhanced Product Ion" (**Figura 70B**) e, ao ser expandido nos forneceu uma fragmentação detalhada do composto que gerou o íon m/z 135, que, no caso refere-se à toxina [D-Asp<sup>3</sup>]MCLR presente na amostra (**Figura 70C**).



**Figura 70.** Cromatograma da amostra 6. Análise da variante [D-Asp<sup>3</sup>]MCLR por LC-MS. A) Cromatograma obtido no modo Precursor Ion m/z 135. B) Cromatograma obtido no modo Enhanced Resolution Ion referente à toxina de PM = 980,5 (m/z 981,5). C) Cromatograma obtido no modo Enhanced Product Ion expandido

Portanto, o ensaio por ELISA competição (metodologia padronizada em caseína) foi o método mais adequado para a detecção de microcistinas no

ecossistema aquático, em amostras ambientais, na água para consumo humano e em amostras de meio de cultura. Também foi capaz de detectar a grande maioria das variantes de microcistina (FISCHER *et al.*, 2001), visto que, supostamente, o anticorpo utilizado no ensaio ELISA reconheceu o grupamento Adda destes compostos (MOUNTFORT *et al.*, 2005).

Os pontos mais relevantes a serem destacados nas análises das 62 amostras através dos três ensaios foram que:

(i) todas as amostras negativas por ELISA, em ambos os kits, foram também negativas por LC-MS. E isso reafirma que o método ELISA competição padronizado é específico, com desprezível reação inespecífica e, funciona como um bom método de triagem.

(ii) todas as amostras positivas por ELISA, em ambos os kits, foram também positivas por LC-MS, confirmando que o método por ELISA foi um excelente ensaio de triagem de amostras positivas para as toxinas estudadas.

(iii) todas as amostras negativas por LC-MS também foram negativas pelo ensaio ELISA competição padronizado, porém, com a presença de reações inespecíficas para o imunoensaio utilizando kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA.

(iv) apesar da diferença da concentração calculada entre os dois imunoensaios, ambos apresentaram boa correlação (correlação de Pearson = 0,988), como mostrado na Figuras 71 e 72.

(v) apesar do sistema LC-MS não detectar nodularina, os ensaios por ELISA podem detectar a presença das mesmas, direcionando análises futuras.



Figura 71. Relação entre as concentrações calculadas entre dois ensaios ELISA competição, padronizado em Caseína e kit comercial Abraxis<sup>®</sup>



Figura 72. Correlação de Pearson entre dois ensaios ELISA competição, padronizado em Caseína e kit comercial Abraxis<sup>®</sup>

Foram obtidos tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais anti-MCLR.

Foi desenvolvido um kit de imunoensaio para detecção de microcistina e/ou nodularina em amostras ambientais. Este ensaio ELISA competição indireto, padronizado e validado, foi fundamentado no anticorpo policlonal anti-MCLR obtido.

Nesse sentido, temos que:

Um multi-método para determinação de microcistina-LR, RR, YR e LA por Espectrometria de Massas foi elaborado;

O antígeno mais imunogênico obtido foi MCLR conjugado ao mcKLH;

O antígeno de sensibilização ideal utilizado no ensaio ELISA indireto, tanto para detecção de anticorpos IgG em soro de camundongo e coelho imunizados como em sobrenadante em meio de cultura, foi MCLR conjugado ao cBSA;

# Quanto à obtenção do anticorpo monoclonal observamos que:

\* Foram obtidos 4 hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-MCLR, tais como  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$ , e  $k_2232$ . Estes clones se mostraram estáveis frente ao congelamento/descongelamento;

Todos os anticorpos monoclonais apresentaram isótipo IgG1, exceto o clone k<sub>2</sub>84 que apresentou isótipo IgG2a. Anticorpos deste isótipo apresentam atividade biológica restrita;

 O clone 32 (k<sub>2</sub>232) foi o clone que apresentou maior rendimento na produção de anticorpos anti-MCLR;

As curvas dose-resposta dos clones frente às quatro variantes de microcistina apresentaram perfis semelhantes. Quanto à reatividade o clone 17 (k<sub>3</sub>17) foi considerado o melhor clone, pois foi o que apresentou melhor resposta à variação na diluição seriada do anticorpo;

Apesar da concentração protéica do clone 48 ( $k_2$ 48) ser inferior ao clone 17 ( $k_3$ 17), a diferença de reatividade entre os dois clones nas diferentes diluições foi acentuada;

A reatividade dos clones 17 (k<sub>3</sub>17) e 232 (k<sub>2</sub>232) nas diferentes diluições seriadas foi semelhante, apesar da concentração protéica do clone 232 (180µg/100µL) ser próxima ao dobro do observado no clone 17 (100µg/100µL). Como os dois clones apresentaram alto grau de pureza uma possível sugestão seria a da maior reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais secretados pelo clone 17;

Através de análises em Gel SDS-PAGE observou-se que não houve perda e a integridade dos anticorpos monoclonais secretados pelos clones foi mantida.

#### Quanto à obtenção do anticorpo policional observamos que:

Foi obtido anticorpo policional anti-MCLR com bom rendimento, ou seja, 40mL de anticorpo policional em uma concentração final de 10mg/mL;

O anticorpo policional anti-MCLR-mcKLH apresentou reatividade crescente pelas variantes MCRR, MCYR e MCLR, respectivamente, em decorrência da presença do aminoácido arginina em sua estrutura;

Como a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere que 1µg/L (1ng/mL) seria a concentração máxima que poderia estar presente na água para consumo humano, essa concentração foi incluída na elaboração da curva de calibração do método padronizado;

O método validado apresentou Limite Inferior de Quantificação de 0,25ng/mL, enquanto que o kit comercial Abraxis<sup>®</sup>, EUA, apresenta LIQ de 0,1ng/mL;

Em contraposição ao kit comercial citado, o ensaio ELISA competição padronizado não apresentou interferência significativa devido à presença de metanol na matriz, exceto em concentrações próximas a 100%;

 O kit comercial e o kit validado apresentaram semelhança relacionada ao Índice de Reatividade (%), tanto para microcistina quanto para nodularina;

 O ensaio validado apresentou Recuperação Relativa de 98%. Isto significa que, além da matriz presente na amostra a ser extraída não influenciar no ensaio ELISA padronizado, também não ocasiona perdas de MCLR durante a extração;

Para construção da curva de calibração, o modelo matemático que melhor descreveu a resposta ao ensaio ELISA competição foi a função logarítmica;

O método em estudo foi considerado preciso e exato, pois apresentou Indices
 de Precisão e Exatidão, intra e inter-dias, intra e interensaio, dentro dos limites

permitidos pela legislação, ou seja, Precisão abaixo de 15% e Exatidão acima de 85%.

Foram comparados os resultados obtidos de quantificação de toxinas algais utilizando os dois kits ELISA competição, kit validado em nosso trabalho e kit comercial Abraxis<sup>®</sup>.

- todas as amostras negativas por ELISA, em ambos os kits, foram também negativas por LC-MS;
- todas as amostras positivas por ELISA, em ambos os kits, foram também positivas por LC-MS;
- todas as amostras negativas por LC-MS também foram negativas pelo ensaio ELISA competição padronizado;
- apesar do sistema LC-MS não detectar nodularina, os ensaios por ELISA podem detectar a presença das mesmas, direcionando análises futuras.

Foi submetido a patente pela Agência USP de Inovação o método por ELISA competição indireto para detecção e quantificação de microcistina e/ou nodularina em amostras de água para consumo humano e em amostras ambientais (ANEXO II).

# 茶水ななどで、茶茶での 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Antígenos e anticorpos. In:\_\_\_\_.
  Imunologia Celular & Molecular. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. cap.3, p.38-65.
- ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. J. Chromatogr. B., Netherlands, v.774, p.215-222, 2002.
- AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon**, England, v.32, p.1495-1507, 1994.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resoluções. Portaria nº 238. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\_03re.htm. Acesso em: 05 dezembro 2008.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicol**., United States, v.181-182, p.441-446, 2002.
- AZMI, F.H.; LUCAS, A.H.; RAFF, H.V.; GRANOFF, D.M. Variable region sequences and idiotypic expression of a protective human immunoglobulin M antibody to capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* group B and *Escherichia coli* K1. **Infect. Immun.**, United States, v.62, iss.5, p.1776-1786, 1994.
- BAIER, W.; LOLEIT, M.; FISCHER, B.; JUNG, G.; NEUMANN, U.; WEIB, M.;
  WECKESSER, J.; HOFFMANN, P.; BESSLER, W.G.; MITTENBÜHLER, K. Int.
  Immunopharmacol., Netherlands, v.22, p.339-353, 2000.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas

- BAIRD, C. A purificação de águas poluídas. In: \_\_\_\_. **Química ambiental**. São Paulo: Artmed Editora S.A., 1999. cap.9, p.483-523.
- BARCO, M.; LAWTON, L.A.; RIVERA, J.; CAIXACH, J. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A., Netherlands, v.1074, p.23-30, 2005.
- BARTEL, A.; CAMPBELL, D. Some immunochemical differences between associated and dissociated hemocyanin. **Arch. Biochem. Biophys.**, United States, v.82, p.23-32, 1959.
- BAZIN, R.; LEMIEUX, R. Role of the macrophage-derived hybridoma growth factor in the in vitro and in vivo proliferation of newly formed B cell hybridomas. J.
  Immunol., United States, v.139, iss.3, p.780-787, 1987.
- BISCHOFF, R.; EISERT, R.M.; SCHEDEL, I.; VIENKEN, J.; ZIMMERMAN, U. Human hybridoma cells produced by electro-fusion. **FEBS Lett.**, Netherlands, v.147, iss.1, p.64-68, 1982.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; KUJBIDA, P.; CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; MOURA, A.N.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v.326, p.687-694, 2005.
- BLOM, J.F.; ROBINSON, J.A.; JÜTTNER, F. High grazer toxicity of [D-Asp<sup>3</sup>, (E)-Dhb<sup>7</sup>] microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. **Toxicon**, England, v.39, p.1923-1932, 2001.
- CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Sci. Am.**, United States, v.270, p.781-796, 1994.

- CHU, F.S.; HUANG, X.; WEI, R.D.; CARMICHAEL, W.W. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl. Environ. Microbiol., United States, v.55, p.1928-1933, 1989.
- CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, United States, v.203, p.264-272, 2005.
- CODD, G.A.; BELL, BROOKS, S.G.; BROOKS, W.P. Cyanobacterial toxins in water. **Water Sci. Technol.**, England, v.21, p.1-13, 1989.
- COLLER, H.A.; COLLER, B.S. Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting diluition tecnique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality.
   Hybridoma, United States, v.2, p.91-96, 1983.
- DAHLMANN, J.; BUDAKOWSKI, W.R.; LUCKAS, B. Liquid chromatography– electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. J. Chromatogr. A, Netherlands, v.994, p.45-57, 2003.
- DAWSON, R.M. The toxicology of microcystin. **Toxicon**, England, v.36, p.953-962, 1997.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, T.K.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. Environ. Toxicol., United States, v.14, p.31-35, 1999.
- ELDER, G.H.; HUNTER, P.R.; COOD, G.A. Hazardous freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Lancet, England, v.341, p.1519-1520, 1993.

- ESPINDOLA, N.M; VAZ, A.J.; PARDINI, A.X.; FERNANDES, I. Excretory/Secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps cysticerci*, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neorocysticercosis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Cuba, v.96, iss.4, p.361-368, 2002.
- FASTNER, J.; CODD, G.A.; METCALF, J.S.; WOITKE, P.; WIEDNER, C.; UTKILEN,
  H. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. Anal. Bioanal.
  Chem., Germany, v.374, iss.3, p.437-444, 2002.
- FERNANDES, I.F.; ESPÍNDOLA, N.M. Imunodiagnóstico: antígenos, anticorpos e interação antígeno-anticorpo. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.2, p.7-23.
- FISCHER, W.J.; GARTHWAITE, I.; MILES, C.O.; ROSS, K.M.; AGGEN, J.B.; CHAMBERLAIN, A.R.; TOWERS, N.R.; DIETRICH, D.R. A congenerindependent immunoassay for microcystins. Environ. Sci. Technol., United States, v.35, p.4849-4856, 2001.
- GAMVRELLIS, A.; LEONG, D.; HANLEY, J.C.; XIANG, S.D.; MOTTRAM, P.;
  PLEBANSKI, M. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells.
  Immunol. Cell. Biol., Australia, v.82, iss.5, p.506-516, 2004.
- GEFTER, M.L.; MARGULIES, D.H.; SCHARFF, M.D. Simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. **Somatic cell Genetics**. England, v.3, iss.2, p.231-236, 1977.
- GIL, E.S.; KUBOTA, L.T.; YAMAMOTO, Y.I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. Quim. Nova, Brasil, v.22, p.874-881, 1999.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUSUKI, D.T., LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Teoria cromossômica da herança. In:\_\_\_\_. Introdução a genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap.3, p.52-84.

- GULLICK, W.J. Production of antisera to synthetic peptides. In: WALKER, J.M. **Basic Protein and Peptide Protocols**. 32.ed. New Jersey: Human Press, 1994. cap.41, p.389-400.
- HARADA, K.; OGAWA, K.; KIMURA, Y.; MURATA, H.; SUZUKI, M. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. **Chem. Res. Toxicol.**, United States, v.4, p. 535-540, 1991.
- HARLOW, E.; LANE, D. Monoclonal antibodies; Growing hybridomas. In:\_\_\_\_.
   Antibodies A Laboratory Manual. United States: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. cap.6 e 7, p.139-282.
- HERMANSKY, S.J.; CASEY, P.J.; STOHS, S.J. Cyclosporin A A chemoprotectant against microcystin-LR toxicity. **Toxicol. Lett.**, Ireland, v.54, p.279-285, 1990.
- HERMANSON, G.T. Functional targets; Zero-length cross-linkers. In:\_\_\_\_.
  Bioconjugate Techniques. New York: Academic Press, 1996. cap.1 e 3, p.3-136 e p.169-186.
- HROUZEK, P.; LUKESOVA, A.; SIMEK, M. Comparison of light and dark nitrogenase activity in selected soil cyanobacteria. **Folia Microbiol.**, Czech Republic, v.49, iss.4, p.435-440, 2004.
- HUMPAGE, A.R.; ROSITANO, J.; BRETAG, A.H.; BAKER, P.D.; NICHOLSON, B.C.; STEFFENSEN, A. Paralytic shellfish poisons from australian cyanobacterial blooms. Aust. J. Mar. Freshwat. Res., Australia, v.45, iss.5, p.761-771, 1994.
- ICH International Conference on Harmonisation. Disponível em:http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html . Acesso em: 05 dezembro 2008.

- INMETRO Instituto Nacional de Metrologia. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratorios/calibEnsaios.asp. Acesso em: 05 dezembro 2008.
- ITO, E; KONDO, F.; TERAO, K.; HARADA, K. Neoplasic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitonial injections of microcystin-LR. **Toxicon**, England, v.35, iss.9, p.1453-1457, 1997.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; NA, J.S.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.; ANTUNES, M.B.; DE MELO FILHO DA, L.T.M.; BARRETO, V.S.; AZEVEDO, S.M.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. N. Engl. J. Med., England, v.338, iss.13, p.873-878, 1998.
- KARNES, H.T.; MARCH, C. Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. J. Pharm. Biomed. Anal., England, v.9, iss.10-12, p.911-918, 1991.
- KOHLER, G. Derivation and diversification of monoclonal-antibodies. **Science**, United States, v.233, iss.4770, p.1281-1286, 1986.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificty. **Nature**. England, v.256, p.495-497, 1975.
- KOLBERG J, SLETTEN K. Monoclonal antibodies that recognize a common pneumococcal protein with similarities to streptococcal group A surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Infect. Immun., United States, v.64, iss.9, p.3544-3547, 1996.
- KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; COLEPÍCOLO, P.; PINTO, E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., United States, v.341, iss.1, p.273-277, 2006.

- KUJBIDA, P.; HATANAKA, E.; CAMPA, A.; CURI, R.; FARSKY, S.H.P.; PINTO, E. Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. **Toxicon**, England, v.51, p.1274-1280, 2008.
- LAMBERT, T.W.; HOLMES, C.F.B.; HRUDEY, S.E. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. **Water Res.**, England, v.30, p.1411-1422, 1996.
- LAU, Y-F; BROWN, R.L.; ARRIGHI, F.E. Induction of premature chromosome condensation in CHO cells fused with polyethylene glycol. **Exp. Cell Res.**, United States, v.110, iss.1, p.57-61, 1977.
- LI, C.; CHU, R.Y.; HSIEH, D.P.H. An enhanced LC-MS/MS method for microcystin-LR in lake water. **J. Mass Spectrom**., England, v.41, p.169-174, 2006.
- LIU, H.; GAZA-BULSECO, G.; CHUMSAE, C.; NEWBY-KEW, A. Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. **Biotechnol. Lett**., Netherlands, v.29, p.1611-1622, 2007.
- MAGGIO, B.; AHKONG, Q.F.; LUCY, J.A. Poly(ethylene glycol), surface-potential and cell-fusion. **Biochem. J.**, England, v.158, iss.3, p.647-&, 1976.
- MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D.B.; ROITT, I. Antibodies. In:\_\_\_\_. Imunology. London: Mosby Elsevier, 2006. cap.3, p.59-86.
- MARCÍAS-SILVA, M.; GARCÍA-SÁINZ, J.A. Inhibition of hormone-stimulated inusitol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Efects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin. **Toxicon**, England, v.32, p.105-112, 1994.

- MATHYS, W. & SURHOLT, B. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. **Int. J. Hyg. Environ. Health**., Germany, v. 207, iss.6, p.601-605, 2004.
- MAUL, G.G.; STEPLEWSKI, Z.; WEIBEL, J.; KOPROWSKI, H. Time sequence and morphological evaluations of cells fused by polyethylene-glycol 6000. In Vitro -Journal of the Tissue Culture Association, United States, v.12, iss.11, p.787-796, 1976.
- McDERMOTT, C.M.; FEOLA, R.; PLUDE, J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique. **Toxicon**, England, v.33, p.1433-1442, 1995.
- McKINNEY, M.M. & PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluids. **J. Immunol. Methods**, Netherlands, v.96, p.271-278, 1986.
- MHADHBI, H.; BEN-REJEB, S.; CL'EROUX, C.; MARTEL, A.; DELAHAUT, P. Generation and characterization of polyclonal antibodies against Microcystins-Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection. **Talanta**, England, v.70, p.225-235, 1998.
- MERILUOTO, J. Chromatography of microcystins. **Anal. Chim. Acta**, Netherlands, v.352, p.277-298, 1997.
- METCALF, J.S.; BELL, S.G.; CODD, G.A. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. **Water Res.**, England, v.34, iss.10, p.2761-2769, 2000b.

- METCALF, J.S.; HYENSTRAND, K.A.; CODD, B.; CODD, G.A. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. J. Appl. Microbiol., England, v.89, p.532-538, 2000a.
- MIKHAILOV, A.; BRASKÉN, A.H.; MERILUOTO, J.; SOROKINA, Y.; DIETRICH, D.; ERIKSSON, J.E. Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine. **Toxicon**, England, v.39, p.477-483, 2001.
- MILLER, A.E.C.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Quim. Nova, Brasil, v.2, p.287-292, 2006.
- MIYAKI, C.; PRAL, M.M.; GALLINA, N.M.F.; RIZZO, E. Micoplasma como contaminantes de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. Rev. Saúde Públ. de São Paulo, Brasil, v.23, iss.1, p.39-44, 1989.
- MOUNTFORT, D.O.; HOLLAND, P.; SPROSEN J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. **Toxicon**, England, v.45, p.199-206, 2005.
- MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cianobacterial hepatotoxins. **Aquat. Toxicol.**, Netherlands, v.78, p.382-397, 2006.
- NAGAJARA, N.V.; PALIWAL, J.K.; GUPTA, R.C. Choosing the calibration model in assay validation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, *England*, v.20, p.433-438, 1999.
- NASEEM, S.M.; MEREISH, K.A.; SOLOW, R.; HINES, H.B. Microcystin-induced activation of prostaglandin synthesis and phospholipids metabolism in rat hepatocytes. **Toxicol. Vitro**, England, v.5, p.341-345, 1991.

- NIBBELING, H.A.M.; KAHAMA, A.I.; VAN ZEYL, R.J.M.; DEELDER, A.M. Use of monoclonal antibodies prepared against *Schistosoma mansoni* hatching fluid antigens for demonstration of *Schistosoma haematobium* circulating egg antigens in urine. Am. J. Trop. Med. Hyg., United States, v.58, p.543-550, 1998.
- OBARA, Y.; CHAI, L.S.; WEINFELD, H.; SANDBERG, A.A. System for studying telophase to interphase progression in nonsynchronized cells telophase-like nucleus of fused interphase-metaphase cells. **J. Cell Biol.**, United States, v.59, iss.2, p.A248, 1973a.
- OBARA, Y.; YOSHIDA, H.; CHAI, L.S.; WEINFELD, H.; SANDBERG, A.A. Contrast between environmental pH dependencies of prophasing and nuclear membrane formation in interphase-metaphase cells. **J. Cell Biol.**, United States, v.58, iss.3, p.608-617, 1973b.
- POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.L.; BARRETO, V.T.S.; WARD, C.J.; PREISER, W.; POON, G.K.; NEILD, G.H.; CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. Lancet, England, v.352, p.21-26, 1998.
- PYO, D.; LEE, J.; CHOI, E. Enzime-Linked immunosorbent assay detection of microcystins using new monoclonal antibodies. J. Immunoass. Immunoch., United States, v.25, iss.3, p.227-239, 2004.
- PYO, D.; LEE, J.; CHOI, E. Trace analysis of microcystins in water using enzimelinked immunosorbent assay. Microchem J., Netherlands, v.80, p.165-169, 2005.
- Registro de patente FAPESP (BR/SP) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Universidade de São Paulo - USP (BR/SP). Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira, Mariana Cabral de Oliveira. Método e kit para a identificação de microcistinas *in situ* através do uso de marcadores moleculares. BR n. PI0400576-7, 03 novembro 2004, 22 junho 2004.

- Registro de patente European Patent Office. XUFANG LIANG, WEI YE, XIAOJIA CHEN, TAO LIU, YUN FU, WANQIN LIAO, LIN WANG, JINXIA DUAN, XU MA. Testing reagent kit containing freshwater fish microcystin-detoxifizyme gene. EUR n. CN 201183798 Y, 21 janeiro 2009.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, England, v.111, p.1-61, 1979.
- RUNNEGAR, M.T.C.; GERDES, R.G.; FALCONER, I.R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. **Toxicon**, England, v.29, p.43-51, 1991.
- SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.2, p.9-48.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.D.; SENNA, P.A.C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasil**. **Bot**., Brasil, v.27, iss.2, p.213-227, 2004.
- SCHNEIDERMAN, S.; FARBER, J.L.; BASERGA, R. Simple method for decreasing the toxicity of polyethylene-glycol in mammalian-cell hybridization. Somatic cell Genetics, England, v.5, iss.2, p.263-269, 1979.
- SHARON, J.; MORRISON, S.L.; KABAT, E.A. Formation of hybridoma clones in soft agarose - effect of ph and of medium. Somatic cell Genetics. England, v.6, iss.3, p.435-441, 1980.
- SHENG, J.; HE, M.; SHI, H.; QIAN, Y. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies. Anal. Chim. Acta, Netherlands, v.572, p.309-315, 2006.

- SHENG, J-W.; HE, M.; SHI, H.C. A highly specific immunoassay for microcystin-LR detection based on a monoclonal antibody. **Anal. Chim. Acta**, Netherlands, v.603, p.111-118, 2007.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAN, J. Toxic Cyanobacteria in Water - A guide to their public health consequences, monitoring and management. 4.ed. London: Spon Press, 2003. cap.3, p.41-111.
- SOUZA, R.C.R.; CARVALHO, L.R. Introdução; Cianotoxinas. In: SANT'ANNA, C.L.;
   AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; SOUZA, R.C.R. Identificação e contagem
   de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. 1.ed. Rio
   de Janeiro: Interciência, 2006. cap.1 e 3, p.1-4 e p.9-19.
- SVERCK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. **J. Environ. Eng. Sci.**, Canada, v.3, p.155-185, 2004.
- TEIXEIRA, M.G.L.C; COSTA, M.C.N., CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE,
  E. Gastroenteritis epidemic in the área of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil.
  Bulletin of PAHO, Argentina, v.27, iss.3, p.244-253, 1993.
- THOMPSON, W.L.; PACE, J.G. Substances that protect cultured hepatocytes from the toxic effects of microcistin-LR. **Toxicol. Vitro**, England, v.6, p.579-587, 1992.
- TSUJI, K.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; WATANABI, M.F.; SUZUKI, S.; NAKAZAWA,
  H.; SUZUKI, M.; UCHIDA, H.; HARADA, K. Stability of microcystins from cyanobactéria. II. Effect of UV light on decomposition and isomerization.
  Toxicon, England, v.33, p.1619-1631, 1995.
- TURNER, P.C.; GAMIE, A.J.; HULLINRAKE, K.; CODD, G.A. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. **Br. Med. J.**, England, v.300, p.1440-1441, 1990.

- UH, H.; HARTGERS, F.; YAZDANBAKHSH, M.; HOUWING-DUISTERMAAT, J.J. Evaluation of regression methods when immunological measurements are constrained by detection limits. **BMC Immunol.**, England, v.9, iss.59, p.1-10, 2008.
- VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algae: from aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. Quim. Nova, Brasil, v.27, p.139-145, 2004.
- VIENKEN, J.; ZIMMERMANN, U. Electric field-induced fusion electrohydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high-yield. **FEBS Lett.**, Netherlands, v.137, n.1, p.11-13, 1982.
- WOJCIESZYN, J.W.; SCHLEGEL, R.A.; WU, E.S.; JACOBSON, K.A. Diffusion of injected macromolecules within the cytoplasm of living cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences, United States, v.78, iss.7, p.4407-4410, 1981.
- YOUNG, F.M.; METCALF, J.S.; MERILUOTO, J.A.O.; SPOOF, L.; MORRISON, L.F.; CODD, G.A. Production of antibodies against microcystin-RR for the assessment of purified microcystins and cyanobacterial environmental samples. **Toxicon**, England, doi:10.1016/j.toxicon.2006.05.015.
- YU, F.; LIU, B.; CHOU, H.; CHU, F.S. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. J. Agric. Food Chem., United States, v.50, iss.15, p.4176-4182, 2002.
- ZECK, A.; WELLER, M.G.; BURSILL, D.; NIESSNER, R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. **Analyst**, England, v.126, p.2002-2007, 2001a.
- ZECK, A.; EIKENBERG, A.; WELLER, M.G.; NIESSNER, R. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. **Anal. Chim. Acta**, Netherlands, v.441, p.1-13, 2001b.

**APÊNDICE I: Complemento - Órgãos linfóides** 

となくのとなないの、ななななないないないないない

APÊNDICE II: Complemento - Resposta imune e interação peptídeo-anticorpo APÊNDICE III: Complemento - Fatores que influenciaram a padronização do ensaio ELISA indireto para avaliação da produção de anticorpos IgG anti-MCLR

# **APÊNDICE I: Complemento - Órgãos linfóides**

Para facilitar o reconhecimento, ativação de resposta imune específica com posterior eliminação de um antígeno, a maioria dos linfócitos e de outras células mononucleares está localizada e concentrada em órgãos anatomicamente definidos, que também são os locais para onde os antígenos são transportados. Só que esta compartimentalização não é fixa, pois muitos linfócitos além de recircularem há um intercâmbio constante entre tecido-corrente sanguínea.

Como esquematizado na **Figura 1** deste apêndice, os tecidos linfóides podem ser classificados em órgãos geradores/tecido linfóide primário (local onde os linfócitos expressam inicialmente os receptores para antígenos e atingem a maturidade fenotípica funcional) ou em órgãos periféricos/tecido linfóide secundário (local onde os linfócitos iniciam e desenvolvem as respostas aos antígenos estranhos). Nos órgãos geradores estão inclusos a medula óssea, de onde derivam todos os linfócitos, e o timo, onde as células-T amadurecem e se tornam funcionais. Já os tecidos linfóides periféricos incluem linfonodos, baço, tecidos linfóides associados às mucosas e o sistema imune cutâneo (ABBAS, 2000).

O timo é um órgão bilobulado, onde cada lóbulo consiste em um córtex externo e uma medula interna (onde são encontrados os corpúsculos de Hassal). O córtex é denso em linfócito T, ao contrário da medula, que é escassamente povoada por linfócitos. Os timócitos (linfócitos do timo) são linfócitos T em vários estágios de maturação. As células imaturas migram do córtex para a medula e ficam em contato com as células epiteliais, com os macrófagos e com as células dendríticas. No percurso para a medula, os timócitos começam a expressar receptores para antígenos e marcadores de superfície, que estão presentes nos linfócitos T periféricos maduros. Assim a medula contém na sua maior parte células T maduras, e somente células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, com função auxiliar e citolítica, que saem do timo e entram no sangue e nos tecidos linfóides periféricos.



Figura 1. Maturação dos linfócitos T e B antes de serem expostos à antígenos nos órgãos linfóides primários e secundários. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

#### Linfonodo

Em especial, os linfonodos são agregados nodulares de tecido linfóide situados ao longo dos canais linfáticos de todo o corpo. Os vasos linfáticos coletam líquidos e células dos espaços interticiais e retornam este fluido (linfa), via linfonodos para a corrente sanguínea. Assim, o sistema linfático proporciona um mecanismo de coleta de antígenos, e os linfonodos, que estão localizados estrategicamente ao longo dos vasos linfáticos, "apresentam" à linfa o material antigênico (MALE, 2006).

Cada linfonodo está envolvido por uma cápsula fibrosa com numerosos vasos linfáticos aferentes trazendo a linfa. Abaixo a esta cápsula estão presentes os folículos que podem ou não conter um centro germinativo, definidos com folículo primário e secundário, respectivamente. A **Figura 2** deste apêndice esquematiza morfologia de um linfonodo.

Contudo, na seqüência temos que a linfa entra por um vaso linfático aferente localizado no seio subcapsular, passa pelo córtex, depois pela medula e, finalmente sai por meio de um vaso linfático eferente único, localizado no hilo do linfonodo.



Figura 2. Morfologia esquemática do linfonodo. (Retirado do site: www.mfn.unipmn.it/~pons/index\_file/Page1257.htm)

Sob o ponto de vista celular, os folículos primários contêm uma grande quantidade de linfócitos B virgens maduros, ou seja, que aparentemente ainda não foram estimulados por um antígeno. A formação de centros germinativos é decorrente de uma resposta à estimulação antigênica, e é por isso que neste local se observa a proliferação de célula B, a seleção de célula B secretora de anticorpos de alta afinidade e a geração de célula B de memória. As células dendríticas foliculares, que residem nos centros germinativos, apresentam antígenos nas suas superfícies e funcionam para ativar seletivamente as células B, que se ligam com alta afinidade aos antígenos. Os plasmócitos completamente diferenciados desenvolvem-se fora dos centros germinativos e podem migrar para fora do linfonodo, indo para outros tecidos.

Já os linfócitos T estão localizados predominantemente entre os folículos e na profundidade do córtex. Para serem estimulados, os linfócitos T virgens penetram em cada linfonodo pela linfa, encontram com os antígenos que foram transportados para o nódulo pela linfa. Assim, os linfonodos são locais onde são iniciadas as respostas dos linfócitos T aos antígenos protéicos originados na linfa. A medula do linfonodo normalmente contém linfócitos dispersos, grande número de macrófagos e de células dendríticas e, nos linfonodos que drenam locais de imunização, contêm numerosos plasmócitos oriundos de canais linfáticos (ABBAS, 2000).

Os mecanismos responsáveis pelo seqüestro anatômico das diferentes classes de linfócitos em áreas distintas do linfonodo ainda não estão esclarecidos. A estrutura dos linfonodos não é fixa, mas se modifica com a exposição aos antígenos. Por exemplo, os centros germinativos se desenvolvem em uma semana depois da imunização e, em geral, regridem depois que o estímulo antigênico for eliminado (MALE, 2006).

#### Baço

O baço, outro tecido linfóide, é irrigado por uma única artéria esplênica que se divide em arteríolas, as quais são cercadas por bainhas linfóides periarteriolares, contendo centros germinativos. Essas bainhas linfóides são cercadas por linfócitos T e B (polpa branca) e macrófagos, células dendríticas, plasmócitos e hemácias (polpa vermelha). Antígenos e linfócitos entram no baço através de sinusóides vasculares. A ativação de linfócitos B é iniciada nas zonas marginais que são adjacentes aos linfócitos T auxiliares nas bainhas linfóides. Os linfócitos B, depois de ativados, migram para os centros germinativos ou para a polpa vermelha (**Figura 3** deste apêndice).

Essencialmente, a função do baço e suas respostas aos antígenos são muito semelhantes às dos linfonodos. A diferença consiste que o baço é o sítio principal das respostas imunes aos antígenos originários do sangue, enquanto que os linfonodos são envolvidos nas respostas aos antígenos conduzidos pela linfa. O baço é também um importante "filtro" para o sangue, ou seja, os macrófagos e sua polpa vermelha retiram do sangue as substâncias estranhas e indesejáveis juntamente com os eritrócitos senis, mesmo na ausência de imunidade específica (FERNANDES & ESPÍNDOLA, 2007).

Existem órgãos linfóides estrategicamente espalhados por todo o organismo, tanto em humanos como em animais. É o caso das Placas de Peyer no intestino, nas amígdalas, na faringe, nas mucosas, na pele, etc.



Figura 3. Destino do antígeno no Baço, enfatizando a seqüência de populações celulares que se ligam e apresentam antígenos aos linfócitos. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

#### APÊNDICE II: Complemento - Resposta imune e interação peptídeo-anticorpo

A essência da resposta imune adaptativa é a capacidade de um organismo reagir à presença de substâncias estranhas e produzir anticorpos ou LT sensibilizados capazes de interagir especificamente com estas substâncias e proteger o hospedeiro de uma invasão. Um *antígeno* ou *imunógeno* é o nome dado à substância que é capaz de induzir a este tipo de resposta imune e que também é capaz de interagir com células sensibilizadas e anticorpos que são gerados contra eles. Usualmente, os antígenos são macromoléculas que contém sítios antigênicos distintos ou epítopos que são reconhecidos e interagem com vários componentes do sistema imune. Eles podem existir como moléculas individuais compostas por substâncias orgânicas sintéticas, lipoproteínas, glicoproteínas, RNA, DNA, polissacarídeos, ou eles podem fazer parte da estrutura celular de fungos, bactérias, vírus ou parasitas (NIBBELING *et al.*, 1998).

Pequenas moléculas como os peptídeos curtos, no caso uma grande variedade de toxinas algais como as microcistinas, embora sejam capazes de interagir com produtos da resposta imune, freqüentemente não são capazes de induzir uma resposta imune (MIKHAILOV *et al.*, 2001). Esses haptenos são considerados antígenos incompletos, e, embora não sejam capazes de causar uma imunogenicidade por si só ou induzir a produção de anticorpos, eles podem se tornar imunogênicos através de seu acoplamento à uma proteína carreadora. Carreadores são antígenos de alto peso molecular que são capazes de induzir a formação de uma resposta imunológica quando administradas *in vivo*.

Em uma resposta imune induzida pelo sistema hapteno-carreador, o linfócito B pode atuar como uma célula APC (célula apresentadora de antígeno) (**Figura 1** deste apêndice). A partir daí, o complexo hapteno-carreador é endocitado e processado (fragmentado em peptídeos) pelo LB (1° sinal de ativação), e depois é apresentado ao LTh-2 (linfócito T helper 2), o qual secreta interleucinas (IL 4, 5, 6 e 10) e IFN $\gamma$  (interferon gama) (2° sinal de ativação) que resultarão na proliferação e diferenciação do LB em plasmócitos, onde estes produzem anticorpos contra o hapteno, contra o carreador e contra uma região comum entre hapteno-carreador (ABBAS, 2000).



Figura 1. Resposta imune induzida pelo sistema hapteno-carreador. Modelo esquemático do processamento do antígeno, ativação e proliferação do linfócito B e, produção de anticorpos específicos.

Em geral, no sistema hapteno-carreador, as células B produzem anticorpos que são específicos tanto para o hapteno como para o carreador, como foi dito anteriormente. Nestes casos, as células T vão apresentar domínios de ligação específicos no carreador, mas não vão reconhecer o hapteno sozinho. Como um mecanismo de sinergismo, tanto os linfócitos T quanto os linfócitos B cooperam para induzir a uma resposta hapteno específica. Mesmo depois que a resposta imune já tenha sido estabelecida, se doses reforços forem administradas somente com o peptídeo, anticorpos hapteno específicos serão produzidos a partir das células de memória formadas após imunização inicial (HERMANSON, 1996).

O sistema imune é um sistema muito mais complexo do que foi resumido aqui. Em vários exemplos citados, a resposta mediada por uma célula B usando um peptídeo (seja ele sintético ou não), nem sempre vai garantir uma imunidade protetora completa direcionada ao antígeno intacto. A resposta imune gerada a partir de um epítopo presente em um peptídeo inserido em uma partícula viral ou em uma célula bacteriana ou em uma proteína carreadora pode ser suficiente para gerar linfócitos B de memória. E nesses casos, acredita-se que a resposta mediada por um linfócito T citotóxico é mais um indicador importante da imunidade protetora. Peptídeos sintetizados para serem mais imunogênicos, ou seja, peptídeos contendo epítopos com sítios ligantes para reconhecimento de LB e LT é um dos maiores desafios da pesquisa na área de imunologia nos dias de hoje.

O conjugado peptídeo-proteína carreadora também é muito utilizado para produzir anticorpos monoclonais altamente específicos. Esses anticorpos obtidos freqüentemente são usados para investigar a estrutura e a interação entre proteínas. Em muitos casos, os haptenos usados para gerar esses monoclonais fazem parte de pequenos segmentos de moléculas que representam sítios antigênicos importantes na superfície de diversas proteínas. Monoclonais obtidos a partir de uma seqüência de peptídeos vão interagir em vias bem definidas com a proteína a qual lhe deu origem (HERMANSON, 1996).

A resposta imune humoral pode ser iniciada no baço (para antígenos que entram na corrente sanguínea), nos linfonodos (para antígenos que entram pela pelo ou outros epitélios) e tecidos linfóides da mucosa (para antígenos inalados ou ingeridos). As imunoglobulinas com função protetora permanecem na circulação enquanto os antígenos estiverem presentes.

Na resposta imune primária, são geradas células B de memória de longa duração. A resposta imune secundária é desencadeada quando o mesmo antígeno estimula as células B de memória, levando à proliferação mais rápida e a diferenciação e produção de quantidades de anticorpo específico maiores que na resposta imune primária (**Figura 2** deste apêndice).


Figura 2. Cinética da resposta imune humoral após primeiro e segundo contato com o antígeno. (il. color. adaptada do livro Imunologia Celular & Molecular. ABBAS, 2000)

## APÊNDICE III: Complemento - Fatores que influenciaram a padronização do ensaio ELISA indireto para avaliação da produção de anticorpos IgG anti-MCLR

Durante os experimentos alguns problemas foram encontrados, nos quais foram solucionados utilizando as técnicas, reagentes e informações disponíveis no momento. Entre elas estão:

(i) O controle positivo (anticorpo monoclonal anti-MCLR) disponível foi obtido através da conjugação da toxina MCLR à proteína carreadora cOVA (Ovoalbumina cationizado). Portanto, surgiu a dúvida se era possível padronizar um ensaio de ELISA indireto sensibilizando a placa com MCLR-cBSA. Por isso, foram realizadas algumas análises por ELISA indireto utilizando o anticorpo comercial (diluição 1:5000). Sensibilizamos poços com MCLR-cBSA, outros somente com o cBSA e outros somente com a toxina MCLR de interesse. No primeiro caso observou-se que este anticorpo comercial reconhece o conjugado MCLR-cBSA, cBSA isolado e a toxina MCLR, nesta ordem decrescente. Logo o anticorpo comercial MC10E7 (Alexis<sup>®</sup>, BioAgency, Brasil) não poderia ser utilizado como controle positivo, em decorrência da reatividade inespecífica ao cBSA. Por outro lado, ficou confirmado que a toxina sozinha pode ser adsorvida à placa Corning<sup>®</sup> high binding (EUA), pois foi observada uma leitura do poço sensibilizado com MCLR somente.

(ii) Outro problema foi que, inicialmente a proteína carreadora *mc*KLH estava indisponível para realizar a conjugação. Portanto, grupos de animais foram imunizados utilizando diferentes vias e antígenos, entre eles utilizando MCLR-cBSA. E, como a realização de uma triagem dos soros por ELISA sensibilizada com BSA, não poderia ser feita, o ensaio da cinética foi elaborado sensibilizando placas somente com a toxina MCLR. Só que ao utilizar soro de camundongo diluído (1:200), como era observado um relativo "excesso" de anticorpo, a detecção de anticorpo anti-MCLR de animais imunizados foi observada, pois diferentes diluições de soro desses animais foram trabalhadas, diluindo ou concentrando as amostras. Várias fusões foram realizadas na tentativa de obter anticorpos monoclonais, mas a detecção da presença de clones secretores de anticorpos de interesse estariam com

poucas células, sendo então insuficientes para secretar quantidades necessárias para serem detectados pelo método de ELISA padronizado, mesmo trabalhando com o sistema Avidina-Biotina.

(iii) Outro grande problema foi que, após imunizações com antígeno contendo BSA, foi necessário trabalhar com uma solução de bloqueio que não contivesse essa proteína. Por isso, realizou-se vários testes com diversas soluções de bloqueio, entre elas a gelatina (oriunda de cartilagem bovina), leite desnatado (Molico, Nestle<sup>®</sup>, Brasil) e caseína. Exceto a caseína, todos os outros apresentam BSA em sua formulação, sendo, portanto excluídos da padronização por ELISA em animais imunizados com antígeno que contivesse BSA na emulsão. Existe também a gelatina de peixe, mas não estava disponível no momento.

(iv) Ao serem realizadas imunizações de animais com MCLR-BSA (BSA cationizado ou não), para a triagem da cinética de produção de IgG, placas de ELISA foram sensibilizadas com MCLR-*mc*KLH, mas praticamente nenhuma reatividade foi observada. Apesar de ser um excelente imunógeno, neste experimento, o KLH não se mostrou um bom antígeno de sensibilização, talvez por alguma mudança conformacional em sua estrutura na presença do tampão de sensibilização, ou então, pela insuficiente produção de anticorpos IgG.

## 9.0 ANEXOS

ANEXO I: Portaria 518/2004 - Ministério da Saúde ANEXO II: Pedido de Patente ANEXO III: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal ANEXO IV: Análise de micoplasma em cinco clones secretores de anticorpos monoclonais anti-MCLR ANEXO V: Curriculum Vitae ANEXO VI: Trabalho originado no período

よれ、 いんなか、 ビット 茶 サギムない 茶

ANEXO I: Portaria 518/2004 - Ministério da Saúde

**ANEXO II: Pedido de Patente** 

## ANEXO III: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



ANEXO IV: Análise de micoplasma em cinco clones secretores de anticorpos monoclonais anti-MCLR

となるとなから、サイキャンチのキャンチンのキャンキャンキャンキャンキャンキャン

**ANEXO V: Curriculum vitae** 

ANEXO VI: Trabalho originado no período

