

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

**Desenvolvimento de técnicas de imunoenensaio para a detecção  
de microcistina em amostras ambientais**

Aluna: Fabyana Maria dos Anjos

Tese apresentada ao programa de pós-  
graduação 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  
A599d Desenvolvimento de técnicas de imunoensaio para detecção de  
microcistina em amostras ambientais / Fabyana Maria dos  
Anjos. -- São Paulo, 2009.  
225p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
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”



## DEDICATÓRIA

---

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 memoriam) que esteve presente nos meus últimos instantes em Goiânia, seu incentivo foi único.



## AGRADECIMENTOS

---

---

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 ter me apresentado ao meu futuro orientador em julho de 2005.

Ao aluno de mestrado do nosso grupo de pesquisa **Vinícius**, por ter auxiliado na validação do método imunoenzimático, resultados e interpretações.

À **Dra. Noeli 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 momentos 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.

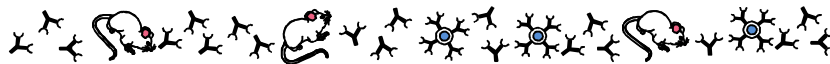
A todos aqueles que um dia hospedaram em minha casinha, **Dina, Vanessa, Nilton Lincopan, Nivia, Vania e Thomas**.

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!





---

---

## **Desenvolvimento de técnicas de imunoenensaio 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 policlonal (em coelho) anti-MCLR. Com relação ao anticorpo monoclonal foram obtidos 9 hibridomas ( $k_29$ ,  $k_210$ ,  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$ ,  $k_290$ ,  $k_2161$ ,  $k_2226$ ,  $k_2232$ ), sendo que apenas 5 se mostraram estáveis ( $k_29$ ,  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$ ,  $k_2232$ ). 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  $k_317$  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 policlonal, o antígeno de imunização foi MCLR-*mckLH*, enquanto que o antígeno de sensibilização foi MCLR-cBSA para o ensaio de titulação de anticorpos de classe IgG por ELISA indireto. Na seqüência, 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 policlonal 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 policlonal, ELISA.



## ABSTRACT

## 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 ( $k_29$ ,  $k_210$ ,  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$ ,  $k_290$ ,  $k_2161$ ,  $k_2226$ ,  $k_2232$ ) were obtained; however only 5 were stables ( $k_29$ ,  $k_317$ ,  $k_248$ ,  $k_284$ ,  $k_2232$ ). 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-secreting hybridomas, clone  $k_317$  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-*mc*KLH 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.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

