

“Anticorpos aviários como reagentes para o diagnóstico da intoxicação humana por organofosforados”

por

Beatriz Coutinho Brum

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

*Orientadora principal: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Cheble Bahia Braga
Segundo orientador: Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva*

Rio de Janeiro, agosto de 2010.

*Dedico essa dissertação de mestrado aos meus pais,
irmã e ao meu namorado Daniel, por todo apoio, amor
e por estarem sempre ao meu lado nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me transmitir fé, paciência, determinação em todas as realizações alcançadas nesta jornada.
- Agradeço, especialmente, aos meus pais, Nisio e Mima, por todo apoio, carinho, amor que me transmitiram nesta etapa profissional e também na minha vida pessoal. Obrigada por serem meu porto seguro nestes momentos, por me incentivarem a melhorar sempre.
- À minha querida irmã Mariana, por ser minha amiga e por todo seu apoio. E agradeço também ao meu cunhado, por todo seu incentivo, compreensão e seu bom humor.
- Ao meu namorado Daniel por todo apoio, carinho e amor ao longo desses anos. Seu apoio foi fundamental para que eu concluísse esta etapa em minha vida.
- À minha orientadora Ana Braga, por toda dedicação, incentivo e amizade. Obrigada por ter me ensinado muitas coisas durante este período que passamos juntas.
- Ao meu co-orientador Valmir que ao lado de sua grande competência técnica, seu apoio e confiança no meu trabalho foram imprescindíveis. Serei sempre grata por esta grande ajuda.
- Ao Moacélio por todo suporte, ensinamentos, compreensão e amizade a mim ofertada durante todas as etapas desta jornada. Muito Obrigada.
- Ao Prof. Jefferson por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este estudo, além da amizade e aos ensinamentos.
- Às minhas amigas Fernanda, Tatyane e Juliana por todos os momentos de alegria, apoio e amizade que passamos juntas.
- Ao pessoal do CESTEJ, principalmente, Paula, Sérgio, Rita, Simone, Alan, Arthur, Carla, Mário e Lucineide;
- Ao pessoal da turma do mestrado, em particular Débora, Daniele Rocha, Daniel, Deise e Igor por poder sempre contar com vocês para rir, chorar, tirar dúvidas, etc.
- A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

Os agrotóxicos são substâncias usadas para exterminar pragas ou doenças que causam danos às plantações. Os organofosforados são agrotóxicos responsáveis por 70% das intoxicações ocupacionais e atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase por meio da fosforilação do aminoácido serina do sítio ativo. Existem diversos métodos de diagnóstico para monitorar a exposição a estes compostos, tais como: identificação e análise quantitativa de compostos livres no plasma; identificação e análise quantitativa de metabólitos na urina; determinação da atividade de colinesterases no plasma ou no sangue total. Entretanto, estas metodologias possuem algumas limitações, como por exemplo, a falta de especificidade, tecnologias de análise caras e variações interindividuais (sexo, idade, etc.). Uma tentativa de contornar estas limitações na quantificação da atividade de colinesterases é o desenvolvimento de metodologias baseadas na detecção da enzima fosforilada através de técnicas imunológicas. Este estudo teve como objetivo desenvolver um método de imunoenensaio para o diagnóstico rápido da exposição humana aos organofosforados pela detecção de acetilcolinesterase inibida no sangue humano por anticorpos aviários produzidos contra uma sequência de aminoácidos ao redor da serina fosforilada do centro catalítico da enzima. Para isto, foram adquiridos dois decapeptídeos sintéticos correspondentes ao sítio catalítico "não fosforilado" (SOH) e outro com o resíduo de serina fosforilado (SOP). Estes peptídeos foram conjugados com albumina bovina de soro (BSA), injetados em galinhas poedeiras da raça Isa-Brown e anticorpos IgY foram obtidas das gemas dos ovos das galinhas imunizadas. A especificidade dos anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP foi testada por meio de métodos ELISA constatando-se que estes anticorpos reconhecem os peptídeos livres, os peptídeos conjugados com BSA e a própria BSA. Além disso, ocorreu uma significativa reação cruzada, ou seja, os anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP não conseguiram diferenciar os peptídeo SOH e SOP. Estes resultados não permitem a indicação destes anticorpos para o desenvolvimento de métodos para diagnóstico de intoxicação.

Palavras chave: Inseticidas Organofosforados; Acetilcolinesterase; IgY aviária; Imunoensaio;

ABSTRACT

Pesticides are chemical substances used to control plagues and diseases in plantations. Organophosphates are the pesticides involved in 70% of the occupational intoxications and act inhibiting the enzyme acetylcholinesterase by phosphorylation of the serine residue of catalytic centre. There are several methods for monitoring the exposition to these compounds, as so: identification and assay the free compounds into plasma; identification and assay metabolites into urine; cholinesterases assay into plasma or blood. However, these methods have some limitations, as for example lack of specificity, expensive analytical technologies and inter-individual variety (sex, age, etc.). One way to outline these limitations on cholinesterase assay is the development of methods based on phospho-enzyme detection by immunochemical techniques. This study have had the objective to developing an immuno-assay method for rapid diagnosis of human exposition to organophosphorus compounds by immuno-detection of inhibited acetylcholinesterase using aviary antibodies produced against a peptide sequence of the catalytic centre around phospho-serine residue. Two synthetic decapeptides were bought: one with the sequence of "not-phosphorylated" catalytic centre (SOH) and another with a serine-phosphorylated residue. These peptides were conjugated with bovine serum albumin (BSA), injected into Isa-Brown hens and antibodies IgY were isolated from egg yolk of immunized hens. The specificity of IgY anti-SOH and anti-SOP was tested using ELISA methods showing that these antibodies recognize free peptides, conjugated peptides and BSA. In addition, there was a significant cross reaction, or in other words, the antibodies IgY anti-SOH and anti-SOP failed on differentiate the peptide SOH and SOP. These results do not allow the indication of these antibodies for developing methods for intoxication diagnosis.

Keywords: Insectides Organophosphates; Acetylcholinesterase; avian IgY; Immunoassay.

SUMÁRIO

1	Introdução	Erro! Indicador não definido.
2	Revisão da literatura.....	5
2.1	Características dos inseticidas organofosforados	6
2.2	Acetilcolinesterase.....	6
2.3	Mecanismo de ação dos organofosforados	8
2.4	Avaliação da exposição aos agrotóxicos: Monitoramento Biológico	9
2.5	Anticorpos.....	11
2.5.1	Imunoglobulina Y.....	11
2.6	Imunoensaios.....	13
2.6.1	Imunoensaios aplicados à organofosforados	14
3	Objetivos	15
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	Material e Métodos	16
4.1	Material.....	16
4.1.1	Peptídeos sintéticos	16
4.1.2	Animais.....	16
4.1.3	Doadores humanos	17
4.1.4	Reagentes	17
4.2	Métodos.....	18
4.2.1	Conjugação dos peptídeos SOH e SOP com albumina bovina.....	18
4.2.2	Obtenção da imunoglobulina Y (IgY) anti-SOH e anti-SOP	18
4.2.3	SDS-PAGE.....	19
4.2.4	ELISA indireto	20
4.2.5	Desnaturação da acetilcolinesterase eritrocitária não inibida	21
4.2.6	Hemaglutinação	21
4.2.7	Determinação de proteínas totais	22
4.2.8	Análise dos Resultados	22
5	Resultados.....	23
6	Discussão	32
7	Conclusões	38
8	Referências Bibliográficas	39
9	Anexos	44
9.1	Anexo 1:	44
9.2	Anexo 2.....	45
9.3	Anexo 3.....	47

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 - Hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela ação da enzima AChE. ...	7
Figura 2 - Sítio ativo da enzima AChE	7
Figura 3 - Reação de inibição da AChE. En-OH: enzima acetilcolinesterase.....	8
Figura 4 - Comparação estrutural entre IgG(PM:160kDa) e IgY(PM:~180kDa).	12
Figura 5 - SDS-PAGE dos peptídeos SOH e SOP conjugados à BSA	25
Figura 6 - SDS-PAGE das IgY anti-SOH e anti-SOP	26
Figura 7 - SDS-PAGE de IgY anti-SOP repurificada com Sulfato de amônio.....	27
Figura 8 – Especificidade dos anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP frente à SOH, SOP, SOH-BSA, SOP-BSA e BSA.	28
Figura 9 - Titulação pareada das IgY anti-SOH e anti-SOP com SOH-BSA e SOP- BSA	29
Figura 10 - Titulação pareada das IgY anti-SOH e anti-SOP com SOH e SOP ...	30
Figura 11 - Demonstração da ausência de hemólise após tratamento com DTT ..	30
Tabela 1 - Hemaglutinação das IgYs anti-SOH e anti-SOP em placa de microdiluição de fundo cônico	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE - acetilcolinesterase
Ala - alanina
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BChE- butirilcolinesterase
BSA - albumina de soro bovino
DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DEP - dietilfosfato
DEPDT - o,o-dietilfosforoditioato
DEPT - o,o-dietilfosforotioato
DMP - dimetilfosfato
DMPDT - o,o-dimetilfosforoditioato
DMPT - o,o-dimetilfosforotioato
EDPC - hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
GC-MS - cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa
Glu - ácido glutâmico
Gly - glicina
IgA - imunoglobulina A
IgD - imunoglobulina D
IgE - imunoglobulina E
IgG - imunoglobulina G
IgM -imunoglobulina M
IgY - imunoglobulina Y
OMS - organização mundial de saúde
OPD - o-fenilenodiamina
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PEG - polietilenoglicol
SDS - lauril sulfato de sódio
Ser - serina
TEMED - N,N,N',N' – tetrametiletlenodiamina
Tris base - Tris-(hidroximetil)-amino-metano
WHO - World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

Este projeto pretendeu desenvolver um método de imunoensaio para a avaliação da exposição aguda aos organofosforados (OP). No presente estudo foi avaliada a detecção da acetilcolinesterase (AChE) eritrocitária inibida por meio da hemaglutinação direta com anticorpos policlonais aviários.

O século XX caracterizou-se, entre outros aspectos, por intenso e contínuo processo de mudanças tecnológicas e organizacionais que atingiram o mundo da produção acarretando grandes transformações nas formas, nos processos e nas relações de trabalho. A agricultura, que por séculos foi o meio de subsistência dos trabalhadores rurais, converteu-se numa atividade orientada para a produção comercial.

Historicamente, a evolução da utilização dos agrotóxicos foi demarcada por dois períodos distintos, separados entre si pela Segunda Guerra Mundial. No período anterior utilizavam-se compostos inorgânicos e extratos vegetais para o controle de pragas, tais como a nicotina e a rotenona. O segundo período foi marcado pela descoberta das propriedades inseticidas do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), pertencente à classe dos inseticidas organoclorados, que são caracterizados por sua alta estabilidade no meio ambiente e seu potencial inseticida, tornando o DDT amplamente utilizado (Larini, 1999). Entretanto, tais características físico-químicas, associadas à sua lipossolubilidade e capacidade de acumular-se nas células gordurosas, conduzem à biomagnificação e à bioacumulação do DDT nos organismos vivos e nas cadeias alimentares. Este fenômeno gerou graves problemas ambientais e para a saúde, o que levou à proibição desta classe para uso agrícola, exceto para campanhas de saúde pública no combate a vetores como o da malária. Esta proibição deste agente químico levou um aumento do uso de outros pesticidas (SINDAG, 2008).

Na década de 60, o processo de alterações tecnológicas da agricultura, levando à modernização desta atividade através da mecanização, substituiu a mão-de-obra pelas máquinas e também pela introdução dos agrotóxicos no campo. Este processo foi conhecido como “Revolução Verde” (Abramoyay, 1992; OIT, 2001).

No Brasil, a Revolução Verde foi responsável pela introdução de profundas mudanças nos processos agrícolas com grandes impactos sobre o meio ambiente, gerados pela utilização de produtos químicos devido ao aumento da produção agrícola; instalações de indústrias produtoras e formuladoras de agrotóxicos; e estímulo do governo, através do crédito rural, para o consumo de agrotóxicos e fertilizantes (Meirelles, 1996; Alves & Oliveira-Silva, 2003).

Entretanto, esta revolução gerou um grande número de intoxicações humanas por agrotóxicos, devido ao fato da população rural estar despreparada, ou seja, sem nenhum treinamento apropriado para manipulação destes agentes, sendo exposta a um grande número de substâncias potencialmente tóxicas além da ampla degradação ambiental gerada pelo uso descontrolado (Oliveira-Silva & MEYER, 2003). A utilização destes agentes químicos teve, como consequência, grandes impactos na saúde e no meio ambiente.

Dentre os impactos ao meio ambiente, a contaminação de coleções de águas superficiais e subterrâneas acaba servindo como transportadora destes contaminantes para outras localidades, tornando-se também motivo de preocupação.

Os efeitos na saúde humana causados pelos agrotóxicos podem ser de dois tipos: agudos e crônicos. Os efeitos agudos ocorrem depois da exposição a concentrações de agentes tóxicos capazes de causarem danos em um período de 24 horas. Tais efeitos são facilmente observáveis, tais como convulsões, náuseas, vômitos, dificuldade respiratória e espasmos musculares (OPS, 1996). Os efeitos crônicos são gerados a partir de exposição continuada a doses relativamente baixas do agente, podendo apresentar sintomas em semanas ou meses após a exposição. Efeitos neurotóxicos, alterações cromossomiais, lesões renais, lesões hepáticas, cânceres e efeitos reprodutivos são efeitos crônicos observados após exposição a baixas doses (OPS, 1996).

O Brasil é responsável por 50% dos agrotóxicos utilizados na América Latina, o que envolveu um comércio de cerca de 6,3 bilhões de dólares em 2007 (ABIQUIM, 2009). Ocupa ainda o segundo lugar no ranking mundial como consumidor de agrotóxicos (Kleffmann, 2009), sendo a Região Sudeste

responsável por 40% de todo o consumo no país, seguindo-se as regiões Sul e Centro-Oeste (Peres & Moreira, 2003).

Cerca de três milhões de pessoas são contaminadas por agrotóxicos no mundo, sendo 70% em países em desenvolvimento. Estes países são responsáveis por 20% do uso de agrotóxicos (WHO, 1985). No Brasil, o órgão responsável pelos registros de intoxicações é o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), que também fornece informações toxicológicas e farmacológicas sobre medicamentos e agentes tóxicos existentes em nosso meio. No ano de 2000, este órgão registrou 5.127 casos de intoxicação em geral, com 141 óbitos (SINITOX, 2003). Em 2006, dos 6.588 casos de intoxicações atribuídos à circunstância ocupacional, 1.874 (28,4%) das intoxicações foram atribuídas aos agrotóxicos de uso agrícola (SINITOX, 2006).

Existem diversas metodologias para o diagnóstico da exposição a agrotóxicos. Para a classe dos organofosforados, um dos métodos atualmente utilizado consiste na determinação da atividade da AChE. Esta avaliação é interpretada a partir do percentual de inibição da atividade dessa enzima. Entretanto, existem limitações como a ausência de valores de referência de normalidade padronizados para a atividade enzimática, a não especificidade do método por ter outros agentes ou variáveis que tem influência nesta atividade, além da variabilidade inter e intraindividual (Worek *et al.*, 2005).

As limitações existentes nas metodologias empregadas no monitoramento biológico da exposição aos organofosforados dificultam o diagnóstico e, por consequência, a terapêutica. Metodologias alternativas estão sendo estudadas para este fim, tais como os imunoenaios, que são técnicas de fácil aplicação e de baixo custo.

É neste contexto que este estudo se insere: O desenvolvimento de uma metodologia que supra as limitações dos métodos aplicados atualmente para o diagnóstico da intoxicação por inibidores de acetilcolinesterase, que seja rápido, de baixo custo e com a possibilidade de execução em campo. O método alternativo desenvolvido neste estudo utiliza anticorpos policlonais aviários, do tipo IgY, produzido a partir de gemas de galinhas poedeiras que estão sendo usados em

substituição aos anticorpos produzidos em mamíferos e roedores. Esta substituição tem sido indicada por promover o bem estar animal e por garantir uma produção constante durante toda a vida útil da ave.

Apesar da existência de alguns imunoenaios para a avaliação da exposição à organofosforados, o presente trabalho diferencia-se dos demais pelas seguintes razões: (1) o animal utilizado para a obtenção dos anticorpos foi a galinha, que é produtora do anticorpo IgY nas suas gemas; (2) o uso de hemaglutinação direta em lâmina é um método de revelação simples que pode ser usado em situações de emergência.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os agrotóxicos são definidos pela FAO como "qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais causadoras de danos durante (ou interferindo na) produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeiras e derivados ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação" (FAO, 2003).

Estes compostos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade de uso. O primeiro tipo é através de seu grupo químico como os organoclorados, carbamatos, piretróides, organofosforados, dentre outros. Também, de acordo com a sua toxicodinâmica, (anticoagulantes, anticolinérgicos, dentre outros), a ação sobre a espécie alvo (inseticidas, fungicidas, herbicidas, dentre outros.) (Hogstedt, 1992; Fengsheng, 1993)9,10. Outra classificação, que é estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), separa os agrotóxicos em quatro categorias: extremamente perigosos (classe Ia), altamente perigosos (classe Ib), moderadamente perigosos (classe II) e levemente perigosos (classe III). Este sistema é reforçado por uma simbologia cromática (vermelho, amarelo, verde e azul) (WHO, 1996; OLIVEIRA-SILVA, 2000).

Os agrotóxicos da classe dos organofosforados surgiram inicialmente com intuítos bélicos durante a Segunda Guerra Mundial. Estas substâncias foram desenvolvidas na Alemanha por Gerhard Schrader e ficaram conhecidas como "gases dos nervos" (Larini, 1999). Após à guerra foram feitas modificações nas moléculas a fim de reduzir sua toxicidade para que pudessem ter outros tipo de uso. Atualmente são utilizados na agricultura, em ambientes domésticos como inseticidas e para o controle de vetores (Moraes, 1981).

Representando 70% dos casos de intoxicações por exposição ocupacional (Garcia, 2001), os organofosforados são os agrotóxicos mais utilizados devido ao

seu baixo custo, sua baixa estabilidade no ambiente e sua alta efetividade contra diferentes espécies de insetos (Worek *et al.*, 2005).

2.1 Características dos inseticidas organofosforados

Devido à alta lipossolubilidade, os organofosforados são absorvidos pelo organismo humano através da pele, da via respiratória, do trato gastrointestinal e das mucosas (Costa, 2007). A principal via de exposição ocupacional é a via dérmica e a via respiratória. A exposição por via dérmica ocorre quando indivíduos aplicam agrotóxicos organofosforados através de pulverização. Devido ao clima quente do Brasil, a absorção por via dérmica é aumentada. A exposição por via respiratória ocorre na atividade de formulação ou por aerossóis. Após a absorção, são distribuídos no organismo concentrando-se especialmente nos tecidos adiposos, fígado, rins, glândulas salivares, tireóide, pâncreas, pulmões e paredes do intestino e estômago e em menor proporção no sistema nervoso central e músculos (Larini, 1999).

No organismo humano sofrem rápida metabolização e geram metabólitos hidrossolúveis. O processo para formação destes metabólitos envolve vários tipos de reações como hidrólises, oxidações e conjugações. A substituição do átomo de enxofre pelo átomo de oxigênio, processo conhecido como dessulfuração oxidativa, faz com que estes compostos se tornem toxicologicamente ativos. A principal via de eliminação é a urina, e em pequenas proporções as fezes, durante as primeiras 48 horas após a exposição (Larini, 1999).

2.2 Acetilcolinesterase

A AChE pertence à família das esterases e é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina presente nas fendas sinápticas nervosas e na placa motora. A AChE também é encontrada na membrana externa dos eritrócitos (Fukuto, 1990; Taylor, 1991; Lotti, 1995; Marrs, 2007). Esta degradação forma dois produtos: a colina e o ácido acético (Figura 1). A acetilcolina é responsável pelos impulsos nervosos nas junções colinérgicas sinápticas e neuromusculares. O sítio ativo da AChE consiste de dois domínios: o domínio esterásico e o domínio aniônico como ilustra a Figura 2 (Marrs, 2007). A acetilcolina é levada ao sítio

ativo da enzima por atração eletrostática através de um canal hidrofóbico. No sítio ativo ocorre a acetilação do aminoácido serina do sítio esterásico resultando em uma enzima acetilada. Esta é a etapa que depende da enzima já que em seguida ocorre uma desacetilação espontânea liberando a enzima para um novo ciclo (Fukuto, 1990). Além desta enzima, outra esterase da mesma família, a butirilcolinesterase (BChE), também conhecida como colinesterase do plasma ou pseudocolinesterase, também pode agir sobre acetilcolina. Entretanto, a função fisiológica desta enzima no homem permanece ainda desconhecida (Giacobini, 2001).

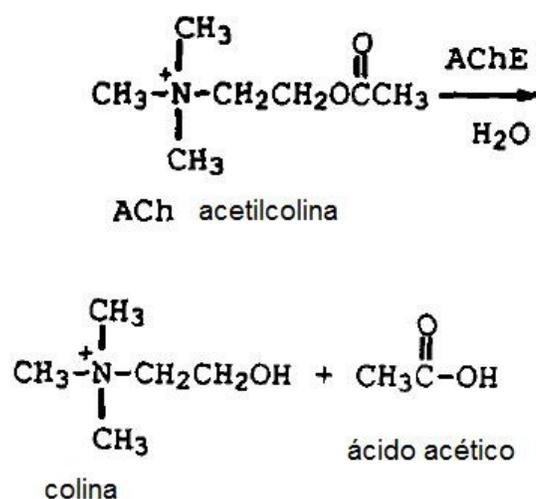


Figura 1 - Hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela ação da enzima AChE. (adaptado de Fukuto, 1990).

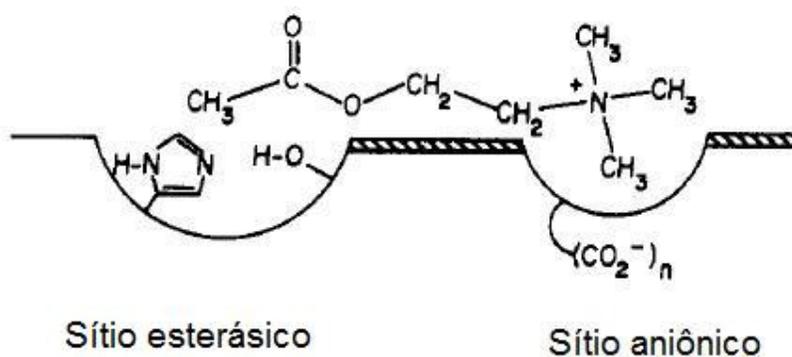


Figura 2 - Sítio ativo da enzima AChE (adaptado de Quinn, 1987).

reflexos pupilares, secreção bronquiolar excessiva, estertor, dificuldade respiratória e cianose (Aprea *et al.*, 2002).

Considerando que o principal mecanismo de ação dos organofosforados é a inibição da acetilcolinesterase, e que sua ampla utilização gera impactos na saúde humana e no meio ambiente, é necessário que se faça um biomonitoramento, ou seja, um diagnóstico do tipo de exposição para que seja feito um tratamento adequado.

2.4 Avaliação da exposição aos agrotóxicos: Monitoramento Biológico

O monitoramento biológico é definido como a avaliação das exposições a substâncias tóxicas, ou metabólitos, em tecidos, fluidos, secreções, excreções, dentre outros (Pivetta *et al.*, 2001). Este tipo de procedimento pode ser efetuado por meio de três tipos de indicadores biológicos: a) o indicador de dose interna, que tem a capacidade de determinar a quantidade da substância química e/ou metabólitos presentes em amostras biológicas, como, sangue, urina ou tecidos; b) o indicador de efeito, que se baseia nas alterações bioquímicas, isto é, avaliam as conseqüências da exposição e não o agente causal; c) e o indicador de dose efetiva, que detecta o produto formado pela ligação do agente químico, ou de seus metabólitos, com receptores celulares (Aprea *et al.*, 2002). A avaliação da exposição deve estar baseada no histórico da exposição, na avaliação clínica e no diagnóstico laboratorial.

Existem diversos métodos de diagnóstico utilizados para medir a exposição aos organofosforados: a identificação e análise quantitativa de compostos livres no plasma; a identificação e análise quantitativa de metabólitos na urina; e a determinação da atividade das colinesterases no plasma ou no sangue total (Worek *et al.*, 2005).

A determinação dos organofosforados não metabolizados pode ser feita por cromatografia seguida de espectrometria de massa, tanto no sangue como na urina, no conteúdo gástrico e, em casos fatais, no sistema nervoso central para confirmação da intoxicação (Aprea *et al.*, 2002). Entretanto, esta abordagem tem limitações devido à curta meia vida destes compostos que só podem ser detectados até poucas horas após a exposição (Worek *et al.*, 2005).

A maioria dos organofosforados, ao serem metabolizados, produz metabólitos alquilfosfatos que são excretados na urina como sais de sódio e potássio, que também podem ser detectados por cromatografia. A identificação destes metabólitos na urina possui como vantagens a sensibilidade e a possibilidade de identificar exposições recentes e à baixas doses, além de ser um método não invasivo. Entretanto, é um método analiticamente mais exigente por necessitar de aparatos tecnológicos sofisticados e complexos. Outra desvantagem que limita este tipo de diagnóstico é a grande distância entre os laboratórios e o meio rural (Aprea *et al.*, 2002).

A determinação da atividade da enzima AChE é um método rápido, barato e conveniente que entretanto, possui diversas limitações. Uma limitação é não ser um método específico para organofosforados, já que existem outros inibidores da atividade enzimática da AChE, como os carbamatos. É um método que não é sensível para detectar exposições à doses médias e baixas (Worek *et al.*, 2005). Além disto, existem variações inter-individuais como sexo, idade e polimorfismos genéticos, dentre outros, que podem afetar a avaliação deste biomarcador no momento de estabelecer valores de referência de normalidade da atividade enzimática. Um exemplo desta metodologia é o KIT Lovibond, que é um método semi-quantitativo que expressa valores da atividade enzimática em sangue total e se baseia na mudança de pH pela liberação do ácido acético.

A atividade da enzima AChE eritrocitária é a mais utilizada para fazer o diagnóstico da exposição devido ao fato de ser a única que reflete a inibição nas sinapses, já que é a mesma enzima (Cocker *et al.*, 2002). A BChE serve apenas como bioindicador de exposição, mas não de toxicidade, enquanto que a AChE eritrocitária serve como bioindicador tanto de exposição como de efeito. A correlação entre a atividade da AChE eritrocitária e a da AChE no cérebro vai depender da farmacocinética do composto, da efetividade de cruzar a barreira hemato-encefálica e da janela de tempo entre a exposição e a medição da atividade (Lotti, 1995).

As abordagens metodológicas existentes para o diagnóstico da intoxicação por organofosforados possuem limitações que culminam na busca de alternativas que possam suprir estes impasses. Uma proposta metodológica seria a utilização

de imunoenaios. Os imunoenaios são testes analíticos que utilizam anticorpos para diversas finalidades.

2.5 Anticorpos

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são glicoproteínas de alto peso molecular e sua estrutura, em forma de Y, é composta por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas ligadas entre si por meio de pontes dissulfeto. O sítio determinante da ligação dos anticorpos com antígenos correspondentes encontra-se no topo da estrutura em Y e é denominado de fragmento Fab. A especificidade dos anticorpos é determinada pela sequência de aminoácidos encontrada no fragmento Fab. Em humanos, as imunoglobulinas são agrupadas em cinco classes de anticorpos: IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, determinadas pela sequência de aminoácidos da cadeia pesada e pela posição das pontes dissulfeto (Gil & Kubota, 1999).

2.5.1 Imunoglobulina Y

A imunoglobulina Y é encontrada em aves, répteis, anfíbios e provavelmente em peixes pulmonados, enquanto que a IgG é encontrada apenas em mamíferos (Warr *et al.*, 1995). Tanto a IgG e a IgY possuem duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As cadeias leves têm um domínio variável e um domínio constante, nas duas imunoglobulinas. O que varia entre as características destas imunoglobulinas é que a IgG possui um domínio variável e três domínios constantes em suas cadeias pesadas enquanto que a IgY possui um domínio variável e quatro domínios constantes em sua cadeia pesada. Além disto, o peso molecular da IgY é de aproximadamente 180kDa, enquanto que o peso molecular da IgG é de aproximadamente 160kDa, conforme descrito na Figura 4 (Araújo, 2007).

A imunoglobulina Y antes era chamada de IgG aviária por possuir uma grande semelhança com a IgG encontrada em mamíferos. Entretanto, Leslie e Clem (1969) mostraram haver grandes diferenças entre estas duas moléculas. Devido a isto, a imunoglobulina IgG aviária foi denominada de IgY (de *yolk*, gema em inglês), já que a nomenclatura da IgG já estava bem implementada. Estudos

realizados com a imunoglobulina Y indicam que esta proteína deu origem às imunoglobulinas de mamíferos IgG e IgE (Warr *et al.*, 1995).

Os principais anticorpos encontrados nas galinhas são: IgA, IgM e IgY. Os anticorpos IgA e IgM são muito semelhantes aos dos mamíferos. Os anticorpos IgA e IgM na galinha são transferidos para o ovo, em pequena quantidade, carregados pela albumina. Enquanto que o anticorpo IgY é transferido para a gema do ovo em quantidades comparáveis ao do soro (Schade *et al.*, 2001).

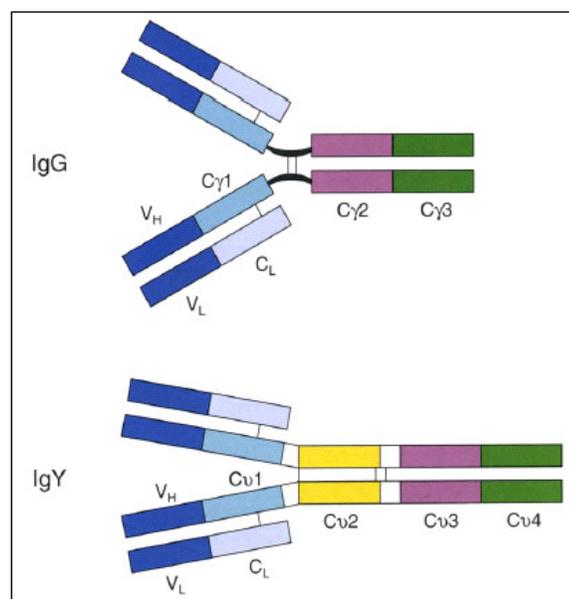


Figura 4 - Comparação estrutural entre IgG (PM: 160kDa) e IgY (PM: ~180kDa).
 V_H: domínio variável da cadeia pesada e V_L: domínio variável da cadeia leve; C_L: domínio constante da cadeia leve, C_γ1, C_γ2, C_γ3 e C_γ4: domínios constantes da cadeia pesada da IgY;
 C_γ1, C_γ2, C_γ3: domínios constantes da IgG. (Fonte: Warr *et al.*, 1995).

A substituição de mamíferos por aves (galinhas) para a produção de anticorpos policlonais é sugestiva por apresentarem inúmeras vantagens, tais como:

- Economicamente viável, pois o modo de criação das galinhas é considerado de baixo custo e simples (Araujo, 2007);
- Método não invasivo devido ao fato de que os anticorpos são transferidos para a gema, não havendo a necessidade de coletas de sangue ou eutanásia como ocorre com a utilização de coelhos. Em 1999, o *Office Vétérinaire Federal na Suíça e o European center for the validation of alternative methods* (ECVAM) aprovou a utilização de

galinhas para produção de anticorpos como um método alternativo para o bem estar do animal;

- Redução do número de animais utilizados, já que a quantidade de anticorpos que se obtém de uma só galinha é expressivamente maior que a produção de anticorpos em mamíferos (coelhos);
- Necessitam de uma pequena quantidade de antígeno para hiperimunização devido ao baixo peso corpóreo destes;
- A quantidade de anticorpos produzidos em uma só ave pode chegar a 20 a 40 g de IgY por ano (Schade *et al.*, 2005), chegando a ser de 5 a 10 vezes maior que a produtividade de IgG de um coelho;
- A produção de anticorpos por estes animais se mantém em altos níveis de anticorpos específicos por um longo período (Polson *et al.*, 1980);
- A atividade e estrutura das IgYs se mantém estável entre os pH 4 e 11 e em temperaturas até 60° C, segundo FAN e colaboradores (2009)

2.6 Imunoensaios

Os imunoensaios se baseiam na reação entre antígeno e anticorpo *in vitro* e podem ser utilizados para detectar ambos os componentes desta reação. São empregados anticorpos monoclonais ou policlonais. Os anticorpos policlonais são provenientes de diversos clones da célula B e a obtenção deste tipo de anticorpo é simples e de baixo custo (Kendall, 2006). Os anticorpos monoclonais são produzidos por linhagens segregadas e imortalizadas de linfócito B. Os anticorpos monoclonais são muito mais específicos que os policlonais, entretanto o uso de anticorpos policlonais se dá mais frequentemente quando se quer analisar uma classe de poluentes na sua totalidade (Gil & Kubota, 1999).

Os imunoensaios têm limitações em detectar a presença de antígenos quando estes têm um peso molecular relativamente baixo. Entretanto, esta limitação é solucionada quando se conjuga estes antígenos à proteínas carreadoras como a albumina (Gil & Kubota, 1999). Com relação à concentração de anticorpos obtidos em animais de produção, vai depender da natureza do antígeno e do sistema imune do animal de experimentação que irá produzi-los. Os animais que são geralmente utilizados para a produção de anticorpos são os ratos, camundongos e coelhos, animais adaptados às

condições laboratoriais. Para a obtenção de quantidades suficientes de anticorpos se faz necessária a eutanásia destes animais (Schade *et al.*, 2001).

2.6.1 Imunoensaios aplicados à organofosforados

Existem diversas propostas e estudos a respeito do biomonitoramento da exposição a organofosforados baseado em imunoensaios. Wang e colaboradores (2008) propõem um imunoensaio eletroquímico que detecta diretamente a AChE fosforilada. Outra proposta é um imunoensaio baseado na adsorção de zircônio aos grupos fosfóricos encontrados na enzima AChE inibida por organofosforados (Wang *et al.*, 2009).

Liu e colaboradores (2008) desenvolveram um imunossensor que pode detectar exposições à organofosforados usando óxido de zircônio (ZrO_2) como agente de reconhecimento do aduto de proteína fosforilada. Um anticorpo ligado a nanopartículas é responsável pela detecção eletroquímica do aduto de proteína.

George *et al.* em 2003 conseguiram obter anticorpos policlonais contra um peptídeo sintético conjugado à molécula carreadora *keyhole limpet hemocyanin* (KLH), peptídeo este, correspondente a região do sítio ativo da enzima AChE, que é inibida por organofosforados através da fosforilação do aminoácido serina deste sítio ativo (George *et al.*, 2003). Os autores conseguiram demonstrar que a simples fosforilação da serina presente nesta sequência já quebra o reconhecimento pelo anticorpo, indicando a possibilidade de produção de anticorpos que sejam capazes de reconhecer o tipo de aduto de proteína gerado pela inibição da AChE.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um método de imunoensaio com anticorpos aviários para a detecção da exposição a compostos organofosforados pela detecção de acetilcolinesterase inibida no sangue humano por hemaglutinação direta.

3.2 Objetivos específicos

- Obter anticorpos aviários IgY contra peptídeo sintéticos com sequências correspondentes ao sítio ativo da acetilcolinesterase humana normal (SOH) e fosforilada (SOP)
- Avaliar *in vitro* a atividade dos anticorpos anti-SOH e anti-SOP frente aos peptídeos correspondentes;
- Testar *in vitro* a especificidade dos anticorpos anti-SOH e SOP contra hemácias humanas íntegras através de hemaglutinação direta.

4 Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 *Peptídeos sintéticos*

Os peptídeos sintéticos correspondentes à região do sítio ativo da AChE humana, com o resíduo serina livre (SOH) e com esta serina fosforilada (SOP), foram adquiridos da empresa Peptides International. O peptídeo SOH (H-Thr-Leu-Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-Ala-Ala-OH) possui peso molecular de 0,923kDa e o peptídeo SOP (H-Thr-Leu-Phe-Gly-Glu-Ser[H₂PO₃]-Ala-Gly-Ala-Ala-OH) possui peso molecular de 1,003kDa.

4.1.2 *Animais*

Os animais utilizados para este projeto foram galinhas poedeiras da raça Isa-Brown, em fase inicial de postura, oriundas de uma granja situada em Campo Grande, no Rio de Janeiro, com idade entre 18-20 semanas. Foram utilizadas 4 galinhas para este estudo. Estas aves encontravam-se vacinadas contra as principais doenças aviárias e foram previamente selecionadas com um peso médio de 1,8kg e nível de postura de aproximadamente 5 ovos por semana. Durante o projeto as aves permaneceram na granja. Ao final da fase de postura as aves serão eutanasiadas por meio de deslocamento da coluna cervical. As carcaças serão descartadas na FIOCRUZ como resíduo biológico A4, segundo a resolução da ANVISA RDC No 306, de 7 de dezembro de 2004. De acordo com esta regulamentação, os resíduos biológicos gerados neste estudo serão dispostos formolizados em local devidamente licenciado para descarte final de resíduos de serviço de saúde. No caso deste projeto, os resíduos serão acondicionados em sacos brancos leitosos e descartados nas lixeiras da cor branca encontradas na ENSP, em hora e local combinados com o Escritório de Biossegurança. Após o seu descarte, será informado ao Escritório de Biossegurança a quantidade e peso dos resíduos que foram descartados. Com uma antecedência de 24 horas será emitido um documento de autorização para a entrada das carcaças na FIOCRUZ e a Comissão de Biossegurança da ENSP será comunicada da entrada deste resíduo

biológico na instituição. Estes procedimentos foram sugeridos pela Comissão de Ética no uso de animais sob o registro LW-22/09.

4.1.3 Doadores humanos

A enzima AChE eritrocitária humana foi obtida por meio de análise em amostras de sangue humano coletadas de 10 voluntários do Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) da Fundação Oswaldo Cruz, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 55 anos. O sangue foi coletado por meio de punção venosa com agulhas descartáveis em tubos vacutainer heparinizados. Foram coletados num volume total de 10mL em cada coleta (com previsão de três coletas ao longo de todo o projeto). As amostras biológicas foram utilizadas somente para o desenvolvimento deste imunoenensaio e descartadas posteriormente em caixas coletoras de materiais perfurocortantes. O critério de inclusão para a participação do projeto foi quem consentiu ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ser ambos os sexos, com idade entre 18 e 55 anos. E como critério de exclusão da pesquisa aqueles que não apresentaram faixa etária determinada. Número da licença do Comitê de Ética em Pesquisa: 108/09.

4.1.4 Reagentes

Etanol absoluto, ácido acético, Comassie blue, nitrato de prata, formaldeído, metanol, Tween 20, ácido clorídrico (HCl), glicose, cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH), solução de sulfato de cobre anidro, solução de tartarato de sódio e potássio, solução de carbonato de sódio, citrato de sódio, tris (hidroximetil) amino metano (Tris), sulfato dodecil de sódio (SDS) e ácido cítrico foram adquiridos de VETEC Co. Albumina bovina ultrapurificada, hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC), adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, polietilenoglicol 8000 (PEG), glicerol, tampão carbonato bicarbonato, tampão citrato de fosfato, ditietriol (DTT), anticorpo anti-IgY, folin e albumina bovina foram adquiridas de Sigma Aldrich Co. EDTA foi adquirido pela Invitrogen Co., a glicina pela Merck Co.. Conjugado anti-IgY ligado a peroxidase (HRP) e o-fenilenodiamina (OPD) foram adquiridos pela Promega Co. Ácido Sulfúrico foi comprado pela Proquímios Co.

4.2 Métodos

4.2.1 Conjugação dos peptídeos SOH e SOP com albumina bovina

Uma solução com 1,25mg de albumina bovina (BSA) ultrapurificada (Sigma Aldrich Co) dissolvida em 5mL de PBS (pH 7,2) teve seu pH elevado para 8,3 com hidróxido de sódio. Uma solução contendo 8mg dos peptídeos dissolvidos em 1 mL de PBS foi adicionada, gota a gota, à solução de BSA sob agitação e temperatura ambiente. O pH foi ajustado à 8,3 com NaOH e o volume completado para 10 mL com água destilada. Em seguida, um total de 21mg de EDPC (hidroclorato de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida) foram divididas em quatro partes iguais, e cada parte adicionada em intervalos de duas horas à solução de Peptídeos-BSA, que ficou mantida sob agitação durante 8 horas, no escuro e à 4°C, conforme (Sousa, 2008) com algumas modificações. O conjugado foi submetido a uma diálise utilizando a coluna Ultracel-PL (Sigma Aldrich Co), onde as soluções dos conjugados SOP-BSA e SOH-BSA foram inseridas e submetidas a quatro centrifugações à 4000rpm por 40 minutos. No intervalo de cada centrifugação foi adicionado PBS à coluna.

4.2.2 Obtenção da imunoglobulina Y (IgY) anti-SOH e anti-SOP

Os animais foram mantidos em galinheiros telados e arejados, em gaiolas suspensas e individuais, com limpeza diária, recebendo ração ao dia e água potável *ad libitum*. Para a imunização das aves, a forma de contenção utilizada foi a mecânica, num período mínimo de 5-10 minutos por ave. Duas galinhas foram imunizadas com 200µg dos antígenos SOH e SOP livres, e duas com 200µg dos conjugados SOH-BSA e SOP-BSA. Estes antígenos foram emulsionados em 0,1mg/mL de adjuvante completo de Freund e em seguida inoculados em dez pontos do músculo peitoral da galinha, acompanhado de mais dois inóculos com 0,1mg/mL de adjuvante incompleto, em intervalos de uma semana cada, perfazendo três semanas, totalizando um volume final de dose de 0,5mL distribuídos entre os pontos de inoculação, dando 0,05ml por ponto. O procedimento de inoculação foi realizado utilizando seringas de 3mL uma agulha de calibre 25x8mm. Após um intervalo de 20 dias depois do último inóculo, iniciou-se a coleta dos ovos.

Os ovos foram coletados após a postura natural das aves, rotulados e armazenados em geladeira (4 a 8°C) até o momento da extração. As imunoglobulinas IgY dos ovos colhidos foram extraídas pelo método de Polson e colaboradores (1985). Primeiramente as gemas foram separadas da clara e em seguida 10mL de gema foram transferidos para 40mL de PBS pH 7,6 contendo 1,75g de PEG 8000 3,5% p/v, homogeneizados e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente este homogeneizado foi centrifugado (Centrífuga Sorvall Legend RT) por 25 minutos à 5000g e temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e filtrado e o precipitado foi descartado. Foi adicionado ao filtrado PEG 8000 para uma concentração final de 12%, seguindo-se homogeneização e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 25 minutos à 5000g e temperatura ambiente. O sedimento foi dissolvido em 25mL de PBS pH 7,6, adicionando-se 3g de PEG 8000 (concentração final de 12%p/v), incubando-se por 10 minutos e centrifugando-se por 25 minutos à 5000g e temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi dissolvido em 2,5mL de PBS pH 7,6 à 0°C e um volume igual de etanol 50% à -20°C foi adicionado. Em seguida, o material foi centrifugado por 25 minutos à 10000g e -5°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi dissolvido em 2,5mL de PBS pH 7,6 e armazenado à -20°C.

Uma parte dos anticorpos IgY anti-SOP que foram purificados conforme descrito anteriormente foi purificado por precipitação com sulfato de amônio. Para tanto, uma alíquota da solução de IgY teve seu pH ajustado para pH 7,4 com NaOH e submetido a uma agitação a 7°C. Sulfato de amônio foi adicionado lentamente para uma concentração final de 20% (p/v). Depois da precipitação a agitação foi mantida por mais 30 minutos. Em seguida o material foi centrifugado à 2000g por 20 minutos e ressuspensão em PBS pH 7,4. Estas soluções foram dialisadas contra PBS pH 7,4 utilizando colunas Centriprep (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e estocadas a 4°C.

4.2.3 SDS-PAGE

Os conjugados de peptídeos com BSA e as imunoglobulinas IgY purificadas foram caracterizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de lauril sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970). Alíquotas de cada solução foram desnaturadas em tampão de amostra (SDS; EDTA; Glicerol;

Tris pH 8,3; β -mercaptoetanol, azul de bromofenol) por fervura durante 3 minutos. As corridas foram feitas em gel a 12% e 10%, respectivamente, com corrente constante de 50mA durante 30 minutos à temperatura ambiente na presença de tampão de corrida com frente de glicina. Depois da corrida as proteínas foram coradas por duas metodologias: prata e Comassie Blue. Na coloração por prata, o gel foi imerso na solução de fixação (etanol/ácido acético) por 30 minutos, sob agitação. Depois da fixação, o gel foi retirado e colocado na solução de nitrato de prata por 30 minutos, sob agitação. Em seguida, os géis foram lavados rapidamente por duas vezes com água, e colocados em solução reveladora (NaOH/formaldeído) até o aparecimento das bandas, paralisando a coloração com solução de ácido acético à 5%. Na coloração por Comassie Blue, o gel foi imerso na solução fixadora (ácido acético, metanol, Comassie Blue R-259) por no mínimo 2 horas ou overnight, quando necessário. Em seguida o gel foi descorado com a solução metanol/ácido acético.

4.2.4 ELISA indireto

A verificação da atividade dos anticorpos IgY anti-SOH, anti-SOP, anti-SOH-BSA e anti-SOP-BSA foi feita através do ensaio imunoenzimático (ELISA) segundo VOLLER e colaboradores (1976) com modificações, no qual placas (Maxi Sorb, Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ L de solução dos seguintes antígenos diluídos em tampão carbonato/bicarbonato: peptídeos SOH e SOP livres; peptídeos SOH e SOP conjugados com BSA (SOH-BSA e SOP-BSA) e BSA (Anexos 1, 2 e 3). A adsorção dos antígenos foi feita com uma incubação à 4-8°C por 16 horas. Posteriormente as placas foram lavadas duas vezes com 200 μ L com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Os anticorpos foram diluídos em PBS-T com caseína 1% (leite em pó desnatado-MOLICO®), e, posteriormente, 100 μ L destas soluções foram aplicadas nos poços e incubadas por 1h a 37°C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes como descrito acima. Em seguida foram adicionados 100 μ L de conjugado anti-IgY ligado a peroxidase (anti-IgY-HRP) diluído 1:1000 em caseína 1% em cada poço e incubado-se por 1h à 37°C. A etapa da lavagem foi repetida três vezes com PBS-T e foram adicionados 100 μ L de solução reveladora contendo 10mg de o-fenilenodiamina (OPD) e 10 μ L de peróxido de hidrogênio em 25 mL de tampão citrato. As placas foram em seguida incubadas por 15-20 minutos à temperatura ambiente, em ambiente protegido da luz. A reação foi paralisada com a adição de ácido sulfúrico 2M e as placas foram lidas através do leitor de microplacas (Test Line

- Biotech Instruments, USA), usando filtro de referência de 490nm e filtro de contraste de 630nm.

4.2.5 Desnaturação da acetilcolinesterase eritrocitária não inibida

Teste com HCl: Foram adicionados 900 μ L de sangue total em tubos de vidros e em seguida foi adicionado HCl nas concentrações finais de 0%, 0,4%, 0,8%, 1,6% e 2%. Após 30 minutos expondo as hemácias a este composto, foi centrifugado os tubos por 10 minutos à 2000rpm, coletou-se o sobrenadante e realizou a leitura fotométrica no comprimento de onda de 540nm no espectrofotômetro Uv-Visível (Shimadzu, modelo UV-160A).

Teste com DTT: Foram adicionados 900 μ L de sangue total em tubos de vidros e em seguida foi adicionado DTT nas concentrações finais de 0mM, 1mM, 2mM, 4mM, e 5mM. Após 15 minutos expondo as hemácias a este composto, foi centrifugado os tubos por 10 minutos à 2000rpm, coletou-se o sobrenadante e realizou a leitura fotométrica no comprimento de onda de 540nm no espectrofotômetro UV- Visível (Shimadzu, modelo UV-160A).

4.2.6 Hemaglutinação

Lâminas de Vidro: Foram aplicados em uma lâmina de vidro, 50 μ L de sangue total que foi previamente exposto com DTT com concentração final de 5mM. Em seguida, foi adicionado 50 μ L de anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP diluídos 1:10 e 1:100 em solução salina à 0,9% (NaCl) e em Tampão Alsever (2,05g glicose, 0,42g NaCl, 0,8g Citrato de Sódio, 0,05g ácido). Os imunorreagentes forma misturados inicialmente com o auxílio de espátula e mantidas sob agitação orbital lenta por 5 minutos.

Placas de fundo cônico: Foram aplicados em uma placa de microdiluição com fundo cônico, 50 μ L de anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP concentrados, diluídos 1:2 e 1:4 em solução salina à 0,9% (NaCl). Em seguida, foi adicionado 25 μ L das seguintes amostras de hemácias diluídas 1:20 que foram divididas em dois grupos: tratadas previamente com DTT na concentração final de 5mM, sendo estas lavadas com NaCl 0,9% ou não. Outro grupo é das hemácias não tratadas com DTT, sendo estas lavadas ou não com NaCl 0,9%. Em todos estes grupos foram

adicionados o anticorpo anti-IgY 1:100. Os imunorreagentes foram misturados inicialmente e mantidos em repouso por 1 hora.

4.2.7 Determinação de proteínas totais

As amostras dos peptídeos conjugados à BSA, e os anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP foram determinados pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio em volumes predefinidos. Foi adicionado às amostras 1mL de reagente de dosagem (1 mL de Solução de Sulfato de Cobre Anidro 2% + 1mL de solução de Tartarato de Sódio e Potássio 4% em 100mL de solução de Carbonato de Sódio 2% e Hidróxido de Sódio 0,1M), homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100µL de reagente de Folin 1N, homogeneizado e incubado por 45 minutos à temperatura ambiente. Para a curva de calibração, foram utilizados 5 (cinco) pontos de concentração de BSA à 2mg/mL: 5µg, 10µg, 20µg, 40µg e 80µg para um volume final de 100µL. No tubo "branco" foram adicionados 100µL de água destilada. A leitura foi feita em um espectrofotômetro UV-Visível (Micronal) a 660nm.

4.2.8 Análise dos Resultados

As avaliações das IgYs anti-SOH e anti-SOP foram inseridas no programa Excell 2003 da plataforma da Microsoft. As densidades óticas obtidas no ELISA foram plotadas neste programa e foram gerados gráficos que possibilitou a interpretação dos resultados obtidos.

A determinação da ausência de hemólise das hemácias na presença de DTT foi avaliado utilizando o programa Excell da plataforma Microsoft onde as absorvâncias obtidas foram inseridas neste programa e analisadas.

5 RESULTADOS

A conjugação dos peptídeos SOH e SOP com BSA foi avaliada pelas diferenças dos valores dos pesos moleculares da BSA livre e dos conjugados (Figura 5A). A BSA apresentou PM de 70 kDa enquanto os conjugados SOH-BSA e SOP-BSA apresentaram PM ao redor de 87kDa. A diferença entre estes compostos demonstra que entre 17 e 19 moléculas de haptenos foram ligadas a cada molécula de BSA (Figura 5B). Tanto os peptídeos livres como os conjugados foram injetados nas galinhas só sendo possível observar a formação de anticorpos para os peptídeos conjugados, denominados de anti-SOH e anti-SOP.

As IgYs anti-SOH e anti-SOP, extraídas e purificadas pelo método de Polson (1985), foram submetidas à SDS-PAGE que apontou a presença das imunoglobulinas IgY através das bandas de 69 e 26 kDa correspondentes, às cadeias pesada e leve da IgY, respectivamente (Figura 6). Entretanto, esta SDS-PAGE apontou a presença de proteínas contaminantes o que levou à tentativa de melhorar a purificação da imunoglobulina. Para tanto, amostras de IgY anti-SOP extraídas pelo método de Polson (1985) foram repurificadas por precipitação com sulfato de amônio (Araújo, 2007). Este anticorpo foi selecionado para testar a repurificação por ser o reativo para molécula alvo do imunoenensaio, ou seja, a acetilcolinesterase inibida. A Figura 7 mostra que esta repurificação não foi capaz de eliminar as proteínas contaminantes.

A Figura 8 mostra que as imunoglobulinas IgY anti-SOH e anti-SOP reconhecem BSA, SOH e SOP, apresentando uma densidade ótica (D.O.) um pouco mais intensa para os pares homólogos. As IgY anti-SOH e anti-SOP foram tituladas pareadamente por meio de ELISA usando os peptídeos conjugados à BSA (SOH-BSA e SOP-BSA) como antígenos, como mostra a Figura 9. As IgYs também foram tituladas com os peptídeos SOH e SOP livres, conforme apresentado nas Figuras 10A e 10 B. Estas titulações comprovam, mais uma vez, que os anticorpos interagem, como era esperado, com os peptídeos heterólogos, livres ou conjugados. Mesmo assim, as reações são visivelmente mais fortes para os pares homólogos.

A escolha do DTT como fator desnaturante da AChE foi baseado no estudo de Wang e colaboradores (2008). A exposição das hemácias ao DTT, nas concentrações indicadas, não provocou hemólise, conforme demonstrado na Figura 11. Hemácias tratadas com 5mM de DTT, obtidas de um doador saudável, foram usadas para testar a técnica de hemaglutinação. No primeiro teste a hemaglutinação foi feita em lâminas de vidro, não sendo possível evidenciar aglutinação com anti-SOH, que deveria reconhecer a acetilcolinesterase eritrocitária não-inibida (dado não mostrado). No entanto, em placas de fundo cônico com hemácias lavadas com salina foi possível constatar uma hemaglutinação discreta e insuficiente para fins diagnósticos (Tabela 1).

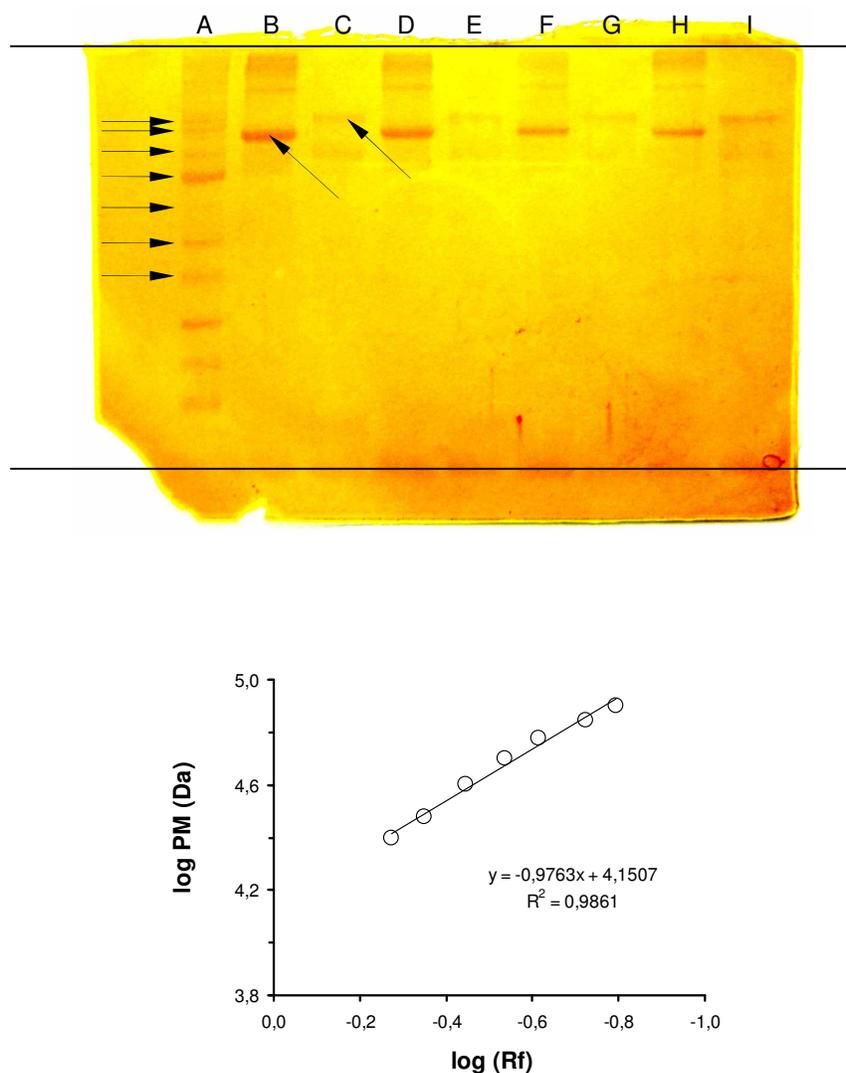


Figura 5 - SDS-PAGE dos peptídeos SOH e SOP conjugados à BSA

A = Padrão de Peso Molecular (PM; BenchMark Protein Ladder, Invitrogen), com as bandas indicadas por setas usadas para a Curva Padrão de PM (25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80kDa); **B** = BSA com banda indicada por seta usada para cálculo do PM; **C** = SOH-BSA com banda indicada por seta usada para o cálculo de PM; **D** = BSA; **E** = SOP-BSA; **F** = BSA; **G** = SOH-BSA; **H** = BSA; **I** = SOP-BSA.

Gel separador a 12% segundo Laemmli (1970); Revelação por prata; Linhas indicam as posições dos poços e do *front* de corrida usadas para o cálculo dos Rf. O inserto representa a regressão linear para os cálculos de Peso Molecular

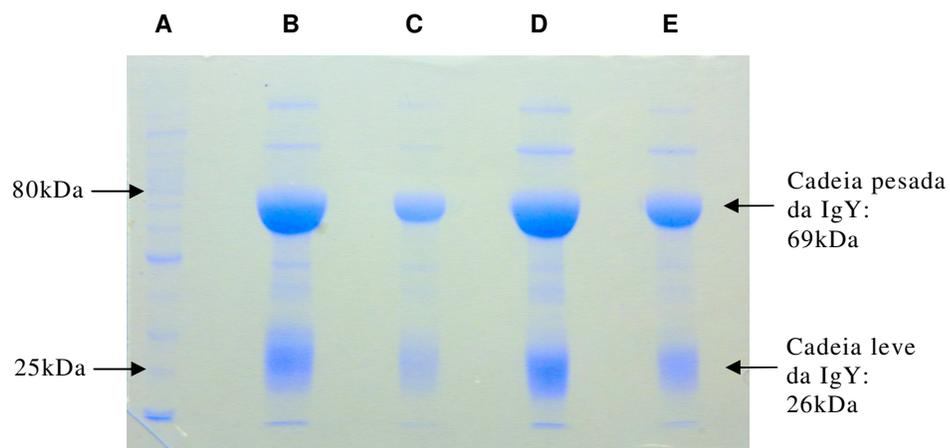


Figura 6 - SDS-PAGE das IgY anti-SOH e anti-SOP

A = Padrão de Peso Molecular (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen) com as setas indicando os limites usados para construção da Curva Padrão); **B** = IgY anti-SOH 1:4; **C** = IgY anti-SOH 1:10; **D** = IgY anti-SOP 1:4; **E**: IgY anti-SOP 1:10.

Gel separador a 10%, segundo Laemmli (1970); Revelação por Comassie Blue.

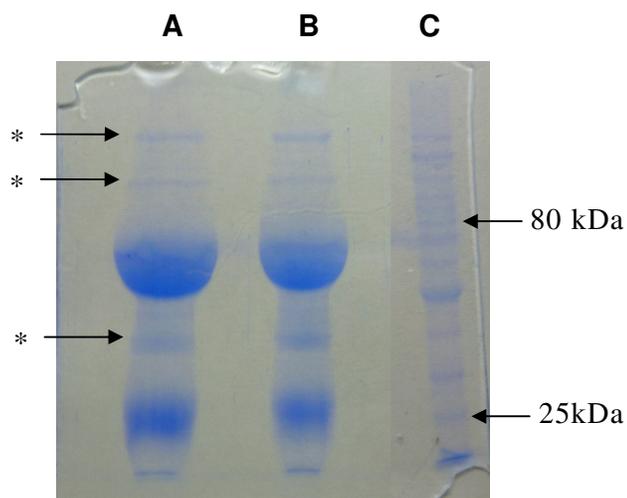
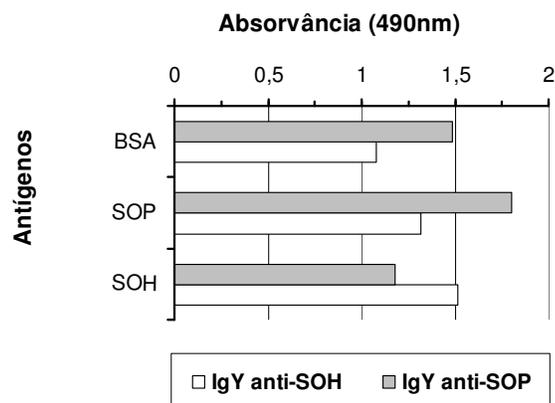
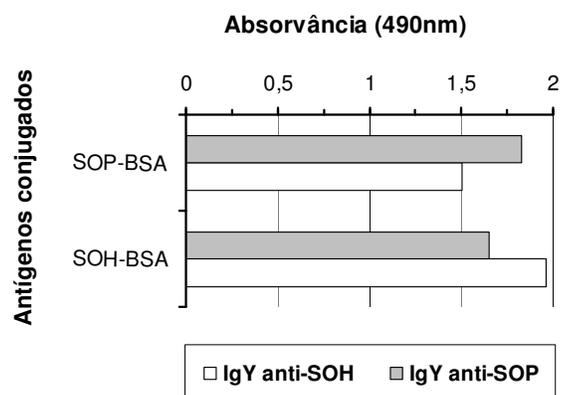


Figura 7 - SDS-P. E de IgY anti-SOP repurificada com sulfato de amônio

A = IgY anti-SOP precipitada com PEG e repurificada por precipitação com sulfato de amônio 20%; **B** = IgY anti-SOP precipitada com PEG; **C** = Padrão de Peso Molecular (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen) com as setas indicando os limites usados para construção da Curva Padrão); * proteínas residuais.

Gel separador a 10%, segundo Laemmli (1970); Revelação por Comassie Blue.

A**B****Figura 8** – Especificidade dos anticorpos IgY**A** = Antígenos não conjugados; **B** = Antígenos conjugados

ELISA com antígenos e conjugados ligados à placa, absorção com IgY anti-SOH e anti-SOP e revelação com anti-IgY-HRP e OPD

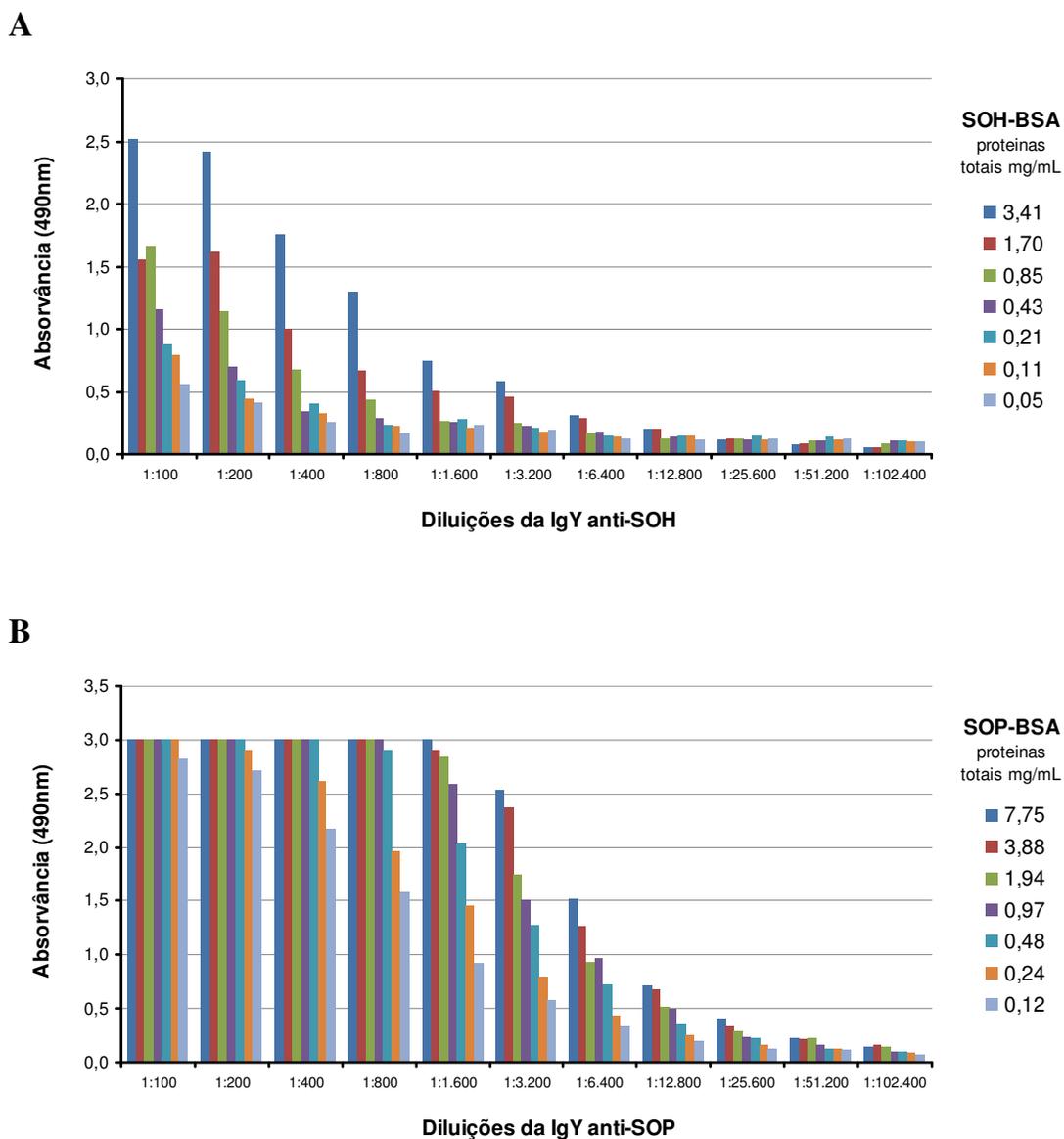


Figura 9 - Titulação pareada das IgY anti-SOH e anti-SOP com SOH-BSA e SOP-BSA.

A = Titulação da IgY anti-SOH; **B** = Titulação IgY anti-SOP

ELISA com conjugados ligados à placa, absorção com IgY anti-SOH e anti-SOP e revelação com anti-IgY-HRP e OPD

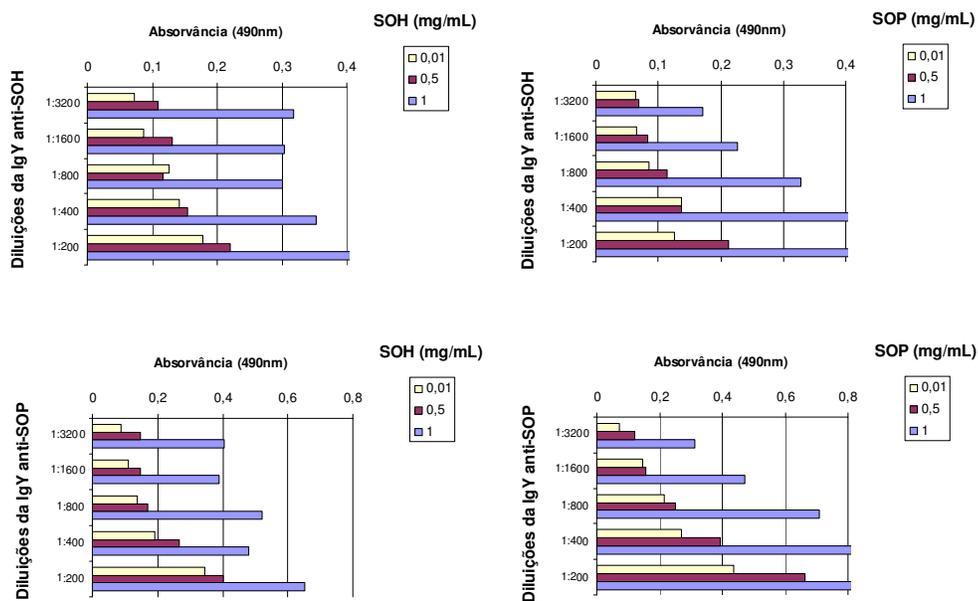


Figura 10 - Titulação pareada das IgY anti-SOH e anti-SOP com SOH e SOP

ELISA com conjugados ligados à placa, absorção com IgY anti-SOH e anti-SOP e revelação com anti-IgY-HRP e OPD

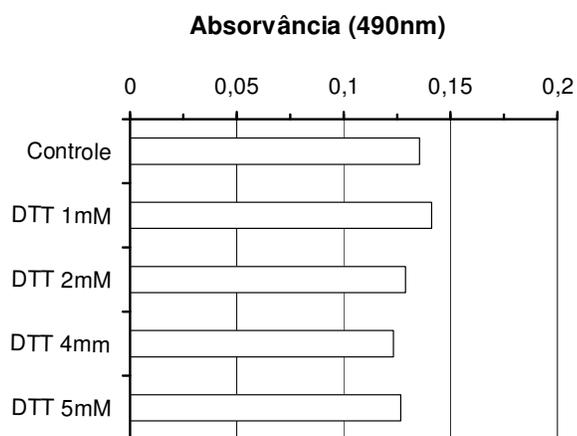


Figura 11 - Demonstração da ausência de hemólise após tratamento com DTT

Tabela 1 - Hemaglutinação das IgYs anti-SOH e anti-SOP em placa de microdiluição de fundo cônico

Anticorpo	Controle (Sem IgY)	Tratamentos das hemácias			
		Nenhum	Lavagem com NaCl	DTT	DTT e lavagem com NaCl
IgY anti-SOH concentrado	-	-	+	+↓	+↑
IgY anti-SOP concentrado	-	+	+↓	+	+
IgY anti-SOH 1:2	-	-	+	+↓	+↑
IgY anti-SOP 1:2	-	+	+↓	+	+
IgY anti-SOH 1:4	-	-	+	+↓	+↑
IgY anti-SOP 1:4	-	+	+↓	+↑	+

Hemácias humanas diluídas 1:20, tratadas ou não tratadas com DTT 5mM, lavadas ou não lavadas com NaCl, tratadas com IgY anti-SOH e anti-SOP concentrada ou diluída.

+ = reação de hemaglutinação positiva; +↓ = reação de hemaglutinação menor que +; +↑ = reação de hemaglutinação maior que +; - = ausência de reação de hemaglutinação.

6 DISCUSSÃO

Existem dados sobre a produção de anticorpos policlonais contra os peptídeos ao redor do centro catalítico da AChE fosforilada (George *et al.*, 2003), entretanto foram utilizados coelhos para a produção desses anticorpos e a análise sorológica foi feita por *immunoblot*. Neste estudo, foram utilizadas galinhas e o método de análise sorológica foi o ELISA. Já em relação à hemaglutinação, não existem dados na literatura com anticorpo aviário para pesquisa da intoxicação em humanos.

Os peptídeos SOH e SOP utilizados são compostos por 10 aminoácidos, o que lhes conferem características de haptenos. Com o propósito de produzir IgY anti-SOH e anti-SOP, aves foram inoculadas com tais peptídeos puros, livres de moléculas carreadoras, pois segundo Schade e colaboradores (1996), foi possível obter anticorpos em galinhas diretamente com um octapeptídeo. No entanto, neste estudo, não foi possível detectar anticorpos com as aves inoculadas somente com os peptídeos, confirmando suas propriedades haptênicas. O fato destes peptídeos não induzirem resposta imune nas aves, seja pela baixa complexidade química ou pelo baixo peso molecular, também pode ser atribuído à tolerância oral, ou seja, a um mecanismo regulatório e protetor do organismo da ave contra a hipersensibilidade causada por proteínas que não são totalmente digeridas e que possam ser absorvidas através do intestino (Bueno & Pacheco-Silva, 1999).

Existem diversas metodologias para realizar a conjugação de haptenos com moléculas carreadoras utilizando diversas substâncias ligantes, tais como formaldeído (Pengelly, 1977), dimetilformamida (Weiler & Wieczorek, 1981) e carbodiimida (Maldiney *et al.*, 1986). Neste estudo foi utilizada a metodologia com carbodiimida. As proteínas presentes depois da conjugação foram comparadas com a BSA através de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e foi visto que os conjugados (SOH-BSA e SOP-BSA) apresentaram Peso Molecular (PM) de 87kDa e a BSA 70kDa (Figura 5). Com a diferença de 17kDa é possível estimar que foram conjugadas entre 17 e 19 moléculas de peptídeos para cada molécula de BSA.

Os peptídeos SOH e SOP conjugados com BSA foram capazes de induzir resposta imune nas aves, como mostra a Figura 6. Existem diversas metodologias para a extração e purificação da IgY, tais como: precipitação com sulfato de amônio (Deignan *et al.*, 2000) ou polietilenoglicol (Schade *et al.*, 2001); vários processos cromatográficos (Meulenaer & Huyghbaert, 2001); e filtração por membranas (Kim e Nakai, 1996). A metodologia utilizada neste estudo para purificação das IgY foi a precipitação com polietilenoglicol (PEG) proposta por Polson e colaboradores (1985), por ser uma metodologia bem estabelecida e de uso corrente no laboratório que serviu de base para esta pesquisa (Figura 6). O PM da IgY ainda não é bem estabelecido, existindo divergências entre os autores. Segundo Warr e colaboradores (1995), o PM da IgY é de aproximadamente 180kDa enquanto para Leslie e Clem (1999) o PM seria 206kDa. Neste estudo foi obtido uma IgY com PM ao redor de 190kDa, que muito se aproxima dos resultados anteriormente descritos. O PM das IgY foi estimado considerando duas cadeias pesadas (69kDa) e duas cadeias leves (26kDa) para cada imunoglobulina, conforme descrito na Figura 6. Carlander (2002) aponta 65 e 18kDa para as cadeias pesada e leve da IgY, respectivamente. Estes resultados indicam que as imunoglobulinas que foram purificadas dos ovos das galinhas imunizadas estão de acordo com as descrições atuais para esta imunoglobulina.

A Figura 6 aponta algumas bandas além daquelas correspondentes às cadeias da IgY. Araújo (2007) fez uma comparação entre algumas metodologias para purificação de IgY e mostrou que a precipitação com sulfato de amônio pode purificar sem haver muita perda. No entanto, testes realizados com IgY anti-SOP mostraram que a precipitação com sulfato de amônio não foi capaz de melhorar os resultados obtidos pela precipitação com PEG, conforme mostram os resultados descritos na Figura 7.

A quantidade de IgY produzida por uma galinha pode ser de 20 a 40g por ano (Schade *et al.*, 2005). Segundo Carlander (2002), a concentração de IgY nas gemas dos ovos é constante e é possível obter cerca de 100mg de IgY purificada em um único ovo. A produtividade dos anticorpos IgY em aves pode ser de 5 a 10 vezes maior que a produtividade de IgG em coelhos (200mg IgG/ 40mL sangue) (Schade *et al.*, 2001). Dentro desta quantidade de IgY produzida, apenas cerca de 3 a 3,2% dos anticorpos são específicos aos antígenos administrados (Akita & Li-

Chan, 1998). Neste estudo foram obtidos cerca de 80mg de IgY anti-SOH e 105mg de IgY anti-SOP por gema, o que está de acordo com os resultados obtidos por Carlander (2002).

A produção de anticorpos utilizando haptenos conjugados à moléculas carreadoras geram três tipos de anticorpos: um para o determinante hapteno, outro para epítomos inalterados na proteína carreadora e outro para novos epítomos formados por partes combinadas tanto do hapteno como do carreador (Kindt *et al.*,2002). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com esta descrição já que as IgY anti-SOH reconheceram tanto o peptídeo SOH puro, como o peptídeo conjugado à BSA e a própria BSA pura. Este mesmo resultado também foi observado para a IgY anti-SOP, conforme descrito nas Figuras 8A e 8B.

George e colaboradores (2003) conseguiram anticorpos que foram capazes de diferenciar entre o peptídeo fosforilado e o não fosforilado por meio de *immunoblot*. Vale ressaltar que tais resultados só foram possíveis com a passagem da solução de anticorpos em colunas de imunoafinidade para a remoção das imunoglobulinas que interagem com sítios comuns de ambos os peptídeos, tornando os anticorpos mais específicos. Além disto, estes autores mostraram que a fosforilação no aminoácido serina é responsável pela quebra do reconhecimento pelos anticorpos produzidos contra o peptídeo não fosforilado. Neste projeto foi tentada a implementação do método proposto por George e colaboradores (2003), substituindo o coelho por galinhas como animal de produção de anticorpos. A intenção inicial foi obter resultados semelhantes aos destes autores, verificando, ainda, se as IgYs poderiam diferenciar o peptídeo SOH do peptídeo SOP.

Neste projeto as reações antígeno-anticorpo apresentou uma D.O. mais intensas entre os imunorreagentes correspondentes (por exemplo, IgY anti-SOH *versus* peptídeo SOH), e menos intensa quando confrontadas com antígenos heterólogos (por exemplo, IgY anti-SOH *versus* peptídeo SOP). Além disto, a molécula de BSA também é reconhecida por estas IgY (Figura 8A).

Uma opção para melhorar a especificidade dos anticorpos IgY anti-SOH e anti-SOP produzidos neste trabalho é a absorção com os antígenos heterólogos e com a BSA para reduzir as reações inespecíficas, ou ainda utilizar outro tipo de

molécula carreadora que seja filogeneticamente mais distante, como a KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), que foi usada por George e colaboradores (2003).

Vale ressaltar que a utilização de galinhas para a produção de anticorpos possui diversas vantagens, tais como os custos de manutenção das aves e a concentração de anticorpos extraídos da gema que supera os níveis encontrados no plasma de mamíferos. Mas, a principal vantagem desta abordagem é a preservação do bem estar do animal, já que a coleta de ovos é um método não invasivo. Além disso, a maior produtividade leva ao uso de um menor número de animais. Tais critérios éticos levaram o *Office Vétérinaire Federal*, na Suíça a aprovar a tecnologia de IgY como método alternativo para estudos imunológicos. Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA) que, apesar dos esforços para preservar o bem estar dos animais utilizados, sugeriu que as aves fossem eutanasiadas ao final da atividade.

A titulação pareada de anticorpos e seus antígenos é um processo que tem como finalidade determinar a atividade dos imunorreagentes ao mesmo tempo e em uma só placa. Neste estudo foi feita a titulação pareada das IgY anti-SOH e anti-SOP com os antígenos não conjugados (SOH e SOP) e com os antígenos conjugados (SOH-BSA e SOP-BSA). A Figura 9 mostra a titulação das IgY com os conjugados homólogos, que permitiu demonstrar a reação de uma solução de SOH-BSA contendo 0,05mg/mL de proteínas totais até uma diluição da IgY anti-SOH de 1:400 (Figura 9A). Da mesma forma, uma solução de SOP-BSA contendo 0,12mg/mL foi reativa até uma diluição da IgY anti-SOP de 1:12.800 (Figura 9B). Apesar desta grande sensibilidade, é preciso ressaltar que nestas reações também a BSA está sendo reconhecida, conforme é possível deduzir da Figura 8A.

A titulação pareada das IgY anti-SOH e anti-SOP com os peptídeos não conjugados foi feita com os antígenos homólogos e também com seus antígenos heterólogos, como mostra a Figura 10. A IgY anti-SOH na presença de seu antígeno correspondente (SOH) apresentou uma D.O. maior do que quando titulada com o antígeno não correspondente (SOP), sendo detectada reatividade até uma diluição desta IgY de 1:3.200, em ambos os casos (Figura 10). A IgY anti-SOP quando titulada com SOP apresentou uma D.O. maior quando comparada com o peptídeo SOH e também apresentou reatividade até a diluição de 1:3200 (Figura

10). Estes dados demonstram mais uma vez a falta de especificidade destas imunoglobulinas.

A desnaturação da AChE eritrocitária é uma etapa obrigatória para que os anticorpos anti-SOH e anti-SOP possam acessar o sítio ativo da enzima, tendo em vista a conformação tridimensional desta enzima. Neste estudo, primeiramente, orientou-se pela alteração do pH, tratando o sangue total com ácido clorídrico a 2,5%, ocorrendo hemólise completa das hemácias. Segundo Wang e colaboradores (2008), o ditionotrieto (DTT), que funciona como agente redutor de pontes dissulfeto de proteínas, consegue expor o centro catalítico da AChE eritrocitária. Neste trabalho, o tratamento de hemácias humanas com 5mM de DTT, conforme Figura 11, não provocou hemólise. Testes de hemaglutinação das hemácias tratadas com 5mM de DTT (Tabela 1), no entanto, não revelaram resultados positivos frente aos anticorpos anti-SOH e anti-SOP usando hemaglutinação em lâminas de microscopia. Como a proposta inicial deste estudo foi o desenvolvimento de um imunoenensaio rápido, foi testada a hemaglutinação em lâmina pela similaridade com o teste clássico do sistema AB0. Como não foi possível reconhecer qualquer reação nestas lâminas de vidro, foi feito a hemaglutinação em placas plásticas de microdiluição com fundo cônico, sendo possível constatar uma reação discreta, conforme apresentado na Tabela 1. Entretanto, a baixa reatividade apresentada nos testes de hemaglutinação com as hemácias tratadas com DTT, não permite estabelecer com segurança o diagnóstico da alteração da AChE. Existem dados que mostram a viabilidade de se utilizar IgY na técnica de hemaglutinação, tais como o de Guimarães e colaboradores (2008) que utilizaram IgY contra o vírus da parvovirose em fezes. Wang e colaboradores (2008) conseguiram realizar um imunoenensaio com amostras de plasma humano, que possui uma grande complexidade, utilizando agentes bloqueadores que conseguiram reduzir as interferências causadas pela amostra.

Os organofosforados inibem a enzima AChE formando adutos, que são ligações covalentes estáveis entre estas duas moléculas. A característica de cada aduto vai depender do tipo de organofosforado que foi ligado à enzima, mas que existem duas classes predominantes, o dimetoxi e o dietoxi (Thompson *et al.*, 2010). O estudo da arte das metodologias aplicadas para avaliação da exposição à organofosforados tem a constante preocupação de se detectar os adutos formados

por estes agentes químicos, ou seja, visa detectar a substância química propriamente dita. A metodologia mais eficiente para se fazer este tipo de detecção é por espectrometria de massas (MS), que se baseia em identificar proteínas e suas modificações baseadas no peso molecular de peptídeos provenientes destas proteínas digeridas enzimaticamente. Outra metodologia que também pode auxiliar na detecção da proteína e de suas modificações é por imunoenaios, que é um método específico, simples e barato. Um exemplo de identificação de adutos através de imunoensaio é de Wang e colaboradores (2008) onde buscaram identificar adutos por de OP-AChE por meio de imunoensaio eletroquímico com partículas de zircônia.

Neste estudo, a preocupação também foi a identificação do aduto OP-AChE através da mimetização do sítio ativo da AChE fosforilado por OP. Entretanto, não foi possível obter anticorpos que diferenciassem com segurança diagnóstica os peptídeos que mimetizam o sítio ativo da AChE fosforilada. A dificuldade de discriminação destes dois peptídeos foi mostrada pela reação cruzada observada nos testes sorológicos. Isto evidencia que é necessária uma etapa de purificação dos anticorpos, por meio de uma coluna imunoafinidade, para que estas IgYs tornem-se específicas para o reconhecimento dos adutos OP-AChE.

7 CONCLUSÕES

- Os peptídeos sintéticos com sequências correspondentes ao sítio ativo da acetilcolinesterase humana normal (SOH) e fosforilada (SOP) inoculados em galinhas não induzem a síntese de IgY.
- Os peptídeos sintéticos SOH e SOP carregados pela BSA tornam-se imunogênicos e induzem a produção de IgY específica ao serem inoculados em galinhas.
- IgY anti-SOH e anti-SOP analisadas no ensaio imunoenzimático, reconhecem especificamente e com maior intensidade reacional os peptídeos sintéticos correspondentes conjugados à BSA e, em menor intensidade, os peptídeos livres.
- As reações das IgYs com os peptídeos homólogos foram mais relevantes diante das reações obtidas com os peptídeos heterólogos nos ensaios imunoenzimáticos.
- IgY anti-SOH e anti-SOP interagem com a BSA no ensaio imunoenzimático.
- IgY anti-SOH e anti-SOP não aglutinam hemácias tratadas com DTT na hemaglutinação direta em lâmina de vidro.
- A hemaglutinação direta em placas plásticas de microdiluição de fundo cônico apresentou discreta reação das IgYs com as hemácias tratadas com o DTT.
- A reação apresentada no teste de hemaglutinação direta em placa não permite estabelecer com segurança a determinação da AChE alterada pelo DTT.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoyay R. As particularidades da agricultura no desenvolvimento econômico. In: Paradigmas do capitalismo agrário em questão. São Paulo: Edusp; 2007. p.219-61.
- Alves R. S., Oliveira-Silva J.J. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. In: Peres F., Moreira J.C, editores.É veneno ou é remédio? Rio de janeiro, Editora Fiocruz; 2003.p.137-156.
- Apra C., Colosio C., *et al.* Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *Journal of Chromatography B.* 2002; 769:191-219.
- Araújo A.S. Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha [Dissertação]. Minas Gerais:Escola de Veterinária-Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
- Bueno V.; Pacheco-Silva A. Tolerância Oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 1999; 45(1): p.79-85.
- Carlander D. Avian IgY antibody: *in vitro* and *in vivo* [Tese]. Suécia: Universidade Uppsala; 2002.
- Cocker J., Mason H.J., *et al.* Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters.* 2002; 134 (97):p.97-103.
- Costa L.G. Toxic effects of pesticides. In: Klassen C, editor. *Toxicology: The Basic Science of Poisons.* New York : Ed Mc Graw Hill Medical; 2007.p.883-930.
- Deigan T.; Kelly J.; *et al.* Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. *Food and Agricultural Immunology.* 2000; 12(1):p.77-85.
- FAO (Food and Agriculture Organization) - Agriculture Database, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em: 5/05/2008.
- Fukuto T.R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamates insecticides. *Environmental Health Perspectives.*1990; 87:p.245-254.
- Garcia E.G. Segurança e Saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. Fundacentro, São Paulo, 2001.

- George K.M., Schule T., *et al.* Differentiation between acetylcholinesterase and the organophosphate-inhibited form using antibodies and the correlation of antibody recognition with reactivation mechanism and rate. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:p.45512-45518.
- Giacobini E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging*. 2001; 18(12):p.891-8.
- Gil E.S., Kubota L.T. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Química Nova*. 1999; 22(6):p.874-881.
- Guimarães M.C.C., Amaral L.G., *et al.* Production and use of egg-yolk antibody for detection of canine parvovirus in feces. *R.Ci.Méd.Biol.* 2008; 7(3): p.241-248.
- Kendall L.V. Production of polyclonal antibodies. In: HOWARD, G.C., KASER, M.R, editores. *Making and using antibodies: a practical handbook*. CRC Press; 2006. p. 41-72.
- Kim H., Nakai S. Immunoglobulin separation from egg yolk: a serial filtration system. *Journal of Food Science*.1996; 61(1): p. 510-512.
- Kindt T.J., Osborne B.A., Goldsby R.A. *Imunologia de Kuby*. Editora Revinter, 4^aed, 2002.
- KLEFFMANN GROUP. Brasil caminha para liderar uso de defensivo agrícola. Disponível em www.kleffmann.com.br. Acessado em 01/02/09.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: p.680-685.
- Larini L. *Toxicologia dos Praguicidas*. Editora Manole, 1^a Ed., 1999.
- Leslie G.A., Clem L.W. Immunoglobulins of the chicken. In: *Phylogeny of immunoglobulin structure and function*. *J.Exp.Med.* 1969; 130: p.1337-1352.
- Liu G., Wang J., *et al.* Nanoparticle- based electrochemical immunosensor for the detection of phosphorylated acetylcholinesterase: an exposure biomarker of organophosphate pesticides and nerve agents. *Chem. Eur. J.* 2008; 14: p. 9951-9959.
- Lotti M. Cholinesterase Inhibition: Complexities in interpretation. *Clin. Chem.* 1995; 41(12): p.1814-1818.

- Lowry, O. H., Rosebrough N.J., *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- Maldiney R., Leroux B., *et al.* A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormone:auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal of Immunological Methods*. 1986; 90: p.151-158.
- Marrs T.C. Toxicology of organophosphate nerve agents. *JWBK*. 2007; 130 (08):p.191-221.
- Meirelles, L.C. Controle de agrotóxicos: estudo de caso do Estado do Rio de Janeiro [Dissertação].Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro;1996.
- Meulenaer B., Huyghbaert A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. *Food and agricultural Immunology*. 2001; 13(1): p.275-288.
- Moraes E. C. F. Índices Biológicos De Exposição A Agentes Químicos. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. 1981; 9: p. 7-12.
- Oliveira-Silva J.J., Alves S.R., *et al.* Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. *Human & Experimental Toxicology*. 2000; 19:p.173-177.
- Oliveira-Silva J.J., Meyer A. O sistema de notificação das intoxicações: o fluxograma da joeira. In: Peres, F., Moreira, J.C, editores. *É veneno ou é remédio?*.Editora Fiocruz; 2003.p.317-326.
- OPS (Organização Pan-Americana da Saúde). Manual de Vigilância da Saúde de populações expostas a agrotóxicos. Ministério da saúde, secretária de Vigilância Sanitária. Brasília: OPS/OMS, 1996.
- OIT (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO)2001. Agricultura y sectores basados en recursos biológicos, pp. 64.2-64.77. In *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*, vol. III, parte X, capítulo 64. Disponível em: <http://www.mtas.es/Publica/enciclo/default.htm>. Acessado em 05/05/2008.
- Pengelly W. A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta*.1977;136: p.173-180.
- Peres F., Moreira J.C. O desafio interdisciplinar da avaliação da exposição humana a agrotóxicos. In: Peres, F., Moreira, J.C, editores. *É veneno ou é remédio?* Editora Fiocruz; 2003.p.347-366.

- Pivetta F., Machado J.M.H., *et al.* Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em Saúde Pública. *Cadernos de Saúde*. 2001;17(3):p.545-554.
- Polson A., Coetzer T., *et al.* Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations*. 1985; 14(4): p.323-327.
- Quinn D.M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.*1987; 87:p. 955-979.
- Schade R., Behn I., *et al.* Chicken Egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology. Springer, 2001.
- Schade R., E.G. Calzado, *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.*2005; 33: p.1-26.
- Schade R., Staak C., *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. *Alternatives to laboratory animals*. 1996; (24):p.925-934.
- Silva Filho M.V., Oliveira M.M., *et al.* Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. *Toxicology Letters*. 2004; 153: p. 247-154.
- SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). Vendas de Pesticidas por estados Brasileiros. Disponível na Internet via URL: <http://www.sindag.com.br/EST97989900.zip>. Arquivo capturado em 2008.
- SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Estatística Anual de casos de intoxicação e envenenamento: Brasil-2000. Rio de Janeiro: Centro de informações científica e tecnológica (Cict/FIOCRUZ), 2003. Disponível: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acessado em: 10/ 10/ 2008.
- SINITOX(Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Disponível:<http://www.fiocruz.br/sinitox/2006/umanalise2006.htm>. Acessado em: 10/ 10/ 2008.
- Sousa C.M. Produção de anticorpos policlonais para detecção e quantificação de moléculas de Ácido Indol-acético, Zealina e Isopenteniladenina, visando a determinação e o controle de níveis hormonais em plântulas de gérbera *in vitro* [Tese].Rio de Janeiro:Instituto de agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;2008.
- Taylor P. The Cholinesterases. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(7): p.4025-4028.

- Wang H., Wang J., *et al.* EQCM immunoassay for the phosphorylated acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposures based on selective zirconia adsorption and enzyme-catalytic precipitation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009; 24: p. 2377-2383.
- Wang H., Wang J., *et al.* Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma. *Anal.Chem.*2008; 80: p.8477-8484.
- Warr G.W., Magor K.E., *et al.* IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*. 1995; 16(8):p.392-398.
- Weiler E.W., Wieczorek U. Determination of femtomol quantities of gibberelic acid by radioimmunoassay. *Planta*. 1981; 152(1): p.159-167.
- Worek F., Koller M., *et al.* Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology*. 2005; 214: p. 182-189.
- WHO (World Health Organization). Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva, 1985.
- WHO (World Health Organization). Biological monitoring of chemical exposure in the workplace. 1996; 1.
- Voller A., Bidwell D.E, *et al.* Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*. 1976; 53: p.55-65.
- ABIQUIM. A indústria química brasileira em 2009. Disponível em www.abiquim.org.br. Acessado em 09/08/2010.
- Fan J., Zuo Y., *et al.* Preparation and physicochemical property of chicken yolk immunoglobulin (IgY) against porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV). *Front. Agric. China*. 2009; 3(4): p.466-470.
- Thompson C.M., Prins J.M., *et al.* Mass spectrometric analyses of organophosphate insecticide oxon protein adducts. *Environmental Health Perspectives*. 2010; 118(1):p.11-19.
- Akita E.M., Li-Chan E.C.Y. Isolation of bovine immunoglobulin G subclasses from milk, colostrum and whey using immobilized egg yolk antibodies. *J. Dairy Sci.*1998; 81(1): p.54-63.

