

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Produção de Anticorpos IgY de Galinhas e IgG de
Coelhos para Análise de Auxina e Citocininas.**

Cleiton Mateus Sousa

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgY DE
GALINHAS E IgG DE COELHOS PARA
ANÁLISE DE AUXINA E CITOCININAS.**

Cleiton Mateus Sousa

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Motta Miranda

E Co-orientação do Professor
Ronald Bastos Freire

Tese submetida como
requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor
em Fitotecnia.

Seropédica, RJ
Julho de 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

CLEITON MATEUS SOUSA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

TESE APROVADA EM 25 de Julho de 2008.

Ricardo Motta Miranda, PhD, UFRRJ
(Orientador)

Leonardo Oliveira Medici, DSc, UFRRJ

Marco Antonio Stephano, DSc, USP

Lázaro Eustáquio Pereira Peres, PhD, ESALQ-USP

Gilmar Roberto Zaffari, DSc, EPAGRI-SC

A Valdivino Mateus e Aparecida Helena

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida;

Ao professor Ricardo Motta Miranda, o qual fez papel de pai, amigo e orientador durante o período de permanência na Rural. Agradeço pela confiança, incentivo e a oportunidade de ingressar no meio acadêmico sob a sua orientação desde o primeiro período da graduação;

Ao professor Ronald Bastos Freire pela amizade, motivação e orientação. Sempre transmitindo mensagens positivas, de motivação e jamais mediu esforços para superar todos os obstáculos que surgiram durante o decorrer do trabalho;

Ao Instituto de Zootecnia da UFRuralRJ pela doação de animais (coelhos e galinhas) utilizados na obtenção dos anticorpos;

A EMBRAPA-Agrobiologia pelo empréstimo de materiais, reagentes e equipamentos utilizados na purificação de anticorpos e determinação de densidade ótica de amostras.

A FAPERJ pelo financiamento parcial do projeto através da concessão de duas bolsas na categoria Cientista do Nosso Estado;

A CAPES pelo financiamento parcial do projeto através da concessão de uma bolsa do programa PRODOC e 21 meses de bolsa de doutorado;

A Dra. Flávia Venâncio pelo empenho no ajuste de metodologias e amizade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitotecnia;

A todos os professores que contribuíram na minha formação;

Aos colegas da Escola Agrotécnica Federal de Ceres, GO;

A equipe do Laboratório de Imunologia, Aline, Kelly, Thiago, Rodrigo, Deise, Felipe, pela amizade e colaboração na execução deste trabalho;

A equipe do LCTV-DFITO-IA, José Fausto, Fábio, Erich, Murilo, Léo, pelo convívio e colaboração nas atividades no laboratório;

Aos colegas do Curso, Ariane, Arison, Madelon, Mariluci, Mariella, Edilson, Zé Dias pela amizade e auxílios;

Aos amigos Deusimar, Márcio Emanuel, Raphael, Bárbara, José Henrique, Cida, Júnior, Gilma, Kaká, Nádia, Luis, Beto e Vitor pela amizade e companheirismo nos momentos em que passamos juntos;

Aos membros da banca examinadora que contribuíram na elaboração final da tese;

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Cleiton Mateus Sousa, filho de Valdivino Mateus de Sousa e Aparecida Helena Mateus, nasceu no primeiro dia do mês de agosto de 1981 na cidade de Rubiataba - GO.

Em 1996 ingressou no curso técnico em Agropecuária da Escola Agrotécnica Federal de Ceres, GO, concluindo em 1998. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Março de 1999 e, em Maio de 2003, graduou-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas. Neste período, foi estagiário e bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, sob a orientação do Prof. Ricardo Motta Miranda, e desenvolveu trabalhos científicos direcionados com a regeneração e multiplicação de plantas *in vitro*.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, ao nível de Mestrado, em 2003, na mesma Universidade e defendeu a dissertação na área de Cultura de Tecidos Vegetais, intitulada “Otimização de protocolos para a propagação *in vitro* de gébera (*Gerbera jamesonii*)”, em janeiro de 2005.

Em março do mesmo ano ingressou no mesmo curso, em nível de Doutorado, também sob a orientação do prof. Dr. Ricardo Motta Miranda e co-orientação do prof. Dr. Ronald Bastos Freire. Em 2006 foi aprovado em concurso para professor na Escola Agrotécnica Federal de Ceres, GO. Desenvolveu Tese visando a produção de anticorpos policlonais contra moléculas de hormônios vegetais, para uso na detecção e quantificação de auxina e citocininas em tecidos vegetais.

RESUMO GERAL

SOUSA, Cleiton Mateus. **Produção de anticorpos IgY de galinhas e IgG de coelhos para análise de auxina e citocininas**. Seropédica: UFRRJ, 2008. 61 p. (Tese, Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A determinação do nível hormonal endógeno pode ser uma excelente ferramenta para estudar o desenvolvimento vegetal. Atualmente, fica limitada devido a complexidade das metodologias adotadas, uma vez que demandam equipamentos e reagentes de alto custo e ainda apresentam baixo rendimento. Por outro lado, os ensaios imunoenzimáticos possuem algumas vantagens que superam essas limitações, demonstrando um potencial de uso prático na dosagem de hormônios vegetais. Entre os ensaios imunoenzimáticos, destaca-se o teste Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), o qual vem sendo utilizado na detecção de moléculas com baixo peso molecular. No entanto, o teste ELISA exige anticorpos específicos e que sejam capazes de reconhecer as moléculas de interesse, no caso os hormônios vegetais. Hoje no mercado não há anticorpos disponíveis para a determinação das moléculas hormonais. Diante disso, propôs-se produzir e caracterizar anticorpos contra moléculas de AIA, 2ip e zeatina e posteriormente, usá-los na detecção dessas moléculas. Para isso, as moléculas hormonais foram conjugadas com proteína (BSA) para posterior imunização de galinhas poedeiras ou coelhos. A partir do soro de coelhos ou de gemas de ovos de galinhas os anticorpos foram purificados e caracterizados através do teste de imunodifusão, SDS-PAGE e teste ELISA. Os anticorpos que apresentaram melhores resultados foram utilizados na detecção de moléculas hormonais em amostras de tecidos de plântulas mantidas *in vitro*. O teste de imunodifusão revelou que os anticorpos obtidos foram capazes de detectarem a molécula em estudo. Através do SDS-PAGE verificou-se que os anticorpos obtidos em gemas de ovos de galinhas apresentaram maior pureza que os obtidos em coelhos, sugerindo que os mesmos possuem maior potencial de uso prático. A partir dos resultados do teste ELISA, observou-se que os anticorpos contra AIA não apresentaram potencial de uso prático na determinação dessa molécula em amostras vegetais. Sendo assim, a detecção de moléculas hormonais em amostras de tecidos vegetais ficou restrita a 2ip e a zeatina. A detecção dessas duas moléculas em extrato bruto, obtidos a partir de plântulas de gérbera mantidas *in vitro*, revelou que o nível endógeno de zeatina foi superior ao nível de 2ip. Plântulas com seis semanas após a repicagem apresentaram maior nível de zeatina do que plântulas recém repicadas, enquanto para o 2ip, essa diferença não foi evidente. O uso de anticorpos obtidos em gemas de ovos de galinhas permitiu a detecção e quantificação de zeatina e 2ip em amostras vegetais utilizando o teste ELISA.

Palavras chaves: produção de anticorpos, ELISA, determinação hormônios vegetais, gérbera *in vitro*.

ABSTRACT

SOUSA, Cleiton Mateus. **Production of antibodies IgY from chicken and IgG from rabbits for analysis of auxin and cytokinins.** Seropédica: UFRRJ, 2008. 61 p. (Thesis, Doctorate in Plant Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The determination of plant hormones can be an excellent tool for to study the plant development. Today, the complexity of methods, equipment and reagents of high cost limit the use with practice of routine. Some advantages of methods immunoassay can exceed those limitations, showing a potential of practical use in determination of plant hormones. The test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is utilized in detection of molecules with low molecular weight. However, the ELISA requires specific antibodies against molecules of interest, in the case, plant hormones. Today in the market there is not available antibodies for the determination of hormonal molecules. Faced with that, proposed be produced and characterize antibodies against molecules of AIA, 2ip and zeatin and subsequently, for use the detection those molecules. For that, the hormonal molecules were conjugated with protein (BSA) for subsequent immunization of chicken or rabbits. From the serum of rabbits or yolks eggs the antibodies were purified and characterized through the test of precipitation of double diffusion, SDS-PAGE and test ELISA. The antibodies that presented better results were utilized in detection of plant hormones molecules in samples of plantlets *in vitro* of gerbera. The test of precipitation of double diffusion revealed that the antibodies productized were capable of will detect the molecule in study. Through in the SDS-PAGE was verified that the antibodies obtained in eggs yolks of chicken presented superior purity than them obtained in serum of rabbits. From the results of the test ELISA, observed itself that the antibodies against AIA did not present potential of practical use. The detection of plant hormones in samples of tissue stayed restricted to 2ip and zeatin. The detection of those two molecules in crude extract, obtained from plantlets *in vitro* of gerbera, revealed that the level endogenous of zeatin was higher of level 2ip. Plantlets with six weeks after multiplication presented higher level of zeatin than plantlets with one week after multiplication. For the 2ip, that difference was not evident. The use of antibodies obtained in eggs yolks of chicken permitted the determination of zeatin and 2ip in samples plant utilizing the test ELISA.

Key words: production of antibodies, ELISA, determination of plant hormones, gerbera *in vitro*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comportamento da produção de anticorpos após a imunização dos animais. Fonte: Carlos Sinogas – material didático.	12
Figura 2. Diálise de conjugado contra água destilada à 4 °C com duas trocas diárias durante 72 horas.	15
Figura 3. Coelho mantido no biotério para a imunização e obtenção de anticorpos contra hormônios vegetais.	18
Figura 4. Galinhas mantidas em gaiolas para a imunização e obtenção de anticorpos contra hormônios vegetais.	19
Figura 5. Preparo de emulsão do conjugado com o adjuvante de Freund para inoculação dos animais.	19
Figura 6. Inoculação intradérmica do antígeno, em coelho, pelo método dos múltiplos sítios.	20
Figura 7. Imunização de galinhas com inoculação do conjugado com adjuvante completo de Freund no músculo peitoral.	21
Figura 8. Obtenção do soro a partir da amostra de sangue coletada na veia marginal da orelha do coelho.	21
Figura 9. Teste de imunodifusão em gel de agarose. Soro – 1; Conjugado inoculado (AIA-BSA) – 2; Conjugado de captura (AIA-OVA) - 3; Outro conjugado de captura – 4 (AIA-KLH); Carreador usado no inóculo (BSA) – 5; Carreador de captura (OVA) – 6 e hapteno (AIA) – 7.	23
Figura 10. Valores de absorbância das soluções de AIA, BSA e conjugado AIA-BSA.	25
Figura 11. Valores de absorbância das soluções de AIA, OVA e do conjugado AIA-OVA.	26
Figura 12. Valores de absorbância das soluções de AIA KLH e do conjugado AIA-KLH.	26
Figura 13. Valores de absorbância das soluções de 2ip, BSA e do conjugado 2ip-BSA.	27
Figura 14. Resposta alérgica dos coelhos após a inoculação do conjugado AIA-BSA.	27
Figura 15. Precipitação de soro, obtido em coelhos, com Sulfato de Amônia.	28

Figura 16. Revelação do teste de imunodifusão utilizando soro obtido em coelho e vários conjugados ou haptenos. Soro – 1; Conjugado inoculado (AIA-BSA) – 2; Conjugado de captura (AIA-OVA) - 3; Outro conjugado de captura – 4 (AIA-KLH); Carreador usado no inoculo (BSA) – 5; Carreador de captura (OVA) – 6 e hapteno (AIA) – 7.	28
Figura 17. Solução de gemas diluídas com água ácida (esquerda) ou água gelada (direita).	29
Figura 18. Precipitação das IgY's após 45 minutos do preparo. Esquerda água ácida e a direita com água gelada (4°C).	30
Figura 19. Comparação da precipitação de IgY's após 12 horas da diluição. A esquerda o método utilizando água gelada (4°C) e a direita o método utilizando água ácida.	30
Figura 20. Dificuldade na precipitação de IgY's contra AIA com os métodos utilizando água ácida ou Sulfato de Amônia.	31
Figura 21. SDS-PAGE dos anticorpos anti-hormônios purificados de soro de coelho e de gema de ovos de galinhas, evidenciando a cadeia pesada (Fc) e a cadeia leve (Fab) do anticorpo. 1 e 4- IgG anti-AIA e anti-2ip respectivamente, 2 e 3 - IgY anti-AIA e 5 – IgY anti-2ip.	32
Figura 22. SDS-PAGE dos anticorpos obtidos a partir de gemas de ovos de galinhas, evidenciando a cadeia pesada (Fc) e a cadeia leve (Fab) do anticorpo.	32
Figura 23. Revelação da placa de ELISA na titulação do conjugado AIA-OVA e anti-AIA.	33
Figura 24. Absorbância de IgG anti-AIA, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.	34
Figura 25. Absorbância de IgY anti-AIA, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.	35
Figura 26. Revelação da placa de ELISA na titulação do conjugado zeatina-OVA e anti-zeatina.	35
Figura 27. Revelação da placa de ELISA na titulação do conjugado 2ip-OVA com anti-2ip.	36
Figura 28. Absorbância de IgY anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.	36
Figura 29. Absorbância de IgY anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os	37

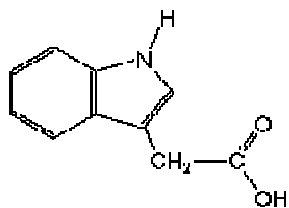
diversos reforços.	
Figura 30. Absorbância de IgY anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.	37
Figura 31. Absorbância de IgG anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.	38
Figura 32. Absorbância de IgY anti- zeatina, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.	38
Figura 33. Comparação dos anticorpos anti-AIA obtidos em coelhos (IgG) e galinhas (IgY) após o primeiro reforço.	39
Figura 34. Comparação dos anticorpos anti-2ip obtidos em coelhos (IgG) e galinhas (IgY) após o primeiro reforço.	40
Figura 35. Curva padrão do 2ip.	41
Figura 36. Determinação do índice de competição do 2ip através de ELISA de competição.	42
Figura 37. Determinação do IC50 de zeatina, na faixa de 0-50 nanomoles, através de ELISA de competição.	43
Figura 38. Determinação do IC50 do AIA através de ELISA de competição.	43
Figura 39. Esquema dos procedimentos adotados na obtenção do extrato vegetal.	51
Figura 40. Ilustração das etapas do teste ELISA realizado.	52
Figura 41. Nível endógeno de zeatina e 2ip determinados através de ELISA, em plântulas de gérbera recém repicadas (início) e com seis semanas in vitro (fim), cultivadas em meio Murashige & Skoog (1962) adicionado de 1 mg L^{-1} de BAP.	53

ABREVEATURAS

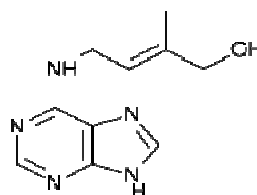
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
AIA - Ácido Indolacético

2ip – 2-isopenteniladenina
 BSA – Soro Albumina Bovina
 OVA - Ovalbumina
 KLH - Hemocianina
 SDS-PAGE – Eletroforese em gel de Poli(acrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio
 IgY – anticorpos obtidos a partir de gemas de ovos de galinhas
 IgG - anticorpos obtidos a partir de soro de mamíferos
 IC50 – Concentração do composto que inibe 50% da ação biológica dos anticorpos
 HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
 pH – Potencial de Hidrogênio
 GA₃ – Ácido giberélico
 PBS – Tampão Fosfato-Salino
 EDPC – Hidrocloro de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida
 NaOH – Hidróxido de Sódio
 TBE - Tampão Tris (solução contendo uma mistura de base T, Ácido Bórico e EDTA).
 NaCl -Cloroeto de Sódio
 HCl – Ácido Clorídrico
 Fc- Cadeia pesada do anticorpo
 Fab – Cadeia leve do anticorpo
 MS – Meio de Cultura Murashige & Skoog
 BAP - 6-benzilaminopurina

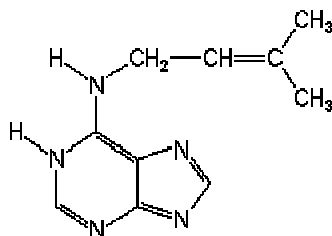
SÍMBOLOS



AIA



Zeatina



2ip

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
---------------------------	---

2. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA MOLÉCULAS DE AUXINA E CITOCININAS.....	4
2.1 INTRODUÇÃO	6
2.1.2. Anticorpos	7
2.1.3. Produção de anticorpos	8
2.1.4 Obtenção de conjugados de haptenos com carreadores	10
2.1.5 Imunização.....	11
2.1.6 Extração e purificação	13
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.2.1 Conjugação das moléculas hormonais (haptenos) com proteínas (carreadores)	15
2.2.1.1 Conjugação de AIA-BSA com Hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC)	15
2.2.1.2 Conjugação de AIA-OVA com Hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC)	16
2.2.1.3 Conjugação de AIA-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin - hemocianina) com Hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC).....	16
2.2.1.4 Produção de conjugados de citocininas	17
2.2.2 Produção e caracterização de anticorpos	18
2.2.3 Preparo da emulsão para inoculação.....	19
2.2.4 Imunização de coelhos.....	20
2.2.5 Imunização de aves.....	20
2.2.6 Coleta de sangue em coelhos e em galinhas	21
2.2.7 Sangria e preparação do soro	21
2.2.8 Purificação de IgG	22
2.2.9 Isolamento e purificação de IgY	22
2.2.10 Teste de sensibilidade (imunodifusão).....	23
2.2.11 Caracterização de anticorpos por SDS-PAGE	23
2.2.12 Caracterização dos anticorpos com ELISA	24
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.3.1 Imunização dos coelhos e das galinhas.....	27
2.3.2 Purificação de IgG	28
2.3.3 Teste de sensibilidade (imunodifusão).....	28
2.3.4 Isolamento e purificação de IgY	29
2.3.5 Caracterização de anticorpos por SDS-PAGE	31
2.3.6 Caracterização dos anticorpos com ELISA	33
2.4 CONCLUSÕES	44
3 USO DE ELISA E ANTICORPOS POLICLONAIS DO TIPO IGY NA DETECÇÃO DE CITOCININAS EM PLÂNTULAS DE GÉRBERA.	46
3.1 INTRODUÇÃO	48
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.4 CONCLUSÕES	55
3.5 CONCLUSÕES GERAIS	56

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
---	-----------

1. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento vegetal é influenciado por diversos fatores, dentre os quais, destaca-se o balanço hormonal, pois regula todas as fases do desenvolvimento de uma planta. Atualmente predominam cinco classes de fitorreguladores, sendo cada uma delas responsável pela indução, ou controle, de respostas fisiológicas específicas em plantas (KENDE & ZEEVAART, 1997). Por conta disso, o uso de fitorreguladores em cultura de tecidos de plantas tornou-se rotina para controlar as diversas respostas organogênicas.

Para induzir a diferenciação de raízes adventícias utilizam-se balanços exógenos de fitorreguladores favoráveis às auxinas e para induzir a formação da parte aérea utilizam-se balanços favoráveis às citocininas (SKOOG & MILLER, 1957). Entretanto, essas tendências de resposta podem variar de acordo com o material genético, com as condições ambientais, ou mesmo com a época do ano em que se obtêm os propágulos destinados aos cultivos *in vitro*. Isso, provavelmente, ocorre em função do balanço hormonal endógeno presente no momento do estabelecimento das culturas *in vitro*. A dosagem do teor endógeno de hormônios tem sido, portanto, motivo para o desenvolvimento de protocolos direcionados aos processos organogênicos, uma vez que, o balanço hormonal é de extrema importância e, na maioria das vezes, não é considerado devido a elevada complexidade das metodologias adotadas na determinação dos teores de auxina e citocininas.

PITELLI (2006) destacou que a dosagem de hormônios vegetais “integra as principais abordagens para o entendimento do papel do balanço hormonal no crescimento e desenvolvimento das plantas”. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias para a dosagem de hormônios vegetais, atualmente limitadas ao uso de tecnologias que dependem de mão de obra especializada e de reagentes e equipamentos onerosos. Nas metodologias adotadas predominam-se a separação das moléculas em cromatografia líquida, marcação radioativa e a detecção dos hormônios com o uso de anticorpos. Dentre estes métodos, os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm sido considerados como sendo os mais promissores e de fácil aplicação. Por outro lado, o uso depende da produção de anticorpos com alta especificidade às moléculas hormonais. Até o presente, tais anticorpos são exclusivamente produzidos na Europa e Estados Unidos da América, representando uma tecnologia cara, a despeito da simplicidade de sua utilização.

Segundo VOLLER et al. (1978), o ELISA é um método que permite detectar ou quantificar moléculas com baixo peso molecular, e atualmente vem sendo utilizado para detectar microorganismos (POUSSIN et al. 1997; YUKI et al., 2000; KOZLOVA et al., 2001; MOURA et al., 2001; YORINORI et al., 2003; FAJARDO et al., 2003; RADAELLI et al., 2006) e várias moléculas com baixo peso molecular (MAZZAFERA & VITÓRIA, 1998; SHIMOI et al. 2002; YAKOVLEVA et al. 2003; MAKROVA et al. 2003; CANTO-CANCHÉ et al., 2005; HINTEMANN et al. 2006; CHEN et al. 2008; ZHU et al., 2008). Sendo assim, a partir do potencial a ser adotado na quantificação de hormônios vegetais, esse método torna-se bastante promissor, uma vez que apresenta algumas vantagens quando se compara com outras metodologias utilizadas na quantificação de hormônios vegetais, como a redução de custos, rapidez e facilidade de manuseio. Acrescenta-se a isto, o fato de que, o grau de precisão e a viabilidade do ELISA dependem de variáveis exógenas, de especificidade e sensibilidade dos anticorpos utilizados, que são facilmente ajustáveis (MALDINEY et al., 1986).

Na quantificação de moléculas de auxina e de citocininas com o teste ELISA é necessário o uso de anticorpos que sejam capazes de reconhecer essas moléculas. No entanto, não existem anticorpos comercializados para todas as moléculas hormonais. Além disso, os

anticorpos disponíveis apresentam custos elevados, ocasionando uma limitação na aplicação do ELISA com esta finalidade. Por conta disso, torna-se essencial o desenvolvimento de metodologias para obtenção de anticorpos contra moléculas hormonais de modo a viabilizar a utilização independente do ELISA nas práticas rotineiras que envolvam a determinação dos níveis endógenos de auxina e citocininas.

A maior limitação na produção de anticorpos contra hormônios vegetais está vinculada às características moleculares de tais hormônios, os quais são genericamente denominados de haptenos, assim como as demais moléculas que não são capazes de provocar a produção de anticorpos. Tais moléculas são consideradas antígenos incompletos, isto é, não são capazes de induzir a formação de anticorpos isoladamente, mas são passíveis de interagir com anticorpos anti-haptênicos. Os organismos superiores somente geram anticorpos a partir da estimulação por antígenos completos, tais como quando estes hormônios de baixo peso molecular encontram-se conjugados com moléculas carreadoras de maior complexidade estrutural (KABAT, 1968).

Na quantificação de moléculas com baixo peso molecular SHIMOI et al. (2002), determinaram as concentrações de um hapteno excretado na urina de seres humanos que estava associado com algumas doenças, como câncer e diabete, em ELISA e em HPLC. Os autores concluíram que os resultados obtidos no teste ELISA apresentaram boa correlação com os dados obtidos em HPLC, e ainda sugeriram que o teste ELISA pode ser adotado na determinação de moléculas haptênicas em urina sem nenhum tratamento prévio. Esses resultados sugerem ser possível determinar moléculas com baixo peso molecular em amostras brutas somente com o teste ELISA, dispensando a separação das moléculas em HPLC o que reduz o tempo e os custos dessas análises.

MIKROVA et al. (2003), similarmente, determinaram a presença de resíduos de inseticidas utilizando ELISA, cromatografia líquida ou gasosa. Os resultados indicaram que o ELISA pode ser utilizado como um método conveniente, confiável e rápido para determinar resíduos de carbofuran em alimentos, mesmo utilizando amostras brutas.

Deste modo, o teste ELISA apresenta potencial de uso na detecção e determinação de moléculas com baixo peso molecular, sendo uma ferramenta bastante promissora para a dosagem de hormônios vegetais. Sua aplicação pode simplificar as dosagens de hormônios vegetais endógenos, as quais podem ser realizadas sem a prévia fragmentação das amostras vegetais em HPLC.

Esta tese foi realizada com a intenção de produzir, purificar e caracterizar anticorpos contra o Ácido Indolacético (AIA), Zeatina (Z) e 2-Isopenteniladenina (2ip). Para tanto, foram feitos estudos comparativos nos quais aves e mamíferos foram utilizados como fontes geradoras de anticorpos anti-haptênicos com especificidades e sensibilidades distintas. Do mesmo modo, definiu-se um protocolo para a aplicação do método de ELISA para a detecção e quantificação de moléculas de auxina e citocininas.

Capítulo I

2. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA MOLÉCULAS DE AUXINA E CITOCININAS.

RESUMO

Os hormônios vegetais são moléculas orgânicas, com baixo peso molecular que interferem no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Apesar da aplicação de fitorreguladores em tecidos vegetais, para estimular ou inibir respostas fisiológicas, o que desencadeia os eventos fisiológicos é o balanço hormonal endógeno nos tecidos. Esse fato nem sempre é considerado, uma vez que as metodologias que predominam na sua determinação apresentam limitações técnicas e econômicas, inviabilizando a sua aplicação como prática de rotina. O teste ELISA, por sua vez, permite a detecção de moléculas com baixo peso molecular, sendo, portanto, limitado unicamente pela obtenção de anticorpos com alta especificidade e sensibilidade às moléculas de interesse. Nesse estudo, propôs-se definir metodologias para a obtenção de anticorpos anti-AIA, anti-zeatina e anti-2ip em coelhos ou em galinhas. Para induzir a resposta imunológica nos animais, os hormônios vegetais foram conjugados com proteínas, BSA ou OVA. Após a imunização, a cada semana, foram coletadas amostras de sangue nos coelhos ou ovos das galinhas e, posteriormente, através do teste de imunodifusão dupla, avaliou-se a capacidade dos anticorpos a reconhecerem as moléculas dos hormônios quando conjugados às proteínas carreadoras. Além do teste de imunodifusão dupla, os anticorpos foram caracterizados quanto à pureza através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e quanto à sensibilidade e especificidade pelo teste ELISA. Os anticorpos obtidos, tanto em coelhos quanto em galinhas, foram capazes de reconhecerem as moléculas hormonais. O teste SDS-PAGE, entretanto, evidenciou que os anticorpos obtidos em coelhos apresentaram grande quantidade de proteínas interferentes capazes de diminuir sua sensibilidade. Por outro lado, os anticorpos obtidos em gemas de ovos de galinhas apresentaram excelente grau de pureza, sugerindo o potencial de uso bem sucedido na dosagem de hormônios vegetais. O teste ELISA indicou que os anticorpos obtidos contra a zeatina e o 2ip podem ser utilizados na detecção desses hormônios. A produção de anticorpos contra moléculas hormonais foi possível tanto em coelhos quanto em galinhas. A qualidade do anticorpo depende da molécula hormonal de interesse assim como do animal utilizado na sua obtenção. Os resultados obtidos indicaram que a obtenção de anticorpos contra moléculas hormonais consiste em uma ferramenta bastante promissora para ser adotada como uma metodologia simples, com baixo custo e confiável na detecção de moléculas de hormônios vegetais.

Palavras chave: produção e caracterização de IgG e IgY, hormônios vegetais.

PRODUCTION OF ANTIBODIES POLICLONAL AGAINST AUXIN AND CYTOKININS.

ABSTRACT

Plant hormones are organic molecules with low molecular weight and interfere in plant growth and development. Despite of the application of growth regulators in plants, for stimulate and inhibit responses physiological, the plant growth an development depend of hormonal level endogenous in tissue. That fact always is not considered, since the methods that predominate in determination present economic and technical limitations. The test ELISA permit the detection of molecules with low molecular weight, being, therefore, limited only by the obtaining of antibodies with high specificity and sensibility to the molecules of interest. In that study, proposed the production of antibodies against AIA, zeatin and 2ip from rabbits and/or from egg yolk of chicken. For it stimulate the immunological response in animal, the plant hormones were conjugated with proteins, BSA or OVA. After immunization, to each week, were collected samples of serum in rabbits or eggs of chicken, subsequently, through the test of the test of precipitation of double diffusion, evaluated itself the capacity of the antibodies it will recognize the molecules of the hormones when conjugated to the proteins carriers. Beyond the test of the test of precipitation of double diffusion, the antibodies were characterized in SDS-PAGE and ELISA. The antibodies obtained from rabbits and eggs yolks of chicken were capable of will recognize the hormonal molecules, however, the test SDS-PAGE showed up that the antibodies obtained from rabbits presented others proteins in serum. The antibodies obtained in eggs yolks of chicken presented excellent rank of purity, suggesting the potential of use well happened in the determination of plant hormones. The test ELISA indicated that the antibodies obtained against the zeatin and the 2ip can be utilized in the detection of those molecules. The production of antibodies against plant hormones was possible so much in rabbits how much in eggs yolks of chicken. The quality of the antibody depends on the hormone molecule of interest as well as of the animal utilized in production. The results obtained indicated that the production of antibodies against plant hormones consists of a promising enough tool for to be adopted like a simple method, with low cost and sensible in determination of plant hormones.

Key words: production and characterization of IgG and IgY, plant hormones.

2.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos trabalhos com a dosagem de hormônios vegetais com anticorpos não deixa explícito todas as etapas realizadas. Alguns descrevem apenas o uso de anticorpos para a dosagem em ELISA (PERES et al. 1997; MECIER et al. 2003; SUZUKI et al. 2004), outros apenas a produção dos anticorpos, e poucos relatam todas as etapas, envolvendo desde a produção de anticorpos até a determinação das moléculas em tecidos vegetais. Entretanto, para a produção de anticorpos para duas citocininas, SZÉKÁC et al. (2000) realizaram todas as etapas. O diferencial em relação aos demais trabalhos é o enfoque de alguns fatores que influenciam na validação do teste ELISA com o uso de anticorpos. Dessa forma, fica mais fácil para entender as divergências dos resultados da dosagem de hormônios vegetais com o uso de anticorpos, e até mesmo se entender e se superar as principais dificuldades durante a reprodução dos testes. A maioria dos trabalhos apresenta apenas os resultados obtidos e não registram os fatores que interferem de forma negativa, ou mesmo as dificuldades encontradas durante a produção de anticorpos e a efetivação dos testes imunológicos.

Apesar da definição das concentrações ótimas do anticorpo e do antígeno para o uso no ensaio imunoenzimático (ELISA), a maioria dos autores não descreve os procedimentos realizados, apenas comentando que as concentrações analíticas foram determinadas indiretamente através da competição das diferentes concentrações do antígeno com os anticorpos. SZÉKÁC et al. (2000), para obter o IC50 observaram variações na diluição do soro quando compararam anticorpos obtidos em animais imunizados com conjugados contendo diferentes proteínas carreadoras.

Outra fonte de variação que foi estudada foi a concentração do antígeno, que variou entre 1,0, 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. O título variou entre as concentrações do antígeno na placa e quanto a proteína carreadora, BSA ou OVA. O limite de detecção foi influenciado por todos os fatores. Os autores ainda verificaram que o período de incubação influenciou na absorbância. Sugeriram que a incubação durante 45 minutos é suficiente, uma vez que apresenta ótimos sinais nos ensaios. Incubações a partir de uma hora resultam IC50 com altos valores, o que gera perda na sensibilidade. Além disso, ainda relataram que os anticorpos foram capazes de determinar zeatina e Zip em tomate e fumo na escala de $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de massa fresca de tecido vegetal.

Desta forma, fica evidente que além de todos os cuidados e o uso de metodologias apropriadas para a obtenção de anticorpos, a qualidade desses, também depende da forma e das condições que são utilizados, podendo limitar o uso de anticorpos produzidos em outros locais, mesmo quando adota a mesma metodologia. Sendo assim, toda vez que for utilizar anticorpos para a detectar moléculas ou organismos, deve se realizar todas as etapas de ajuste da técnica ELISA.

Isso apesar de ser evidente, não é encontrado na maioria dos trabalhos, e como existem vários fatores que interferem nos resultados, não fica claro como os valores foram obtidos, dificultando a reprodução dos testes. Isso indica que apesar dos anticorpos serem utilizados como uma ferramenta na quantificação de hormônios vegetais, todas as etapas devem ser ajustadas de acordo com as condições de trabalhos e, para cada lote do anticorpo utilizado, pois cada um apresenta características específicas.

A comparação dos resultados dos níveis hormonais endógenos fica restrita apenas nas condições semelhantes de trabalho, pois, mesmo quantificando os níveis endógenos, torna-se complicado se ter a certeza que os valores obtidos são os reais daquelas moléculas presentes nos tecidos. Uma vez que de acordo com o ajuste da metodologia da quantificação de moléculas, pode ocorrer ampla variação nos limites de determinação (SZÉKÁC et al. 2000).

Uma das dificuldades para comparar resultados com a dosagem de hormônios vegetais é a forma com que os dados são expressos. Existe uma ampla variação na forma de se expressar as unidades nos valores encontrados. No trabalho de PERES et al. (1997), a curva padrão foi expressa em fmoles e as quantidades determinadas em micromoles.kg⁻¹ de massa fresca. MALDINEY et al. (1986) apresentaram os valores em ng.g⁻¹ massa fresca. SZÉKÁC et al. (2000), na curva padrão, utilizaram as concentrações dos hormônios da concentração de ng.ml⁻¹ da solução utilizada e ng.g⁻¹ massa fresca. PENGELLY (1977) detectou auxina (AIA) na faixa de ng.g⁻¹ de tecido vegetal. Uniformizando as unidades, PERES et al. (1997) e SZÉKÁC et al. (2000) determinaram hormônios na faixa de nmoles.g⁻¹ de massa fresca, e PENGELLY (1977) fmoles.g⁻¹ de massa fresca. PERES et al. (1997) determinaram auxina e citocininas, PENGELLY (1977) apenas AIA e SZÉKÁC et al. (2000) duas citocininas. WEILER & WIECZOREK (1981) obtiveram alta sensibilidade e especificidade para a determinação de giberelina. A detecção foi de 2-5 fmoles (pg). Já a determinação de AIA variou entre 1-200 pmoles com radioimunoensaio. Os trabalhos de PERES et al. (1997) e SZÉKÁC et al. (2000) foram com ELISA, sugerindo ter havido uma variação na sensibilidade dos anticorpos de acordo a técnica utilizada para a determinação. Deve se ressaltar que antes da determinação dos hormônios a maioria dos trabalhos utiliza HPLC para separar as moléculas e posteriormente quantificá-las através do ELISA. SZÉKÁC et al. (2000), na quantificação de citocininas não deixaram explícito se as amostras foram previamente separadas em HPLC. Apenas referem-se à utilização de amostras de folhas de plântulas *in vitro* para preparar o extrato das amostras vegetais em diferentes diluições. O método utilizado no preparo das amostras, sem dúvida, pode influenciar na eficiência da extração das moléculas.

Os autores atribuem a diluição como um fator importante, particularmente para o monitoramento de zeatina, em que os níveis endógenos são diferentes dos níveis de detecção pelo sistema ELISA, podendo haver desta forma, a estimativa de forma equivocada dos níveis destas moléculas.

Estas variações podem ser diante das características dos anticorpos, e outro fato é que a partir dos anticorpos purificados, torna-se possível manipular as concentrações utilizadas do antígeno e do anticorpo, determinando em níveis diferentes. SZÉKÁC et al. (2000) verificaram que o limite de detecção do ensaio variou de acordo com a diluição. Por outro lado, esses fatos demonstram a necessidade da titulação dos anticorpos, bem como o ajuste das concentrações do antígeno e do anticorpo, nas diferentes condições de uso nos ensaios a serem realizados.

2.1.2. Anticorpos

Os anticorpos pertencem a uma família de glicoproteínas relacionadas estruturalmente, chamadas imunoglobulinas (Ig), presentes no soro sanguíneo de todos os animais, e no caso das aves podem ser transferidas às gemas. Tais proteínas são produzidas naturalmente pelo sistema imune dos vertebrados após a indução da reação com antígenos, e possui a capacidade de reconhecer substâncias e organismos estranhos para sua posterior eliminação (MARANHÃO & BRÍGIDO, 2001).

Na maioria dos animais superiores, cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulinas são conhecidas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, diferenciando uma das outras em tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos (NUNES, 2005), e ainda varia o momento em que ocorre o pico na produção de cada uma. Além destas imunoglobulinas ainda existe IgY, produzidas nas aves. O Y têm origem de “yolk” (gema), local que predominam estas imunoglobulinas.

Diante da capacidade do sistema imune em produzir anticorpos contra moléculas ou organismos estranhos, torna-se possível induzir a produção de proteínas que são capazes de reconhecer diferentes substâncias e até mesmos microorganismos. A capacidade de reconhecer “corpos” estranhos tem sido utilizada em vários setores, tanto para detectar a presença quanto para quantificar determinadas partículas. Neste sentido, anticorpos vêm sendo utilizados como uma ferramenta para a dosagem de diferentes hormônios vegetais. Os principais hormônios que são quantificados com o uso de anticorpos são algumas citocininas, auxina, giberelina e ácido abscísico.

As imunoglobulinas podem ser obtidas tanto em mamíferos, tais como coelhos, camundongos e cabras, quanto em aves, onde as galinhas poedeiras são as mais utilizadas. BRENNER (1981) relatou que na produção de anticorpos contra hormônios vegetais, predominava o uso de coelhos para a obtenção de anti-soro, o mesmo sendo observado até os dias atuais. Apesar disso, dadas as dificuldades da obtenção de “bons anticorpos” para hormônios vegetais, comercialmente existe somente anticorpos monoclonais anti-AIA, produzidos em camundongos, disponíveis comercialmente (SIGMA[®]).

Apesar da existência de vários trabalhos científicos direcionados à produção de anticorpos e seu uso na determinação de hormônios vegetais, atualmente, estes produtos não estão disponíveis no mercado. A SIGMA[®] comercializa somente anticorpos monoclonais anti-AIA, obtidos a partir da estimulação com AIA conjugado à OVA. Uma das aplicações é o uso em ELISA, para detecções em concentrações na faixa de 1-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do mesmo hapteno conjugado a um carreador distinto (AIA-BSA). É digno de nota o fato de que o produto não se encontra disponível para pronta entrega, sendo necessário um período de três meses para que os anticorpos sejam produzidos em cultivos de hibridomas. Além do custo elevado dos anticorpos em solução (US\$ 1.380,50/200 μl), existem limitações ao uso dos monoclonais por conta da baixa sensibilidade, decorrente da grande especificidade para o hapteno, que pode gerar falsos negativos e subestimar a concentração endógena de fitormônios.

Existem relatos da produção de anticorpos contra hormônios vegetais tanto em mamíferos (MALDINEY et al. 1986) quanto em aves (REDIG et al. 1996), entretanto, não há comparação da qualidade de anticorpos obtidos em espécies diferentes.

2.1.3. Produção de anticorpos

Para a produção de anticorpos específicos à determinadas moléculas é necessário que a molécula apresente capacidade de induzir a resposta imune, imunogênica, e o organismo seja capaz de reconhecê-la como um corpo estranho, e em seguida produzir proteínas específicas para o posterior isolamento. Entre as diversas moléculas na natureza, encontram-se moléculas que são capazes de provocar uma resposta imune, que induz a produção de anticorpos e outras que não são capazes de provocar a produção de anticorpos.

As moléculas que são reconhecidas pelo sistema imune e induzem a produção de anticorpos são denominadas de antígenos completos. Entre os diversos fatores que limitam a indução de produção de anticorpos, é o peso molecular da molécula de interesse. Moléculas com baixo peso molecular, quase sempre, não apresentam capacidade de induzir a resposta imune e são denominadas de haptenos, ou antígenos incompletos. Entretanto, uma alternativa para a produção de anticorpos para os haptenos é a sua conjugação com moléculas que apresentam alto peso molecular, tais como proteínas e polissacarídeos, as quais são denominadas de carreadoras. Entre estas, a conjugação de hormônios com BSA e OVA predomina na literatura.

Sendo assim, o antígeno utilizado para provocar a produção de anticorpos é o conjugado do hapteno (hormônio) com o carreador (proteína na maioria das vezes). Existem várias técnicas para a produção do conjugado (antígeno), variando o método de conjugação, o

local da molécula que vai ligar ao carreador, e até mesmo variações na capacidade de provocar a produção de anticorpos e também na qualidade do anticorpo obtido, a sensibilidade e a especificidade às moléculas em estudo.

A produção de anticorpos é ativada nos animais após a inoculação do antígeno. As substâncias com peso moléculas menor que 1000 Da, como os hormônios vegetais, não possuem a capacidade de provocar a produção de anticorpos e são denominadas de haptenos. Por outro lado, macromoléculas como as proteínas e polissacarídeos, são altamente imunogênicas, e estimulam fortemente a resposta imune. Dessa forma, para a produção de anticorpos contra hormônios vegetais torna-se necessário a conjugação dos haptenos com um carreador, formando um complexo com capacidade de provocar a produção de anticorpos.

Outro fator indispensável para a produção de anticorpos é a capacidade do animal imunizado em reconhecer o antígeno e produzir proteínas com alta afinidade e especificidade ao antígeno. Os mamíferos são tradicionalmente mais utilizados na obtenção de soro, uma vez que possuem esses requisitos. Por outro lado, existem registros que as galinhas são excelentes alternativas, e que podem produzir anticorpos com melhor qualidade que os mamíferos.

Em relação à especificidade dos anticorpos, quando se deseja obter anticorpos de melhor qualidade é conveniente se imunizar animais mais distantes filogeneticamente que possível, em relação à fonte do antígeno. Essa estratégia geralmente apresenta resultados satisfatórios. Como exemplo, para produzir anticorpos para uma proteína humana é mais indicado usar coelho, cabra, camundongos do que macaco. No entanto, geralmente, as aves são mais eficientes para produzir anticorpos contra moléculas que apresentam baixa capacidade de provocar a produção de anticorpos em mamíferos (SIGMA®).

Poucos estudos comparam diretamente a produção e a qualidade de anticorpos produzidos em aves com outras espécies. Entre os poucos que existem, alguns indicam que anticorpos produzidos em galinhas apresentam especificidade e afinidade no mínimo iguais aos produzidos em coelhos, camundongos e outros mamíferos.

As aves apresentam as vantagens de maior facilidade na coleta e o maior rendimento dos anticorpos. Enquanto nos mamíferos é necessário realizar a sangria para coletar o soro, nas aves isso não é necessário. Além disso, nos mamíferos, como coelhos, para a coleta de 15-20 ml de soro é necessário um período, de no mínimo, duas semanas. Nas aves, após 15 dias da imunização é possível obter um ovo a cada dia, contendo em torno de 100 mg de anticorpos (LOSSO et al. 1998 citado por MUNENE, 2004), permitindo dessa forma, obter um rendimento acumulado superior ao obtido em coelhos. Sendo assim, apesar da produção de anticorpos predominar em mamíferos, nas aves, na maioria das vezes, encontram-se vantagens, tais como obtenção de maior quantidade de IgY; menor custo; purificação relativamente simples; e maior facilidade de manejo dos animais (LOSSO, 1993).

O rendimento do volume de soro obtido varia conforme a espécie. Nas aves quando trabalha com o soro obtêm-se cerca de 1-2 ml de soro e com os ovos pode obter-se 15 ml de gema. Em coelhos obtêm-se cerca de 25,0 ml e em ovelha, cerca de 200 ml (SIGMA, 2006). Quando se trabalha com aves o rendimento geral pode ser superior a estas espécies, uma vez que é comum obter um ovo por dia. Desta forma no período que é necessário para coletar 200 ml de soro em ovelhas é possível obter um volume maior de gemas. Entretanto, na produção de anticorpos, além do rendimento, o mais importante é a qualidade dos anticorpos obtidos.

Alguns imunologistas consideram que as IgY são mais específicas que as IgG, porém, nem sempre isso ocorre, uma vez que depende do antígeno e das condições do estudo. Além disso, a resposta quanto à produção de anticorpos varia muito entre os animais. MUNENE (2004) verificou uma variação significativa na produção de anticorpos para β -cyclocitral em aves imunizadas com o hapteno conjugado a um carreador.

Embora alguns pesquisadores insistam em afirmar que as IgG são mais específicas que as IgY, a produção de anticorpos em aves permanece sendo uma opção favorável devida a

grande quantidade de anticorpos obtida, ao custo de produção reduzido, bem como às características de resistência a variações térmicas, ausência de correlação com receptores bacterianos existentes em mamíferos e elevada resistência às variações de pH (FREIRE et al, 2004). WOOLEY & LANDON (1995) demonstraram que anticorpos obtidos em galinhas e ovelhas apresentaram afinidades semelhantes, considerando as duas espécies promissoras para a produção de anticorpos em grande escala. Apesar disso, evidenciaram amplas variações entre animais da mesma espécie, sugerindo a necessidade da utilização de vários indivíduos para a produção de anticorpos de boa qualidade.

BOLLEN et al. (1996) compararam a produção de anticorpos em coelhos e galinhas imunizados com antígenos preparados com vários tipos de adjuvantes e verificaram que o tipo de adjuvante interfere na resposta e varia entre as espécies. Entretanto, em geral, o título dos anticorpos obtidos em coelhos foi entre 1,5-2,0 vezes superior ao título dos anticorpos obtidos em galinhas. No entanto, os anticorpos produzidos em galinhas apresentaram melhor afinidade (especificidade). Nas galinhas, ainda compararam a produção de anticorpos no soro das aves e nas gemas e relataram que existe diferença na qualidade dos anticorpos.

Em relação à produção de anticorpos para hormônios vegetais, não existem resultados prévios na literatura comparando aves com outras espécies, sendo que predomina a produção em coelhos (PENGELLY, 1977; WEILER, 1980; WEILER, 1981; WEILER & WIECZOREK, 1981; MALDINEY et al. 1986). Nesses trabalhos, a sensibilidade da determinação das moléculas hormonais em tecidos vegetais com o uso de anticorpos varia na escala de nanograma a femtomol. Esta variação provavelmente ocorre devido à especificidade e sensibilidade dos anticorpos, que dependem da qualidade dos anticorpos, origem e processamento do tecido vegetal, método de extração e das condições nas quais as plantas foram mantidas antes da obtenção das amostras.

Assim, a qualidade dos anticorpos depende desde a metodologia utilizada para a produção do conjugado do hapteno com o carreador para imunizar os animais, material genético utilizado (espécie, raça ou linhagem), tipo de imunização adotada, época da coleta do soro e até da purificação dos anticorpos. Apesar de existirem diversos trabalhos sobre a produção de anticorpos contra hormônios vegetais, ocorrem variações metodológicas, principalmente relativas à produção dos conjugados, processos de imunização e estratégia utilizada na purificação dos anticorpos.

2.1.4 Obtenção de conjugados de haptenos com carreadores

Durante as últimas décadas, vários procedimentos utilizando diferentes reagentes têm sido descritos para a preparação de conjugados hapteno-carreador (PAUILLAC et al. 1998). As variações no método de conjugação do hapteno com o carreador podem gerar antígenos com diferentes capacidades de induzir resposta imune, alguns sendo mais eficientes que os outros, ou até mesmo quanto a qualidade do anticorpo produzido, que apresentam diferenças na qualidade.

Na produção de anticorpos contra AIA em coelhos, PENGELLY (1977), conjugou a molécula de auxina com BSA na presença de Formaldeído, WEILER (1981) conjugou na presença de Dimetilformamida e MALDINEY et al. (1986) na presença de Carbodiimida. A SIGMA[®] comercializa anticorpos monoclonais para AIA, gerados em camundongos, utilizando o conjugado AIA-OVA como o antígeno. Para outras moléculas das classes hormonais encontram-se diferentes metodologias. As variações nos métodos de conjugação estão relacionadas com o tipo de moléculas dos haptenos utilizados, o local onde deseja ligar o hapteno no carreador e com a capacidade de resposta imunológica da espécie animal selecionada para a produção de anticorpos.

Para a produção de anticorpos para citocininas, SZÉKÁC et al. (2000), imunizaram coelhos com conjugado preparado com 20 mg de Zeatina ou 2ip dissolvidos em 4 ml de Metanol, adicionado, em seguida, de 10 ml de Periodato de Sódio, gota a gota. Posteriormente adicionaram, em solução, a proteína carreadora, BSA ou OVA, dissolvidas em água, na concentração de 115 mg da proteína em 5 ml de água. Após a mistura das soluções, proteína e hapteno, o pH foi ajustado a 9,2, permaneceu durante 1 h em temperatura ambiente. Após incubação, adicionaram Borohidrato de Sódio e mantiveram, por mais 45 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Ao término do segundo período de reação, o pH foi ajustado para 6,5 e o material foi mantido em repouso durante duas horas adicionais. O conjugado foi separado do excesso de haptenos não conjugados através de diálise em água durante dois dias, com três trocas diárias da água.

MALDINEY et al. (1986) dissolveram 1 mg de OVA em 500 µl de PBS e adicionaram 20 µl de Glutaraldeído, gota a gota, sob forte agitação. Após 3h de incubação, adicionaram 25 µl de Lisina (2M) e mantiveram por mais 1 h para em seguida ser dializada em PBS. Todas as reações foram realizadas no escuro e temperatura ambiente. Para a solução do hapteno, dissolveram 2 mg de Zeatina em 200 µl de Metanol, adicionaram 1 ml de Iodato de Sódio (0,01 M) e deixaram incubada durante 20 minutos. Em seguida adicionaram 50 µl de Etilenoglicol, retiraram 120 µl desta solução para ser misturada com 10 mg de OVA dissolvidas em 3 ml de água e 50 µl de Carbonato de Potássio (1%). Após 1 h adicionaram 120 µl de NaBH₄ (2mg.ml⁻¹) e incubaram por mais uma hora. O pH foi ajustado à 5,0 com Ácido Acético e depois de duas horas a solução foi dializada com água. O conjugado foi armazenado a -18°C.

Para a obtenção de conjugados de citocininas, que são capazes de induzir a produção de anticorpos, cada trabalho utilizou metodologias específicas. Apesar disso, todos obtiveram sucesso na produção de anticorpos. Sendo trabalhos distintos, não se pode estabelecer uma comparação fidedigna da qualidade dos anticorpos que, provavelmente, variaram em função das metodologias utilizadas. Como resultado dessas variações, existem distorções nos resultados que levaram a divergências quanto a sensibilidade e especificidade dos anticorpos produzidos pelos diferentes grupos de pesquisas.

Apesar da existência de poucos trabalhos quanto à produção de anticorpos para giberelina, WEILER & WIECZOREK (1981) conjugaram GA₃ com BSA. O processo utilizado foi diferente dos demais métodos utilizados para a conjugação de auxina e citocininas, indicando não existir uma padronização na metodologia de conjugação de haptenos destinados à produção de anticorpos.

2.1.5 Imunização

A imunização varia de acordo com o animal. Em coelhos, a imunização com conjugados, geralmente, se faz através da inoculação de vários pontos, com cerca de 100 µl, no dorso do animal. Em aves, igualmente, pode-se inocular vários pontos no músculo peitoral. Após a imunização, o organismo começa a produzir anticorpos, ou imunoglobulinas que são receptores presentes na membrana (linfócitos B) e as proteínas de secreção que são os anticorpos. Durante esse processo ocorre a produção de diversos anticorpos e existe uma variação no tempo para cada classe (Figura 1).

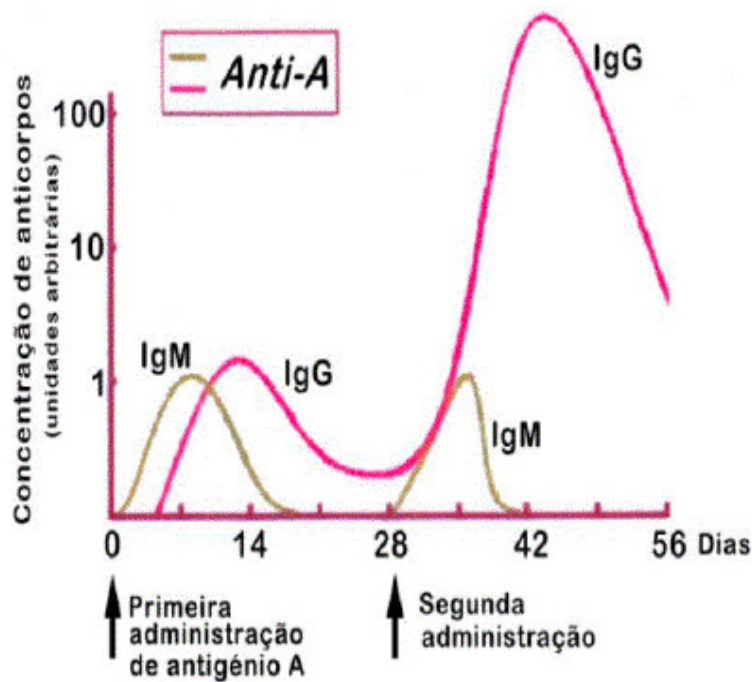


Figura 1. Comportamento da produção de anticorpos após a imunização dos animais. Fonte: Carlos Sinogas – material didático.

A reação antígeno-anticorpo é não-covalente e ocorre devido ao encaixe físico e às forças de atração (pontes de Hidrogênio, forças eletrostáticas, força de van der Waals e de hidrofobicidade). Quanto mais intensa é a interação antígeno-anticorpo, maior será a afinidade e, por conseguinte a especificidade dos anticorpos. A sensibilidade não está diretamente relacionada à especificidade, mas à capacidade de interação, independentemente do reconhecimento específico de um antígeno.

Em termos práticos, a especificidade refere-se à perfeita identificação de um fragmento do antígeno (epítipo) e a sensibilidade à capacidade de reconhecimento geral de diferentes epítipos presentes numa preparação antigênica. Assim, quanto maior for a sensibilidade, menor será a especificidade, e vice e versa. A afinidade refere-se à força de ligação entre o antígeno e o anticorpo, a especificidade diz respeito que cada anticorpo reconhecerá apenas um antígeno, o que interfere na reação cruzada, enquanto a sensibilidade e a quantidade de moléculas que são necessárias para ser reconhecida pelo anticorpo.

Na produção de anticorpos em aves, após a imunização os anticorpos predominam no soro, em seguida, cerca de duas semanas, nas gemas encontra-se maior quantidade de anticorpos.

O título dos anticorpos aumenta com os reforços. MUNENE (2004) utilizou reforços no intervalo de 15 dias para a produção de anticorpos. WOOLEY & LANDON (1995), BOLLEN et al. (1996) a cada mês fizeram um reforço com inoculação do antígeno distribuído entre quatro e seis pontos. Já HANSEN et al. (1998) utilizaram intervalos de três semanas. Como os anticorpos são transferidos às gemas, torna-se mais viável a coleta dos ovos do que o soro das aves. Enquanto coleta-se cerca de 1-2 ml de soro, pode-se obter até 15 ml em cada ovo.

WEILER (1981) imunizou coelhos adultos, com 12-16 semanas de idade, com uma emulsão do conjugado obtido com adjuvante completo de Freund na relação 1:1 (o mesmo utilizado para imunizar aves). O autor concluiu que o adjuvante foi capaz de induzir maior

resposta imune e ainda apresentar a característica de liberar lentamente o antígeno. Na imunização de animais a mistura do conjugado com adjuvante aumenta a resposta imune, favorecendo a produção de anticorpos, e ainda retarda a liberação do antígeno no organismo do animal, garantindo, dessa forma a produção de anticorpos por um período mais prolongado. O adjuvante de Freund é o mais utilizado, sendo composto por água, óleo e lisado de bactérias. Na primeira imunização geralmente se utiliza adjuvante completo e nos reforços o incompleto. Essa estratégia demonstra-se mais eficiente que as demais adotadas na imunização de animais (BOLLEN et al., 1996).

2.1.6 Extração e purificação

A obtenção dos anticorpos consiste no isolamento de proteínas no soro do animal ou em gemas de ovos. A obtenção de amostras contendo anticorpos varia de acordo com os animais em estudo. Nos mamíferos retira-se sangue dos animais para obter soro contendo os anticorpos para o uso nos ensaios imunoenzimáticos, enquanto nas aves, os anticorpos devem ser purificados a partir das gemas, uma vez que os lipídios estão presentes em grande quantidade nas gemas, dificultando, ou até mesmo, limitando o seu uso direto em ensaios imunoenzimáticos. A presença de lipídios exige a purificação das IgY. Esse fato não acontece quando trabalha com soro de animais, que podem ser utilizados, mesmo sem a prévia purificação de anticorpos, em teste ELISA.

Para a escolha do método para a purificação do anticorpo deve se levar em consideração a estrutura do anticorpo para obter alta eficiência no processo. Para a concentração das imunoglobulinas existem várias formas, entre elas, a precipitação com solução salina (Sulfato de Amônia ou de Sódio), filtração em Sephadex ou biogel, centrifugação, cromatografia em DEAE-celulose ou pela combinação desses métodos (KABAT, 1968). Na purificação dos anticorpos produzidos em mamíferos na maioria das vezes predomina a precipitação do soro com solução saturada de Sulfato de Amônia, seguida de centrifugação, e posterior dissolução do precipitado. MUNENE (2004), relata que a purificação de IgY é simples. Após a purificação dos anticorpos deve-se realizar testes para verificar se são capazes de reconhecer o antígeno e determinar a sensibilidade dos mesmos, ou seja, qual a quantidade mínima do antígeno que o anticorpo consegue reconhecer.

Para isolar IgY das gemas a maioria dos métodos utilizam Sulfato de Amônio ou PEG. Nos trabalhos disponíveis na literatura predomina a metodologia, às vezes com adaptações, descrita por AKITA & NAKAI (1992). Conforme MUNENE (2004), a técnica consiste na diluição da gema, com água ácida (pH 2,5), na relação de 1: 10, seguido do ajuste do pH para 5,0. A solução é mantida durante uma noite a 4°C, e posteriormente centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos. No sobrenadante, separado do precipitado, se adiciona 19% de Sulfato de Amônio e se mantém mais uma noite a 4°C. O precipitado contendo IgY, obtido após a segunda centrifugação da solução durante 20 minutos a 10.000 x g, é dissolvido em PBS ou solução salina, para posterior armazenamento e uso.

HANSEN (1998) utilizou os mesmos procedimentos, no entanto, com algumas modificações, principalmente em relação ao tempo de incubação da solução. Ao invés de uma noite, manteve a suspensão incubada durante 6 h a 4°C antes de retirar o sobrenadante para centrifugar durante 15 minutos a 10.000 x g. Tanto para IgG quanto para IgY, se pode realizar uma diálise para retirar excesso de sal presente nas preparações de anticorpo, em função do processo de purificação.

Os anticorpos apresentam duas cadeias, uma pesada e uma leve. Quando as proteínas são desnaturadas ocorre a fragmentação das cadeias, formando duas bandas, uma pesada e uma leve. Com esse método torna-se possível a separação das duas partes e a revelação da presença de outras proteínas nas amostras.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é amplamente utilizada com a finalidade de se caracterizar preparações protéicas de origem animal e vegetal. Com esta técnica torna-se bastante viável se avaliar a pureza dos preparados de anticorpos. O princípio do método consiste na capacidade de separação de proteínas, conforme sua massa molecular, através da indução do deslocamento com a aplicação de um campo elétrico (LEHNINGER et al. 1995).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nas instalações e infra-estruturas disponíveis da parceria entre LCTV-DFITO-IA, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda e o Laboratório de Imunologia-IB, sob a responsabilidade do prof. Dr. Ronald Bastos Freire, ambos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

2.2.1 Conjugação das moléculas hormonais (haptenos) com proteínas (carreadores)

2.2.1.1 Conjugação de AIA-BSA com Hidrocloro de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC)

O conjugado AIA-BSA foi preparado com a mistura de uma solução de BSA (SIGMA[®]) na concentração de 31,74 μ M e outra de AIA (SIGMA[®]) com 1.015,68 μ M, totalizando no final, um volume de 10 mL, conforme MALDINEY et al. (1986) com algumas modificações. A conjugação do AIA com o BSA ocorreu na presença de Hidrocloro de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC) (SIGMA[®]).

Para a obtenção do conjugado AIA-BSA, preparou-se uma solução com 20 mg de BSA dissolvidas em 2 mL de tampão PBS (pH 7,2) e o pH elevado para 8,3 com Hidróxido de Sódio (VETEC[®]). A solução do AIA foi obtida após dissolver 2 mg de AIA em 1,2 mL de água bidestilada e 2,4 mL de Dimetilformamida (VETEC[®]). A solução de AIA foi adicionada, gota a gota, à solução de BSA, sob agitação e temperatura ambiente. O pH foi ajustado à 8,3 com NaOH (VETEC[®]) e o volume completado para 10 mL com água destilada. Em seguida, 21 mg de EDPC foram divididas em quatro partes iguais, e cada parte foi adicionada em intervalos de duas horas à solução de AIA-BSA, que foi mantida sob agitação durante 8 horas, no escuro e à 4 °C.

O conjugado foi submetido a diálise contra 300 ml de água, à 4°C, com duas trocas diárias durante 72 horas (Figura 2). O conjugado resultante foi distribuído em alíquotas de 1000 μ L e congelado a - 20 °C para uso posterior.

As concentrações do hapteno e do carreador foram usadas numa proporção de 32:1, respectivamente, esperando-se que 32 moléculas de hapteno conjugassem à cada molécula de proteína.



Figura 2. Diálise de conjugado contra água destilada à 4 °C com duas trocas diárias durante 72 horas.

Os espectros das soluções de AIA, BSA e do conjugado foram obtidos para determinar os comprimentos de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$). Colocou-se 1,0 mL do conjugado (AIA-BSA), diluído 4 vezes, em uma cubeta de quartzo com um passo ótico de 1 cm. Para ter o controle, utilizou-se água bidestilada para zerar o aparelho. Em seguida foi realizada uma leitura da densidade ótica entre os comprimentos de onda 208 e 280 nm. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções de AIA e BSA.

Para o AIA preparou-se uma solução, na concentração de 1 M, usando Dimetilformamida e água, na relação 1:1, como solvente. A absorbância do BSA foi obtida a partir de solução na concentração de 31,74 μ M, equivalente a concentração da molécula no conjugado. Todas as observações foram realizadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV e visível.

2.2.1.2 Conjugação de AIA-OVA com Hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC)

O conjugado AIA-OVA foi preparado com a mistura de uma solução de OVA (SIGMA[®]), na concentração de 31,74 μ M, com uma de AIA (SIGMA[®]), na concentração de 1.015,68 μ M, totalizando no final, um volume de 10 mL.

O AIA e OVA foram conjugados na presença de Hidrocloreto de N-N-Dimetilaminopropil-N-Etil-Carbodiimida (EDPC) (SIGMA[®]). Para a obtenção do conjugado, 14,28 mg de OVA foram dissolvidas em 2 mL de tampão TBE pH (8,3). A solução de AIA foi obtida após dissolver 2 mg de AIA em 1,2 mL de água bidestilada e 2,4 mL de Dimetilformamida. A solução de AIA foi adicionada, gota à gota, a solução de OVA. A mistura foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente, o pH foi determinado e o volume completado à 10 mL com água bidestilada. Em seguida, 21 mg de EDPC foram divididas em quatro partes iguais, e cada parte foi adicionada em intervalos de duas horas à solução de AIA-OVA, que foi mantida sob agitação durante 8 horas, no escuro e à 4 °C.

As concentrações de hapteno e de carreador foram usadas numa proporção de 32:1, respectivamente, esperando-se que 32 moléculas do hapteno conjugassem com cada molécula do carreador (OVA).

A solução foi submetida à diálise à 4 °C contra 300 ml de água com duas trocas diárias durante 72 horas. O conjugado resultante foi distribuído em alíquotas de 1000 μ L e congelado a - 20 °C para uso posterior.

Os espectros das soluções de AIA, OVA e do conjugado AIA-OVA foram obtidos para a determinar os $\lambda_{\text{máx}}$. Colocou-se 1 mL do conjugado (AIA-OVA), diluído 4 vezes, em uma cubeta de quartzo com um passo ótico de 1 cm. Para obter o controle, utilizou-se o valor da leitura de água bidestilada. Em seguida foi realizada uma leitura da densidade ótica entre 208 e 280 nm. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções de AIA e OVA.

Para o AIA foi preparado uma solução, na concentração de 1M, dissolvido em Dimetilformamida e água bidestilada (1:1). O espectro UV da OVA foi obtido empregando-se concentrações equivalentes à concentração desta molécula no conjugado (31,74 μ M). Todas as leituras foram realizadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV e visível.

2.2.1.3 Conjugação de AIA-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin - hemocianina) com Hidrocloreto de N-N-dimetilaminopropil-N-etil-carbodiimida (EDPC)

O conjugado KLH-AIA foi preparado com a mistura de uma solução de KLH (SIGMA[®]) (31,74 μ M) com uma de AIA (SIGMA[®]) (1.015,68 μ M), e o volume completado à 10 mL. O AIA e o KLH foram conjugados na presença de Hidrocloreto de N-N-Dimetilaminopropil-N-Etil-Carbodiimida (EDPC). Para a obtenção do conjugado, 142,83 mg

de KLH foram diluídas em 2,0 mL de tampão TBE pH (8,3). No preparo da solução de AIA utilizou uma mistura de 1,2 mL de água e 2,4 mL de Dimetilformamida para dissolver 2,0 mg de AIA.

A solução de AIA foi adicionada, gota à gota, à solução de KLH, sob agitação, temperatura ambiente, o pH determinado e o volume completado para 10 mL com água destilada. Em seguida, um total de 21 mg de EDPC foram divididas em quatro partes iguais, e cada parte foi adicionada em intervalos de duas horas à solução de AIA-KLH, que foi mantida sob agitação durante 8 horas, no escuro e à 4 °C.

Após a adição da EDPC, colocou-se 360 mg de NaCl à solução para aumentar a solubilidade. As concentrações de hapteno e de carreador foram usadas numa proporção de 32:1, respectivamente, esperando-se que 32 moléculas de hapteno conjugassem com cada molécula de KLH.

A solução foi submetida à diálise à 4 °C contra 300 ml de água com duas trocas diárias durante 72 horas. O conjugado resultante foi distribuído em alíquotas de 1000 µL e congelado a - 20 °C para uso posterior.

Os espectros das soluções de AIA, KLH e do conjugado foram obtidos para determinar os comprimentos de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$). Foi colocado 1 mL do conjugado AIA-KLH, diluído 16 vezes, em uma cubeta de quartzo com um passo ótico de 1 cm. Para ter o controle, utilizou-se água para zerar o aparelho. Em seguida foi realizada uma leitura da densidade ótica das soluções, entre os comprimentos de onda 208 e 280 nm.

Para o AIA preparou-se uma solução (1M) utilizando uma mistura de Dimetilformamida e água (1:1) como solvente. A absorvância da KLH foi obtida usando uma solução diluída 64 vezes em relação a concentração de KLH existente no conjugado (31,74µM), pois a solução de KLH é turva, devido a baixa solubilidade da proteína. Todas as observações foram realizadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV e visível.

2.2.1.4 Produção de conjugados de citocininas

Os conjugados das citocininas, zeatina (SIGMA[®]) ou 2ip (SIGMA[®]), foram obtidos de acordo com a metodologia de WEILER (1980). Os conjugados de BSA-2ip, BSA-zeatina, OVA-2ip, foram preparados com uma relação de 10 mg do hapteno com 110 mg de proteína carreadora, enquanto para OVA-zeatina, utilizou-se 5 mg do hapteno e 55 mg de proteína carreadora. Durante o preparo dos conjugados, primeiro preparou-se uma solução com cada molécula, hapteno ou proteína, e posteriormente, misturou-se a solução do hapteno com a solução da proteína, obtendo uma relação em torno de 26 moléculas de hapteno para cada molécula de proteína carreadora.

Para a obtenção dos conjugados hapteno-proteína, 10 mg de cada hapteno, zeatina ou 2ip, foram diluídas em 1 mL de Metanol (VETEC[®]). As soluções foram misturadas com 5 mL de Periodato de Sódio (0,01M) (VETEC[®]), gota à gota, distribuídas durante, cerca, de sete minutos. As soluções foram agitadas durante 13 minutos e depois se adicionou 0,3 mL de Etilenoglicol (0,1M) (VETEC[®]). Após 5 minutos, as soluções de cada hapteno foram transferidas para uma das soluções de proteína, OVA ou BSA, para formar o conjugado de interesse. As soluções de proteínas carreadoras, foram preparadas na relação de 110 mg de BSA ou OVA em 5 mL de água e o pH ajustado para 9,3 com K₂CO₃ à 5% (VETEC[®]).

Durante a adição da solução do hapteno na solução de proteína, o pH foi mantido entre 9,2 e 9,3 com adição de K₂CO₃. Após 60 min, foram adicionadas 5 mg de NaBH₄ (VETEC[®]) e depois de 40 min adicionou-se mais 5 mg. No final o pH foi ajustado à 6,5 com Ácido Acético (1M) (VETEC[®]) e a solução mantida sob agitação durante duas horas.

Os conjugados foram submetidos à diálise à 4 °C (em geladeira) contra 300 ml de água com duas trocas diárias durante 72 horas, e em seguida foram divididos em alíquotas de 1,0 mL e congelado a - 20 °C para uso posterior.

Os espectros das soluções dos haptenos, proteínas e dos conjugados foram obtidos para determinar os comprimentos de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$). Foi colocado 1 mL de cada conjugado, diluído 4 vezes, em uma cubeta de quartzo com um passo ótico de 1 cm, utilizando água como branco para zerar o aparelho. Foi realizada uma varredura entre os comprimentos de onda 260 e 280 nm para cada solução. Para o 2ip utilizou uma solução com 1M, dissolvido em Metanol e água (1:1). O espectro UV das proteínas foi obtido usando uma solução com 31,74 μ M. Todas as observações foram realizadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV e visível.

2.2.2 Produção e caracterização de anticorpos

Para a produção de anticorpos contra AIA e 2ip foram utilizados, para imunização, coelhos da raça Califórnia pesando aproximadamente 2 Kg, doados pelo Instituto de Zootecnia (IZ) da UFRRJ. Os animais foram mantidos em gaiola, recebendo ração comercial e água potável à vontade (Figura 3). Cada coelho foi imunizado com um conjugado de um hormônio.



Figura 3. Coelho mantido no biotério para a imunização e obtenção de anticorpos contra hormônios vegetais.

Além dos coelhos, também foram utilizadas galinhas da linhagem HY Line Brown pesando aproximadamente 2 Kg, doadas pelo IZ da UFRRJ. As aves foram mantidas em gaiolas, recebendo 140 g de ração ao dia e água potável à vontade (Figura 4) e cada uma imunizada com um conjugado específico.

As galinhas foram imunizadas com os conjugados específicos, sendo a primeira com AIA-BSA, a segunda com 2ip-BSA e a terceira com zeatina-BSA, possibilitando, dessa forma, a produção de anticorpos contra os três hormônios em estudo, os coelhos sendo utilizados apenas para produzir anticorpos contra AIA e 2ip.



Figura 4. Galinhas mantidas em gaiolas para a imunização e obtenção de anticorpos contra hormônios vegetais.

2.2.3 Preparo da emulsão para inoculação

Foram preparadas emulsões oleosas, nas quais 2,0 ml do conjugado AIA-BSA, 2ip-BSA ou zeatina-BSA foram misturados a igual volume de adjuvante de Freund completo (Difco). As emulsões (antígenos) foram preparadas em câmara de fluxo unidirecional (Figura 5) no dia da imunização. A emulsão foi considerada adequada para inoculação nos animais quando uma gota era colocada em água e não se homogenizava.



Figura 5. Preparo de emulsão do conjugado com o adjuvante de Freund para inoculação dos animais.

2.2.4 Imunização de coelhos

Os coelhos foram imunizados com conjugados de AIA-BSA ou 2ip-BSA. Antes da imunização coletou-se amostras de 500 μ L de sangue, por punção venosa, da veia marginal da orelha. Os coelhos foram inoculados intradermicamente pelo método de múltiplos sítios, em 40 pontos dorsais, com 100 μ L de inóculo em cada (Figura 6).

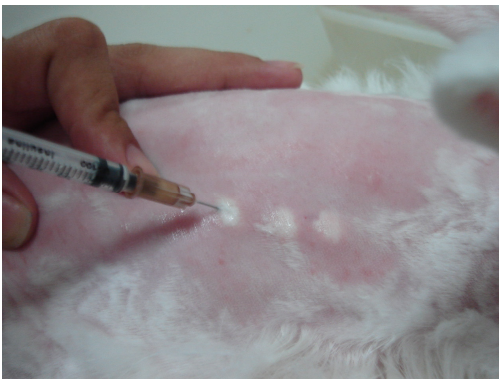


Figura 6. Inoculação intradérmica do antígeno, em coelho, pelo método dos múltiplos sítios.

Os animais receberam reforços subcutâneos com 500 μ L da mistura de 1,0 ml do conjugado com 1,0 mL de adjuvante de Freund incompleto (Difco). Os coelhos receberam reforços com intervalos de duas semanas, conforme LI et al. (2003).

2.2.5 Imunização de aves

Amostras de sangue foram coletadas em três galinhas HY Line Brown antes da imunização e usadas como controle negativo no teste de ELISA de captura. Cada galinha foi imunizada com conjugado específico, sendo uma com AIA-BSA, outra 2ip-BSA e a terceira com Zeatina-BSA.

Para imunizar as galinhas utilizou-se uma mistura, na relação 1:1, do conjugado com adjuvante completo de Freund. As inoculações foram intramusculares, no músculo peitoral. Os reforços, utilizando conjugado e adjuvante incompleto de Freund, também na relação 1:1, foram inoculados em intervalos de duas semanas. Após seis semanas da inoculação, os ovos foram coletados diariamente (REDIG et al. 1996), e utilizados nos testes de sensibilidade.

Os ovos eram estocados a 4°C por até um mês para serem usados. Ovos pré-imunização foram coletados por sete dias antes da imunização (MUNENE, 2004).



Figura 7. Imunização de galinhas com inoculação do conjugado com adjuvante completo de Freund no músculo peitoral.

2.2.6 Coleta de sangue em coelhos e em galinhas

Nos coelhos, coletava-se amostras de 500 μ L de sangue por punção venosa da veia marginal da orelha, antes do início da imunização, em intervalos de uma semana, durante sete semanas seguidas. Em seguida, o soro era utilizado nos testes de sensibilidade através da imunodifusão para detectar a capacidade de reação dos anticorpos às moléculas hormonais em estudo.

Nas galinhas coletava-se amostras de sangue na veia da asa esquerda e adotava os mesmos procedimentos para verificar a capacidade de reação dos anticorpos.

2.2.7 Sangria e preparação do soro

A sangria dos coelhos foi realizada pelo método de punção cardíaca, retirando, cerca de, 50 mL de sangue com seringa esterilizada. O sangue foi colocado em frasco de vidro esterilizado com capacidade de 200 mL, vedado com papel alumínio e mantido a temperatura ambiente durante duas horas para coagular.

Após este período houve a separação do soro e o coágulo (Figura 8), sendo retirado o soro com uma pipeta com cuidado de não haver aspersão do coágulo.



Figura 8. Obtenção do soro a partir da amostra de sangue coletada na veia marginal da orelha do coelho.

Posteriormente, foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos à 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um frasco de vidro e mantido a 4°C por uma noite.

O coágulo foi mantido durante uma noite a 4°C para haver contração e liberação de mais soro. Na manhã seguinte, o soro obtido foi separado e centrifugado nas mesmas condições anteriores e o coágulo foi descartado. As duas frações de soro foram transferidas para mesmo recipiente. Posteriormente, a amostra foi fracionada em alíquotas de 1 mL e armazenada a 20°C negativo. Nas alíquotas em uso, adicionou-se Merthiolate, sendo posteriormente mantida a -4°C.

2.2.8 Purificação de IgG

A purificação dos anti-soros foi realizada conforme KABAT (1968) e HARLOW & LANE (1988). A amostra de soro foi precipitada através da adição, sob agitação à temperatura ambiente, de igual volume de solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,35 M) à 4°C. A solução foi mantida durante 1h, à 4°C e depois, centrifugada a 10.000 x g, durante 20 minutos. O precipitado foi dissolvido com solução de Sulfato de Amônia (19%) e agitada lentamente (cerca de 50 rpm) durante 30 minutos. A solução foi centrifugada novamente e o precipitado foi suspenso em tampão PBS, pH (7,2). A solução foi dialisada contra água destilada por 72 horas com duas trocas diárias da água e posteriormente armazenada a -20°C.

2.2.9 Isolamento e purificação de IgY

Os ovos foram coletados, identificados quanto a galinha e a data, armazenados em geladeira e utilizados para o isolamento das IgY's. Para o isolamento, a gema foi separada da clara, lavada com água destilada e envolvida em papel toalha a fim de remover o máximo de albumina aderida na superfície da gema. Posteriormente, perfurou-se a membrana da gema, retirou-se o líquido da gema e transferiu-se para um béquer (MUNENE, 2004).

Para a purificação de IgY's adotou-se os métodos que se utiliza água ácida, Clorofórmio, Sulfato de Amônia e água gelada (4°C).

Em todos os métodos, a gema foi diluída 10 vezes com água bidestilada esterilizada, acrescentando-se 10% (v/v) de Sulfato de Dextrana (P.M. inferior a 5000.000, Sigma, USA). A precipitação de globulinas foi realizada de acordo com cada método.

No método que se utiliza Sulfato de Amônia, na gema diluída em água, na relação 1:10, adicionou-se mesmo volume de solução saturada de Sulfato de Amônia. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para purificar as IgY.

Na precipitação das IgY's com Clorofórmio adicionou-se 50% do volume de Clorofórmio na solução com gema diluída em água, na relação 1:10.

No método que utiliza água ácida, a gema foi diluída na relação de 1:10 com água acidificada com HCl (100mM) com pH 2,5. Em seguida a solução foi agitada durante alguns minutos, o pH ajustado à 5,0, e o diluído foi mantido durante uma noite a 4°C (MUNENE, 2004).

A precipitação em água gelada (4°C) consistiu na diluição da gema com água gelada (4°C), na relação de 1:10, em seguida o diluído sendo mantido na geladeira durante uma noite.

Após a precipitação, em todos os métodos, o sobrenadante contendo IgY (MUNENE, 2004) foi centrifugado a 10.000 x g durante 20 minutos. No sobrenadante obtido adicionou-se, cerca de, 19% de Sulfato de Amônio e manteve-se durante mais uma noite a 4°C. O precipitado contendo IgY foi obtido após nova centrifugação da solução durante 20 minutos a

10.000 x g. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em PBS (0,01M KH_2PO_4 , 0,01M Na_2HPO_4 , 0,15M NaCl pH 7,4) e armazenado a -20°C para uso posterior.

2.2.10 Teste de sensibilidade (imunodifusão)

A resposta do anticorpo foi monitorada comparando anticorpos isolados após cada reforço (inoculação) pelo teste de imunodifusão (Figura 9).

Em gel de agarose realizou-se orifícios com um molde (3 mm de diâmetro), em cada um, sendo aplicados 15 μL (1) soro, (2) do conjugado inoculado, (3) do conjugado de captura, (4) de outro conjugado de captura, (5) do carreador usado no inóculo, (6) do carreador de captura e (7) do hapteno (Figura 9).

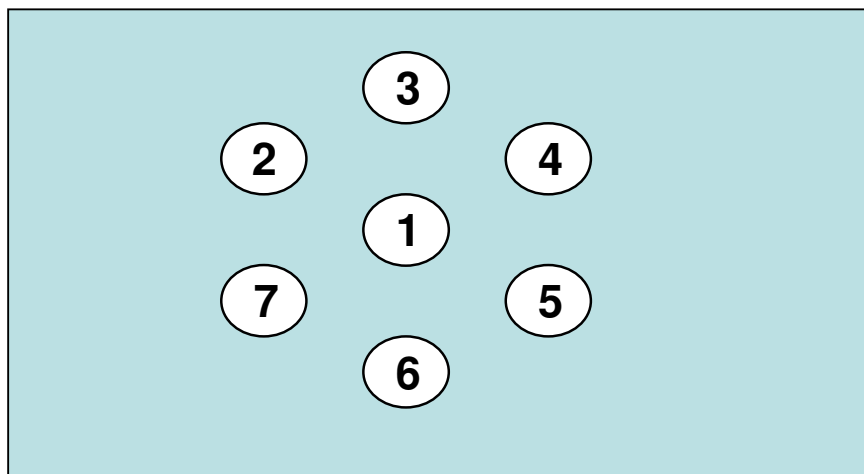


Figura 9. Teste de imunodifusão em gel de agarose. Soro – 1; Conjugado inoculado (AIA-BSA) – 2; Conjugado de captura (AIA-OVA) - 3; Outro conjugado de captura – 4 (AIA-KLH); Carreador usado no inóculo (BSA) – 5; Carreador de captura (OVA) – 6 e hapteno (AIA) – 7.

Caso haja reconhecimento do anticorpo com as demais soluções forma uma linha de precipitação na direção do orifício da molécula específica.

2.2.11 Caracterização de anticorpos por SDS-PAGE

Os anti-soros purificados foram caracterizados através de eletroforese em gel de Poliacrilamida na presença de Lauril-Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 10%, em aparelho de minigel (Miniprotean II, BIO-RAD) com corrente constante de 40mA durante 55 minutos à temperatura ambiente.

Amostras de 20 μL , contendo 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram inseridas em cavidades do gel de Poliacrilamida. A separação das moléculas no gel, conforme o peso molecular, ocorre em função do coeficiente relativo de migração das moléculas no gel. Após a fixação dos géis e a coloração com azul de Comanssie (R640) a 0,25%, são revelados diversos pontos no gel que existem moléculas, indicando a capacidade de migração de cada molécula, podendo ser associado para estimar o peso molecular de cada molécula. Caso haja evidência de apenas duas bandas no gel, fica evidente a ausência de moléculas na amostras que não sejam anticorpos específicos às moléculas de interesse.

2.2.12 Caracterização dos anticorpos com ELISA

A caracterização dos anticorpos utilizando o teste ELISA consistiu-se em verificar a capacidade dos anticorpos a reconhecerem as moléculas dos hormônios em estudo.

A titulação consistiu-se em combinações de diferentes diluições, em série, dos anticorpos e dos conjugados das moléculas hormonais com proteínas carreadoras, permitindo dessa forma, definir as diluições ótimas tanto dos anticorpos quanto dos conjugados.

O processo foi realizado em placas de ELISA com 96 orifícios, obtidos na combinação de oito linhas e 12 colunas. Os anticorpos foram diluídos nas linhas enquanto os conjugados nas colunas. A metodologia foi comum a todos os procedimentos, utilizando os conjugados e anticorpos específicos para cada hormônio vegetal.

Na primeira etapa, colocou-se 100 μL de tampão carbonato/bicarbonato em cada orifício, em seguida colocou-se 100 μL do conjugado, na diluição 1:20, na primeira coluna, misturou bem, retirou-se 100 μL e transferiu-se para a coluna seguinte, e assim foi até a penúltima coluna, obtendo dessa forma, 11 diluições em série. Após a diluição do conjugado manteve-se a placa durante duas horas a 37°C, ou uma noite na geladeira, em seguida lavou-se com tampão PBS + 0,05% de Tween 20 e secou-a. Na segunda etapa, colocou-se 100 μL do anticorpo em estudo na primeira linha, a diluição foi da mesma forma do antígeno, manteve-se a placa durante duas horas a 37°C, lavou-se com tampão PBS + 0,05% de Tween e secou a placa novamente. A diluição inicial do anticorpo variou entre 1:10 até 1:100, de acordo com a origem dos anticorpos obtidos, aves ou coelhos. Na terceira etapa, adicionou-se 100 μL do anticorpo anti-espécie conjugado à enzima peroxidase e diluído 1:20000. Na titulação dos anticorpos obtidos em coelhos utilizou-se anti-IgG e para os anticorpos obtidos em gemas de ovos de galinhas utilizou-se anti-IgY. Em seguida as placas foram mantidas durante uma hora a 37°C, lavadas com tampão PBS + 0,05% de Tween e secas. Por fim, adicionou-se 200 μL do substrato ortho-phenylene diamine (OPD), manteve durante 20 minutos, no escuro e temperatura ambiente. A reação foi paralisada com Ácido Sulfúrico (concentrado) e realizada a leitura das densidades ópticas.

Para o AIA, foram realizadas outras titulações, utilizando o anticorpo mais concentrado.

A partir da titulação, definiu-se as concentrações ideais do conjugado e do anticorpo e realizou-se ELISA de competição, para verificar as menores concentrações dos haptenos que o anticorpo consegue detectar.

O processo da competição consistiu-se na sensibilização das placas com os conjugados nas concentrações ideais, definidas na etapa anterior (titulação). Paralelamente, em outra placa de ELISA, adicionou-se 100 μL de tampão PBS em todos os orifícios e na primeira coluna, utilizando quatro repetições, adicionou-se 100 μL de solução contendo o hapteno na concentração de 50 nM. A partir desta concentração realizou-se 20 diluições em série, trabalhando com concentrações variando entre 50 nM e 0,1 pM. Em seguida adicionou-se o anticorpo específico contra a molécula em estudo na concentração determinada na titulação, manteve durante duas horas a 37°C. Em seguida, a mistura da solução do hormônio com o anticorpo foi transferida para a placa que havia sido sensibilizada com tampão carbonato/bicarbonato. Manteve-se durante duas horas a 37°C, lavou-se com tampão PBS + 0,05% de Tween 20 e secou a placa. Posteriormente inseriu o anticorpo anti-espécie conjugado com a enzima peroxidase, manteve durante 2 horas a 37°C, lavou-se com tampão PBS + 0,05% de Tween 20 e secou a placa. Por fim, adicionou-se 200 μL do substrato OPD, manteve durante 20 minutos, no escuro e temperatura ambiente. A reação foi paralisada com Ácido Sulfúrico (concentrado) e realizada a leitura das densidades ópticas.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A conjugação dos haptenos com as proteínas carreadoras foi avaliada conforme as diferenças dos valores das absorvâncias dos haptenos, das proteínas carreadoras e dos conjugados. Além disso, verificou-se a capacidade do conjugado em provocar resposta alérgica nos animais imunizados.

As metodologias utilizadas na conjugação das moléculas de auxina e citocininas com as proteínas OVA, BSA e KLH demonstraram serem viáveis, pois ocorreram diferenças nos espectros de absorvâncias dos conjugados com o das proteínas carreadoras ou dos haptenos (hormônios). A diferença no espectro de absorvância do conjugado com os espectros de absorvância dos haptenos e das proteínas carreadoras indica que obteve uma nova estrutura molecular, com maior massa molecular que os haptenos, e com a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos aos haptenos conjugados às proteínas carreadoras.

A Figura 10 mostra que o conjugado AIA-BSA apresentou menor espectro de absorvância que a solução de AIA ou de BSA. Essa divergência demonstra que houve conjugação de moléculas de AIA com moléculas de proteína (BSA) resultando em menor absorvância no conjugado.

A solução de AIA foi a que apresentou maior absorvância (Figura 10), no entanto, apresentou a mesma tendência do BSA nos diferentes comprimentos de ondas que se realizou as leituras. Entre os comprimentos de ondas adotados (208-280 nm), o pico da absorvância para o AIA foi em torno de 222 nm (Figura 10). MUNENE (2004) verificou que a partir de 210 nm o BSA apresenta tendência de redução da absorvância, o mesmo sendo observado no presente trabalho.

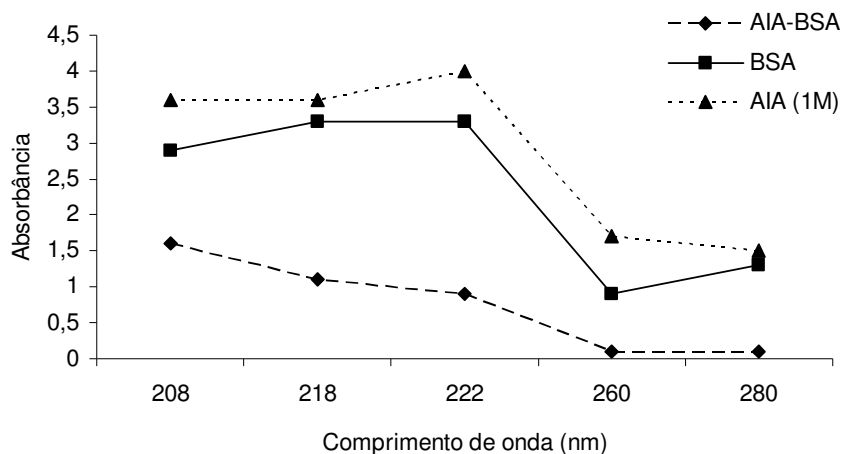


Figura 10. Valores de absorvância das soluções de AIA, BSA e conjugado AIA-BSA.

No conjugado AIA-OVA verificou-se a mesma tendência do conjugado com BSA, no entanto, a diferença do espectro de absorvância do AIA e da OVA foi menor que a diferença verificada com o BSA. O espectro de absorvância foi inferior aos obtidos para o AIA e para OVA (Figura 11).

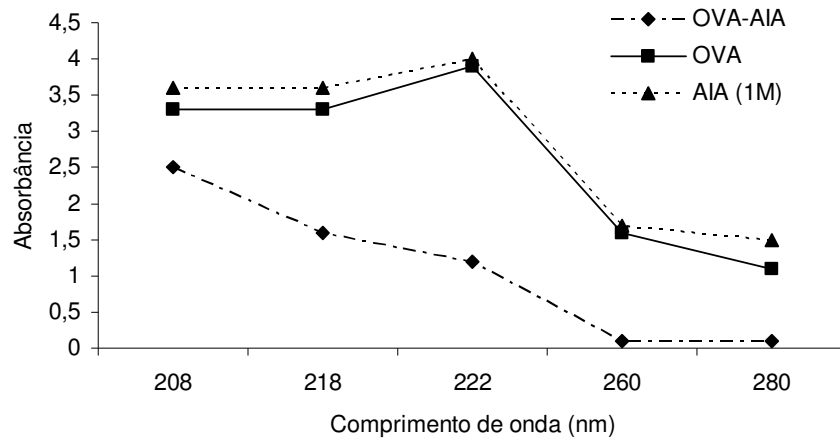


Figura 11. Valores de absorvância das soluções de AIA, OVA e do conjugado AIA-OVA.

No conjugado AIA-KLH verificou-se aglomerados de difícil solubilidade, comprometendo o seu uso na imunização dos animais. A solução apresentava coloração turva, diferente quando utilizou BSA ou OVA como proteína carreadora.

O espectro de absorvância do KLH foi inferior aos obtidos para BSA e OVA. Essa divergência pode ser atribuída às características específicas dessa proteína, a qual apresenta maior massa molecular que as demais. Na Figura 12 observa-se que houve variação no espectro do hapteno da proteína carreadora e do conjugado.

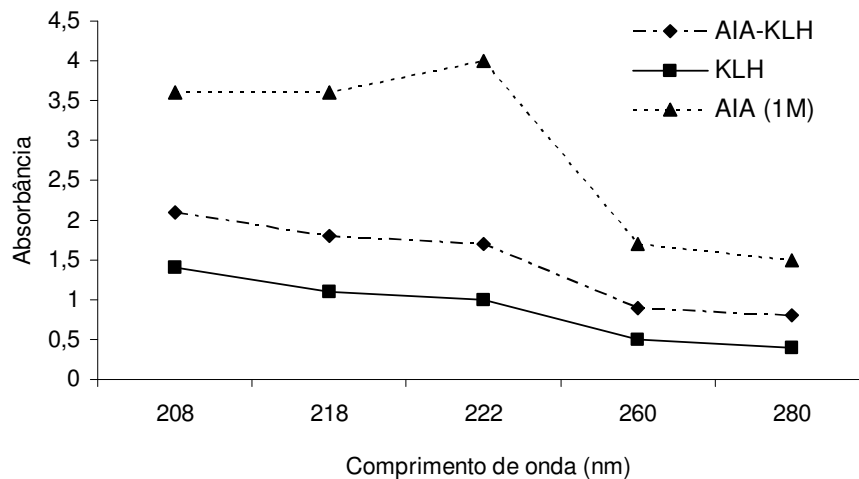


Figura 12. Valores de absorvância das soluções de AIA KLH e do conjugado AIA-KLH.

As citocininas demonstraram comportamento diferente do AIA quanto a diferença do espectro de absorvância quando comparado com a proteína carreadora. Esse fato pode estar associado com a massa molecular dessas moléculas, uma vez que o AIA apresenta menor massa molecular que as duas citocininas em estudo.

A solução do 2ip apresentou maior absorvância que a solução de BSA, e não houve variação ampla dos resultados obtidos para o conjugado (Figura 13).

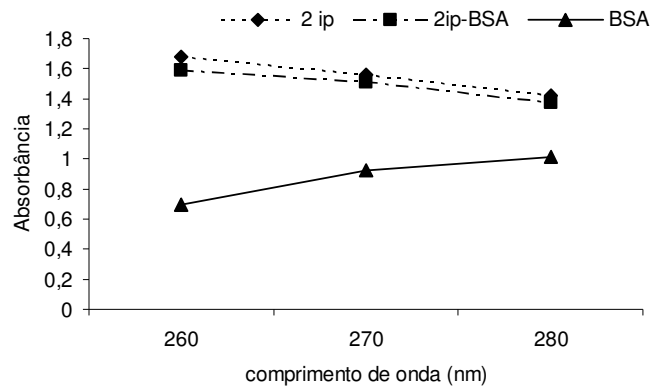


Figura 13. Valores de absorvância das soluções de 2ip, BSA e do conjugado 2ip-BSA.

2.3.1 Imunização dos coelhos e das galinhas

O método utilizado para imunizar os animais demonstrou eficiência para induzir a produção de anticorpos, uma vez que, logo após a imunização, iniciou a resposta alérgica nos animais, caracterizada pela formação de ondulações, com coloração vermelha intenso (Figura 14), e quente. Esses efeitos são atribuídos em resposta ao antígeno, do conjugado, inoculado nos animais.

As características observadas coincidem com as descritas na reação de Arthus, na qual ocorre a formação de precipitado de antígeno anticorpo no ponto de inoculação do antígeno em um animal altamente imunizado.



Figura 14. Resposta alérgica dos coelhos após a inoculação do conjugado AIA-BSA.

2.3.2 Purificação de IgG

A metodologia adotada para purificar as IgG's produzidas nos coelhos demonstrou-se viável, pois com a adição do Sulfato de Amônia, ocorreu a precipitação das IgG's (Figura 15).

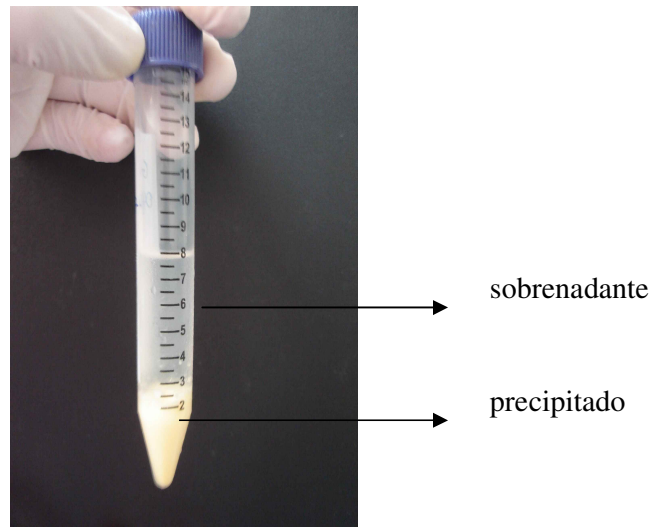


Figura 15. Precipitação de soro, obtido em coelhos, com Sulfato de Amônia.

2.3.3 Teste de sensibilidade (imunodifusão)

Segundo FORTE (2004) a imunodifusão trata-se de uma reação de precipitação em meio de agarose, resultando na formação de halos de precipitação na zona de excesso de anticorpo.

A reação de precipitação no teste de imunodifusão ocorreu com o conjugado específico utilizado na imunização dos animais como para a proteína carreadora (Figura 16). Após quatro horas, ficou evidente a formação de halos de precipitação apenas na direção das moléculas que foram reconhecidas pelos anticorpos contidos no soro (Figura 16), indicando que o soro possui anticorpos específicos a determinadas moléculas.

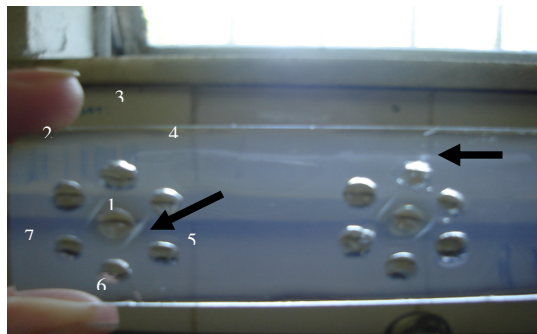


Figura 16. Revelação do teste de imunodifusão utilizando soro obtido em coelho e vários conjugados ou haptenos. Soro – 1; Conjugado inoculado (AIA-BSA) – 2; Conjugado de captura (AIA-OVA) - 3; Outro conjugado de captura – 4 (AIA-KLH); Carreador usado no inoculo (BSA) – 5; Carreador de captura (OVA) – 6 e hapteno (AIA) – 7.

A Figura acima, diante do princípio do método, revela que houve a formação do precipitado apenas no orifício contendo o hapteno conjugado com BSA, o mesmo inoculado no animal. Sendo assim, no soro não havia anticorpos capazes de reconhecerem os demais haptenos conjugados com os carreadores.

Esse método permite detectar a presença de anticorpos contra antígenos em soros (RAMIREZ, 2007), o que possibilita comprovar a capacidade do antígeno em induzir a produção de anticorpos, ou até mesmo a indicação de antígenos mais viáveis para obter anticorpos para tais antígenos como foi relatado no trabalho de COSTA (2003).

2.3.4 Isolamento e purificação de IgY

Apesar de predominar o uso de água ácida para precipitar IgY (MUNENE, 2004), para os hormônios vegetais em estudos, esse método não foi viável. O método, independente do hormônio em estudo, que apresentou melhor resultado foi com o uso de água gelada (4°C), isso não sendo reportado na literatura.

Após a diluição das gemas com água ácida ou água gelada (4°C) houve alteração na coloração das soluções. A diluição das gemas com água ácida ocasionou a formação de uma solução com coloração clara, aparência de leite, enquanto a diluição com água gelada (4°C) proporcionou a coloração amarela clara (Figura 17) e a formação de precipitado no fundo do recipiente, o que não houve com a diluição com água ácida.



Figura 17. Solução de gemas diluídas com água ácida (esquerda) ou água gelada (direita).

A precipitação com água gelada se iniciou, cerca de, 45 minutos (Figura 18) após a diluição das gemas, enquanto na diluição com água ácida o fato não ocorreu, mesmo após 48 horas da diluição.

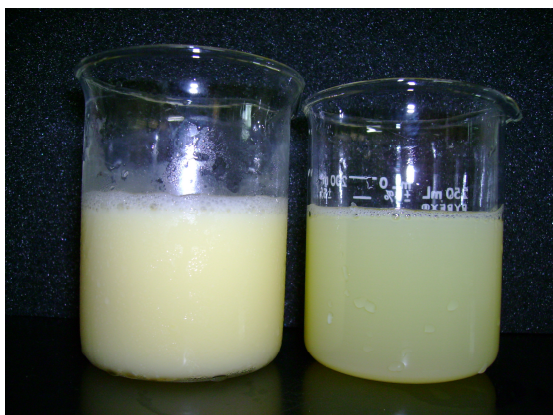


Figura 18. Precipitação das IgY's após 45 minutos do preparo. Esquerda água ácida e a direita com água gelada (4°C).

Na figura 19 observa-se a aparência das soluções, após 12 horas da diluição das gemas com água gelada ou com água ácida.



Figura 19. Comparação da precipitação de IgY's após 12 horas da diluição. A esquerda o método utilizando água gelada (4°C) e a direita o método utilizando água ácida.

Essa divergência quanto a eficiência da precipitação das IgY's em estudos com os relatos na literatura pode ser explicada devido as características das moléculas, pois não há relatos da produção de anticorpos em aves contra hormônios vegetais. Apesar de apresentar algumas vantagens em relação aos anticorpos obtidos nos mamíferos, ainda predomina a produção em mamíferos, principalmente em coelhos. Entretanto, a produção de anticorpos em aves apresenta uma série de vantagens, destacando-se a melhor qualidade na maioria das vezes, rendimento e facilidade na obtenção dos anticorpos.

No caso da precipitação das IgY's contra AIA com água ácida ou com Sulfato de Amônia ocorreu a formação de uma camada na superfície da solução, não havendo a formação de precipitados (Figura 20).



Figura 20. Dificuldade na precipitação de IgY's contra AIA com os métodos utilizando água ácida ou Sulfato de Amônia.

Devido as características específicas de cada molécula em estudo, há necessidade de ajustar métodos específicos para precipitá-las, o que ocasiona dificuldades na obtenção de anticorpos contra as moléculas, quando se utiliza protocolos disponíveis na literatura para outras moléculas. Apesar da maioria dos trabalhos utilizar água ácida para precipitar as IgY's, esse método não demonstrou-se eficiente para precipitar IgY's contra as moléculas hormonais em estudo.

2.3.5 Caracterização de anticorpos por SDS-PAGE

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), possuem duas cadeias “leves” (25 kD) e duas cadeias pesadas (50 kD), as quais são ligadas entre si por pontes de dissulfeto, formando estrutura simétrica em Y (GIL et al., 1999).

A desnaturação do anticorpo, proteína, ocasiona a fragmentação dessas duas cadeias, obtendo dessa forma, dois grupos de moléculas com mesmo peso molecular (Fab ou Fc) na mesma amostra. Sendo assim, é possível verificar a existência de outras moléculas na amostra do anticorpo, uma vez que o método de SDS-PAGE revela as duas bandas separadas, as quais caracterizam a estrutura de anticorpos desnaturados.

Nas amostras de anticorpos obtidos em coelhos, o SDS-PAGE, apontou a presença de proteínas interferentes no perfil de bandas das IgG's de coelho e o mesmo não foi observado nas amostras obtidas em galinhas (Figura 21).

Os resultados indicaram que a purificação de anticorpos a partir de gemas de ovos de galinhas permitiu obter anticorpos com maior pureza quando se compara com os anticorpos obtidos em soro de coelhos (Figura 21), indicando que as IgY apresentaram maior potencial de uso prático em testes imunológicos.

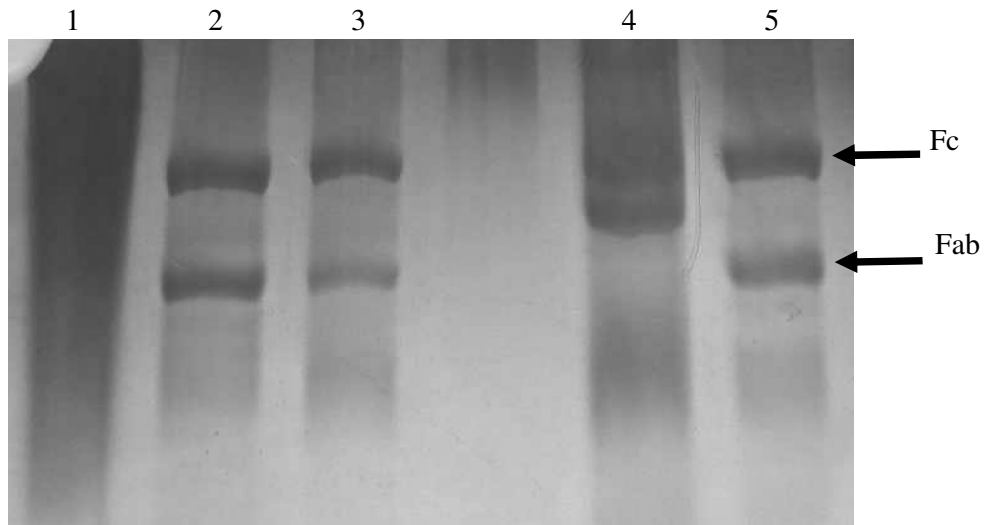


Figura 21. SDS-PAGE dos anticorpos anti-hormônios purificados de soro de coelho e de gema de ovos de galinhas, evidenciando a cadeia pesada (Fc) e a cadeia leve (Fab) do anticorpo. 1 e 4- IgG anti-AIA e anti-2ip respectivamente, 2 e 3 - IgY anti-AIA e 5 - IgY anti-2ip.

Nos anticorpos obtidos em galinhas para os três hormônios (AIA, zeatina e 2ip) não se observou a presença de proteínas interferentes nas amostras, uma vez que ficou evidente a separação das duas bandas dos anticorpos (Figura 22), diferente do que foi observado para o AIA e 2ip obtido em coelho (Figura 21). Sendo assim, os anticorpos obtidos nas aves apresentaram melhores resultados quanto a purificação (Figura 22) e conseqüentemente maior potencial de uso na dosagem desses hormônios.

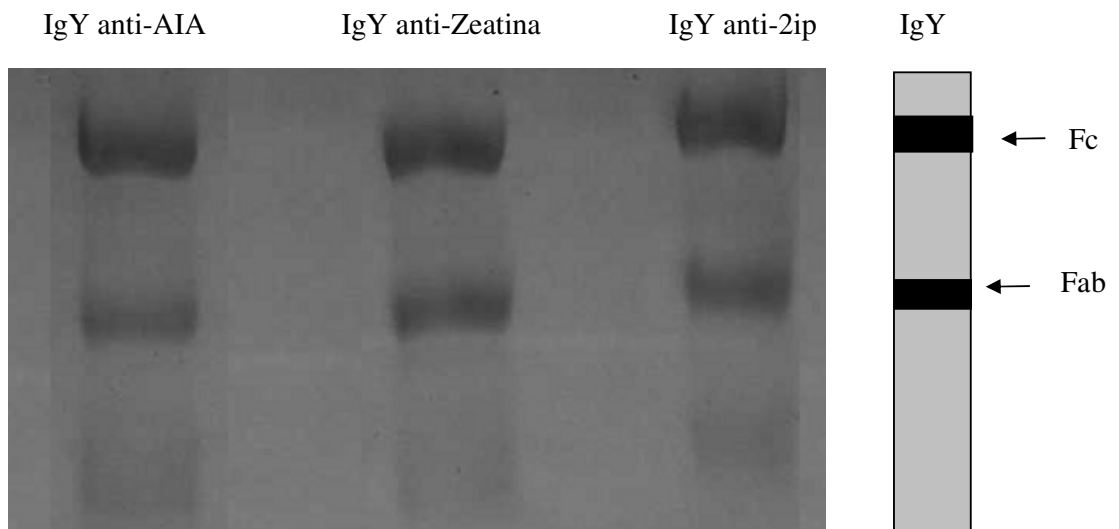


Figura 22. SDS-PAGE dos anticorpos obtidos a partir de gemas de ovos de galinhas, evidenciando a cadeia pesada (Fc) e a cadeia leve (Fab) do anticorpo.

2.3.6 Caracterização dos anticorpos com ELISA

O teste ELISA revelou a capacidade dos anticorpos obtidos em reconhecer as moléculas hormonais em estudo, pois ocorreu reação positiva com a alteração na coloração das amostras após a revelação. Para o AIA e o 2ip comparou-se as respostas das IgG's e IgY's, enquanto para a Zeatina estudou somente IgY.

Para o AIA e 2ip comparou-se as respostas dos anticorpos obtidos em coelhos e gemas de ovos de galinhas. Os resultados obtidos nos testes ELISA mostraram que os anticorpos contra AIA não apresentaram potencial para serem utilizados em testes quantitativos (Figura 23), inviabilizando o uso desses anticorpos na quantificação de auxina em amostras vegetais. Os resultados indicaram a necessidade de estudar novas estratégias para otimizar a produção de anticorpos contra AIA. Entre as alternativas, o aumento do número de reforços nos animais utilizados na produção de anticorpos pode aumentar significativamente a concentração de anticorpos e, com isto, a sensibilidade para o hapteno, uma vez que os antissoros são policlonais e a concentração relativa de anticorpos anti-haptênicos foi considerada insuficiente para uma aplicação quantitativa em teste ELISA.

A Figura 23 evidencia a baixa sensibilidade dos anticorpos de coelho obtidos após imunização com AIA-BSA. A aplicação rotineira de preparações como esta, de baixa sensibilidade, mesmo que apresentando elevada especificidade, não pode ser efetivada por conta da quantidade de material necessária para a realização de ensaios quantitativos utilizando o teste ELISA.

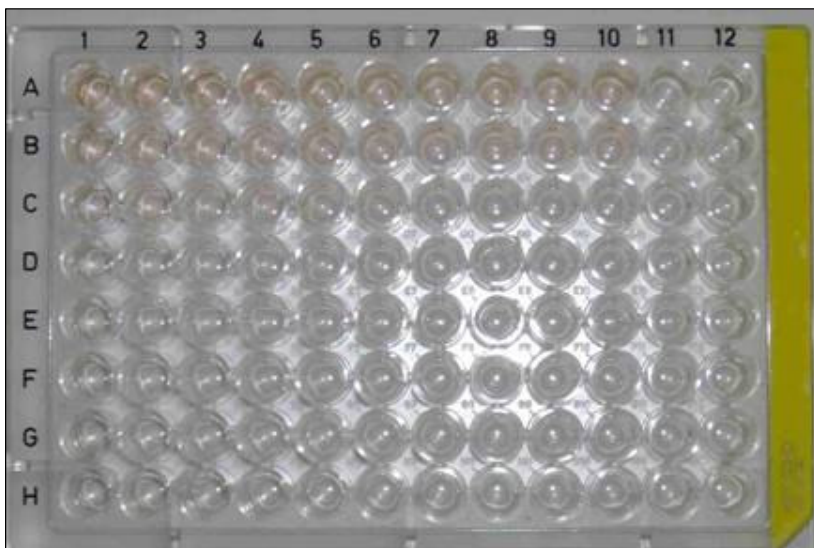


Figura 23. Revelação da placa de ELISA na titulação do conjugado AIA-OVA e anti-AIA.

A Figura 24 mostra a absorbância dos anticorpos contra AIA obtidos em coelhos, em diversas diluições, obtidos após os reforços. Os valores relativamente altos nas menores diluições confirmam ter havido uma resposta inespecífica bastante pronunciada, porém com concentrações de IgG bastante inferiores ao desejável. As absorbâncias elevadas possivelmente ocorreram em função do reconhecimento de diferentes partes do conjugado, sendo que a presença de concentrações de idiótipos de anticorpos, exclusivos para o hapteno, foi desprezível. Esse fato pode ocasionar alto índice de reações cruzadas, uma vez que os anticorpos provavelmente não foram específicos às moléculas de AIA, reconhecendo outras moléculas, assim como a proteína carreadora.

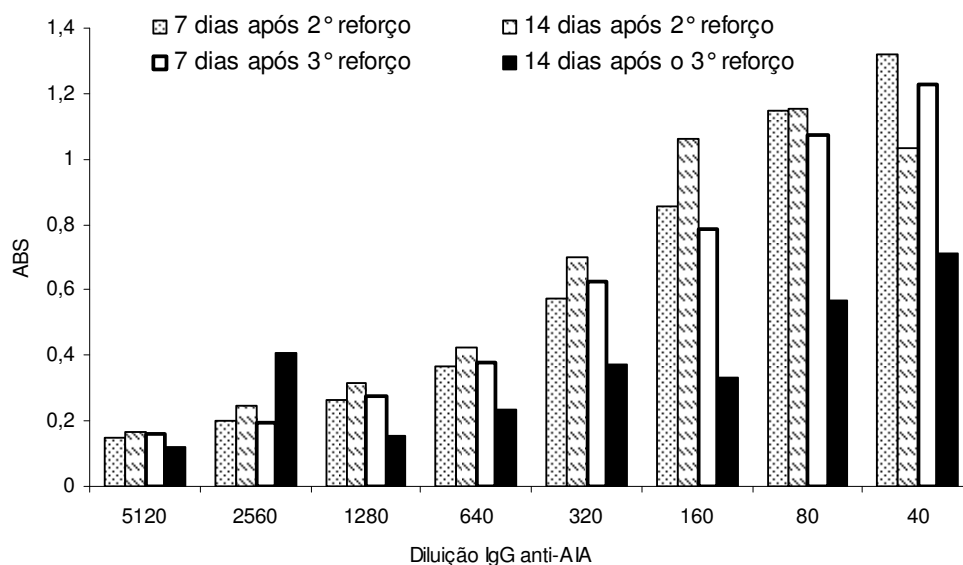


Figura 24. Absorbância de IgG anti-AIA, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

A absorbância dos anticorpos contra AIA, obtidos em galinhas, variou após a imunização e os diversos reforços (Figura 25).

Nas diluições acima de 1:80 os resultados foram bastante semelhantes e com baixa capacidade de detectar o AIA. O melhor resultado foi obtido na diluição 1:10 e com o soro obtido em amostra coletada aos sete dias após o terceiro reforço.

A diluição ótima do anticorpo contra AIA, nas condições adotadas, está muito abaixo das diluições desejáveis para uso em teste ELISA. As DO não apresentaram redução linear de acordo com as diluições do anticorpo (Figura 25).

O prolongamento do período de imunização dos animais, possivelmente, pode ocasionar a produção de anticorpos com melhor qualidade. Na literatura, encontra-se resultados sugerindo que os anticorpos obtidos seis meses após a imunização apresentam maior especificidade e sensibilidade. Outro fato relacionado com a baixa qualidade dos anticorpos obtidos contra o AIA, refere-se a capacidade de resposta dos animais utilizados para imunizar com os haptens conjugados com as proteínas carreadoras.

Para aumentar a sensibilidade dos anticorpos contra AIA deve-se prolongar e aumentar o número de reforços inoculados nas aves, pois o melhor resultado obtido referiu-se aos dados obtidos após o último reforço (Figura 25).

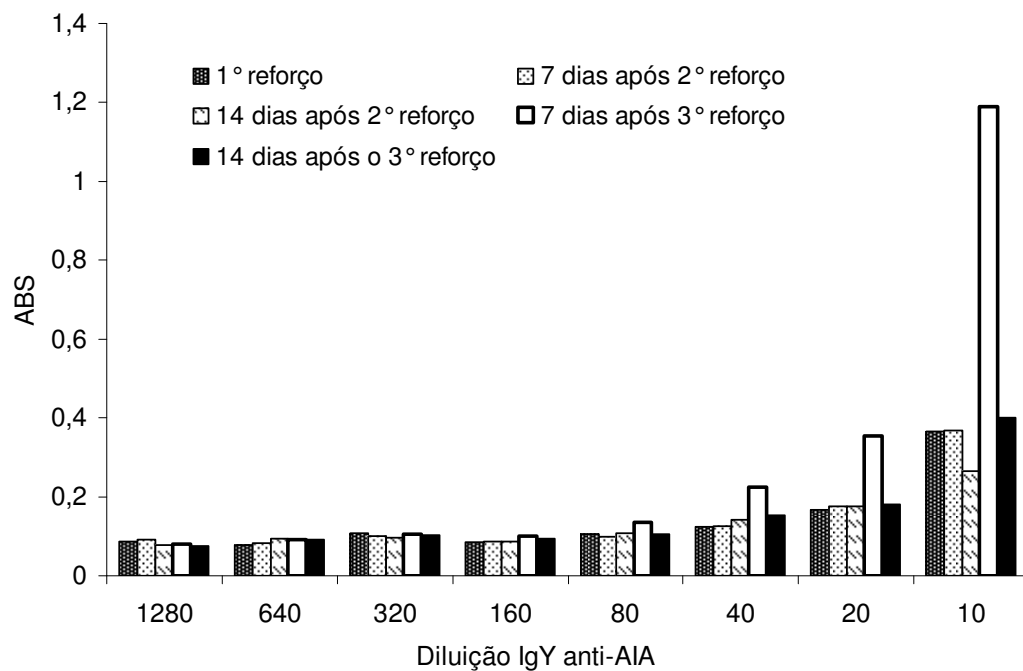


Figura 25. Absorbância de IgY anti-AIA, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

Os anticorpos contra as citocininas apresentaram melhores resultados quando se compara com os anticorpos contra o AIA, pois, mesmo nas maiores diluições, ainda houve reações positivas na titulação do anticorpo contra o conjugado com as moléculas dos hormônios.

Comparando a titulação dos anticorpos contra as citocininas observa que a reação para a zeatina foi mais intensa e mais ampla (Figura 26), ou seja, houve o reconhecimento do conjugado com as moléculas de zeatina mesmo nas maiores diluições, o que não foi observado para o 2ip (Figura 27).

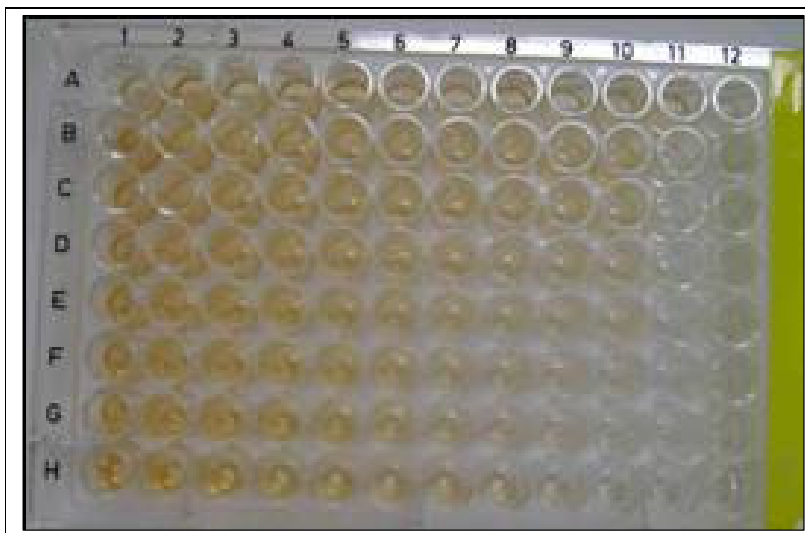


Figura 26. Revelação da placa de ELISA na titulação do conjugado zeatina-OVA e anti-zeatina.

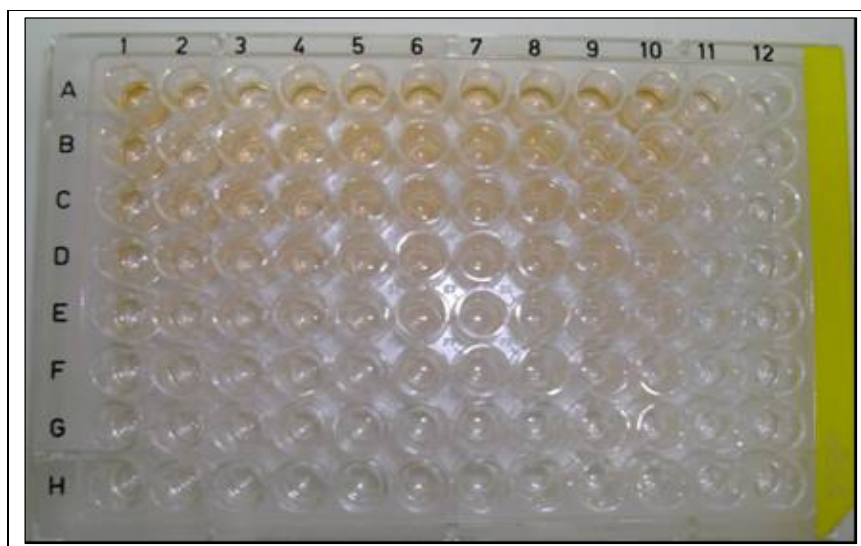


Figura 27. Revelação da placa de ELISA na titulação do conjugado 2ip-OVA com anti-2ip.

As diluições de IgY anti-2ip acima de 1:80 apresentaram absorvância semelhantes e com valores em torno de 25% da máxima obtida, na diluição 1:10. Na diluição 1:20, as amostras obtidas aos 14 dias após o 2° e o 3° reforços apresentaram os melhores resultados. Esses resultados sugerem que os melhores momentos para coletar ovos para purificar as IgY fica próximo aos 7 e 14 dias após o segundo reforço. Nas diluições 1:10 e 1:20, aos 7 dias após o terceiro reforço a absorvância reduziu drasticamente, apresentando tendência de aumento aos 14 dias após o terceiro reforço. Nas diluições maiores esse comportamento não ficou evidente (Figura 28).

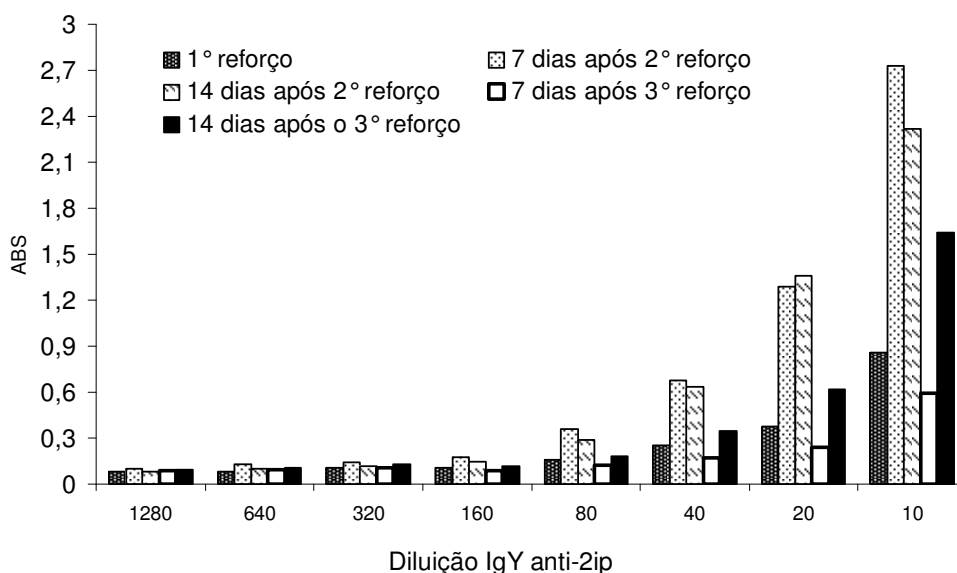


Figura 28. Absorvância de IgY anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

Nos anticorpos obtidos em coelhos contra o 2ip a absorbância não apresentou amplas variações até a diluição 1:320 (Figura 29). No entanto, no teste ELISA não houve reação positiva (alteração na coloração) nessas diluições. Isso confirma a interferência de outras moléculas nas amostras no teste ELISA, como foi sugerido na caracterização dos anticorpos por SDS-PAGE.

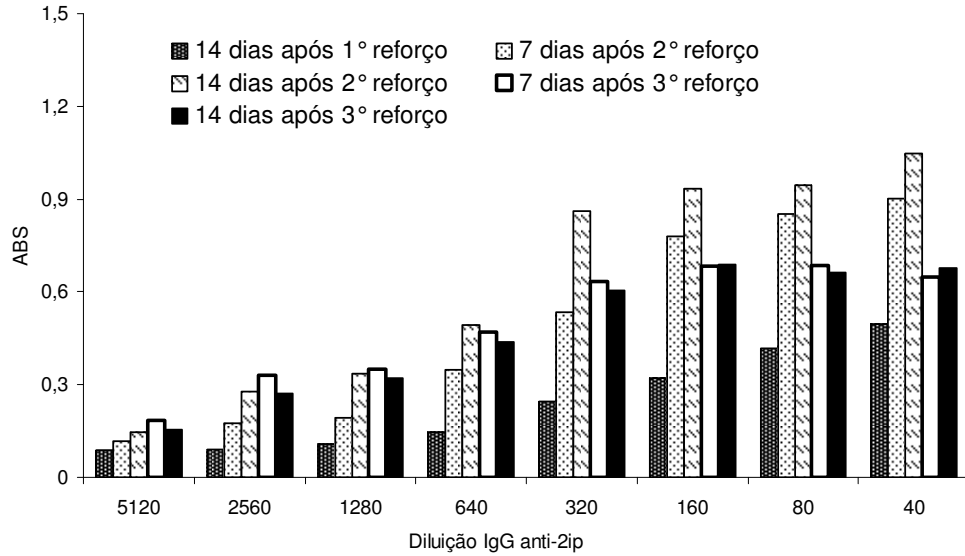


Figura 29. Absorbância de IgY anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

A Figura 30 mostra o comportamento das absorbâncias das IgY contra 2ip, obtidas após os reforços, na faixa de diluição entre 1:10 e 1:80, enquanto na Figura 31, observa-se o comportamento das IgG contra o 2ip.

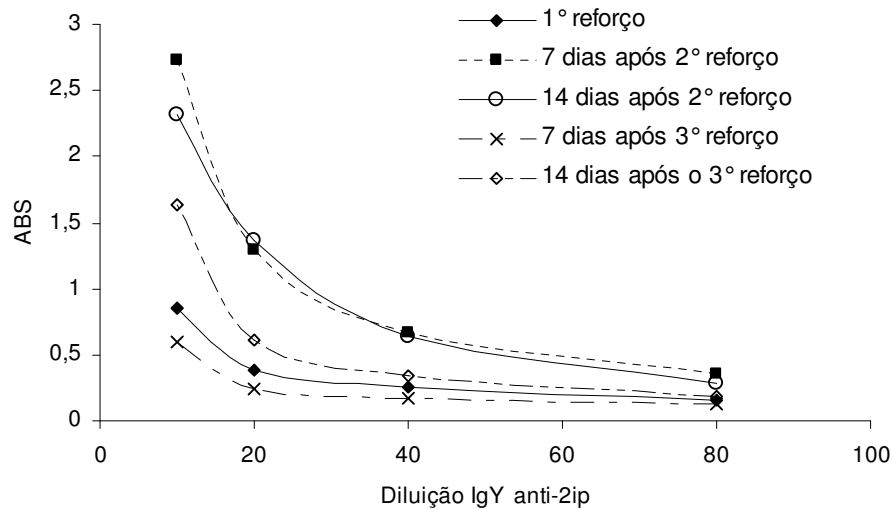


Figura 30. Absorbância de IgY anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

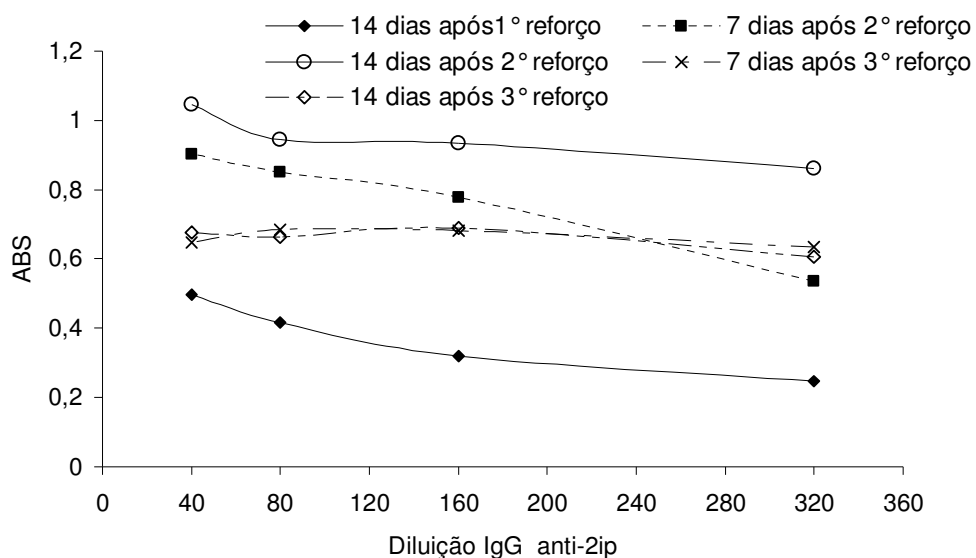


Figura 31. Absorbância de IgG anti-2ip, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

A Figura 32 mostra a resposta de IgY contra Zeatina em vários períodos após os reforços.

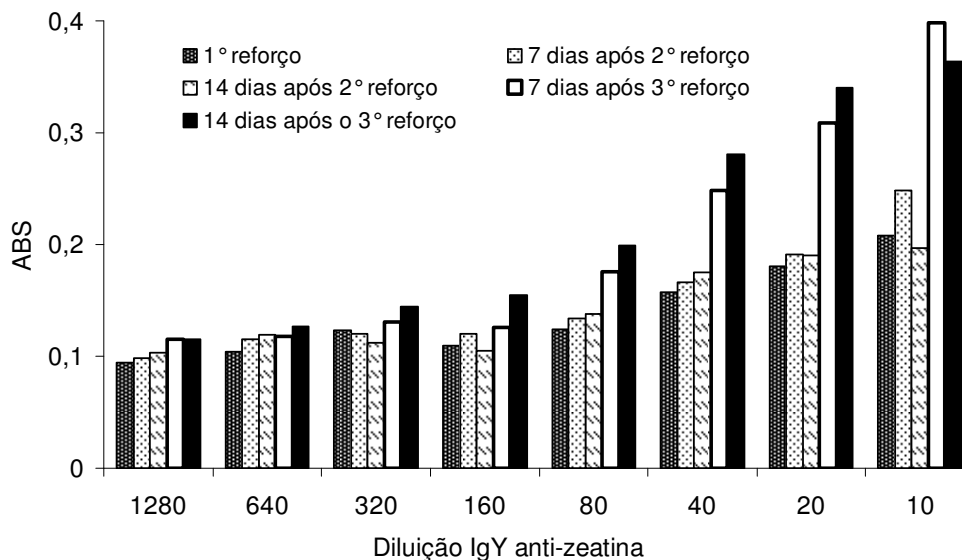


Figura 32. Absorbância de IgY anti-zeatina, em diferentes diluições, obtidas após os diversos reforços.

As variações das absorbâncias dos anticorpos (IgY e IgG) contra AIA estão apresentadas na Figura 33. Aos sete dias após o primeiro reforço não houve reação da IgG contra o AIA, sendo apresentado os valores obtidos a partir da segunda semana do primeiro reforço. A absorbância da IgY da diluição 1:10 apresentou um pico bastante significativo próximo aos 28 dias do primeiro reforço, indicando que seja o melhor momento para utilizar

os ovos para purificar IgY contra AIA. Já na diluição 1:80 não houve esse comportamento, sempre apresentando resultado bastante inferior quando comparado com os demais, deixando evidente que além do período após os reforços, a diluição apresenta extrema relevância para otimizar o uso de anticorpos em ELISA.

Os valores das absorbâncias das IgG's foram superiores aos obtidos nas IgY. No entanto, isso não significa que as IgG's apresentam melhor qualidade que as IgY's, pois como foi apresentado na Figura 21, nas IgG's observou-se a presença de outras proteínas, as quais não são anticorpos específicos para o AIA, ocasionando interferências nos resultados.

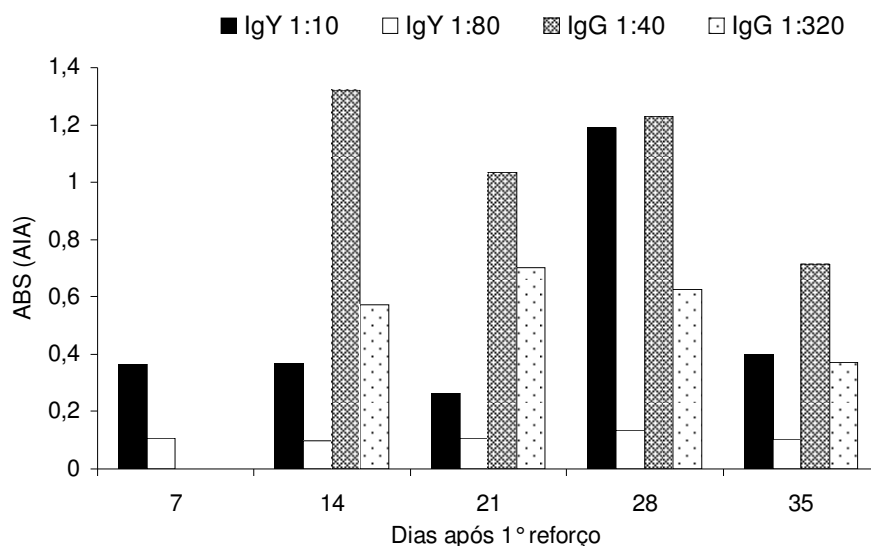


Figura 33. Comparação dos anticorpos anti-AIA obtidos em coelhos (IgG) e galinhas (IgY) após o primeiro reforço.

Para a citocinina 2ip a absorbância da IgY na diluição 1:10 foi superior as obtidas com IgG (Figura 34). Já IgY anti-2ip na diluição 1:80 apresentou os menores valores, o mesmo sendo observado para o AIA (Figura 33).

Enquanto para o AIA o pico do valor da absorbância ocorreu aos 28 dias (Figura 33), para o 2ip ocorreu aos 14 dias após o primeiro reforço, em seguida reduziu até aos 28 dias, e aos 35 dias houve incremento (Figura 34).

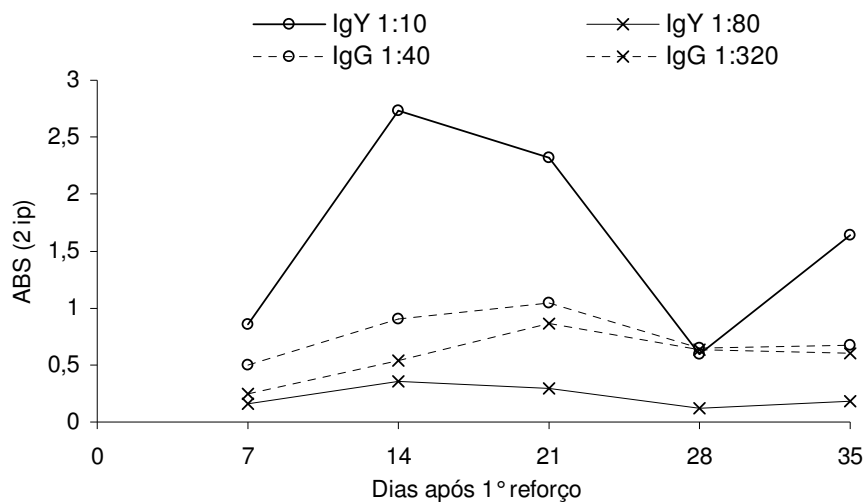


Figura 34. Comparação dos anticorpos anti-2ip obtidos em coelhos (IgG) e galinhas (IgY) após o primeiro reforço.

Para a zeatina a comparação entre os títulos de anticorpos IgY e IgG não foi realizada, uma vez que utilizamos somente aves para induzir a produção de anticorpos para esta molécula de hapteno. Os resultados mais promissores obtidos para o AIA e com 2ip sugerem que os anticorpos obtidos a partir de gemas apresentam maior facilidade na obtenção, além de apresentarem qualidades superiores em termos de sensibilidade, estabilidade e especificidade para os hormônios testados, em relação aos anticorpos obtidos em coelhos.

Como os anticorpos obtidos para AIA e 2ip em coelhos apresentaram proteínas interferentes, o que não ocorreu na produção em galinhas, decidiu-se induzir a produção de anticorpos contra zeatina apenas em galinhas poedeiras. Os anticorpos produzidos em galinhas, não envolvem o sacrifício ou sangrias de animais, além de serem de fácil execução e maior rendimento.

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de produzir, pela primeira vez no Brasil, anticorpos contra hormônios vegetais, a despeito das variações na qualidade dos anticorpos produzidos em coelhos e galinhas para as diferentes moléculas de hormônios vegetais, corroborando com os resultados obtidos por outros grupos de pesquisas.

A comparação entre as qualidades intrínsecas e extrínsecas dos anticorpos obtidos em coelhos com aqueles obtidos em galinhas poedeiras sugere serem os primeiros de baixa especificidade. As IgY's, ao contrário, possibilitaram a realização de ensaios quantitativos, corroborando com a literatura, que sugere serem os anticorpos obtidos em aves mais específicos e sensíveis quando comparados aos obtidos em mamíferos.

A qualidade dos anticorpos anti-AIA provavelmente esta associada com as propriedades químicas da molécula do hormônio, uma vez que existem várias outras moléculas que apresentam características próximas ao AIA, como o Triptofano, o que ocasiona dificuldade em obter anticorpos específicos a molécula.

Os anticorpos anti-zeatina e anti-2ip apresentaram potencial de uso prático, uma vez que reconheceram as moléculas do hormônio quando conjugados com uma proteína.

A produção de anticorpos, contra hormônios vegetais, em coelhos e galinhas demonstrou ser viável para as moléculas de citocininas, apresentando potencial para o futuro, na quantificação dessas moléculas. No entanto, a determinação do balanço hormonal endógeno foi limitada, devido a dificuldade em se obter anticorpos contra AIA utilizando-se

das mesmas características empregadas na obtenção de anticorpos específicos para citocininas.

Sendo os anticorpos anti-citocininas portadores de maior especificidade e sensibilidade, foi possível seu emprego para a realização de quantificações em extratos brutos de partes de plantas mantidas sob cultivo. Foi possível determinar curvas de detecção desses haptenos, assim como curvas de inibição, passíveis de serem utilizadas no estabelecimento do IC50%. Tal índice era decorrente da concentração ideal de hapteno que, uma vez adicionado às placas de sorologia, impedia a ocorrência da metade das reações entre antígeno e anticorpo, representados pelos conjugados presentes nas placas, em relação aos anticorpos anti-citocininas cujos títulos eram previamente conhecidos. Como resultados dos testes ELISA de competição, obteve-se curvas padrão para o 2ip (Figura 35) e de percentagem de inibição de reações para zeatina, 2ip e AIA (Figuras 36, 37 e 38).

Devido a baixa especificidade e sensibilidade referentes ao anti-AIA produzido, tanto em coelhos como em galinhas poedeiras, não foi possível se estabelecer um IC50%, mas tão somente um IC 30% para esta auxina, em torno de 480 pMoles (Figura 40). As concentrações limites para a linearização da resposta para AIA (a partir de 7,0 pMoles) foram sempre superiores àquelas obtidas para zeatina (entre 3,4 e 11 nMoles) e 2ip (6 e 150 pMoles). Uma vez que não foi possível determinar a IC50% para AIA dentro da faixa de linearidade, os dados de competição obtidos foram baseados na IC30% (480 pMoles).

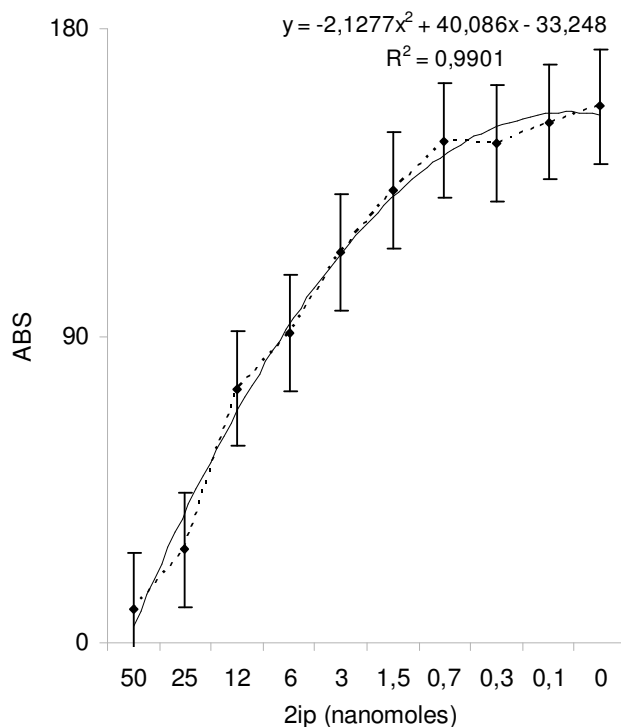


Figura 35. Curva padrão do 2ip.

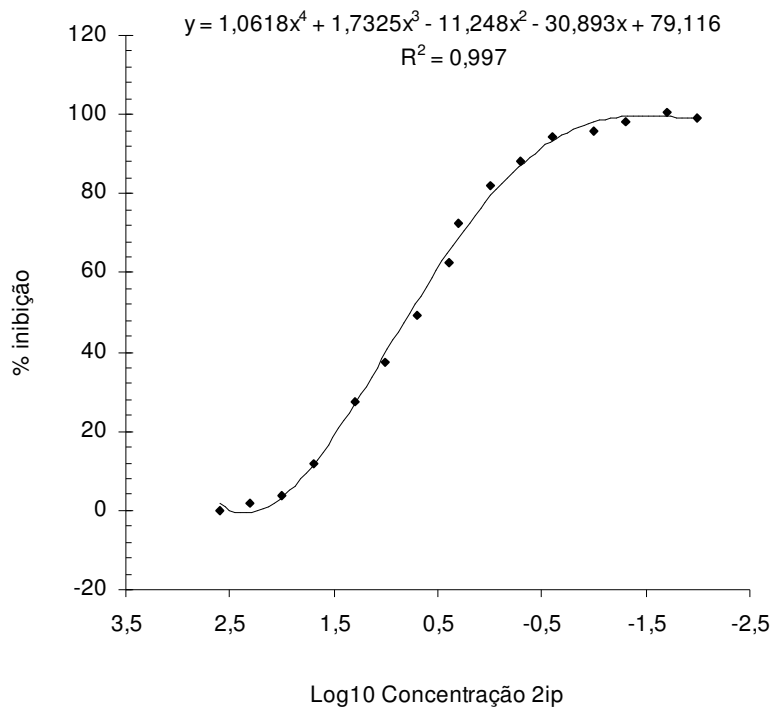


Figura 36. Determinação do índice de competição do 2ip através de ELISA de competição.

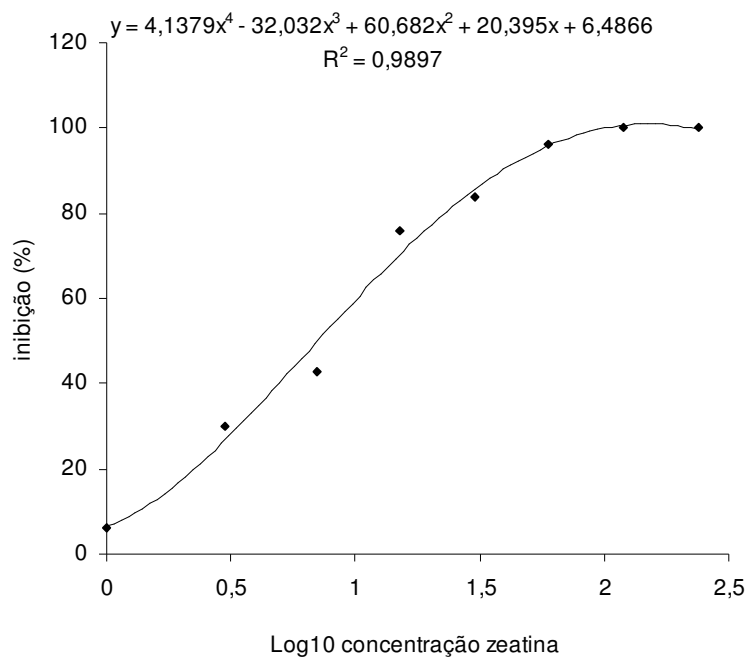


Figura 37. Determinação do IC50 de zeatina, na faixa de 0-50 nanomoles, através de ELISA de competição.

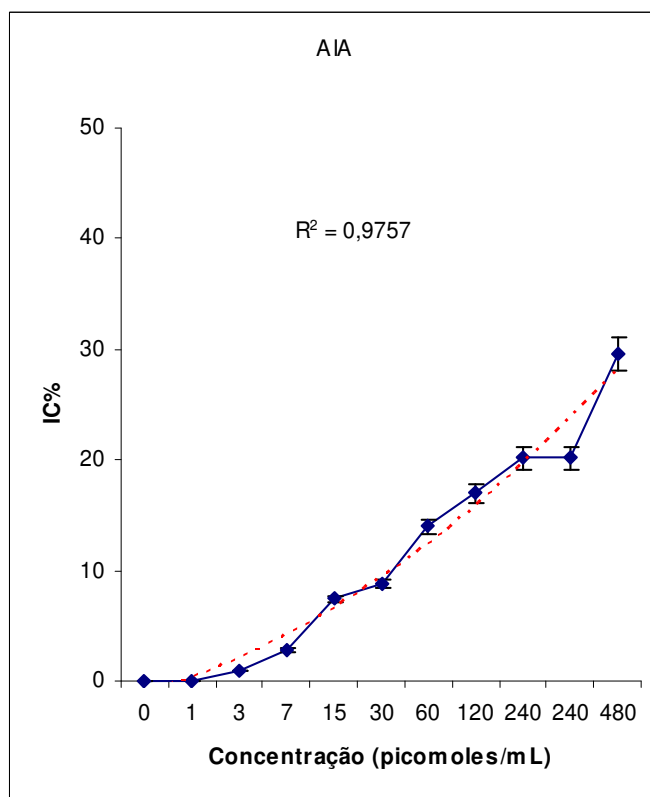


Figura 38. Determinação do IC50 do AIA através de ELISA de competição.

2.4 CONCLUSÕES

A imunização de coelhos e galinhas poedeiras com conjugados de hormônios vegetais com proteínas carreadoras provocou a produção de anticorpos contra moléculas hormonais;

Os anticorpos obtidos foram capazes de reconhecerem as moléculas dos hormônios vegetais em estudo;

A qualidade dos anticorpos obtidos variou entre as espécies utilizadas na produção;

Anticorpos obtidos em galinhas poedeiras apresentaram maior potencial de uso prático que os anticorpos obtidos em coelhos;

Para as moléculas de zeatina e 2ip foi possível determinar a faixa de linearização de resposta de competição, o mesmo não sendo possível para o AIA.

Capítulo II

3 USO DE ELISA E ANTICORPOS POLICLONAIS DO TIPO IgY NA DETECÇÃO DE CITOCININAS EM PLÂNTULAS DE GÉRBERA.

RESUMO

A dosagem de hormônios vegetais pode ser uma excelente alternativa para entender alguns dos eventos fisiológicos que ocorrem nos vegetais. No entanto, o uso como rotina torna-se limitado devido o alto custo, o baixo rendimento e as dificuldades em executar as metodologias utilizadas na determinação das moléculas. Por outro lado, o teste ELISA apresenta potencial de superar essas limitações e ainda permite obter resultados semelhantes aos obtidos em outros métodos. A viabilidade do teste ELISA depende da qualidade dos anticorpos utilizados. O objetivo foi determinar moléculas de zeatina e 2ip em extratos brutos de plântulas de gérbera utilizando anticorpos IgY obtidos em gemas de ovos de galinhas. Os anticorpos utilizados foram obtidos conforme detalhado no primeiro capítulo. Preparou-se extratos brutos de plântulas de gérbera mantidas *in vitro*, da variedade Ornela, em duas fases de desenvolvimento. A primeira, plântulas recém repicadas e a segunda, plântulas com seis semanas após a repicagem. Ambas foram mantidas em meio MS suplementado com 1 mg L^{-1} de BAP. Os anticorpos foram capazes de detectarem moléculas de zeatina e 2ip em amostras brutas. O nível endógeno de zeatina em plantas mantidas durante seis semanas *in vitro* foi superior ao nível determinado em plântulas com uma semana. Para o 2ip os níveis foram semelhantes. Diante dos resultados, verifica-se que é possível determinar níveis de zeatina e 2ip, em extratos brutos, a partir de anticorpos policlonais obtidos em gemas de ovos de galinhas.

Palavras-chaves: dosagem de hormônios; ELISA; gérbera *in vitro*; zeatina e 2ip.

DETECTION OF CYTOKININS IN PLANTLETS OF GERBERA WITH ANTIBODIES IgY FROM CHICKEN EGG YOLK IN TEST ELISA.

ABSTRACT

The plant hormones dosage can be an excellent alternative for understand some of the physiological events in plants. However, the use as practices of routine stay limited due the high cost, low yield and the difficulties in execute the methods utilized in determination of the molecules. The test ELISA presents potential of exceed those limitations and still is going to obtain similar results to them obtained in others methods. The availability of ELISA depends on quality the antibodies utilized. The objective was evaluate the capacity of determine molecules of zeatin and 2ip in crude extracts of plantlets of gerbera utilizing antibodies IgY obtained in chicken eggs yolks. The antibodies utilized were obtained in agreement detailed in the first chapter. It prepared itself crude extracts of plantlets of gerbera maintained in vitro, variety Ornela, in two phases of development. To first, plantlets with on week age and to second plantlets with six weeks age. Both they were maintained in media culture MS supplemented with 1 mg L^{-1} of BAP. The antibodies were capable of detect molecules of zeatin and 2ip in crude extract. The level endogenous of zeatin in plants maintained during six weeks in vitro was over the determined level in plantlets with a week. For the 2ip the levels were similar. A determination of levels of zeatin and 2ip in crude extracts in the plantlets of gerbera was possible with use the antibodies polyclonal obtained in chicken eggs yolks.

Key words: determination plant hormone; ELISA; gerbera *in vitro*; zeatin and 2ip.

3.1 INTRODUÇÃO

Desde 1930 existem relatos de estudos com hormônios vegetais (THIMANN, 1974). A maioria dos estudos, naquela época, estava direcionada para o entendimento do papel dos hormônios vegetais no controle do crescimento e desenvolvimento vegetal.

Na cultura de tecidos vegetais, o uso de moléculas reguladoras do crescimento está associado com a suplementação dos níveis endógenos e o controle da organogênese, pois se acredita que, na maioria das vezes, os tecidos utilizados não possuem níveis endógenos suficientes para induzir determinadas respostas fisiológicas e ainda apresentam baixa capacidade de síntese de hormônios. Neste sentido, alguns autores consideram que o uso de reguladores de crescimento na cultura de tecidos tem o principal objetivo em suprir as necessidades da cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A organogênese é um processo essencial após o período embriogênico nos vegetais e requer um balanço específico para controlar a divisão e a diferenciação celular. POZO et al. (2005) relatam que entre os hormônios vegetais, as auxinas e as citocininas estão mais envolvidas no controle do ciclo celular das células. No entanto, existem várias evidências que indicam a importância de outros hormônios relacionados ao controle do ciclo celular.

Nos primeiros 50 anos de estudos da aplicação de substâncias reguladoras do crescimento em plantas predominava as respostas dos vegetais aos tratamentos com aplicações exógenas de moléculas reguladoras do crescimento. No entanto, a partir de 1980 surgiram alguns trabalhos científicos relacionando com as respostas fisiológicas com a determinação dos níveis endógenos de alguns hormônios vegetais (WELIER, 1980; WELIER, 1981; WEILER & WIECZOREK, 1981). Entretanto, apesar da dosagem de hormônios vegetais ser considerada como uma das principais abordagens para o entendimento do papel do balanço hormonal no crescimento e desenvolvimento vegetal (PITELLI, 2006), essa alternativa não vem sendo adotada como rotina para facilitar o entendimento do processo, uma vez que os métodos demandam reagentes e equipamentos onerosos.

Apesar da existência de vários compostos que apresentam atividade das auxinas, nos tecidos vegetais predomina a molécula de AIA, sendo a mais abundante e de maior relevância fisiológica (BARTEL, 1997; KENDE & ZEEVAART, 1997, TAIZ & ZEIGER, 2004).

As auxinas estão associadas com o alongamento celular, diferenciação de raízes adventícias e em combinação com as citocininas induzem a divisão celular em cultura de calos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Além disso, apresentam efeito na formação de tecidos vasculares, dominância apical, formação e desenvolvimento de embrião (POZO et al. 2005). VANNESTE et al. (2005) ainda relataram que as auxinas estão envolvidas no controle do ciclo celular, principalmente, durante a formação de raízes laterais.

O AIA está presente nos tecidos vegetais em várias formas, a livre, que apresenta atividade fisiológica, a conjugada com outras moléculas como aminoácidos e carboidratos. Com a conjugação do hormônio com outras moléculas ocorre a inativação, devido a perda da atividade biológica (KENDE & ZEEVAART, 1997). Nesse sentido, o nível endógeno de uma molécula com ação hormonal representa todas as moléculas presentes nos tecidos, no entanto, parte das moléculas pode não apresentar atividade biológica.

Apesar da síntese de hormônios vegetais predominar em alguns pontos nas plantas, isso nem sempre ocorre. PERES et. al. (1997) relataram que nos vegetais não existem órgãos especializados na síntese de hormônios, embora possa existir diferenças na capacidade de síntese de cada um. De acordo com NORMANLY (1997) o balanço entre o metabolismo e a síntese de AIA define o nível endógeno de auxina em tecido vegetal, e em consequência desencadeia as respostas fisiológicas.

A ação de uma determinada molécula hormonal envolve três etapas principais: a percepção; a transdução e a resposta (LIBBENGA & MENNES, 1995). A percepção é feita através da ligação do hormônio a um receptor, geralmente uma proteína.

Os mecanismos de ação apresentam especificidade para cada classe hormonal. No entanto, de maneira geral, PERES & KERBAUY (2004) descrevem este mecanismo da seguinte forma:

- Após a ligação, o receptor pode sofrer mudanças conformacionais indo para um estágio ativado que por sua vez inicia um programa molecular que leva a uma resposta específica, desse modo, as proteínas receptoras atuam tanto na detecção como na transdução do sinal;

- Outras moléculas, mensageiros secundários, podem estar envolvidas na transdução do sinal, amplificando-o;

- Por fim, o sinal percebido e amplificado deve agir sobre mecanismos celulares básicos como a expansão, divisão ou diferenciação, os quais são alvos primários, e cuja somatória de efeitos se traduz na morfogênese do vegetal como um todo.

Nos últimos 25 anos, o efeito das auxinas no alongamento celular foi determinado pela teoria do crescimento ácido. De acordo com esta teoria, as auxinas acidificam os espaços livres na parede celular, possivelmente pela ativação de bombas de prótons nas membranas. O aumento da concentração de prótons provoca um aumento na plasticidade da parede celular e causa um rápido aumento na taxa de alongamento dos tecidos (LIBBENGA & MENNES, 1995).

De maneira geral, a ação das auxinas consiste na ligação da molécula com um receptor (proteína específica) formando um complexo hormônio-receptor. Em seguida, este complexo libera um mensageiro secundário que migra até o núcleo e provoca a expressão gênica. A formação de mRNA a partir do DNA induz a síntese de enzimas que quebram as ligações polissacarídicas da parede celular (TAIZ & ZEIGER, 1998).

O uso de auxina na produção de mudas apresenta grande relevância, uma vez que possui o potencial de induzir a diferenciação de raízes adventícias em propágulos, que sem tratamento com auxina, não tem condição de enraizar (HARTMANN et al. 1997). Entretanto, TEALE et al. (2005) relatam que apesar do uso, em baixas concentrações, para induzir a diferenciação de raízes adventícias, em altas concentrações, as auxinas podem inibir o alongamento radicular assim como a diferenciação celular.

Em culturas de noz *in vitro* a aplicação de auxina causou incremento rápido na quantidade de AIA livre e ainda reduziu a atividade da peroxidase, destacando estes eventos de grande importância na indução do enraizamento observado (BISBIS et al. 2003).

A descoberta das citocininas ocorreu em torno de 20 anos após a descoberta da auxina. Essa classe hormonal foi descoberta pelo grupo do Professor Folke K. Skoog em Madison, Wisconsin, USA. Até poucos anos atrás, era a classe dos hormônios vegetais menos compreendida em relação a biossíntese, metabolismo, percepção e transdução. No entanto, os avanços da biologia molecular, possibilitaram o progresso muito rápido na identificação de moléculas para a compressão da biossíntese, do metabolismo, e dos receptores de moléculas com ação hormonal (MOK & MOK, 2001).

O modo de ação das citocininas no desenvolvimento vegetal envolve rotas de transdução de sinais que geram respostas específicas. Atualmente, acredita-se que a ação das citocininas envolve o chamado sistema de dois componentes, descrito anteriormente em bactérias. Fica evidente que as citocininas são percebidas por proteínas histidina quinase e transferidas para um sistema de sinalização de dois componentes (MOK & MOK, 2001).

As citocininas estão envolvidas no controle de diversos e importantes processos associados com o crescimento e desenvolvimento vegetal. Elas fazem parte do controle da divisão celular, desenvolvimento de cloroplastos, diferenciação de gemas, iniciação e

desenvolvimento de brotos, crescimento e senescência de folhas (BRAULT & MALDINEY, 1999). Diante disso, é comum o uso de citocininas para induzir a diferenciação e o desenvolvimento de gemas vegetativas em culturas *in vitro* (OHKI & SAWAKI, 1999).

Assim como o AIA, as citocininas podem estar presentes nos tecidos vegetais na forma livre, com atividade fisiológica, ou inativa. A inativação das moléculas pode ser através da conjugação com outras moléculas, como a glicose, ou através da oxidação das mesmas (KENDE & ZEEVAART, 1997).

NANDI et al. (1990) verificaram as variações no conteúdo total de citocininas em calo de tabaco. Relataram que após subcultura dos calos houve um incremento no conteúdo endógeno de citocininas, no entanto, com o decorrer do tempo o nível endógeno foi reduzindo. BOONKORKAEW et al. (2007) observaram que o nível endógeno de zeatina e 2ip durante a formação de frutos de pepino foi reduzindo após o quarto dia da antese.

SZÉKÁCS et al. (2000) sugerem que os níveis endógenos de zeatina e 2ip são excelentes indicadores da resistência das plantas a estresses abióticos e ataque de doenças. Os autores descreveram um sistema de ELISA sensível e viável para detectar os níveis endógenos desses hormônios em extratos brutos de plantas. A partir desse método comprovaram que mutantes de tabaco e tomate resistentes a estresses abióticos apresentam nível endógeno de citocinina superior as plantas normais. Sendo assim, a dosagem de hormônios vegetais apresenta elevado potencial de uso na agricultura, desde aplicações no entendimento do papel dos hormônios vegetais até mesmo como uma ferramenta na seleção de genótipos resistentes a fatores abióticos.

Nesse sentido, avaliou-se a capacidade de anticorpos policlonais obtidos em galinhas em detectar moléculas de zeatina e 2ip em amostras de plântulas *in vitro* de *Gerbera jamesonii*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: foram utilizadas plântulas de *Gerbera jamesonii*, variedade Ornela, mantidas *in vitro*, em sala de crescimento com 16 horas luz ao dia e temperatura $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

As plântulas foram mantidas em meio de cultura MS (Mursahige & Skoog (1962), com a presença de 1 mgL^{-1} de BAP, denominado meio de multiplicação para induzir a proliferação de brotos, conforme sugerido por SOUSA (2005).

Utilizou plântulas em duas fases: 1 – plântulas com uma semana após a repicagem e 2 - plantas com seis semanas após a repicagem.

A capacidade dos anticorpos detectarem moléculas de zeatina e 2ip nas amostras foi através do método ELISA. No ELISA utilizou extratos brutos das plântulas, e a metodologia foi de acordo com a descrita por PERES et al. (1997), com algumas modificações. Não houve fragmentação das amostras em HPLC.

Preparo do extrato: Amostras de 1,0 g de material fresco de plântulas de gérbas, mantidas *in vitro*, foram maceradas com 10,0 ml de Metanol. O extrato foi mantido durante uma hora, no escuro e a 4°C . Em seguida, o extrato foi filtrado em filtro com diâmetro de 0,22 mm, para uso posterior no teste ELISA (figura 39).

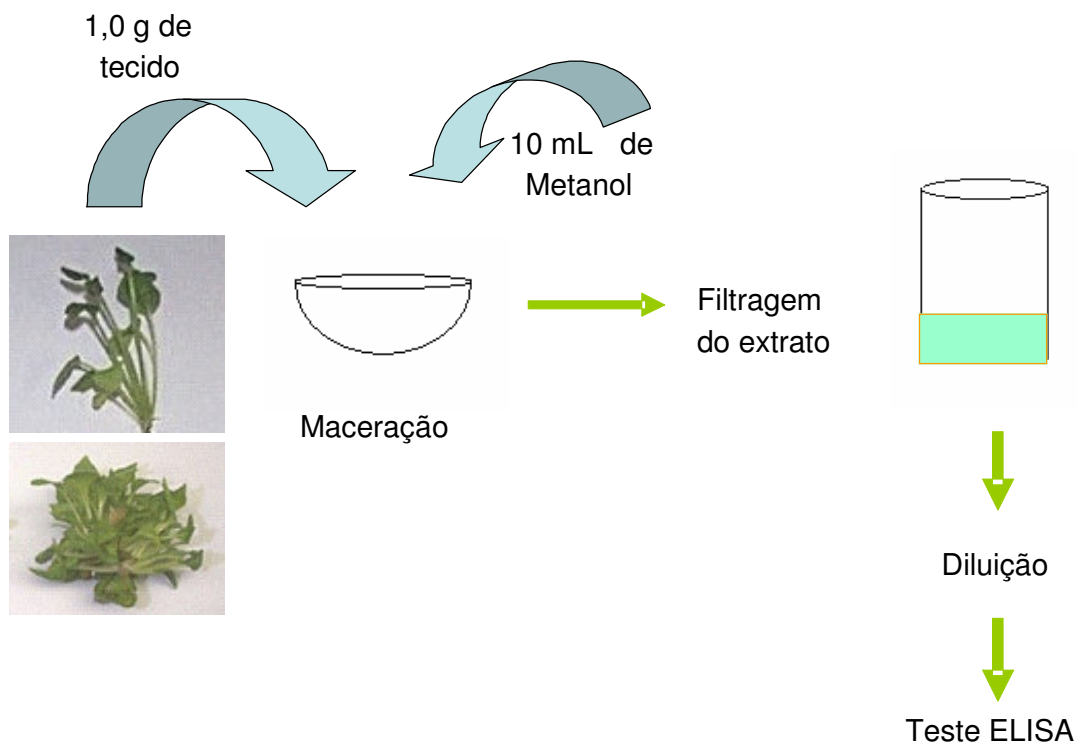


Figura 39. Esquema dos procedimentos adotados na obtenção do extrato vegetal.

Determinação dos hormônios: Na determinação de zeatina e 2ip, houve competição de moléculas sintéticas ou moléculas presentes nas amostras dos tecidos vegetais com os anticorpos específicos contra essas moléculas.

A partir das soluções dos hormônios sintéticos preparou-se uma curva padrão. No extrato vegetal, preparou-se quatro diluições (1:1; 1:2; 1:4 e 1:8), havendo competição, em cada diluição, com anticorpos contra zeatina (1:400) e 2ip (1:200).

O teste ELISA consistiu na sensibilidade da placa com o conjugado específico, diluído 1:400, durante 2h, lavagem da placa, em seguida inseriu 100 µL da mistura extrato vegetal-anticorpo ou da solução do hormônio (curva padrão). Após 2h, lavou-se a placa novamente, adicionou-se 100 µL do anticorpo específico anti-zeatina (1:400) ou anti-2ip (1:200), manteve por mais 2h, lavou-se a placa e logo em seguida adicionou-se 100 µL do anticorpo anti-espécie conjugado com enzima peroxidase diluído 1:20000 e manteve durante duas horas. Por fim, adicionou-se 200 µL do substrato OPD, manteve durante 20 minutos, no escuro e temperatura ambiente. A reação foi paralisada com Ácido Sulfúrico (concentrado) e realizada a leitura das densidades ópticas (Figura 40). Entre uma etapa e outra, em todas as lavagens das placas utilizou-se tampão PBS + 0,05% de Tween 20, sendo seguida secadas.

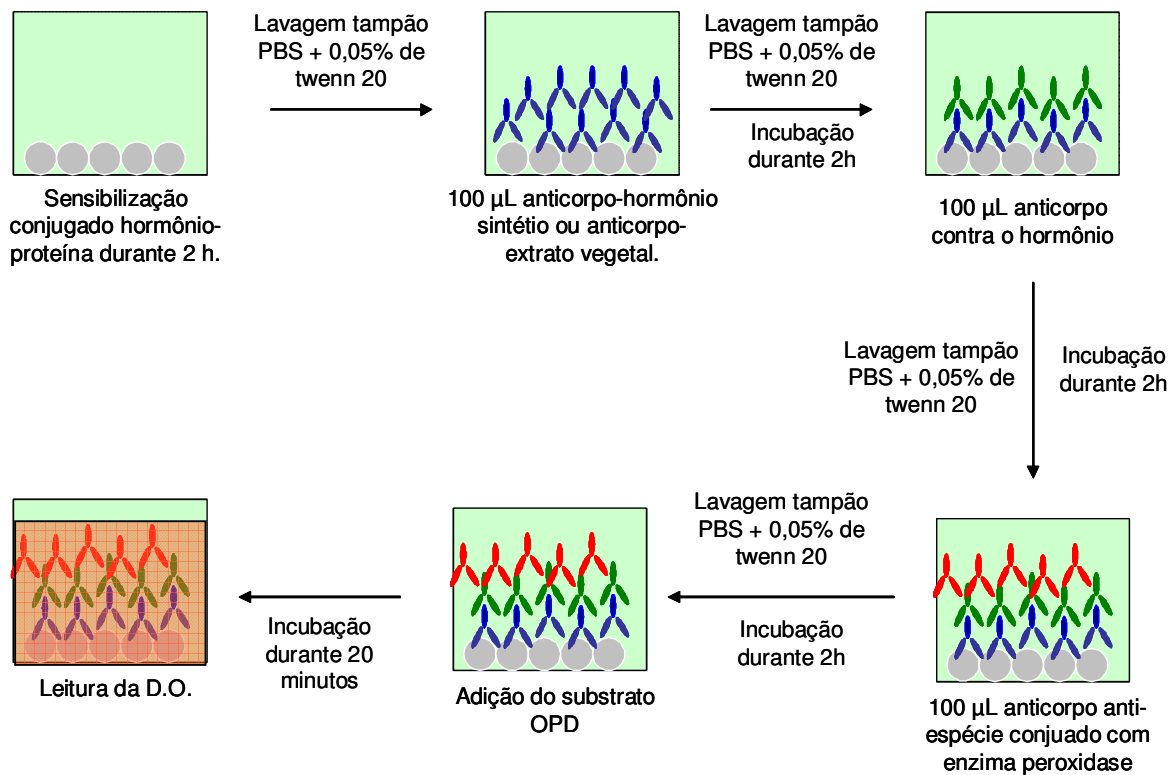


Figura 40. Ilustração das etapas do teste ELISA realizado.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do método imunoenzimático de captura (ELISA) para a detecção de zeatina e 2ip em extratos metanólicos preparados com a parte aérea das plântulas apresentou resultados bastante estimulantes e permitiram a realização de inferências de relevância no estudo de cultivos de gérbera *in vitro*. Desse modo, os níveis endógenos de citocininas determinados em plântulas *in vitro* de gérbera através de ensaios imunoenzimáticos de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays), mostrou-se viável, simples e econômico, originando dados comparativos capazes de serem utilizadas em outros cultivares de interesse fitotécnico.

As culturas recém repicadas não apresentavam sistema radicular e nem brotos recém formados. Já as culturas com seis semanas após a implantação, apresentavam sistema radicular e vários brotos. Esse mesmo comportamento foi relatado por SOUSA (2005).

O nível endógeno de zeatina foi superior ao nível endógeno de 2ip tanto no início quanto após seis semanas de permanência das plântulas *in vitro*. Após seis semanas da permanência das plântulas *in vitro* houve um ligeiro aumento do nível endógeno de zeatina (Figura 41). Esse fato provavelmente está associado com a formação do sistema radicular, o qual é um sítio de síntese de citocininas. Já para o 2ip, não houve variação significativa, demonstrando que em cultura de gérbera *in vitro* a zeatina predominou em relação ao 2ip.

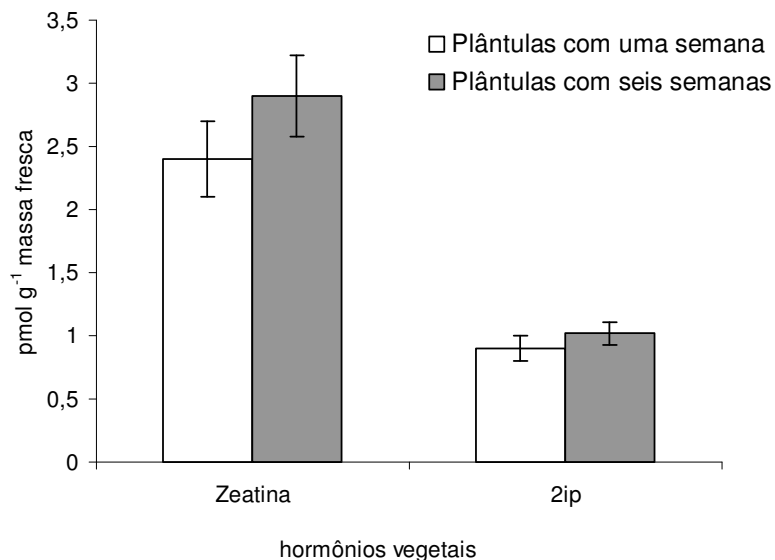


Figura 41. Nível endógeno de zeatina e 2ip determinados através de ELISA, em plântulas de gérbera recém repicadas (início) e com seis semanas *in vitro* (fim), cultivadas em meio Murashige & Skoog (1962) adicionado de 1 mg L^{-1} de BAP.

BLAKESLEY et al. (1991) relatam que a maioria da citocinina adicionada no meio de cultura é consumida nos primeiros 20 dias. Posteriormente, ocorre a diferenciação e o desenvolvimento de brotos, os quais passam a ser novos sítios de síntese de auxina (DAVIES,

1995), podendo alterar o balanço hormonal endógeno e em seguida disparar uma série de eventos fisiológicos, incluindo a diferenciação de raízes.

PINTOS et al. (2002) verificaram que os níveis endógenos de 2ip foi superior aos níveis endógenos de zeatina em calo de *Medicago arborea* e com o decorrer do tempo, houve tendência de aumento dos níveis endógenos de zeatina e redução no nível endógeno de 2ip. Os autores associaram o fato do nível de 2ip ser superior ao nível de zeatina devido a molécula do 2ip ser um produto obtido durante a síntese de citocininas. No entanto, a figura 41 mostra que, nas condições de estudo, em plântulas de gérbera *in vitro*, tanto o nível de zeatina quanto o de 2ip apresentou ligeiro aumento, não deixando evidências da mudança do comportamento dessas moléculas presentes nos tecidos no decorrer do tempo.

YANG et al. (2002) verificaram, tanto no endosperma quanto em raízes de arroz, que o nível de zeatina foi superior ao de 2ip o mesmo comportamento sendo verificado por SZÉKÁCS et al. (2000) quando trabalharam com linhagens de tomate e tabaco. Já em explantes de *Corylus avellana* L preparados a partir de cotilédones, os níveis endógenos de 2ip foi sempre superior aos níveis endógenos de zeatina (CENTENO et al., 1997). SUZUKI e KERBAUY (2006) relataram que, independente dos tratamentos utilizados, a forma predominante das citocininas em *Catsetum fimbriatum* foi a Zeatina.

Sendo assim, os resultados indicam a viabilidade do uso de anticorpos policlonais IgY, obtidos em gemas de ovos de galinhas, contra zeatina e 2ip e para detecção dessas moléculas em amostras vegetais.

3.4 CONCLUSÕES

O uso de anticorpos IgY obtidos em galinhas permitiu a detecção de moléculas de zeatina e 2ip em extratos brutos de plântulas de gérbera;
Em plântulas de gérbera *in vitro* o nível de zeatina foi superior ao nível de 2ip;
Os níveis de zeatina e 2ip apresentaram o mesmo comportamento em plântulas recém repicadas e plântulas com seis semanas de idade.

3.5 CONCLUSÕES GERAIS

Os conjugados dos hormônios vegetais, AIA, zeatina e 2ip, com proteínas carreadoras provocaram respostas imunogênicas em coelhos e galinhas, e conseqüentemente, induziu a produção de anticorpos contra essas moléculas;

A purificação de IgY contra AIA, zeatina e 2ip somente foi possível com o uso de água gelada (4°C). Já a purificação das IgG's foi possível com o método da precipitação com Sulfato de Amônia;

A purificação das IgY's contra AIA e 2ip foi mais eficiente que as IgG's, indicando maior potencial de uso prático de anticorpos obtidos em galinhas;

Os anticorpos obtidos foram capazes de detectaram moléculas de AIA, zeatina e 2ip em ELISA de competição;

Os anticorpos contra AIA, tanto IgG quanto IgY, apresentaram baixa sensibilidade à molécula, inviabilizando o uso na dosagem de auxina em amostras vegetais;

As IgY's contra zeatina e 2ip foram capazes de detectaram essas moléculas em amostras de extratos brutos de plântulas de gérbera, demonstrando ser uma excelente alternativa para a quantificação dessas moléculas em tecidos vegetais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and purification. *Journal of Food Science*. v. 57, n. 3. p. 629-634. 1992.
- BARTEL, B. Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. 48:51–66
- BISBIS, B.; KEVERS, C.; CREVECOEUR, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Restart of lignification in micropropagated walnut shoots coincides with rooting induction. *Biologia plantarum*. v. 47, n. 1, p. 1-5, 2003.
- BOLLEN, L. S.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG: A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of immunological methods*. v. 191. p.113-120, 1996.
- BOONKORKAEW, P.; HIKOSAKA, S.; SUGIYAMA, N. Effect of pollination on cell division, cell enlargement, and endogenous hormones in fruit development in a gynoeious cucumber. *Scientia Horticulturae*. v. 116, n. 1, p. 1 – 7. 2008.
- BRAULT, M.; MALDINEY, R. Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiol. Biochem*. v. 37, n. 5, p. 403-412, 1999.
- BRENNER, M. L. Modern methods for plant growth substance analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol*. v. 32. p. 511-538. 1981.
- CANTO-CANCHÉ, B. B.; MEIJER, A. H.; COLLU, G.; VERPOORTE, R.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Characterization of a polyclonal antiserum against the monoterpene monooxygenase, geraniol 10-hydroxylase from *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*. v. 162. p. 393-402. 2005.
- CENTENO, M. L.; RODRÍGUEZ, R.; BERROS, B.; RODRÍGUEZ, A. Endogenous hormonal content and somatic embryogenic capacity of *Corylus avellana* L. cotyledons. *Plant Cell Reports*. v. 17, p. 139-144. 1997.
- CHEN, Y.; SHANG, Y.; LI, X.; et al.,. Development of an enzyme-linked immunoassay for the detection of gentamicin in swine tissues. *Food Chemistry*. v. 108, p. 304–309, 2008.
- COSTA, A. B. *Caracterização de bactérias do complexo Aeromonas isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica*. Tese (Doutorado em Agronomia) ESALQ. 2003. 54p.
- DAVIES, P.J. The plant hormones concept: concentration, sensitivity and transport. In: DAVIES, P. J. (Ed.) *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dorderecht, Kluwer Acad. Publi. 1995, p. 13 - 38.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; & KUHN, G. B. Detecção de um Isolado de Grapevine virus A e Caracterização do Gene da Proteína Capsidial. *Fitopatol. bras*. v. 28. n. 5. p. 521-527, 2003.
- FORTE, W. *Imunologia básica e aplicada*. Porto Alegre, RS. p. 359. Artmed. 2004.
- FREIRE, R. B.; FREIRE, M. F. I.; BERBARA, R. L. ELISA de captua com IgY para quantificação de Acetato de Lupeol em *Vernonia scorpioides* LAM. PERS (ASTERACEAE). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1069-1074, 2004.
- GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Química Nova*, v. 22, n. 6, 1999.
- GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A.C; CALDAS. L. S. & BUSO, J. A. (Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas*. 1. Ed. Brasília: SPI.v.1. p.183-260. 1998.
- HANSEN, P.; SCOBLE, J. A.; HANSON, B.; HOOGENRAAD, N. J. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interation chromatography. *Journal of immunological methods*. v. 215, p. 1-7, 1998.

- HARLOW, E. & LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA. 1988.
- HINTEMANN, T.; SCHNEIDER, C.; HEINZ F. SCHOLER, H. F.; et al., Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Research*. v. 40 p. 2287 – 2294, 2006.
- JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis in vitro. *Plant Science*. v. 160, p. 247-257, 2001.
- KABAT, E. A. *Structural concepts in immunology and immunochemistry*. 1968.
- KENDE, H., ZEEVAART, J. A. D. The five “classical” plant hormones. *The Plant Cell*, v. 9, p. 1197-1210. 1997.
- KOWALCZYK, M.; SANDBERG, G. Quantitative analysis of Indole-3-acetic acid metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiology*. v. 127, p. 1845-1853, 2001.
- KOZLOVA, N.V., STRUNNIKOVA, O.K., LABUTOVA, N.M. & MUTOMTSEV, G.S. Production and specificity of polyclonal antibodies against soluble proteins from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* v. 10, p. 301-305, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª ed. São Paulo: ed. Sarvier, 1995, 839 p.
- LI, J.; XIAO, L. T.; ZENG, G.M. ET AL., A renewable amperometric I immunosensor for phytohormone β -indole acetic acid assay. *Analytica Chimica Acta*. v. 494, p. 177–185, 2003.
- LIBBENGA, K. R.; MENNES, A. M. Hormones binding and signal transduction. In DAVIES, P. J. (Ed.) *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht, Kluwer Acad. Publi., 1995.
- LIMANTON-GREVET, A.; SOTTA, B.; BROWN, S. et al.; Analysis of habituated embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. *Plant Science*. v.160, p.15–26, 2000.
- LOSSO, J. N.; KUMMER, A.; LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Development of a particle concentration fluorescence immunoassay for the quantitative determination of IgG in bovine milk. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 41, p. 682-686, 1993.
- MALDINEY, R.; LEROUX, B.; SABBAGH, I.; SOTTA, B.; SOSSOUNTZOV, L.; MIGINIAC, E. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormone: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal of Immunological Methods*. v. 90, p. 151-158. 1986.
- MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Anticorpos Humanizados. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* – n. 23, p. 338-343, 2001.
- MAZZAFERA, P. & VITORIA, A. P. Produção de anticorpos para cafeína e seu derivado cafeinidina. *Cien. Tec. Alimen*. v. 18, n. 1, p. 13-16, 1998.
- MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R. M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Braz. J. Plant. Physiol*. v. 15, n. 2, p. 107-112. 2003.
- MICKOVA, B.; ZROSTLIKOVA, J.; JANA HAJŠLOVA, J.; et al. Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of *N*-methylcarbamate insecticides in baby food. *Analytica Chimica Acta*. v. 495, p. 123–132, 2003.
- MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Cytokinin metabolism and action. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol*. v. 52, p. 89-118, 2001.
- MONCALÉAN, P.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, B. Effect of different benzyladenine time pulse on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 41 p. 149-155, 2003.

- MOURA, M.C.C.L., LIMA, J.A.A., OLIVEIRA, V.B. & GONÇALVES, M.F.B. Identificação sorológica de espécies de vírus que infectam cucurbitáceas em áreas produtoras do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira*. v. 26, p. 90-92, 2001.
- MUNENE, C. N. *Development of chicken polyclonal and mouse monoclonal-based enzyme immunoassays for the detection of β -cyclocitral in catfish pond water*. Dissertation. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 2004. 118 p.
- NANDI, S. K.; PALNI, L. M. S.; PARKER, C. W. Dynamics of endogenous cytokinins during the growth cycle of a hormone-autotrophic genetic tumor line of tobacco. *Plant Physiol*. v. 94, p. 1084-1089, 1990.
- NORMANLY, J. Auxin metabolism. *Physiologia Plantarum*. v. 100, p. 431-442, 1997.
- NOVÁKOVÁ, M.; MOTYKA, V.; DOBREV, P. I.; et al.; Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 421, p. 2877-2883, 2005.
- NUNES, G. S. Métodos imunquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 28, n. 3, p. 462-471, 2005.
- OHKI, S. & SAWAKI, S. The effects of inorganic salts and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and leaf chlorophyll content of *Delphinium cardinale*. *Scientia Horticulturae*. v. 81, p. 149-158, 1999.
- PAUILLAC, S.; NAAR, J.; BRANAA, P.; CHINAIN, M. An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten-carrier conjugate. *Journal of immunological methods*. v. 220, p. 105-114, 1998.
- PENGELLY, W.A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta*. v. 136, p. 173-180, 1977.
- PERES, L. E. P., KERBAUY, G. B. Citocininas In: KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. 1ª ed. Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan, 2004, p. 250-278.
- PERES, L. E. P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. *R. Bras. Fisiol. Veg.* v. 9, n.3, p. 169-176. 1997.
- PINTOS, B.; MARTÍN, J. P.; CENTENO, M. L.; VILLALOBOS, N.; GUERRA, H.; MARTÍN, L. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. *Plant Science*. n. 163, p. 955-960, 2002.
- PITELLI, A. M. C. M. *Controle hormonal do crescimento de raízes de tomateiro (Lycopersicon esculentum cv. Micro-Tom) em condições de déficit hídrico*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – ESALQ. 2006. 54p.
- POUSSIN, M.; FUENTES, V.; CORBEL, C.; et al., Capture-ELISA: a new assay for the detection of immunoglobulin M isotype antibodies using *Chlamydia trachomatis* antigen. *Journal of Immunological Methods*. v. 204, p. 1-12, 1997.
- POZO, J. C.; LOPES-MATAS, M. A.; RAMIREZ-PARRA, E. et al., Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*. n. 123, p. 173-183, 2005.
- RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; ARAGÃO, F. J. L. & FAJARDO, T. V. M. Diagnóstico Biológico e Molecular e Análise da Sequência de Nucleotídeos do Gene da Proteína Capsidial de um Isolado do Apple stem pitting vírus. *Fitopatol. Bras.* v.31. n. 1, p. 51-86, 2006.
- RAMIREZ, P. A. *Caracterização imunológica e genética da deficiência do componente C5 do sistema complemento humano*. Dissertação (Mestrado em Imunologia) Instituto de Ciências Biomédicas – USP. 2007. 116 p.
- REDIG, P.; PRINSEN, E.; SCHYVERS, N., et al., Chicken Egg Yolk Antibodies for Cytokinin Analysis. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 15, p. 19-25, 1996.
- SHIMOI, K.; KASAI, H.; YOKOTA, N.; et al. Comparison between High-Performance Liquid Chromatography and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Determination of

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in Human Urine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. v. 11, p. 767–770, 2002.

SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. SYMPOSIA SOCIETY OF EXPERIMENTAL BIOLOGY. v. 11, p. 118-231, 1957.

SOUSA, C.M. *Otimização de protocolos para a propagação in vitro de Gérbera (Gerbera jamesonii)*. 2005. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), UFRRJ, Seropédica, p. 74.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Brazilian Journal Plant Physiology*. v. 18, n. 3. p. 359-365. 2006.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. *Journal of Plant Physiology*. v. 161. n. 8. p. 929-935. 2004.

SZÉKÁCS, A.; HEGEDUS, G.; TÓBIÁS, I.; POGÁNY, M.; BARNA, B. Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. *Analytica Chimica Acta*. v. 421, p. 135–146, 2000.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 792 pp. 1998

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; DITENGOU, F.; et al., Auxin and the developing root of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. v. 123, p. 130–138, 2005.

THIMANN, K. V. Fifty years of plant hormone research. *Plant Physiol*. v. 54, p. 450-453, 1974.

VANNESTE, S.; MAES, L.; DE SMET, I.; et al. Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum*. v. 123, p. 139–146, 2005.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*. v. 31, p. 507-520, 1978.

WEILER, E. W. Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable [¹²⁵I] – and [3H]IAA derivatives as radiotracers. *Planta*. v. 153, p.319-325, 1981.

WEILER, E. W. Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugate abscisic acid in plant extracts. *Planta*. v. 148, p. 262-272, 1980.

WEILER, E. W.; WIECZOREK, U. Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmunoassay. *Planta*. v. 152, p. 159-167, 1981.

WOOLEY, J.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *Journal of immunological methods*. v. 178, p. 253-265, 1995.

YAKOVLEVA, J.; ZHERDEV, A. V.; POPOVA, V. A.; EREMIN, S. A.; BORIS B. DZANTIEV, B. B. Production of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assays for the herbicide butachlor. *Analytica Chimica Acta*. v. 491, p. 1-13, 2003.

YANG, J.; ZHANG, J.; HUANG, Z.; WANG, Z.; ZHU, Q.; LIU, L. Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice. *Annals of Botany*. 90, 369-377. 2002.

YAO, Q.; ZHU, H. H.; CHEN, J. Z. Growth responses and endogenous IAA changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation. *Scientia Horticulturae*. v. 105, p. 145-151, 2005.

YORINORI, M. A.; RIBAS, A. F.; UENO, B.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. ; & LEITE JÚNIOR, R. P. Detecção de Xylella fastidiosa em Germoplasma de Cafeeiro. *Fitopatol. bras*. v.28, n. 4, 2003.

YUKI, V.A., REZENDE, J.A.M., KITAJIMA, E.W., BARROSO, P.A.V., KUNYUKI, H., GROppo, G.A. & PAVAN, M.A. Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the State of São Paulo, *Brazil. Plant Disease*. v. 84, p. 516-520, 2000.

ZHU, G.; JIN, M.; WENJUN GUI, W.; et al., Development of a direct competitive enzyme-linked immunoassay for carbofuran in vegetables. *Food Chemistry*. v.107, p. 1737-1742, 2008.