

Telma Maria Alves

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Andrey Pereira Lage

Co-orientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2006

A474p Alves, Telma, 1977-
Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra
Campylobacter fetus subsp. *venerealis* / Telma Maria Alves. –2006.
34 p. :il.

Orientador: Andrey Pereira Lage
Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Heneine
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Infecções por *Campylobacter* -
Teses. 3. Anticorpos monoclonais – Caracterização – Teses. I. Lage,
Andrey Pereira. II. Heneine, Luiz Guilhermee Dias. III. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 693 53

Aos meus pais e minha irmã, pelo carinho, confiança, dedicação constantes.

AGRADECIMENTOS

O tempo passou. Não pensei que seria tão rápido. Hoje não sou como ontem, início... Amadurecer é um processo natural e como tudo na vida, aconteceu comigo. Senhor hoje eu não vou pedir nada, absolutamente nada. Aqui estou para agradecer a oportunidade que me foi dada;

Aos meus pais, Jair e Neusa, e a minha irmã Regina, que mesmo distantes estavam do meu lado, me apoiando, dando amor, amizade e forças para suportar a distância e esse mundo novo. Vocês são a principal razão desta conquista;

Ao Prof. Andrey, pela amizade, dedicação, oportunidade, carinho, confiança e ensinamentos concedidos. A Elizabeth, mentora de tudo, por acreditar em mim, e me dar essa oportunidade de seguir os meus sonhos;

Aos grandes amigos e amigas do Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Ana Cláudia (Patinha), Ana Paula, Paula (Flu), Cristiane (Kika), Karina, Ricardo, Bárbara, Ju, Sílvia, Poester, Carol, Carlos, Renata, Adriano, Michelle, Rebeca, Roberta, que me ensinaram a dar os primeiros passos, ou melhor meus primeiros repiques, pela amizade, apoio, conselhos, puxões de orelha e até colo;

Ao Luiz Guilherme e Luciana que abriram as portas dos laboratórios na FUNED para realizações dos trabalhos. Aos amigos de todas as horas: Patrícia, Márcia, Elaine, Horácio, Rafael, Carolina, Paulo, Flávio, Luciene, Gisele, Ronan. Obrigada pela amizade e pela ajuda, apoio, carinho;

A todos os amigos: Luciana, Eduardo (D2), Simone, Geovana, Creuza, Nádia, Rogério, Eduardo, Jorge, Júnia, Mirli, Fábiana, Nilda, Doris, Graziela e Nelson. A todos os funcionários e professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial aos professores Paulo Roberto, Nelson, Zélia, José Sergio, Roberto, Rômulo, Jenner e Francisco, pela ajuda e carinho concedidos;

Aos BAMS Mariana e Stênio, que foram meu apoio em todos os momentos alegres e tristes desta caminhada. A todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade;

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	9
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 LITERATURA CONSULTADA	10
2.1 Gênero <i>Campylobacter</i> e Campilobacteriose Genital Bovina.....	10
2.2 Anticorpos monoclonais.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Amostras bacterianas de referência e condições de cultivo	14
3.3 Produçãodos antígenos por sonicação.....	14
3.4 Imunização dos camundongos.....	15
3.4.1 Avaliação dos camundongos imunizados	16
3.5 Produção de anticorpos monoclonais	16
3.5.1 Preparo das células do baço.....	16
3.5.2 Preparo das células Sp2/OAg14.....	17
3.5.3 Fusão.....	17
3.5.4 Seleção dos hibridomas	17
3.5.5 ELISA Indireto para <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354.....	18
3.6 Expansão dos hibridomas	18
3.6.1 Cultivo primário de macrófagos e baço de camundongo SPF.....	18
3.7 Clonagem	19
3.7.1 Expansão dos clones	19
3.8 Obtenção do sobrenadante de cultura contendo anticorpos monoclonais.....	19
3.9 Produção de anticorpos monoclonais em líquido ascítico em BALB/c	20
3.10 Isotipagem	20
3.11 Congelamento dos hibridomas	20
3.12 Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto a especificidade	21
3.12.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE	21
3.12.2 “Western blotting”.....	21
4 RESULTADO	21
4.1 Imunização dos camundongos.....	21
4.1.1 Soro hiperimune	22
4.2 Produção dos anticorpos monoclonais	22
4.3 Expansão dos hibridomas	24
4.4 Clonagem	24
4.5 Expansão dos clones	24
4.6 Produção de líquido ascítico em BALB/c	25
4.7 Caracterização dos anticorpos quanto ao isotipo	25
4.8 Caracterização dos anticorpos quanto ao especificidade.....	25
4.9 Caracterização dos anticorpos por western blot	26
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÕES	30
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

ANEXO I	34
----------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras de bactérias de referência dos gêneros <i>Arcobacter</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Escherichia</i> e <i>Helicobacter</i> utilizadas nos diversos experimentos.	15
Tabela 2	Especificidade e classes e subclasses dos anticorpos monoclonais produzidos contra <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	"Dot blot" da titulação dos soros dos camundongos inoculados com antígeno sonicado de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354.....	22
Figura 2	"Dot blot" mostrando a especificidade do soro dos animais após a imunização contra <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354 produzido em camundongos.	23
Figura 3	Hibridomas em fase de crescimento, 48h após da adição de fatores de crescimento (20x).	25
Figura 4	"Western blotting" para a caracterização dos anticorpos monoclonais obtidos.....	24

RESUMO

Para a produção de anticorpos monoclonais contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* foram utilizadas as linhagens de células de mieloma Sp2/0-Ag14 e células de baço de camundongos BALB/c imunizados com sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. A detecção dos anticorpos monoclonais foi realizada por ELISA indireto utilizando antígeno sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. A clonagem foi realizada por diluição limitante e os clones foram caracterizados por ELISA indireto utilizando um painel de bactérias sonicada escolhidas em função da prevalência e habitats: *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, *C. fetus* subsp *fetus* ADRI 1812, *C. sputorum* biovar sputorum LMG 6647, *C. lari* NCTC 11352 e *Arcobacter skirrowii* LMG 6621; e no "western blotting" utilizando antígenos sonicados de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e *C. sputorum* biovar sputorum LMG 6647. Foram obtidos 15 clones produtores de anticorpos anti – *C. fetus* subsp. *venerealis* das classes IgM (1) e IgG (14). Quatro clones dentre os 15 clones obtidos foram produtores de anticorpos monoclonais espécie-específicos: dois clones reagiram com maior especificidade contra *C. fetus* subsp *venerealis* NCTC 10354 e dois clones reagiram com maior especificidade contra *C. fetus* subsp *fetus* ADRI 1812. Nenhum dos clones reagiu contra *C. sputorum* biovar sputorum LMG 6647, comprovando a especificidade dos anticorpos monoclonais testados. Todos os clones reconheceram uma proteína de massa molecular de aproximadamente 148 kDa no sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.

Palavras chave: anticorpos monoclonais, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, bovinos, campilobacteriose genital bovina.

ABSTRACT

Myeloma cells Sp2/0-Ag14 and spleen cells from BALB/c mouse immunized with sonicated *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 were fused with polyethylene glycol (PEG) for the production of monoclonal antibodies (MAB's). Clones were obtained by limiting dilution and screened for specific MAB's to *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 by indirect ELISA and western blot against a panel of bacteria: *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, *C. fetus* subsp *fetus* ADRI 1812, *C. sputorum* biovar sputorum LMG 6647, *C. lari* NCTC 11352, and *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 for the ELISA and *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 and *C. sputorum* biovar sputorum LMG 6647 for the western blotting. Fifteen clones producing MAB's anti – *C. fetus* subsp. *venerealis* of the IgM (1) and IgG (14) classes were further screened for species-specificity. Four clones of the 15 obtained were producers of species-specific MAB's, 2 were specific for *C. fetus* subsp *venerealis* and 2 specific for *C. fetus* subsp *fetus*. None of the clones were reactive against *C. sputorum* biovar sputorum LMG 6647. All clones recognized a protein with molecular mass of approximately 148 kDa from lysed *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.

Keywords: Monoclonal antibodies, *C. fetus* subsp *venerealis*, cattle, bovine genital campylobacteriosis

1 - INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina é uma doença sexualmente transmitida cujo agente etiológico é o *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. As perdas econômicas decorrentes da campilobacteriose genital bovina são representadas por problemas reprodutivos causados no rebanho como repetições de cio freqüentes e a intervalos irregulares e aumentados, infertilidade temporária, morte embrionária, intervalos de parto prolongado e aumento da reposição de touros.

O touro é o maior disseminador da doença e como a maioria dos rebanhos utilizam a monta natural no manejo reprodutivo, com touros não testados para a presença de *C. fetus*, há uma facilitação da transmissão da campilobacteriose genital bovina em nosso meio. Além disso, em grande parte das propriedades a monta é distribuída por todo o ano e nas poucas propriedades que utilizam a inseminação artificial geralmente se encontram touros de repasse, que são fatores de risco para a infecção. Em função disto, a campilobacteriose genital bovina apresenta-se disseminada em todo o Brasil.

O diagnóstico da campilobacteriose genital bovina é realizado principalmente em touros, pelo isolamento e identificação do agente. O isolamento é trabalhoso, necessita de meios de transporte e enriquecimento e condições atmosféricas especiais, pois *C. fetus* subsp. *venerealis* tem baixa resistência fora do seu habitat e a presença da microbiota do trato genital dificulta o isolamento.

Outros testes como a imunofluorescência direta (IFD) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido empregados na detecção de *C. fetus*. Testes de ELISA estão sendo avaliados para a detecção da presença de anticorpos anti-*C. fetus* no muco vaginal e para a detecção do agente.

O desenvolvimento de testes imunoenzimáticos para detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* em lavado prepucial de

touros infectados utilizando anticorpos monoclonais seria de grande valia no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, por poder apresentar grande sensibilidade, especificidade e a praticidade de realizar o diagnóstico de vários animais tornando o diagnóstico mais barato.

Em 1975, Köhler e Milstein descobriram que era possível obter quantidades ilimitadas de anticorpos com especificidade predeterminada pela fusão de linfócitos B com células de mieloma de camundongo. Estes anticorpos, denominados anticorpos monoclonais, são mais homogêneos que o soro hiperimune e possibilitam novas perspectivas de investigação no campo da biologia e da medicina.

As principais características dos anticorpos monoclonais são a alta afinidade e especificidade para com o antígeno que induziu a sua formação, tornando-se poderosas ferramentas em diversos campos da biologia celular, fisiologia, biosseparação, biologia molecular, imunologia, microbiologia e doenças infecciosas, dentre outras. Podem ser utilizados para a localização de moléculas específicas em células ou tecidos, quantificações de antígeno, identificação de molécula em imunoenaios, cromatografia e precipitação por afinidade.

Os objetivos deste trabalho foram produzir e avaliar a especificidade de anticorpos monoclonais contra *C. fetus* subsp. *venerealis*.

2- LITERATURA CONSULTADA

2.1 - Gênero *Campylobacter* e Campilobacteriose Genital Bovina

O *C. fetus* é uma bastonete Gram negativo, curvo em forma de asa de gaivota, microaerófilo, termófilo podendo causar doenças nos animais e no homem. Essa espécie pode ser dividida em duas subespécies, *C. fetus* subsp. *fetus* que pode ser do sorotipo A ou B e *C. fetus* subsp. *venerealis* que é do sorotipo A (Brooks et

al., 2002). Ambos podem causar doença em bovinos; entretanto, *C. fetus* subsp. *venerealis* é agente etiológico da campilobacteriose genital bovina, doença sexualmente transmissível de distribuição mundial (Thompson e Blaser, 2000).

O habitat do *C. fetus* subsp. *venerealis* no macho é o prepúcio, onde o microrganismo é mantido predominantemente nas criptas do epitélio, podendo ser encontrado também nas glândulas do pênis e na uretra distal. O macho infectado é assintomático. Os touros jovens, são relativamente resistentes à infecção sendo que nos touros mais velhos a frequência de infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* é maior em função do aumento do tamanho e do número das criptas no epitélio do prepúcio, o que proporciona uma atmosfera de microaerofilia, favorecendo o crescimento do microrganismo (Dekeyser, 1984).

Nas vacas e nas novilhas, o microrganismo infecta a vagina, a cérvix, o útero e o oviduto em uma infecção ascendente. A infecção nas fêmeas resulta primariamente em infertilidade temporária com repetição de cio a intervalos aumentados e irregulares, em geral maiores que 35 dias, devido a falhas no desenvolvimento embrionário, endometrites secundárias e abortos, que são menos freqüentes, levando a grandes perdas econômicas pelos problemas reprodutivos desencadeados (Dekeyser, 1984).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* é transmitido do macho à fêmea, e vice-versa, durante o coito ou por sêmen contaminado utilizado na inseminação artificial. Nos machos, há relatos de transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* pela atividade homossexual de touros confinados em alta densidade e transmissão indireta por equipamentos usados na coleta de sêmen (Dekeyser, 1984).

A campilobacteriose genital bovina é uma doença de apresentação geralmente subclínica e pouco perceptível no rebanho, principalmente se não há um bom controle zootécnico, pois muitas vezes as repetições de cio não são observadas e quando se

suspeita da doença no rebanho, as perdas já são grandes (Lage, 2000). Em decorrência disto, a campilobacteriose genital bovina é uma doença que diminui silenciosa e lentamente os lucros da exploração pecuária. Após três a seis meses, o sistema imune da vaca supera a infecção, mas a colonização vaginal crônica pode persistir por meses ou mesmo anos (Dubreuil et al., 1990; Wang et al., 1993).

Vinte por cento dos touros de propriedades de pecuária de corte dos estados com maior população bovina do país (Miranda, 2005) estão infectados por *C. fetus*, o que demonstra que a campilobacteriose genital bovina está bastante disseminada em nosso país.

A infecção por *C. fetus* subsp. *fetus* pode levar à septicemia, mas também pode causar problemas reprodutivos nos bovinos e ovinos levando a aborto esporádico em bovinos. A transmissão ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados. Em vacas prenhes, o microrganismo que se localiza no trato gastrointestinal pode causar bacteremia e ser encontrado na placenta resultando em aborto. O *C. fetus* subsp. *fetus* pode ser isolado de fezes e bile de animais infectados. O habitat do *C. fetus* subsp. *fetus* é no trato gastroentestinal (Thompson e Blaser, 2000).

Campylobacter sp. possui proteínas que são imunogênicas importantes para a colonização do hospedeiro (Thompson e Blaser, 2000). As principais proteínas encontradas em *C. fetus*, segundo Dunn et al. (1987), são: o flagelo, com peso molecular de 63 kDa, proteínas de membrana externa, de baixo peso molecular variando de 43 a 44 kDa, e glicopolissacarídeos com peso molecular de 100 kDa. Pode ser encontrada ainda em *C. fetus* uma camada externa constituída principalmente de proteínas de alto peso molecular, de aproximadamente 97 a 149 kDa, denominadas SAP (surface array proteins) (Garcia et al., 1995). Blaser et al. (1994) demonstraram que *C. fetus* tem capacidade de modificar antigenicamente essas proteínas de alto peso molecular após sucessivas passagens em meio

artificial, diminuindo a virulência em camundongos inoculados.

Mc Coy et al. (1975) foram os primeiros a descrever a presença de uma microcápsula em *C. fetus*. A habilidade de *C. fetus* em desenvolver infecções nos animais e no homem tem atraído a atenção de pesquisadores para elucidar a importância de proteínas de membrana externa da bactéria na patogenia da doença (Tummuru e Blaser, 1992; Garcia et al., 1995; Dworkin e Blaser, 1997; Grogono-Thomas et al., 2000).

A razão do diagnóstico da campilobacteriose genital bovina ser realizado principalmente em touros, deve-se ao fato desses animais estarem presentes em menor número nos rebanhos, além de serem os grandes responsáveis pela difusão da doença nos rebanhos. As técnicas laboratoriais rotineiramente utilizadas para o diagnóstico da infecção por *C. fetus* subsp. *venerealis* são, além do isolamento e identificação do microrganismo, o teste de imunofluorescência direta (IFD), que tem sido utilizado para detecção de *C. fetus* em lavado prepucial e muco vaginal (Clark, 1971; Pellegrin, 1999; Figueiredo et al., 2002), e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Hum et al., 1997; Stynen, 2000), que é um teste mais específico e sensível, mas mais caro e laborioso.

Os testes sorológicos de aglutinação e de ELISA (Hewson et al., 1985, Hum et al., 1994) têm sido usados para detecção de anticorpos contra *C. fetus* em amostra de muco vaginal. O ELISA direto para detecção do *C. fetus* em lavado prepucial e muco vaginal está sendo testado mais recentemente por Brooks et al. (2004), utilizando anticorpos monoclonais contra o lipopolissacarídeo (LPS) de *C. fetus*. Os resultados alcançados no ELISA descrito por Brooks et al. (2004) não possuem um bom limite de detecção (sensibilidade analítica), que é muito baixo sendo de 10^4 a 10^6 UFC/mL, apesar de estar utilizando anticorpos monoclonais para tentar aumentar a sensibilidade e especificidade, sendo que a imunofluorescência direta possui uma sensibilidade analítica muito

melhor (detecção de 10^2 UFC/mL) (Figueiredo et al, 2002).

2.2 – Anticorpos Monoclonais

Após o pioneiro trabalho feito por G. Barski, S. Sorieul e B. Cornefert, no início da década de 1960, culturas de hibridomas originados de fusão de células somáticas de diferentes espécies ou tecidos aumentaram a pesquisa em biologia celular e genética. A fusão destas células era espontânea e tinha uma baixa eficiência de células fundidas (Harlow e Lane, 1988). Essa fusão espontânea foi superada dramaticamente em 1965 pelo tratamento de células fundidas com vírus inativado Sendai (Harris e Watkins, 1965). Entretanto o vírus Sendai inativado tem várias desvantagens como fusógeno incluindo a variabilidade e o custo.

Potter, em 1972, induziu a formação de mieloma em camundongos da linhagem BALB/c. Os mielomas podem ser induzidos em algumas linhagens de camundongos pela injeção de óleo mineral dentro da cavidade peritoneal. Essas células são referidas pela abreviação MOPC (plasmócitoma formado por óleo mineral). Mielomas derivados de BALB/c vem se tornando as células mais comuns para a realização de fusões. As linhagens de mielomas de BALB/c mais utilizadas são X63Ag8.653 (Kearney et al., 1979) e Sp2/0-Ag14 (Köhler e Milstein, 1976) (Harlow e Lane, 1988).

Pontecorvo, em 1974, mostrou que protoplasmas de plantas poderiam ser fundidos rapidamente se tratados com polietilenoglicol (PEG). Em 1975, na Inglaterra, Köhler e Milstein descobriram que era possível obter a fusão de linfócitos B de camundongo com capacidade de produzir anticorpos com células de mieloma de camundongo com a utilização de polietilenoglicol e que essas células híbridas cresceriam ilimitadamente, produzindo grandes quantidades de anticorpos homogêneos e com alta especificidade predeterminada para um epítipo (Harlow e Lane, 1988). Estes anticorpos foram denominados anticorpos monoclonais e as células híbridas que os produziam

hibridomas. Os anticorpos monoclonais abriram novas perspectivas de investigação no campo da biologia e da medicina (Köhler e Milstein, 1975).

As células de baço a ser utilizadas na fusão com os mielomas podem ser frescas ou congeladas (Marusich, 1988). O congelamento evita o desperdício de linfócitos B e pode ser realizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e nove partes de meio "high glucose Dulbeccos's modified Eagle's médium" (HGDMEM) em nitrogênio líquido por tempo indeterminado (Marusich, 1988).

Para a formação dos hibridomas, o fusógeno de escolha é o polietilenoglicol, que faz a fusão das membranas plasmáticas em um primeiro estágio formando uma simples célula com dois ou mais núcleos. Em seguida ocorrerá a fusão das membranas nucleares e a formação de heterocáριο e, durante a mitose, o DNA sofrerá uma segregação para as células filhas. Durante a segregação como o número de cromossomos é maior que o normal, nem sempre a divisão é igual para as células filhas e muitos cromossomos podem ser perdidos. A perda de cromossomos pode resultar na incapacidade dos hibridomas em produzir imunoglobulinas ou de fazer rearranjos da fração variável das cadeias leves e pesadas (Harlow e Lane, 1988).

As células de baço de um animal normal, ao contrário das células de mieloma, possuem os genes da imunoglobulina específica desejada e produzem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) que atua na produção dos ácidos nucléicos. Em um linfócitos B normal existem duas vias para síntese de ácidos nucléicos denominadas via 'de novo' e via de salvamento. Os mielomas têm toda a maquinaria necessária para a secreção de anticorpos que não são específicos mas muitos mielomas, mesmo possuindo essa maquinaria, não secretam anticorpos. Alguns mielomas são mutantes para a produção da enzima HGPRT. Os mielomas só possuem a via 'de novo' para a síntese dos ácidos nucléicos. Na fusão a via 'de

novo' pode ser bloqueada por várias drogas tais como azaserina, metrotrexato e aminopterina. A aminopterina é a droga mais utilizada para selecionar as células de mieloma não fusionadas, permanecendo vivas as células que possuem a via de salvamento e, conseqüentemente, possuem a enzima HGPRT.

Para a formação de hibridomas têm sido escolhidos mielomas que não secretam anticorpos e que não possuam a enzima HGPRT.

As células do baço necessárias para se realizar a fusão são isoladas de camundongos imunizados, da mesma linhagem de origem dos mielomas (Harlow e Lane, 1988). Com uma eficiente fusão, aproximadamente 1% das células são fundidas e apenas aproximadamente 1 em 10^5 formam hibridomas viáveis. Como a fusão é aleatória, a possibilidade de fundir mieloma com linfócitos B, linfócitos B com linfócitos B, mieloma com mieloma, células não fundidas do mieloma e linfócitos B, é necessário utilizar uma droga, que pode ser a aminopterina, para selecionar durante o cultivo pós-fusão as células fundidas (Harlow e Lane, 1988).

As células do baço que não fusionaram mesmo tendo a via 'de salvamento' morrerão porque seu tempo de vida é de aproximadamente 7 dias em meio de cultura. As células do mieloma, como possuem apenas a via 'de novo' e essa será bloqueada, morrerão. Apenas os hibridomas que são formados por célula de mieloma cuja a única via foi bloqueada e por linfócito B que ainda possui uma via 'de salvamento' sobreviverão (Harlow e Lane, 1988).

Para o cultivo dessas células híbridas muitas vezes é necessária a utilização de células alimentadoras. Muitos trabalhos relatam que o uso de células alimentadoras, por exemplo: macrófagos peritoneais (Fazekas e Scheidegger, 1980), células do timo, células do baço e fibroblastos, podem aumentar a coleta de anticorpos monoclonais e a viabilidade das células híbridas (Bazin e Lemieux, 1989).

Outra forma para melhorar a produção de anticorpos monoclonais é a utilização de meio condicionado, que é o cultivo das células do baço, linfócitos T, macrófagos e muitos outros tipos de células, que contêm fatores de crescimento solúveis para o hibridoma - HGF ("Hybridoma Growth Factor"), que é similar a IL-6 que é um fator de crescimento, proporcionando a proliferação celular. Esse meio complementar pode ser produzido pela linhagem de células P388D1 - monócito de camundongo (Bazin e Lemieux, 1989).

Ainda para obter-se uma maior produção de anticorpos monoclonais, os hibridomas podem ser inoculados na cavidade peritoneal de camundongo da mesma linhagem, causando ascite no animal. A multiplicação dos hibridomas é auxiliada pelo fluxo de macrófagos e o processo inflamatório resulta em aceleração de ascite rica em anticorpos monoclonais. A concentração dos anticorpos no líquido ascítico fica entre 1 a 10mg/mL. Quando o cultivo dos hibridomas é realizado em garrafas, essa concentração é 1000 vezes menor que no líquido ascítico (Harlow e Lane, 1988).

O desenvolvimento de testes imunoenzimáticos para detecção de *C. fetus* subsp. *venerealis* em lavado prepucial de touros infectados utilizando anticorpos monoclonais, seria de grande valia no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina, por poder apresentar grande sensibilidade, especificidade e a praticidade de realizar o diagnóstico de vários animais, tornando o diagnóstico mais barato e rápido.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, com idade entre 4 a 6 semanas, para a imunização e a coleta do líquido ascítico. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos da linhagem

BALB/c foram mantidos em grupos em gaiola no biotério da Escola de Veterinária da UFMG.

Para a coleta de macrófagos peritoneais (Harlow e Lane, 1988) foram utilizados camundongos suíços livres de patógenos específicos (SPF), adquiridos do Centro de Bioterismo da Fundação Ezequiel Dias - Funed. Os camundongos SPF foram mantidos em grupos em gaiola no biotério da Funed. Todos os camundongos foram tratados com ração e água à vontade.

Este projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) com o protocolo nº 124/04. Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de forma humanitária (REPORT..., 2001).

3.2 - Amostras bacterianas de referência e condições de cultivo

Amostras de referência dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* (Tabela 1), estocadas a -80°C , foram cultivadas em ágar infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI, Difco, EUA), acrescido de 10% de sangue defibrinado de cavalo, em condições de microaerofilia (5% O_2 , 5% H_2 , 10% CO_2 e 80% N_2) a 37°C por 48 h (Vandamme, 2000). *Escherichia coli* foi cultivada em agar Mueller-Hinton (Difco, EUA) a 37°C por 12 h. A pureza das amostras foi avaliada pela coloração com fucsina.

3.3 - Produção dos antígenos por sonicação

Foram feitas suspensões, em solução salina fosfatada tamponada pH 7,4 (PBS), na escala 10 de McFarland, das amostras de referência constantes da Tabela 1. Estas amostras foram sonicadas em gelo por 6 ciclos de 30 seg, com intervalos de 1 min de repouso, a uma frequência de 50 kHz. A sonicação foi avaliada por microscopia ótica por coloração com fucsina, estabelecendo-se um padrão de 60% de lise das bactérias.

As amostras sonicadas foram distribuídas em alíquotas de 1 mL e estocadas a -80°C. A concentração de proteínas dos antígenos

sonicados foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se como padrão a soroalbumina bovina (BSA - INLAB, Brasil).

Tabela 1 - Amostras de bactérias de referência dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia* e *Helicobacter* utilizadas nos diversos experimentos.

Espécie	Amostra
<i>Arcobacter skirrowii</i>	LMG 6621
<i>A. butzleri</i>	LMG 15919
<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11366 ^T
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo A	ADRI 1812
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo B	ADRI 553
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo B	ADRI 1810
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> sorotipo B	ATCC 27374 ^T
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	NCTC 10354
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 510
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 528
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 534
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ADRI 1832
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	LCDC 17398 (=LMG 12686)
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsoni</i>	LMG 14432 ^T
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	LMG 8843 ^T
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	NCTC 11351 ^T
<i>C. lari</i>	NCTC 11352 ^T
<i>C. sputorum</i> biovar fecalis	NCTC 11415
<i>C. sputorum</i> biovar paraureolyticus	LCDC 6577
<i>C. sputorum</i> biovar paraureolyticus	LCDC 6939
<i>C. sputorum</i> biovar sputorum	LMG 6447
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Helicobacter fenneliae</i>	LMG 13306

T – Amostra tipo

LMG – Laboratorium voor Microbiologic – Rijksuniversiteit Gent – Bélgica

NCTC – National Type Culture Collection – Inglaterra

ADRI – Animal Diseases Research Institute – Canadá

ATCC – American Type Culture Collection – Estados Unidos da América

LCDC – Laboratory Center for Disease Control – Canadá

3.4 - Imunização dos camundongos

Foram imunizadas fêmeas de camundongo da linhagem BALB/c, utilizando-se antígeno sonificado da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 com adjuvante completo (primeira inoculação) e incompleto

(segunda e terceira inoculações) de Freund (Sigma, EUA), na proporção de 1:2. As inoculações, em um volume de 500 µL contendo 50 µg de antígeno, foram realizadas por via intraperitoneal nos dias 0, 15 e 30. Uma quarta inoculação foi realizada por via endovenosa ou

subcutânea, com 50 µg de antígeno sonicado em 100 µL de PBS sem adjuvante, quatro dias antes da fusão, para a sincronização das células B (Harlow e Lane, 1988). Antes de cada imunização foi coletado sangue para a titulação dos anticorpos e para servir de controle positivo e negativo nos testes a serem realizados.

3.4.1 – Avaliação dos camundongos imunizados

Foi avaliado o título de anticorpos séricos anti – *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 pela técnica de “dot blot” segundo Harlow e Lane (1988), com modificações.

Foram utilizadas membranas de nitrocelulose (Pharmacia, Suécia) com poros de 0,45µm e área de 9775 mm², sendo hidratada de forma homogênea com tampão Tris salina (TBS pH 7,5), durante 15 min. Em seguida as membranas foram transferidas para o aparelho de “dot blot” (Bio - Dot™ Apparatus, BioRad, EUA) e lavadas com 200 µL por poço de TBS, sob vácuo.

As membranas foram sensibilizadas com antígeno sonicado da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, com 100 µL/poço na concentração de 1 ng/µL. O antígeno foi transferido para a membrana por vácuo e em seguida as membranas foram bloqueadas com solução de BSA a 1%, sendo drenadas pela gravidade. As membranas foram lavadas duas vezes com 200 µL de tampão tris salina com 0,05% de Tween 20 (Sigma, EUA) (TTBS), utilizando-se vácuo.

Os soros a serem testados foram adicionados no volume de 100 µL/poço, diluídos em base 2 de 1:1.000 a 1:50.000, sendo drenados por gravidade. As membranas foram novamente lavadas duas vezes com tampão tris salina Tween 20 0,05% drenado por gravidade e foram então aplicados 100 µL/poço na diluição 1:6.000 do anticorpo secundário (anti - IgG de camundongo conjugado com peroxidase, Sigma, EUA), com a drenagem sendo feita por gravidade. As membranas foram

finalmente lavadas duas vezes com TTBS 0,05% drenado por vácuo, retiradas do aparelho e reveladas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Kit DAB SK-4100, Vector Laboratories, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

3.5 - Produção de anticorpos monoclonais

Para a produção e preparo dos anticorpos monoclonais foram utilizados os procedimentos preconizados por Harlow e Lane (1988) e Coligan et al. (1996), com modificações.

3.5.1 - Preparo das células do baço

Os camundongos que atingiram a melhor titulação Dot Blot, foram sacrificados por deslocamento cervical, quatro dias após a última imunização (Report..., 2001). Foi feita assepsia no abdômen dos camundongos com álcool 70º com o auxílio de uma gaze estéril e em seguida com álcool iodado a 3%. Após a abertura da cavidade abdominal com material cirúrgico estéril, o baço foi retirado de forma asséptica em fluxo laminar, lavado três vezes com meio RPMI 1640 (Invitrogen®, EUA) suplementado com 10 mg/mL de tetraciclina (Sigma, EUA), 1 mg/mL de anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, Brasil) e 40 mg/mL de gentamicina (Sigma, EUA).

O baço foi colocado em uma placa de Petri estéril contendo 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico, macerado com auxílio de pinça estéril e transferido para um tubo de centrifuga de fundo cônico com o auxílio de uma pipeta. O volume foi completado para 15 mL com meio RPMI 1640 sem SFB centrifugado uma vez por 5 min, a 200 X g, a 25°C, para remoção das hemácias e retirada de proteínas solúveis e plasmáticas.

O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado ao sedimento 5 mL do tampão de lise (cloreto de amônio 0,16 M, tris 0,17 M) seguido de 5 min de repouso, pois a lise das hemácias aumenta as chances de colisão entre os linfócitos B e as células de

mieloma (Hurrell, 1982). O material foi então centrifugado uma vez por 5 min, a 200 X g, a 25°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 15 mL de meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico, sendo o tubo centrifugado uma vez por 5 min, a 200 X g, a 25°C.

Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensado em 10 mL de meio RPMI 1640 acrescido de antibióticos e 15% de SFB (Gibco™, EUA). As células foram então contadas em câmara de Neubauer após diluição em azul de tripan (Gibco™, EUA) a 0,3%.

3.5.2 - Preparo das células Sp2/O-Ag14

As células de mieloma da linhagem Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 1581 – Köhler e Milstein, 1976) foram adquiridas do Banco de Células do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Fundação Ezequiel Dias para a produção dos hibridomas.

As células foram previamente descongeladas, cultivadas em meio de pré-fusão (100 mL de RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB e 20 µg/mL 8-azaguanina [Sigma, EUA]) em estufa a 37°C em 5% de CO₂ por uma semana, sendo o meio trocado a cada 48 h. A 8-azaguanina ajuda a selecionar as células que são realmente hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase negativas - HGPRT (Coligan et al., 1996). Em seguida, as células foram cultivadas por mais uma semana em meio base (RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB e sem 8-azaguanina). As células foram contadas em câmara de Neubauer após diluição em azul de tripan a 0,3%.

3.5.3 – Fusão

A fusão foi realizada utilizando-se células de mieloma da linhagem Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 1581) e células do baço de animal imunizado com sonicação de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. Para realizar a fusão foi utilizada uma proporção de 1 célula Sp2/O-Ag14 para 10 células de baço de animal imunizado (Sharon, 1979; Coligan et al., 1996). As células do baço e as células

Sp2/O-Ag14 foram transferidas após contagem para um tubo de centrífuga de fundo cônico de 50 mL.

As células foram centrifugadas por 5 min, a velocidade de 200 X g, a 25°C. O sobrenadante foi descartado. As células do sedimento foram aquecidas a 37°C e em seguida foram adicionados lentamente 0,8 mL de polietilenoglicol (1300-1600, Sigma, EUA), previamente aquecido a 37°C em banho-maria, por 1 min. As células foram homogeneizadas lentamente e foi tomado cuidado com o tempo de exposição ao polietilenoglicol, pois este é tóxico para as células, podendo diminuir o número de células fundidas, sendo 1 min o tempo essencial para realizar uma boa fusão.

Em seguida, foram adicionados 5 mL de meio RPMI 1640, sem SFB, e o tubo incubado a 37°C durante 1 min, para diminuir a ação do polietilenoglicol. Foram acrescentados 10 mL de meio RPMI 1640 sem SFB, sendo o tubo mantido a 37°C por 5 min. Então, as células foram centrifugadas por 5 min, a 200 X g, a 25°C. O sobrenadante foi descartado.

Uma pequena alíquota de células Sp2/O-Ag14 foi reservada a fim de servir de controle do meio do RPMI 1640 suplementado com HAT 100X (RPMI 1640 acrescido com HAT- hipoxantina, aminopterina, timidina, [Sigma, EUA]).

3.5.4 – Seleção dos hibridomas

As células híbridas foram selecionadas pelo meio de cultura suplementado com HAT (200 mL de RPMI 1640, 15% de SFB, insulina bovina (Gibco™, EUA) (16,1 g/mL), 10 mg/mL de tetraciclina, 1 mg/mL de anfotericina B e 40 mg/mL de gentamicina, 2,4 mL HAT.100X). Este suplemento HAT foi utilizado pela ação da aminopterina, que inibe a via 'de novo'. As células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com HAT, em um volume de 20 mL e distribuídas em placas de 96 poços (200 µL/poço) de fundo chato de poliestireno (Sarstedt, Alemanha).

As células Sp2/0-Ag14 reservadas antes da fusão foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com HAT e transferidas para o poço A1 das placas de cultivo celular, pois estas foram usadas como controle do meio de cultura suplementado com HAT. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. As células do poço A1 Sp2/0-Ag14 foram avaliadas diariamente, para controlar a morte destas pelo meio de cultura suplementado com HAT.

As células Sp2/0-Ag14 e as células fundidas foram monitoradas diariamente, trocando-se o meio de cultura quando necessário ou a cada 48 h, utilizando-se meio de cultura suplementado com HAT, até se certificar que todas as células do poço A1 estavam mortas. Decorridos 14 dias da fusão, foi iniciada a triagem dos hibridomas que cresceram, utilizando-se o ELISA indireto, a fim de determinar os poços com híbridos positivos para anticorpos anti - *C. fetus* subsp. *venerealis* (Harlow e Lane, 1988; Coligan et al., 1996).

3.5.5 – ELISA Indireto para *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354

Placas de poliestireno de fundo chato (PoliSorp™ Surface, Nunc, Dinamarca), foram sensibilizadas com 100 µL/poço do sonificado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 na concentração de 3 ng/µL, diluído em tampão carbonato/bicarbonato (Sigma, EUA) 0,05 M pH 9,6 a 4°C durante a noite.

A placa foi bloqueada com 100 µL/poço da solução de bloqueio (soroalbumina bovina-BSA 3% diluída em PBS 0,1 M com 0,05% Tween 20 pH 7,4), a 37°C por 1 h. Após as etapas de sensibilização e bloqueio, as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (salina- NaCl- com 0,5% de Tween 20) e nas demais etapas a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem e o excesso foi retirado batendo a placa em folhas de papel toalha.

Foram adicionados nas placas os sobrenadantes das culturas em um volume

de 100µL/poço e as placas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 min. Cem microlitros do conjugado (IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase, Sigma, USA) diluído a 1:20.000 em PBS acrescido com Tween 20 0,1% foram adicionados a cada poço e incubado por 1 h a 37°C.

Foram adicionados 100 µL/poço de ortofenilenediamina (OPD-Sigma, EUA) na concentração de 40 mg/100 mL, diluído em tampão citrato 0,15 M pH 5,0, e as placas foram incubadas por 1 h a 37°C. A reação foi interrompida com 50 µL/poço da solução de ácido sulfúrico 0,37 mM (Vetec, Brasil) diluído em água. A placa foi lida em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MS 352, Finland) em um comprimento de onda de 492 nm. O ponto de corte foi calculado pela média de 10 controles negativos utilizados em cada reação acrescidos de três vezes o desvio padrão desta média, utilizando-se o programa Sigma Plot 4.0 (Jandel, Alemanha).

3.6 - Expansão dos hibridomas

Após a seleção por ELISA de hibridomas produtores de anticorpos contra *C. fetus* subsp. *venerealis*, estes foram expandidos com a finalidade de se ampliar o número destas células.

O meio de cultura suplementado com HAT foi substituído gradativamente pelo meio de cultura suplementado com HT (Sigma, EUA) (200 mL de RPMI 1640, 15% de SFB, 16,1 g/mL insulina bovina, 10 mg/mL de tetraciclina, 1 mg/mL de anfotericina B e 40 mg/mL de gentamicina, 2,4 mL de HT.100X - hipoxantina e timidina diluída em 10 mL de meio RPMI 1640) e em seguida pelo meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e insulina bovina. Estes hibridomas foram transferidos para placas de poliestireno de 24 e 6 poços (Sarstedt, Alemanha), sucessivamente, para a expansão.

3.6.1 - Cultivo primário de macrófagos e células do baço de camundongos SPF

Os macrófagos peritoneais, também chamados de células alimentadoras, foram

utilizados como fonte de fatores de crescimento para se realizar co-cultura com os hibridomas durante a clonagem (Bazin e Lemieux, 1989).

Para a coleta dos macrófagos peritoneais os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical (Report, 2001). Após o sacrifício, foi realizada assepsia com álcool 70° com o auxílio de uma gaze estéril e o camundongo foi fixado na prancha de dissecação pelas patas com o auxílio de agulhas, sendo o abdômen limpo com álcool iodado a 3%.

Foi feita uma abertura na linha alba, com muito cuidado para não perfurar a musculatura. A pele foi rebatida e fixada na prancha. Foi feito um pique na musculatura abdominal e, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a cavidade foi lavada três vezes com meio utilizado para cultura dos hibridomas, previamente aquecido. O lavado foi distribuído em placas de 96 poços, onde foram colocados os hibridomas.

O baço foi retirado e processado com o mesmo protocolo utilizado anteriormente (3.5.1). As células do baço foram cultivadas em garrafas plásticas para cultivo celular de 25 cm² em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por três dias. Em seguida as células do baço foram centrifugadas a 200 X g, por 5 min, a 25°C. O sobrenadante foi utilizado como meio suplementar em uma proporção de uma parte de meio suplementar e uma parte de meio RPMI 1640 completo. O meio suplementar foi congelado a -20°C para posterior uso.

3.7 - Clonagem

A clonagem dos hibridomas foi realizada por diluição limitante. O meio utilizado foi o meio de cultura suplementado com HT e as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C por 14 dias. Foi realizada a contagem dos hibridomas em câmara de Neubauer e em seguida foi feita a diluição limitante nas concentrações de 10 células e uma célula por poço em um volume de 100 µL/poço.

As placas foram observadas todos os dias por 14 dias para se verificar em primeiro lugar a presença de uma célula por poço e, nos dias seguintes, crescimento e troca de meio. Os clones em expressão foram avaliados quanto a produção de anticorpos monoclonais anti *C. fetus* subsp. *venerealis* por ELISA indireto (3.5.5).

3.7.1 - Expansão dos clones

As células dos poços positivos para a produção de anticorpos foram transferidas para placas de 24 poços e 12 poços para expansão e obtenção de sobrenadante suficientes para a realização da isotipagem, especificidade e caracterização dos anticorpos monoclonais. Neste estágio os hibridomas diminuíram o crescimento e para tentar melhorar o crescimento da cultura o soro fetal bovino foi inativado 30 min a 56°C. Foram introduzidos no meio de cultura fatores de crescimento, como: o fator de crescimento de células endoteliais (EGF – Sigma, EUA) 10 µL/100 mL de meio (1g/100), transferrina bovina (Sigma, EUA) 40 mg/mL de meio, selenito de sódio (Sigma, EUA) 5 µg/mL de meio, 50 µg/mL concanavalina A (Sigma, EUA) e meio suplementar (1:2), meio de cultura CD Hybridoma AGT (Gibco™) para fazer a expansão clonal. As células foram apenas observadas por microscopia e não foram contadas e a cada sete dias foi adicionado um fator.

3.8 - Obtenção do sobrenadante de cultura contendo anticorpos monoclonais

Nas trocas do meio de cultura das placas contendo anticorpos monoclonais, os sobrenadantes das culturas foram coletados em condições assépticas, com auxílio de uma pipeta automática, distribuídos em alíquotas em criotubos devidamente identificados e estocados a -20°C.

3.9 - Produção de anticorpos monoclonais em líquido ascítico em BALB/c

Para a produção de anticorpos monoclonais em líquido ascítico foi seguida a metodologia descrita por Harlow e Lane (1988), com modificações.

Fêmeas adultas de camundongos da linhagem BALB/c, com 6 semanas de idade, foram inoculadas por via intraperitoneal com 0,5 mL de Pristane (2,6,10,14-ácido tetrametildecanoico [Sigma, EUA]) (Potter 1972) e, após 7 dias, os hibridomas foram inoculados intraperitoneal em uma concentração de 5×10^5 a 5×10^6 hibridomas por animal. Os hibridomas antes de serem inoculados foram centrifugados e as células foram ressuspensas em PBS em um volume final de 0,5 mL.

A colheita do líquido ascítico foi feita 14 a 34 dias após a inoculação dos hibridomas com o auxílio de uma agulha 40 X 1,2 (Injex - Brasil). Após a coleta, o líquido ascítico foi colocado em estufa a 37°C por 1 h e em seguida colocado a 4°C durante a noite e congelado a -20°C.

3.10 – Isotipagem

As classes e subclasses dos anticorpos monoclonais produzidos foram determinadas por ELISA de acordo com Harlow e Lane (1988).

Para realizar a isotipagem foram sensibilizadas placas de poliestireno de fundo chato (Immuno™ Plate PoliSorp™ Surface, Nunc, Dinamarca) com antígeno sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 na concentração de 3 ng/ μ L, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Foram adicionados 50 μ L/poço e a placa foi incubada a 4°C durante a noite.

A placa foi bloqueada com 50 μ L/poço da solução de bloqueio (BSA 3% diluída em PBS 0,1 M com 0,05% Tween 20), a temperatura ambiente por 2 h. Após as etapas de sensibilização e bloqueio, as

placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem [salina (NaCl) com 0,5% de Tween 20] e nas demais etapas as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem e o excesso foi retirado batendo a placa em folhas de papel toalha.

Cem microlitros de sobrenadante dos clones produtores de anticorpos foram adicionados em placas de 96 poços, sendo um total de 6 poços para cada clone a ser testado, ou seja, um poço para cada classe ou subclasse a ser testada. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 h. Como controle negativo foi usado 100 μ L/poço de PBST 0,1% e como controle positivo foi utilizado soro hiperimune de camundongo imunizado com sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, diluído 1:500.

Anticorpos monoclonais específicos anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG₁, anti-IgG_{2a}, anti-IgG_{2b} e anti-IgG₃ de camundongo (BD Biosciences Pharmingen, EUA), na concentração de 2 μ L/mL, foram adicionados à placa em um volume total de 50 μ L/poço. A placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente.

Cinquenta microlitros do conjugado (IgG anti-rato conjugado com peroxidase [Sigma, USA]), diluído em PBST 0,1% na razão de 1:10.000, foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente.

Foram adicionados 50 μ L/poço de OPD na concentração de 40 mg/100mL, diluído em tampão citrato 0,15 M pH 5,0 em cada poço e as placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L/poço de ácido sulfúrico a 0,37mM diluído 1:20 em água e a leitura foi feita em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MS 352, Finlândia) em um comprimento de onda de 492 nm.

3.11 - Congelamento dos hibridomas

As células foram congeladas seguindo a metodologia descrita por Campbell et al. (1986), com modificações. O meio utilizado para congelar os hibridomas foi meio

suplementado com HAT acrescido com 6% de DMSO (Sigma, USA) e 10% de SFB. Os hibridomas foram distribuídos em alíquotas em criotubos devidamente identificados. Os criotubos foram envolvidos em papel e acondicionados em uma caixa de isopor lacrada e colocados a 4°C por 1 h. Em seguida a caixa contendo os criotubos foi colocada a -20°C por 24 h e em seguida colocada a -80°C.

3.12 - Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto a especificidade

Para caracterização dos anticorpos monoclonais quanto à especificidade foi utilizado o ELISA (3.5.5) com antígenos sonicados preparados a partir das bactérias: *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, *C. lari* NCTC11351, *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647, *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo A ADRI 1812. Os anticorpos monoclonais reagentes contra essas bactérias foram testados por “western blotting”.

3.12.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante foi empregada a técnica descrita por Laemmli (1970). A concentração dos géis utilizados foram 4% para o gel de concentração e de 12% para o de separação e como marcador molecular foi utilizado “Prestained Molecular Weight Standard Mixture” (Sigma, EUA). Foi utilizado como antígeno a *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647.

3.12.2 - “Western blotting”

Após a eletroforese (SDS-PAGE), o gel foi cuidadosamente retirado do aparelho e equilibrado com solução tampão tris - glicina pH 8,3 (tampão de transferência). Em seguida, o gel foi montado no Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, EUA) e a transferência realizada a 100 V, por 1 h.

Após a transferência, as membranas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem TBS com 0,05% de Tween 20, por 5 min a temperatura ambiente. Então, as membranas foram bloqueadas em TBS pH 7,5, contendo 1% de Tween 20 por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação de 100 rpm. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi acondicionada no Mini Protean® II Multi Screen (BioRad, EUA) para realização do “western blotting”.

Foram adicionados 600 µL do sobrenadante de cada hibridoma a ser testado em cada canaleta. A membrana de nitrocelulose foi incubada à temperatura ambiente por 3 h. Em uma canaleta foi colocado o soro policlonal de camundongo BALB/c, pré-testado em “dot blot” contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, como controle positivo.

Após a incubação, as canaletas foram lavadas com tampão de lavagem TTBS e foram adicionados 600 µL do conjugado (anti - mouse IgG peroxidase), na diluição de 1:5.000 em solução de TBST 0,1% e a membrana de nitrocelulose foi incubadas por 1 h à temperatura ambiente. Após a lavagem, a membrana foi retirada do aparelho e revelada com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (Kit DAB SK-4100, Vector Laboratories, EUA) utilizado segundo recomendações do fabricante.

4 – RESULTADOS

4.1 - Imunização dos camundongos

O esquema de imunização resultou em uma excelente resposta humoral contra *C. fetus* subsp. *venerealis* em camundongos BALB/c. Títulos de 50.000 foram determinados por “dot blot” (Fig. 1). Dois casos de morte de camundongos ocorreram quando o reforço foi realizado por via endovenosa. Sendo assim, a via de inoculação do reforço foi substituída pela via subcutânea.

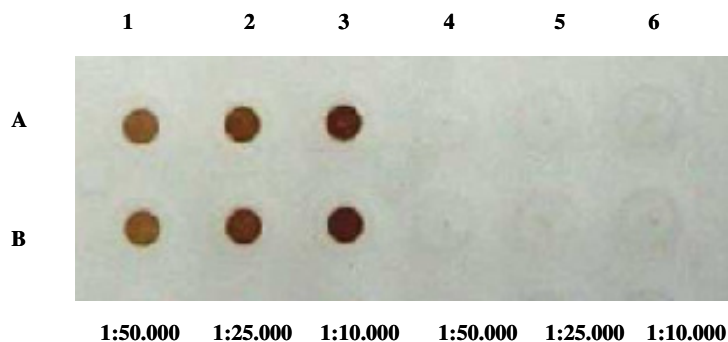


Figura 1 – “Dot blot” da titulação dos soros dos camundongos inoculados com antígeno sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 – Membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com antígeno sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 na concentração de 1 ng/μL. Os soros foram testados em duplicata nas linhas A e B. Nas colunas de 1 a 3 soro hiperimune de camundongo BALB/c, 45 dias após a 3ª imunização. Nas colunas de 4 a 6: controle negativo – soros dos camundongos BALB/c coletado antes da imunização.

4.1.1 - Soro Hiperimune

O soro hiperimune de camundongo reagiu com algumas bactérias da Tabela 1, exceto com *E. coli* ATCC 25922, *C. lari* NCTC 11352, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398 e *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647 (Fig. 2).

4.2 - Produção dos anticorpos monoclonais

Foram realizadas 8 fusões, sendo 4 fusões utilizando células de baço congelado, segundo Marusich (1988) com modificações

e 4 fusões utilizando células de baço fresco. Não foi obtido sucesso na produção de anticorpos monoclonais, a partir de células congeladas. Com as células de baço após descongelamento, a fusão foi realizada, mas não foi obtido crescimento, permanecendo no meio apenas as células de mieloma fundidas, que morriam dentro de poucos dias. Sendo assim não foi possível produzir células híbridas produtoras de anticorpos partir de células de baço congeladas.

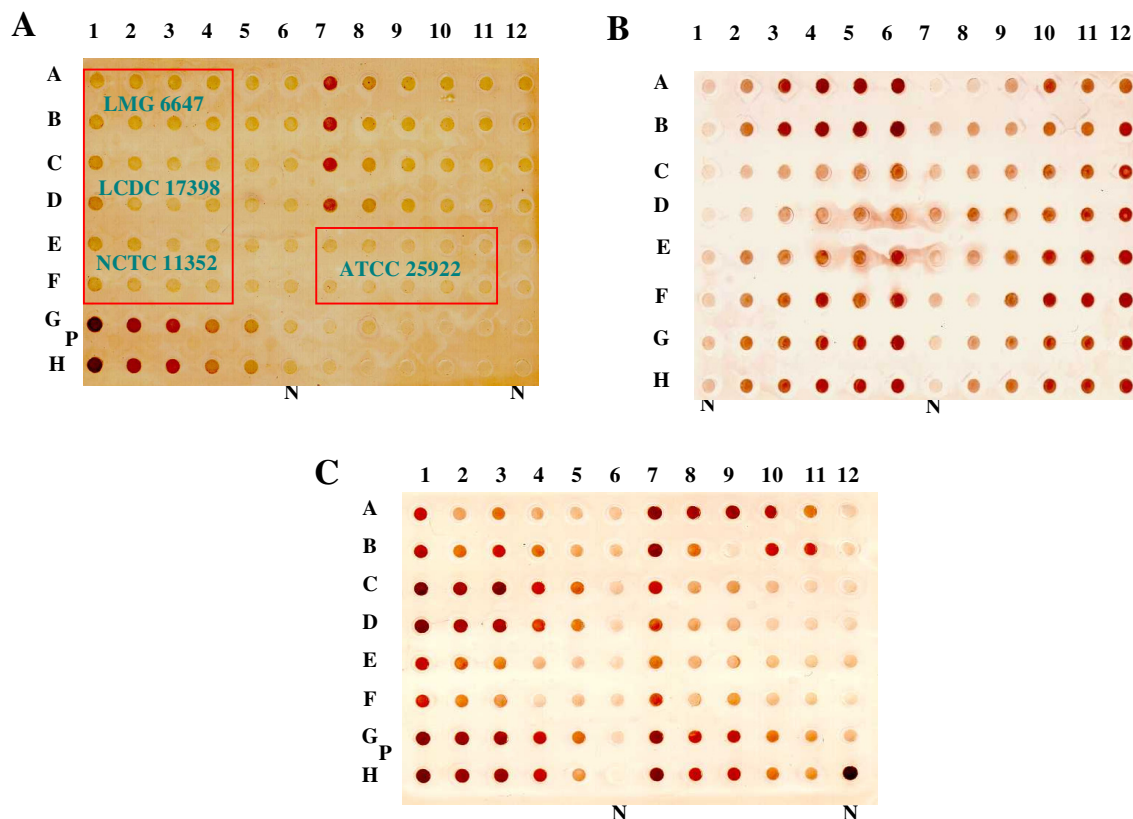


Figura 2 – Dot blot mostrando a especificidade do soro de camundongo BALB/c após a 3^o imunização contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354– Membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com antígenos sonicados das amostras bacterianas constantes da Tabela 1 nas concentrações de 1 ng/μL. Os soro do mesmo animal foi testado em duplicata nas linhas. Foram testadas as diluições de 1:1.000 (colunas 1, 6 e 7), 1:5.000 (colunas 2 e 8), 1:10.000 (colunas 3 e 9), 1:25.000 (colunas 4 e 10) e 1:50.000 (colunas 5 e 11). Nas colunas de 1 a 5 e de 7 a 11, nas membranas A e C, e de 2 a 6 e de 8 a 12, na membrana B, foram testados soro de camundongo BALB/c após a 3^o imunização. Como controle negativo (N) foi empregado soro de camundongo antes da imunização nas colunas 6 e 12 das membranas A e C e nas colunas 1 e 7 da membrana B. Na membrana A, as colunas de 1 a 6 foram sensibilizada com *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6447 (linhas A e B), *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398 (linhas C e D), *C. lari* NCTC 11352 (linhas E e F) e *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (linhas G e H); as colunas de 7 a 12 foram sensibilizadas com *C. hyointestinalis* subsp. *lawsoni* LMG 14432 (linhas A e B), *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351 (linhas C e D) e *E. coli* ATCC 25922 (linhas E e F), nada digno de nota (linha G e H). Na membrana B, as colunas de 1 a 6 foram sensibilizadas com *C. fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 (linhas A e B), *C. fetus* subsp. *fetus* sototipo A ADRI 1812 (linhas C e D), *C. fetus* subsp. *fetus* sototipo B ADRI553 (linhas E e F) e *C. jejuni* subsp. *doylei* LMG 8843 (linhas G e H); as colunas de 7 a 12 foram sensibilizadas com *C. fetus* subsp. *fetus* sototipo B ADRI 1810 (linhas A e B), *C. fetus* subsp. *venerealis* ADRI 1832 (linhas C e D), *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LCDC 6939 (linhas E e F) e *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (linhas G e H). Na membrana C, as colunas de 1 a 6 foram sensibilizadas com *Arcobacter skirrowii* LMG 6621 (linhas A e B), *C. fetus* subsp. *venerealis* ADRI 510 (linhas C e D) e *C. sputorum* biovar *paraureolyticus* LCDC 6577 (linhas E e F), *C. fetus* subsp. *venerealis* ADRI 534 (linhas G e H); as colunas de 7 a 12 foram sensibilizadas com *C. fetus* subsp. *venerealis* ADRI 528 (linhas A e B), *A. butzleri* LMG 15919 (linhas C e D), *C. sputorum* biovar *fecalis* NCTC 11415 (linhas E e F) e *C. coli* NCTC 11366 (linhas G e H).

Foram realizadas quatro fusões utilizando células de baço fresco, mas apenas uma fusão seguiu o curso normal, pois ocorreram alguns problemas técnicos e contaminações, quando as culturas de células híbridas foram perdidas. No preparo das células de baço foi utilizado tampão de lise para retirar as hemácias e foram obtidos bons resultados. Após a fusão foi utilizado apenas meio RPMI 1640, acrescido de 15% de SFB, gentamicina, tetraciclina, insulina bovina e HAT. As células tinham um bom crescimento e podia se observar células com mais de um núcleo (heterocário).

Decorridos 14 dias da fusão, foram detectados por ELISA indireto poços onde havia produção de anticorpos anti – *C. fetus* subsp. *venerealis*. Foram considerados positivos os sobrenadantes com leitura a 492 nm superior ao ponto de corte. Cada fusão resultou em duas placas de 96 poços de fundo chato. Dessas duas placas, 77 poços foram positivos para a produção de anticorpos contra *C. fetus*.

4.3 - Expansão dos hibridomas

Após a seleção dos hibridomas produtores de anticorpo contra *C. fetus* subsp. *venerealis*, os mesmos foram transferidos para uma placa de 24 poços. O crescimento permaneceu excelente, com o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com SFB e insulina bovina. Então, alíquotas de células híbridas foram congeladas e estocadas a -80°C. Outras alíquotas de células híbridas foi mantida em placa de 24 poços para a realização da clonagem.

4.4 – Clonagem

A clonagem foi realizada por diluição limitante, de acordo com Harlow e Lane (1988). Os poços produtores de anticorpo de maior absorbância no ELISA foram clonados e os outros poços de baixa absorbância foram congelados para estudos posteriores. Foram feitas trocas de meio a cada 48 h ou quando necessário e observações em microscopia de contraste de fase em um aumento de 40X e 100X para se verificar os poços que continham apenas uma célula e

o crescimento das colônias. Após 14 dias de clonagem, foi realizado um ELISA com o sobrenadante das culturas. Foram obtidos 96 (16,66%) poços positivos para a produção de anticorpos anti- *C. fetus* subsp. *venerealis*, oriundos de seis placas de 96 poços.

4.5 – Expansão dos clones

As células híbridas eram acompanhadas diariamente por microscopia de contraste de fase em um aumento de 20X, 40X e 100X.

Com a combinação de meio RPMI 1640 e células alimentadoras foi obtida uma melhora temporária dos hibridomas. Foi optado pela utilização de fatores de crescimento EGF que foi adicionado ao meio RPMI 1640 e células alimentadoras onde foi obtido uma nova melhora no crescimento por um tempo limitado, tendo uma paralisação no desenvolvimento celular com uma semana após o uso do meio com o fator de crescimento. Para tentar manter o crescimento celular, foi empregado meio RPMI 1640 com EGF, células alimentadoras e elemento traço - transferrina bovina. As células mantiveram o crescimento por um tempo maior. Então foi introduzida a associação de meio RPMI 1640, EGF, células alimentadoras, transferrina bovina, selenito de sódio e concanavalina A. A melhora das células foi rápida tendo um crescimento significativo, porém resultou em um crescimento ainda temporário dos hibridomas. Em seguida foi introduzido o meio de cultura CD Hybridoma AGT, as células se mantiveram mas o crescimento continuou lento (Figura 3 – A, B, C, D, E).

Mesmo com a adição do EGF e elementos traços, os hibridomas diminuíram o crescimento, diminuindo o número de células drasticamente. Não foi possível a expansão dos clones, permanecendo estes em concentrações baixas e com baixos níveis de produção de anticorpos.

4.6 - Produção de líquido ascítico em BALB/c

Com a finalidade de se recuperar os hibridomas e produzir uma maior concentração de anticorpos foi tentada a produção de líquido ascítico com alguns

clones. Em nenhum dos camundongos BALB/c inoculados houve produção de ascite, apenas uma pequena reação ao pristane, sem produção de líquido ascítico com presença de imunoglobulinas específicas.

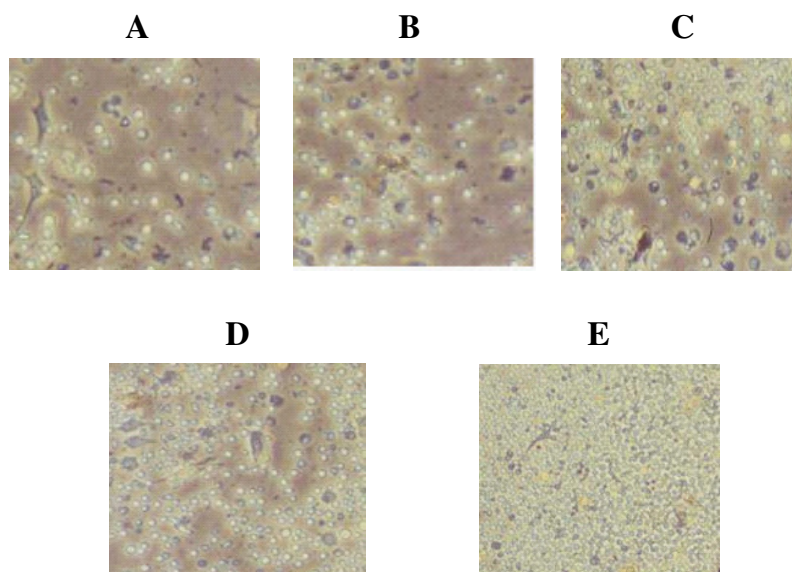


Figura 3 - Hibridomas em fase de crescimento, 48h após da adição de fatores de crescimento (20x). A - Hibridomas sem fator de crescimento com células alimentadoras no dia zero. B - Hibridomas após meio RPMI 1640, células alimentadoras e EGF. C - Hibridomas após meio RPMI 1640, células alimentadoras, EGF e transferrina bovina. D - Hibridomas após meio RPMI 1640, células alimentadoras, EGF e transferrina bovina, selenito de sódio. E - Hibridomas após meio RPMI 1640, células alimentadoras, EGF e transferrina bovina, selenito de sódio, concanavalina, meio complemento (1:2).

4.7 – Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto ao isotipo

Foram observados clones produtores de anticorpos anti – *C. fetus* subsp. *venerealis* das classes IgM (1) e IgG (14), com as subclasses IgG₁ (13) e IgG_{2b} (1) (Tab. 2). Foram considerados positivos todos os poços com leitura acima do ponto de corte em leitor de ELISA a 492 nm. Os clones com leitura abaixo do ponto de corte para todas as classes e subclasses foram descartados e os que reagiram com mais de uma classe e subclasses, foram congelados para estudos posteriores e subclonagem.

4.8 - Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto a especificidade

Para a caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos foram realizados por ELISA (3.5.5) teste com antígenos escolhidos das bactérias *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo A ADRI 1812, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398, *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, *C. lari* NCTC 11351 e *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647. Os resultados da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos estão na

Tabela 2. Dos 15 clones produtores de anticorpos monoclonais, quatro foram específicos para *C. fetus*, sendo dois

específicos para *C. fetus* subsp. *venerealis* (M28 e M 93) e dois para *C. fetus* subsp. *fetus* (M7 e M94).

Tabela 2 – Especificidade e classes e subclasses dos anticorpos monoclonais produzidos contra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.

Clones	Amostras bacterianas					Isotipo
	LMG 6647	NCTC 10354	ADRI 1812	NCTC 11352	LMG 6621	
M2	-	X	X	X	-	IgG ₁
M7	-	-	X	-	-	IgM
M21	-	X	X	X	-	IgG ₁
M22	-	X	X	X	-	IgG ₁
M28	-	X	-	-	-	IgG ₁
M37	-	X	X	X	-	IgG ₁
M39	-	X	X	X	-	IgG ₁
M41	-	X	X	X	-	IgG ₁
M42	-	X	X	X	-	IgG ₁
M44	-	X	-	X	X	IgG ₁
M45	-	X	X	X	X	IgG _{2b}
M60	-	X	X	X	-	IgG ₁
M76	-	X	X	X	-	IgG ₁
M93	-	X	-	-	-	IgG ₁
M94	-	-	X	-	-	IgG ₁

Arcobacter skirrowii LMG 6621

C. fetus subsp. *fetus* sorotipo A ADRI 1812

C. fetus subsp. *venerealis* NCTC 10354

C. hyointestinalis subsp. *hyointestinalis* LCDC 17398

C. lari NCTC11351

C. sputorum biovar *sputorum* LMG 6647

M - Clones produtores de anticorpos monoclonais

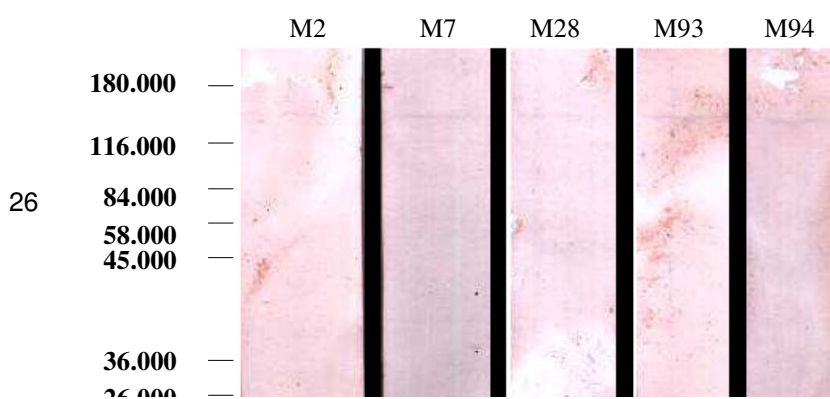
X – produtores de anticorpos monoclonais

- não produtores de anticorpos monoclonais

4.9 - Caracterização dos anticorpos monoclonais por “western blotting”

Os hibridomas isotipados e caracterizados quanto a especificidade foram avaliados por “western blotting”, para se determinar contra quais proteínas das amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647 reagiriam. O resultado obtido pelo “western

blotting” realizado com o antígeno de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 foi o reconhecimento de uma banda com um peso molecular de aproximadamente 148 kDa, por todos os clones (Fig. 4). Nenhuma banda foi identificada pelos clones produzidos quando se utilizou antígeno de *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647 no “western blotting”.



148.000 →

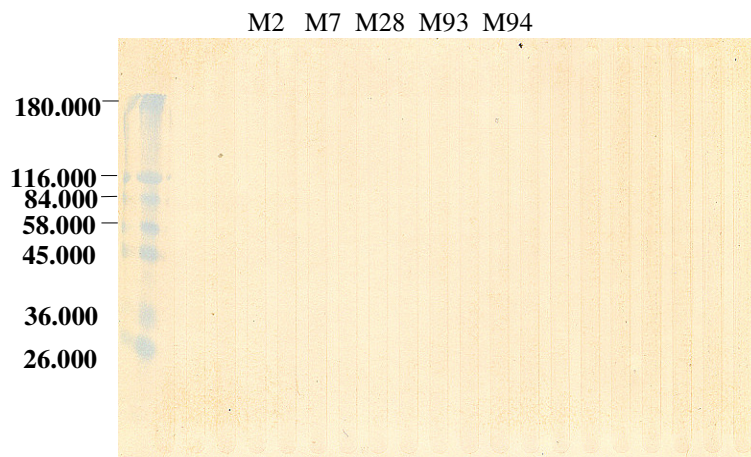


Figura 4 – "Western blotting" para a caracterização dos anticorpos monoclonais obtidos. A – "Western blotting" utilizando antígeno sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (357 µg por canaleta) e 2000 µL de sobrenadante de cultura dos clones M2 (canaleta 1), M7 (canaleta 2), M28 (canaleta 3), M93 (canaleta 4) e M94 (canaleta 5). B - "Western blotting" utilizando antígeno sonicado de *C. sputorum* biovar. *sputorum* LMG 6647 (357 µg por canaleta) e 600 µL de sobrenadante de cultura dos clones M2 (canaleta 1), M7 (canaleta 2), M28 (canaleta 3), M93 (canaleta 4) e M94 (canaleta 5). As reações foram reveladas pelo kit DAB (Vector Laboratories, EUA).

5 – DISCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas de produção de anticorpos monoclonais em cultura de células tem aumentado rapidamente a produção de anticorpos específicos e homogêneos contra um epítipo específico de escolha. No entanto, o sistema de produção de anticorpos monoclonais e o cultivo de células híbridas são complexos e estes necessitam de fatores para o crescimento, proteínas transportadoras e elementos traços, tais como transferrina e selenito de sódio, dentre outros.

Anticorpos monoclonais podem ser ferramentas importantes no estudos da epidemiologia das infecções causadas por *C. fetus* subsp. *venerealis*, podendo originar testes diagnósticos mais específicos e sensíveis, tais como imunoenaios, imunofluorescência direta e imunistoquímica, servir de marcadores de superfície celular para estudo da relação parasita-hospedeiro e triagem de amostras.

No presente trabalho com o protocolo de imunização utilizado (Harlow e Lane, 1988) foi obtida uma excelente resposta humoral utilizando camundongos BALB/c apresentando títulos iguais ou superiores a 50.000. Apesar da boa resposta obtida, ocorreram casos de morte de camundongos imunizados, quando a última inoculação foi realizada pela via endovenosa. Além do estresse ocasionado pela inoculação, que é mais dolorosa por ser caudal, provavelmente ocorreu choque anafilático após as inoculações endovenosas, levando os camundongos a óbito imediato. Para se evitar a perda de animais, a via de inoculação endovenosa do sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* foi substituída pela via subcutânea, que foi realizada no dorso do animal, sendo menos traumática, diminuindo o estresse por ter uma absorção mais lenta que a endovenosa. Desta forma não houve mais morte de animais e os títulos de anticorpos após a imunização permaneceram nos mesmos patamares.

Segundo Marusich (1988), a utilização de células de baço congeladas para a fusão seria uma ótima opção pois seria fácil o congelamento e descongelamento de células de baço imunizadas. Haveria também diminuição da utilização, manutenção e estresse dos camundongos em função do esquema de imunização utilizados - um baço poderia resultar em várias fusões, que poderiam ser feitas em momentos diferentes e em intervalos curtos, não sendo preciso esperar 50 dias de imunização. Além da economia de tempo e dinheiro, ainda poderia ser montado um banco de células de baço de camundongo imunizado com o antígeno escolhido. No presente trabalho foram realizadas no total oito fusões, sendo quatro fusões realizadas com a utilização de células do baço congeladas (Marusich, 1988). Nenhuma das quatro fusões com baço congelados teve sucesso na geração de hibridomas viáveis, não sendo possível a produção de anticorpos monoclonais.

No congelamento das células de baço realizado no presente trabalho foi utilizado o meio RPMI 1640, diferente do meio HGDMEM indicado (Marusich, 1988), o que pode ter influenciado no resultado, pois o RPMI 1640 contém menor concentração de glicose e piruvato de sódio, que são fontes de energia imediata para as células após o descongelamento. Marusich (1988) utilizou HGDMEM suplementado com baixa concentração de β -mercaptoetanol, que já prepara a membrana celular facilitando a fusão das células, insulina, que atua no metabolismo da glicose para fornecimento de energia para a célula, e sobrenadante de cultura de células P388D₁ (linhagem de células de macrófagos de camundongo) que contém fator de crescimento para plasmócito (PCT-GF), que estimulam o crescimento celular. A não utilização no presente trabalho de suplementos no meio de congelamento também pode ter contribuído para o insucesso da utilização de células de baço congeladas na produção de anticorpos monoclonais. Entretanto, talvez o fator mais agravante tenha sido o armazenamento das células do baço. No

presente trabalho as células do baço após serem processadas foram estocadas a -80°C por mais de dois anos. No armazenamento das células a -80°C em lugar da conservação a -196°C em nitrogênio líquido pode ter ocorrido a formação de cristais, que no momento do descongelamento podem ter causado danos irreversíveis às células, resultando na falha da produção de células híbridas.

Quatro fusões foram realizadas com a utilização do baço fresco. Destas quatro fusões, três fusões foram interrompidas por problemas técnicos e contaminações. O protocolo da fusão utilizado (Harlow e Lane, 1988, com modificações) foi bem sucedido, obtendo-se células híbridas produtoras de anticorpos. Nesta etapa não foi necessário a utilização de células alimentadoras, pois as células estavam com um excelente crescimento e foi obtido número de células suficiente para se realizar a clonagem. A clonagem realizada foi eficiente e foram obtidos clones produtores de anticorpos monoclonais específicos. A expansão destes clones ficou comprometida diminuindo o seu crescimento e alguns fatores de crescimento, elementos traços e co-cultivo foram testados.

A introdução do fator de crescimento EGF, que é um fator de crescimento para células endoteliais e não é específico para cultura de hibridomas, teve pouca influência no crescimento celular obtendo-se um crescimento temporário, que não se manteve. Elementos traços, como a transferrina bovina, que é uma proteína transportadora de íons, e o selenito de sódio formam em conjunto com a transferrina e insulina o ITS que é um complexo utilizado para cultivos de hibridomas e cultivo primários. Com a utilização desses fatores de crescimento e elementos traços, foi obtido crescimento temporário dos hibridomas. Após alguns dias houve redução da concentração celular, não sendo possível a expansão dos clones com número suficiente de células para congelamento.

A tentativa de se produzir anticorpos monoclonais em líquido ascítico de

camundongos BALB/c, que propiciariam um ambiente com todos os fatores para um melhor crescimento dos hibridomas, e portanto, uma maior produção de anticorpos monoclonais, não foi produtiva. A produção de líquido ascítico foi provavelmente comprometida em função do lento crescimento das células híbridas, que deveriam estar na fase logarítmica e produzindo anticorpos *in vitro* no momento da inoculação. Ocorreu uma produção de um líquido ascítico em pequena quantidade, que continha imunoglobulinas inespecíficas, que provavelmente foi uma reação ao pristane utilizado para preparar os camundongos para receberem os clones pré-selecionados.

Dentre os clones produtores de anticorpos anti-*C. fetus* obtidos foram encontrados clones produtores de IgM e IgG, nas subclasses IgG₁ e IgG_{2b}, sendo predominantes os clones produtores de IgG₁, o que já era esperado, em função do esquema de imunização e adjuvantes empregados.

Na caracterização da especificidade dos anticorpos monoclonais foi utilizado um painel de bactérias escolhidas em função de suas prevalências e habitats. *C. sputorum* biovar sputorum é comensal do prepúcio do touro podendo ser encontrado nos lavados prepúciais e, em algumas situações, ser confundido com *C. fetus* subsp. *venerealis*, ocasionando resultados falso-positivos no diagnóstico da campilobacteriose genital bovina (Vandamme, 2000). *C. fetus* subsp. *fetus* é habitante do trato gastrointestinal de bovinos, mas também pode ser encontrado no prepúcio de touros e como agente de aborto em bovinos (Thompson e Blaser, 2000). *C. fetus* subsp. *fetus* são as bactérias genética e antigênicamente mais próximas de *C. fetus* subsp. *venerealis*; além disto, a amostra utilizada, *C. fetus* subsp. *fetus* ADRI 1812, é do sorogrupo A, ao qual pertencem todas as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Stoessel, 1982; Vandamme, 2000). *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, que também é uma bactéria intestinal, é a espécie mais próxima geneticamente de *C. fetus* (Wesley et al., 1991). *Arcobacter skirrowii* também pode

ser encontrado no prepúcio do touros e já foi isolada de feto abortado de bovinos e pode ser confundido com *C. fetus* subsp. *venerealis* (Vandamme, 1992; Vandamme, 2000). Por estes motivos, o painel de bactérias escolhido no presente estudo certifica que os anticorpos monoclonais produzidos não têm reações cruzadas com outras bactérias da família *Campylobacteraceae* que podem estar presentes no prepúcio de touros ou em fetos bovinos abortados.

Após a caracterização quanto a especificidade dos clones por ELISA indireto, foi realizado "western blotting" com sobrenadantes coletados dos clones a fim de caracterizá-los quanto à sua especificidade em relação aos componentes antigênicos da bactérias *C. sputorum* biovar *sputorum* LMG 6647 e *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354.

No "western blotting" realizado com sonicação de *C. sputorum* biovar *sputorum* nenhum anticorpo monoclonal reagiu, confirmando a especificidade dos clones selecionados. Os anticorpos monoclonais produzidos por todos os clones reconheceram uma mesma proteína, sendo altamente específicos para uma proteína com um alto peso molecular, aproximadamente 148 kDa, no antígeno sonicado de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354. Esta proteína reconhecida pode ser uma proteína de membrana externa que forma um arranjo protéico constituído de proteínas de alto peso molecular, variando de 97 a 149 kDa, denominada "surface array protein" (SAP) (Blaser et al., 1994; Garcia et al., 1995). A proteína SAP forma uma "cápsula" protéica que recobre todo o lipopolissacáride de *C. fetus* e é imunodominante (Thompson e Blaser, 2000). A imunização realizada com antígeno sonicado, que apresentava 40% de células bacterianas inteiras, associada à imunodominância da proteína SAP podem ter sido responsáveis pela obtenção de clones que só reconhecem esta proteína.

O resultado obtido condiz com os resultados de Dworkin e Blaser (1997), que analisando lisado de *C. fetus* em um gel de

poliacrilamida SDS-PAGE, mostrou a presença de bandas dominantes, sendo proteínas de camada externa. A proteína SAP de amostra do sorotipo A tem a mesma porção amino-terminal, composição similar de aminoácidos e ponto isoelétrico semelhantes. A variação na proteína SAP em *C. fetus* pode ser responsável pela variação antigênica observada *in vitro* (Wang et al., 1993).

6 – CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Não foi possível a produção de anticorpos monoclonais a partir de células de baço congeladas a -80°C em meio RPMI 1640;
2. A utilização da via subcutânea na última inoculação dos camundongos para a imunização não interferiu na produção de anticorpos monoclonais;
3. Foram produzidos anticorpos monoclonais específicos contra *C. fetus* subsp. *fetus* sorotipo A (M7 e M94), *C. fetus* subsp. *venerealis* (M28 e M93) e anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos conservados nos gêneros *Arcobacter* e *Campylobacter* (M2, M21, M22, M37, M39, M41, M42, M44, M45, M60, M76);
4. anticorpo monoclonal M45, que reconhece antígenos conservados nos gêneros *Arcobacter* e *Campylobacter*, poderá ser uma ferramenta para caracterização de gênero.
5. Os isotipos encontrados nos clone produtores de anticorpos monoclonais contra *C. fetus* foram IgG₁ e IgM, sendo o mais freqüente IgG₁;
6. Todos os anticorpos monoclonais obtidos, específicos para *C. fetus*, reagiram com uma proteína de *C. fetus* subsp. *venerealis* de aproximadamente 148 kDa.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARSKI, G.; SORIEUL, S.; CORNEFERT, F. Production of cells of a "hybrid" nature in cultures in vitro of 2 cellular strains in combination. *Compt. Rend.*, v. 251, n. 24, p.1825-7, 1960.
- BAZIN, R.; LEMIEUX, R. Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J. Immunol. Methods.*, v. 116, n. 2, p. 245-249, 1989.
- BLASER, M.J.; WANG, E.; TUMMURU, M.K et al. High-frequency S-Layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by sapA mutagenesis. *Mol. Microbiol.* v. 14, n. 3, p. 453-462, 1994.
- BROOKS, B.W.; DEVENISH, J.; LUTZE-WALLACE, C.L et al. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Vet. Microbiol.*, v. 103, n. 1-2, p. 77-84, 2004.
- CAMPBELL, A.M. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: monoclonal antibody technology the production and characterization of rodent and human hybridomas.* New York: Elsevier Science, 1986. v. 13, 265p
- CLARK, B.L. Review of bovine vibriosis. *Aust. Vet. J.*, v. 47, n. 3, p. 103-107, 1971.
- COLIGAN, J.E.; KRVISBEEK, A.M.; MARCULIES, D.H. et al. *Current protocols in immunology.* New York: John Wiley & Sons, 1996.
- DEKEYSER, J. Bovine genital *Campylobacteriosis*. In: BUTZLER, J.P. *Campylobacter infection in man and animal.* Boca Raton: CRC, 1984. p. 181-191.
- DWORKIN, J.; BLASER, M.J. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Mol. Microbiol.* v. 26, n.3, p. 433 – 440, 1997.
- DUBREUIL, J.D; LONG, S. M.; CUBBAGE, S. et al. Structural and biochemical analyses of surface array protein of *Campylobacter fetus*. *J. Bacteriol.*, v. 170, n. 9, p. 4165-4173, 1988.
- DUBREUIL, J.D.;KOSTRZYNSKA, M.; AUSTIN, J.W et al. Antigenic differences among *Campylobacter fetus* S-Layer proteins. *J. Bacteriol.*, v. 172, n. 9, p. 5035-5043, 1990.
- DUNN, B.E.; BLASER, M.J.; SNYDER, E.L. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter* outer membrane proteins. *Infect. Immun.*, v. 55, n. 7, p. 1564-1572, 1987.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I, *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull.*, v. 62, n. 8, p. 743 – 775, 1992.
- FIGUEIREDO, J.F.; PELLEGRIN, A.O.; FÓSCOLO, C.B. Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of Bovine Genital *Campylobacteriosis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* v.44, p. 118-123. 2002.
- FAZEKAS, S.T.De.; GRTH, S.; SCHEIDEGGER, S. Production on monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods.*, v. 35, n. 1-2, p. 1-24, 1980
- GARCIA, M.M.; LUTZE-WALLACE, C.L; DENES, A.S. et al. Protein shifty and antigenic variation in the S layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of sap A homologs. *J. Bacteriol.*, v. 177, n. 8, p. 1976 – 1995.
- GROGONO-THOMAS, R.; DWORKIN, J.; BLASER, M.J. et al. Role of the surface layer protein of *Campylobacter fetus* subsp *fetus* in ovine abortion. *Infect. Immun.* v. 68, n. 3, p. 1687-1691, 2000.

- HARLOW, E.D.; LANE, D. *Antibody a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.
- HARRIS, H.; WATKINS, J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature*, v. 205, n. 4972, p. 640-646, 1965
- HEWSON, P. I.; LANDER, K. P.; GILL, K. P. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Campylobacter fetus* in bovine vaginal mucus. *Res. Vet. Sci.*, v. 38, n. 1, p. 41-45, 1985.
- HUM, S.; QUINN, C.; KENNEDY, D. Diagnostic of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Aust. Vet. J.*, v. 71, n. 6, p. 140-143, 1994.
- HURRELL, J.G.R. *Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications.*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.
- KEARNEY, J. F.; RADBRUCH, A.; LIESEGANG, B et al. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. immunol*, v. 123, n. 4, p 1548-1550, 1979.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, v. 227, n. 259, p. 680-686, 1970.
- LAGE, A.P. Campilobacteriose genital e tricomonose bovinas. In: ENCONTRO INTEGRADO DE MÉDICOS VETERINÁRIOS DA ZONA DA MATA - MG, 1.; SIMPÓSIO DE MANEJO SANITÁRIO E REPRODUTIVO DE BOVINOS, 1., 2000, Juiz de Fora. *Anais...*, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p. 65-69.
- LANDER, K.P. The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br. Vet. J.*, v. 146, n. 4, p. 334-340, 1990.
- LOWRY, H.L.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MARUSICH, M.F. Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes. *J. Immunol. Meth.*, v. 144, n. 1-2, p. 155-159, 1988.
- MCCOY, E.C.; DOYLE, D.; BURDA, K.; et al. Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. *Infect. Immun.*, v. 11, n. 3, p. 517-525, 1975
- MIRANDA, K.L. *Prevalência da campilobacteriose genital bovina em touros de corte em alguns estados brasileiros em 2000*.47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária UFMG.
- MELLICK, P. W.; WINTER, A. J.; McENTEE, K. Diagnosis of vibriosis in the bull by the use of the fluorescent antibody technic. *Cornell Vet.*, v. 55, n. 2, p. 280 - 294. 1963.
- PEI, Z.; ELLISONIII, R.T.; BLASER, M.J. identification and charecterization of major common antigens from *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J; TOMPKIS, L.S. *Campylobacter jejuni*, currentes status and future trends. Washington: ASM,. 1992.p.-236-237.
- PELLEGRIN, A.O.; LAGE, A.P. ; BARBOSA, E.F.B et al. Ensaio imunoenzimático para detecção de imunoglobulinas A em muco cérvico- vaginal de fêmeas bovinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. *Anais...*, Salvador: CBM, 1999. p.166.

- PONTECORVO, G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somat. Cell Genet.*, v. 1, n. 10, p. 397-400, 1975.
- POTTER, M. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol. Reviews.* v. 52, n. 3, p. 631-719, 1972.
- REPORT of the AVMA panel on euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 218, n. 5, p. 669-696, 2001.
- SHARON, J.; MORRISON, S.L.; KABAT, E.A. Detection of specific hybridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 76, n. 3, p. 1420-1424, 1979.
- THOMPSON, S.A.; BLASER, M.J. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infectiosus. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. *J. Campylobacter*. 2. ed. Washington: ASM, 2000. p.321-347.
- TUMMURU, M.K.R.; BLASER, M.J. Characterization of the *Campylobacter fetus* SAP A promoter: evidence that the sapA promoter is deleted in spontaneous mutant strain. *J. Bacteriol.*, v. 174, n.18, p. 5916-5922, 1992.
- VANDAMME, P.; VANCANNEYT, M.; POT, B. Polyphasic taxonomy study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an Aerotolerante Bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 42, p. 344-356, 1992.
- VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae In NACHAMKING, N.; BLASER, M.J. (eds.) *Campylobacter* 2 ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 3-20.
- WANG, E.; GARCIA, M.M.; BLAKE, M.S. et al. Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. *J. Bacteriol.*, v. 175, n. 16, p. 4979-4984, 1993.
- WESLEY, I.V.; WESLEY, R.D.; CARTELLO, M et al. Oligodeoxy nucleotide probes of *Campylobacter fetus* and *Campylobacter hyointestinalis* bases on 16sRNA sequencias. *J. Clin. Microbiol.* v. 29, n. 9, p. 1812-1817, 1991.
- WINTER, A.J.; SAMUELSON, J.D.; ELKANA, M.A. comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibrio fetus*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 150, n. 8, p. 498 - 502, 1967.

ANEXO I

Certificado de aprovação pela

**Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
(Cetea/UFMG)**

Protocolo nº 124/04