

TÂNIA REGINA PENHA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI
FRAGMENTO Fc DE IgG DE BOVINO

CURITIBA

2007

TÂNIA REGINA PENHA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI
FRAGMENTO Fc DE IgG DE BOVINO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a.Dr^a.Vanete T. Soccol

Co-orientador: Med.Vet.Ernesto R.Krüger

CURITIBA

2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à energia positiva do universo que me ronda e envolve todos que estão ao meu lado nos unindo cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

Em todos estes anos, sempre tive que agradecer a alguém, nas mais diversas fases de minha vida: meus pais, meus filhos, meus irmãos e todos os meus amigos, os que se foram e os que ainda estão ao meu lado, independentemente do motivo.

Também fui agraciada com companheiros impecáveis, que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial o meu co-orientador Ernesto Renato Krüger, meus companheiros Flávio Hiroshi Itano, Ludmilla Della Coletto Troiano, Josiane Brodzinski, André Luiz Cardoso e Cybelle de Souza

Ao nosso gerente Jorge Victor Bacila Agottani e todos os amigos da divisão de antígenos que colaboraram na preparação dos meios, soluções e materiais a serem utilizados no laboratório.

Aos diretores do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) que me acolheram há mais de vinte anos e me concederam a chance de realizar o sonho de um mestrado, este conveniado com Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde tive o prazer de conhecer e trabalhar com uma pessoa maravilhosa, minha orientadora, Prof. Dra. Vanete Thomaz Soccol.

A todos os coordenadores, professores, participantes da banca Professor Doutor Renato Dall Stella e Professora Doutora Juliana Moura, e funcionários do Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos-PPGPB/UFPR.

Agradeço, de coração, a todos, principalmente a Deus por mais esta excelente fase que estou atravessando.

SUMÁRIO

	LISTA DE QUADROS.....	vii
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
	RESUMO	x
	ABSTRACT.....	xi
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	IMUNOGLOBULINAS.....	4
2.1.1	Isotipos.....	4
2.1.2	Propriedades Físicoquímicas das Imunoglobulinas.....	4
2.1.3	Propriedades Funcionais dos Isotipos.....	9
2.1.4	Genes codificadores da região variável.....	13
3	ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	14
3.1	ANTICORPO.....	14
3.2	LINHAGENS CELULARES DE MIELOMA.....	17
3.2.1	Biotecnologia no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.....	22
3.2.1.1	Detecção de proteínas.....	22
3.2.1.1.1.	Imuno-histoquímica.....	22
3.2.1.1.2	Imunoblot.....	23
3.2.1.1.3	Ensaio Imunoenzimático-ELISA DIRETO.....	23
3.2.2	Detecção de anticorpos.....	24
3.2.2.1	ELISA Indireto.....	24
3.2.2.2	Imunoensaio competitivo.....	24
4	OBJETIVOS.....	24
4.1	OBJETIVO GERAL.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	SORO SANGÜÍNEO.....	27
5.2	REMOÇÃO DE LIPOPROTÉINAS DO SORO.....	28
5.3	PRECIPITAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS.....	28
5.3.1	Precipitação das imunoglobulinas G.....	29
5.4	DIÁLISE.....	29
5.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	29
5.6	PURIFICAÇÃO DE IgG.....	30
5.7	PRECIPITAÇÃO DAS IgGs COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)	31
5.8	CAMUNDONGOS.....	31
5.8.1	Protocolo de imunizações de camundongos.....	31
5.9	AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL PARA IgG POR IMUNODIFUSÃO.....	32
5.10	CULTIVO DE MIELOMAS.....	32
5.11	MACRÓFAGOS PERITONIAIS.....	33
5.12	OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS DO BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS.....	34
5.13	FUSÃO.....	35
5.14	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA.....	35

5.15	CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS.....	37
5.16	EXPANSÃO DOS HIBRIDOMAS.....	37
5.17	FRACIONAMENTO DAS IMUNOGLOBULINAS.....	38
5.18	ISOTIPAGEM DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR IMUNODIFUSÃO.....	39
5.19	CARACTERIZAÇÃO DE IgG BOVINA POR SDS-PAGE E WESTERN BLOT.....	39
5.20	CONJUGAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL COM FITC PARA TESTES DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA – IFI.....	42
5.20.1	Caracterização de Vírus e/ou Anticorpo por Imunofluorescência (IFI)	43
5.20.2	Caracterização de Bactéria e/ou Anticorpo por Imunofluorescência (IFI)	44
5.20.3	Caracterização de Parasita e/ou Anticorpo por Imunofluorescência (IFI)	46
5.21	CONJUGAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL COM PEROXIDASE PARA TESTES DE ELISA INDIRETO.....	47
5.21.1	Caracterização de Parasita e/ou Anticorpo por ELISA indireto para detecção de metacestódeo de Taenia saginata.	48
6	RESULTADOS	49
7	DISCUSSÃO.....	61
8	CONCLUSÕES.....	67
	ANEXOS - MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E REAGENTES.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	82

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DO COMPONENTE SECRETÓRIO E DAS DIFERENTES CLASSES DA CADEIA PESADA DAS IMUNOGLOBULINAS BOVINAS.....	5
QUADRO 2 -	CONCENTRAÇÃO (mg/mL) DE CLASSES E SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS EM FLUÍDOS CORPÓREOS DE BOVINOS.....	10
QUADRO 3 -	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE CADEIA PESADA DAS CLASSES E SUBCLASSES DAS IMUNOGLOBULINAS DE BOVINOS.....	12
QUADRO 4 -	MECANISMOS DA GERAÇÃO DA DIVERSIDADE DE ANTICORPOS.....	14
QUADRO 5 -	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS OBTIDAS APÓS A PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO SATURADA (33%) DE SULFATO DE AMÔNIO	49
QUADRO 6 -	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS OBTIDAS APÓS A PURIFICAÇÃO EM COLUNAS HITRAP G.....	49
QUADRO 7 -	CLONE SELECIONADO PARA PREPARAÇÃO DO CONJUGADO.....	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DE UMA IMUNOGLOBULINA.....	2
FIGURA 2 -	ESTRUTURA DA IMUNOGLOBULINA M	6
FIGURA 3 -	REGIÃO VARIÁVEL DA IgG.....	13
FIGURA 4 -	ONTOGÊNESE DO LINFÓCITO B.....	15
FIGURA 5 -	HÍBRIDOS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO.....	18
FIGURA 6 -	FLUXOGRAMA PARA A GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	19
FIGURA 7 -	DISCRIMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PELO USO DA TECNOLOGIA DE HIBRIDOMA.....	20
FIGURA 8 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A PRODUÇÃO DO CONJUGADO ANTI FRAGMENTO Fc DE IgG DE BOVINO.....	26
FIGURA 9 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A PRODUÇÃO DO CONJUGADO ANTI FRAGMENTO Fc DE IgG DE BOVINO (continuação).....	27
FIGURA 10-	PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G EM COLUNA DE CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE.....	30
FIGURA 11-	DIAGRAMA DO TESTE DE IMUNODIFUSÃO EM GEL.....	32

FIGURA 12-	CULTIVO DA LINHAGEM DE CÉLULA SP2-0/ag 14.....	32
FIGURA 13-	CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS NORMAIS.....	34
FIGURA 14-	TITULAÇÃO DO ANTÍGENO IgG BOVINA E CONJUGADO (comercial) POR ELISA.....	36
FIGURA 15-	ELISA INDIRETO PARA A SELEÇÃO DE HIBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI IgG BOVINO.....	37
FIGURA 16-	FRAGMENTAÇÃO DA IgG.....	39
FIGURA 17-	ETAPAS DO WESTERN BLOT.....	41
FIGURA 18-	COLUNA DE CROMATOGRAFIA POR FILTRAÇÃO EM GEL.....	43
FIGURA 19-	TESTE DO CONJUGADO FITC ANTI Fc DE IgG BOVINA EM IMUNOFUORESCÊNCIA INDIRETA PARA O HERPESVÍRUS BOVINO (BHV-1).....	44
FIGURA 20-	TESTE DO CONJUGADO FITC ANTI Fc DE IgG BOVINA EM IMUNOFUORESCÊNCIA INDIRETA PARA <i>Brucella abortus</i>	45
FIGURA 21-	TESTE DO CONJUGADO FITC ANTI Fc DE IgG BOVINA EM IMUNOFUORESCÊNCIA INDIRETA PARA <i>Brucella abortus</i> (após clarificação).....	46
FIGURA 22-	TESTE DE IMUNODIFUSÃO PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO ANTI IgG BOVINA.....	50
FIGURA 23-	ASPECTO DAS CÉLULAS FUSIONADAS QUE SÃO OS POTENCIAIS HIBRIDOMAS.....	50
FIGURA 24-	FORMAÇÃO DA COLÔNIA DE HIBRIDOMA APÓS SETE DIAS DE INCUBAÇÃO.....	51
FIGURA 25-	HIBRIDOMA EM EXPANSÃO APÓS DEZ DIAS DE INCUBAÇÃO.....	52
FIGURA 26-	PLACAS DE ELISA INDIRETO COM SOBRENADANTE DE HIBRIDOMAS PRODUTORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI IgG BOVINO.....	53
FIGURA 27-	GEL SDS-PAGE A 10% COM IgG BOVINO	54
FIGURA 28-	CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI IgG BOVINO B3H12 PELA TÉCNICA DO WESTERN BLOT.....	55
FIGURA 29-	GEL SDS-PAGE A 10% APÓS O FRACIONAMENTO COM PAPAÍNA.....	56
FIGURA 30-	RESULTADO DO TESTE DE WESTERN BLOT	57
FIGURA 31-	TESTE DE ELISA DIRETO COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI IgG BOVINA CONJUGADO COM PEROXIDASE (foto ampliada).....	58
FIGURA 32-	TESTE DE ELISA DIRETO COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI IgG BOVINA CONJUGADO COM PEROXIDASE	58
FIGURA 33	RESULTADO DO TESTE DO CONJUGADO COM PEROXIDASE PRODUZIDO COM ACMC ANTI-FC DE IgG BOVINA ELISA INDIRETO PARTINDO DO TÍTULO 1:1.600 COM PARASITO METACESTÓDEO DE <i>TÂNIA SAGINATA</i> (<i>C.bovis</i>).....	58

FIGURA 34-	RESULTADO DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM VÍRUS (BHV-1).....	59
FIGURA 35-	RESULTADO DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM <i>Brucella abortus</i>	60
FIGURA 36-	RESULTADO DE TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM PARASITO METACESTÓDEO DE <i>Taenia saginata</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS

α -	Alfa
β -	Beta
cm -	Centímetro
ϵ -	Epsilon
γ -	Gama
$^{\circ}\text{C}$ -	Grau Celsius
κ -	Kappa
λ -	Lambda
μg -	micrograma
μL -	microlitro
mg -	Miligrama
mL -	Mililitro
mm -	Milímetro
μ -	Mu
AcMc -	Anticorpos Monoclonais
Arg -	Arginina
BHV-1	Herpesvírus bovino -1
C_H -	Região constante da Cadeia Pesada da imunoglobulina
C_L -	Região constante da Cadeia Leve da imunoglobulina
V_L -	Região Variável da Cadeia Leve da imunoglobulina
V_H -	Região Variável da Cadeia Pesada da imunoglobulina
CO_2 -	Dióxido de carbono
DNA -	Ácido Desoxiribonucleico
ELISA -	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fab -	Fragmento de ligação ao antígeno (<u>a</u> ntigen <u>b</u> inding)
Fc -	Fragmento cristalizável da cadeia pesada da Imunoglobulina
FcRn -	Receptor do fragmento Fc na mucosa intestinal do recém- nato
FITC-	Isotiocianato de fluoresceína
GL -	Guy Lussac
Glu -	Glutamina
HAT -	Hipoxantina, aminopterinina e timina
HPRT -	Hipoxantina fosforibosil transferase
IFI-	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ -	Interferon gama
Ig -	Imunoglobulina
IgA -	Imunoglobulina A
IgD -	Imunoglobulina D

IgE -	Imunoglobulina E
IgG -	Imunoglobulina G
IgM -	Imunoglobulina M
ITCF-	Isotiocianato de Fluoresceína
KDa -	Kilo Dalton
MOPC -	Plasmacitoma induzida por óleo mineral (<i>Mineral Oil Plasmacitoma Cell</i>)
M_r	Massa molecular relativa
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/ <i>World Health Organization</i>
OPI -	Oxaloacetato, Piruvato, Insulina
OPD-	O-phenylenediamine Dihydrochloride
PBS -	Solução tampão fosfatada (<i>buffer</i>)
PVP -	Polivinilpirrolidona
RNA -	Ácido Ribonucléico
RNA _m -	Ácido Ribonucléico mensageiro
RPMI -	Sigla de Roswelt Park Memorial Institute
S _{20,W}	Svedberg
S _{278,W}	Svedberg
SC	<i>Secretory component</i>
SDS-PAGE -	Sodium Duodecil Sulfate – Poliacrylamide Gel Eletroforese
SFB -	Soro fetal bovino
SH/MOL	Concentração total de aminoácidos sulfurosos por Mole
SPF -	Livre de agentes patogênicos (<i>Specific Patogen Free</i>)
TCA -	Ácido tricloroacético
U.V. -	Ultra Violeta

RESUMO

Anticorpos monoclonais (AcMc) anti imunoglobulina G (IgG) bovina foram produzidos e caracterizados. De um total de sete hibridomas obtidos, dois foram escolhidos com base na absorvância obtida por ELISA, a partir do meio de cultura, e foram designados B4F11 e B3H12. Estes monoclonais foram analisados por Western Blot, para fragmentos de IgG obtidos por proteólise com papaína, revelando que o B4F11, possivelmente, dirigia-se a um antígeno conformacional e que B3H12 reagia especificamente com Fc (fragmento cristalizável) de IgG bovino.

Este Anticorpo Monoclonal (B3H12) anti Fc de IgG bovino foi utilizado para a produção de conjugados com isotiocianato de fluoresceína e peroxidase. Ambos os conjugados poderão ser empregados em imunofluorescência indireta e ELISA indireto respectivamente. Estes reagentes foram avaliados em testes de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos dirigidos à *Brucella abortus*, Metacestódeo de *Taenia saginata* (Cisticercose Bovina) e Herpesvírus Bovino 1, com resultados compatíveis à padronização do teste. Quanto ao conjugado para ELISA, quando avaliado revelou-se específico, mas com título que precisa ser melhorado.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies directed to bovine IgG, were produced and characterised. From a total of seven hybridomas with a good performance, two of them were chosen, taking in account the optical density evaluated on ELISA test, where culture medium was the start material, they were designated B4F11 and B3H12. These monoclonals were probed in a Western Blot to detect IgG fragments originated by papain proteolyses, making known that B4H11 reacted with a conformational epitope, while B3H12 interacted in specific manner with the Fc (crystalizable fragment) from bovine IgG.

These monoclonal (B3H12) anti Fc was utilized in a conjugation procedure with fluorescein isothiocyanate and peroxidase in order to develop indirect immunofluorescence and ELISA, respectively. These reagents were evaluated performing indirect immunofluorescence and ELISA, in order to detect antibodies to *Brucella abortus*, *Taenia saginata* metacestodeo (Bovine Cysticercosis) and Bovine Herpesvirus 1. The results were in accordance to the test standards. The ELISA conjugate revealed good performance, besides the low titers.

INTRODUÇÃO

Considera-se a biotecnologia como o mais novo avanço na ciência da vida alcançado no final do século XX, com reflexos nos mais diferentes entendimentos da vida humana e do meio ambiente. Recentes avanços no conhecimento em biologia molecular e da célula têm nos permitido criar moléculas de DNA recombinante com várias aplicações na produção de proteínas de interesse, quer própria ou exógena.

Algumas áreas da saúde animal têm sido promovidas pela biotecnologia, por exemplo, o desenvolvimento de testes diagnósticos para controle de doenças, produção de vacinas, nutrição e controle de parasitas. A produção de imunógenos específicos para o uso de criteriosos protocolos de imunização tem permitido o desenvolvimento de reagentes para uso em testes diagnósticos altamente específicos. Esses anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais em origem, tendo os últimos algumas vantagens sobre os primeiros por serem produzidos por células imortalizadas e altamente específicas. Anticorpos monoclonais são usados em imunoensaios que são extremamente específicos e sensíveis para uma grande quantidade de componentes de vírus, bactérias, protozoários e macroparasitas. A especificidade do sistema de ensaio ultrapassa qualquer restrição quanto à natureza do material que está sendo avaliado. No que concerne à sensibilidade, permite identificar quantidades mínimas de componentes, tão pequenas quanto 10^{-12} (milionésima parte de um grama).

Os avanços conseguidos com as tecnologias de clonagem de gene e de expressão de proteínas recombinantes têm gerado progressos significativos nos sistemas eucarióticos de síntese. Muitas linhagens de células eucarióticas de mamíferos têm sido usadas para sintetizar proteínas via transfecção com plasmídeos ou infecção por vírus.

Especial referência merecem os mielomas, como sistema de síntese de anticorpos monoclonais (AcMc) que são utilizados em uma enorme variedade de metodologias de diagnóstico, formação de imagens e aplicações terapêuticas. Anticorpos têm se mostrado reagentes apropriados em diferentes áreas da Biologia e da Medicina pela forma específica com que se ligam aos antígenos.

A natureza da estrutura proteica dos anticorpos nas suas diferentes regiões das cadeias leves e pesadas torna-os convenientes para a engenharia de proteínas, na qual regiões funcionais, tais como Fab com atividade de ligação a antígenos e Fc com funções efetoras, podem ser substituídas em diferentes anticorpos (FIGURA 1).

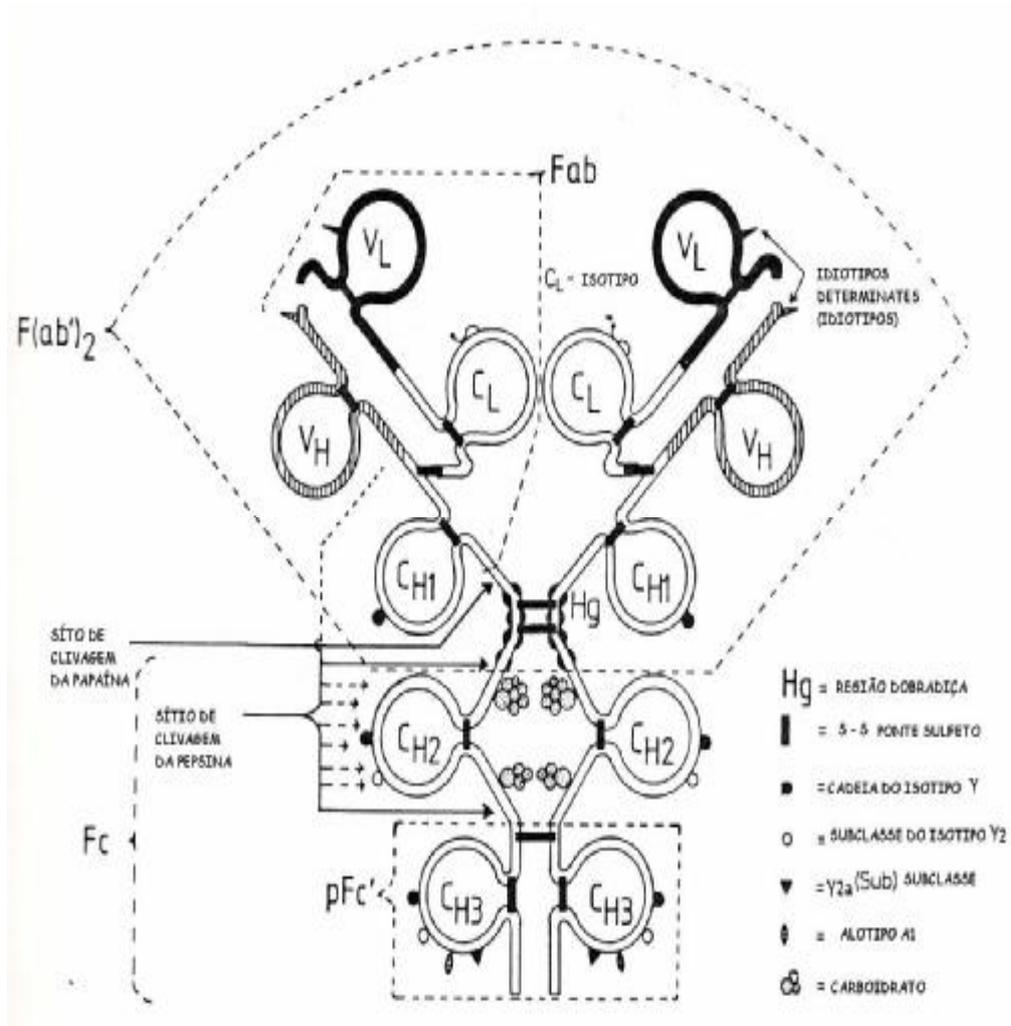


FIGURA 1 - ESTRUTURA DE UMA IMUNOGLOBULINA BOVINA.FONTE: BUTLER,1986.

A utilização de mutantes e cadeias protéicas com regiões substituídas tem sido úteis na elucidação de estruturas funcionais de anticorpos que são responsáveis por suas características e contribuem para a função efetora. Técnicas recombinantes de DNA e de expressão de genes são usadas para produzir anticorpos com características desejáveis e a diferente composição de cadeias protéicas tem gerado novas moléculas tais como quimeras (humanizadas),

anticorpos catalíticos, anticorpos poliméricos e fragmentos de anticorpos (YOO et al., 2002 e ARMOUR et al., 1994).

Conhecer e avaliar a imunidade humoral dos animais domésticos em condições de saúde e de doença significa isolar, caracterizar e quantificar imunoglobulinas, principal componente do sistema de detecção de invasores em soluções nos fluidos biológicos ou associados a células deste meio (LETESSON et al., 1985; VAN ZAANE ET AL., 1984; WILLIANS et al., 1990).

Os recursos diagnósticos, necessariamente, baseiam-se na busca de anticorpos específicos a determinados antígenos, quer estruturais quer resultantes do metabolismo direcionado pelo agente de doença. A identificação isolada de proteínas e ou de ácidos nucleicos não permite a associação causa-efeito. Não menos importantes são a quantificação e a natureza da resposta às vacinas e a discriminação necessária desta para aquela patógeno-associada. Este projeto propõe-se a estruturar um sistema de produção de reagentes diagnósticos, normalmente ausente no domínio de tecnologias em nosso país, que trata da produção de conjugados anti-espécie para imunoglobulinas, que possam ser utilizados para profilaxia, no diagnóstico ou na terapia. Processo que tem por princípio a especificidade e repetibilidade dos anticorpos monoclonais.

Associado ao que precede, os laboratórios de diagnóstico e de pesquisas em doenças animais vivenciam freqüentes dificuldades na obtenção de insumos que dependem de importação, tornando-se caros e inacessíveis em curto espaço de tempo. Conhecida é também a significância da produção de carnes e animais vivos à economia do setor primário, pois tem, o Brasil, a privilegiada condição de maior exportador de carnes do mundo. A integridade sanitária dos rebanhos merece o melhor da competência científica e tecnológica industrial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMUNOGLOBULINAS

2.1.1 Isotipos

As imunoglobulinas possuem diferentes classes, sendo denominadas de isotipos, IgD, IgA, IgG, IgM e IgE. A nomenclatura das imunoglobulinas segue o que foi estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1978), que são estas: IgA, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgM e IgE.

2.1.2 Propriedades Físicoquímicas das Imunoglobulinas

As propriedades físicoquímicas das imunoglobulinas são apresentadas no quadro 1.

As imunoglobulinas bovinas possuem quatro classes: IgM, IgA, IgE e IgG. As IgGs possuem três sub-classes (IgG1, IgG2 e IgG3) e duas cadeias leves λ (lambda) e κ (kappa) (SYMONS et al., 1989; RABBANI et al., 1997). A técnica de produção de anticorpos monoclonais permite desenvolver testes de laboratório específicos para cada uma das classes e sub-classes. Não foram identificados, até hoje, proteínas ou RNAm para a classe IgD. Mais de 90% das cadeias leves são do tipo λ , embora existam tipos específicos. Futuros estudos serão necessários para estabelecer relação entre cadeias λ e κ (PASTORET, 1998).

A molécula de IgM foi a primeira a aparecer durante a evolução dos vertebrados. Esta molécula é expressa nos linfócitos B que começam a se desenvolver e que constituem a primeira linha de defesa. Tem sido identificado um polimorfismo para IgM (diferentes genes codificando proteínas com determinados graus de variação na seqüência de aminoácidos que exercem a mesma função). Isto tem sido observado com a produção de anticorpos monoclonais que são alotipo específico. Existe um estrito relacionamento filogenético entre as moléculas de IgM de diferentes espécies de ruminantes, a composição em aminoácidos chega a 89,4% de similaridade entre bovinos e ovinos. Existem três alotipos de IgM bovino (IgM^a, IgM^b e IgM^c) definidos pela substituição de nucleotídeos que determinam aminoácidos diferentes nas cadeias que codificam (SAINI et al., 2001).

QUADRO 1 PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DO COMPONENTE SECRETÓRIO DAS DIFERENTES CLASSES DA CADEIA PESADA DAS IMUNOGLOBULINAS BOVINAS

Propriedades Físicoquímicas	IgM	IgG1	IgG2 ^a	IgG3 ^a	IgE	IgA	SC
Cadeia pesada	μ	γ 1	Γ 2	γ 3	ε	A	
M _r cadeia pesada PAGE Estimativa (/ 1000)	80	58	55	58	68	60	
M _r Ig (1/1000)	1030	161-163	150-154			385-430	
Alótipos	B 5.4 IL-A50	C1/C2 G1a BA3,BA5	A1/A2				
Mobilidade Eletroforética Relativa	B 2	B 2	Γ			B 2	B 2
S 20, w	19.2-19.7	6,5-7,2	6,5-7,2			10.8-11	4.0-4.9
S ²⁷⁸ 1%,1cm UV-absorção	11.8-12.6	12.1-13.7	12.3-13.5				
Carboidrato (%)	10-12	2.8-3.1	2,6-3.0			6-10	5.9
Manose (%)		0.53	0.57				1.92
Galactose (%)		0.37	0.45				0.19
Glicose (%)		0.62	0.45				0.45
Hexosamine (%)	2.8-3.9	0.9-1.72	0.8-1.6				2.5-3.1
Fucose (%)	1.25	0.10-0.26	0.16-0.26				0.24-0.80
Ácido Salicílico (%)	1.39	0.28	0.15				0.4
Total SH/mol	43.6	37.5-43	32.5-35				30.0

^a A nova nomenclatura proposta substitui a terminologia IgG2a e IgG2b por IgG2 e IgG3;

SC-Componente secretório é somente da IgA e IgM. FONTE: BUTLER (1986).

Em todos os mamíferos a IgM aparece de forma pentamérica, onde cada monômero possui duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Os cinco

monômeros se organizam em pentâmeros através da ligação covalente com a cadeia J (joining) (FIGURA 2).

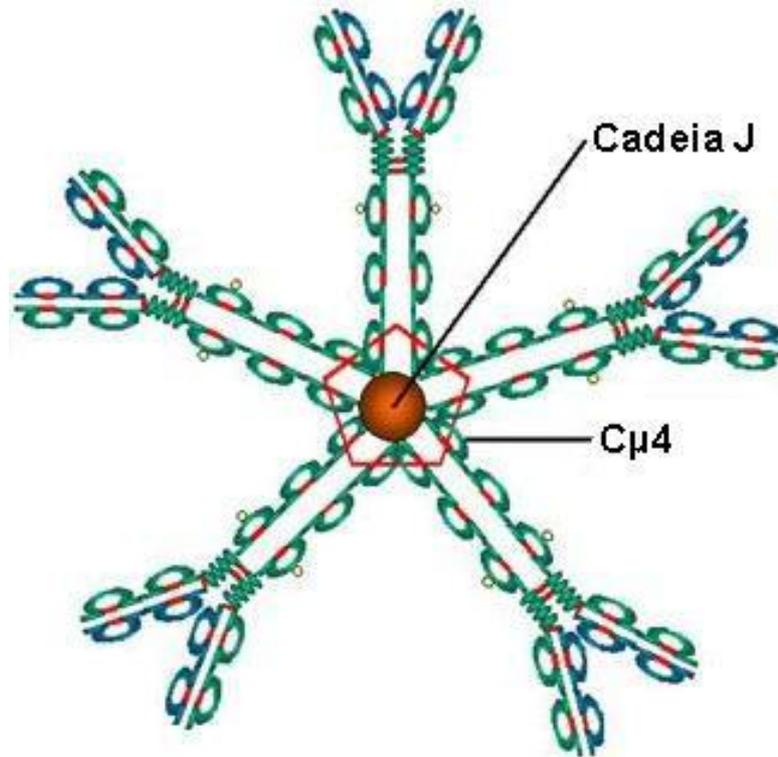


FIGURA 2 – Estrutura da Imunoglobulina M. 1) Pentâmero (19S); 2) Segmento extra (C μ 4); 3) Cadeia J (joining); 4) Valência 5. FONTE: www.southcarolinauniversity, acessado em 25/03/07.

A cadeia pesada da IgM bovina, conforme dados indicados no quadro 1, possui uma elevada massa molecular, maior do que a IgM de camundongo e de humano.

A IgA de bovino é dimérica, ou seja, é formada por dois monômeros ligados pela cadeia J (joining). A IgA secretada que tem sido isolada de secreções exócrinas possui uma massa molecular relativa de 420 a 550 x 10³, isso se deve ao componente secretório associado. O componente secretório, se liga à porção extracelular do receptor das imunoglobulinas poliméricas e é responsável pela ligação e transcitose de IgA dimérica através de células epiteliais da mucosa e do tecido glandular. Uma função adicional do componente secretório é de tornar as imunoglobulinas mais resistentes à ação proteolítica nos ambientes das mucosas. O

DNA complementar do componente secretório já foi determinado e revela uma grande conservação entre as espécies (60% a 70 %).

A IgE bovina é diferente das outras classes e é identificada por sua sensibilização da pele e sua ligação aos mastócitos. Possui anticorpos específicos e são detectadas pelo teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e sua concentração é mencionada por unidades comparadas a um padrão. Foram isolados genes C ϵ da extremidade 5' do gene C α expresso em molécula quimérica da imunoglobulina bovina/murina.

Quanto a IgG existem três sub-classes: IgG1, IgG2 e IgG3, sendo a IgG1 e IgG2 identificadas por eluição da coluna de cromatografia por troca de íons. A IgG1 é mais resistente à eluição e também difere quanto à sensibilidade de proteólise. A IgG1 é mais sensível à pepsina e mais resistente à tripsina que a IgG2. A região flexível das IgG1 e IgG2 são iguais em comprimento, mas mostram divergências evolucionárias. A IgG2 possui uma deleção de 9 pares de base (pb) no começo do segmento dois da cadeia pesada (SYMONS et al.,1989). Isto pode explicar a capacidade diferente das duas sub-classes para se ligarem ao receptor do fragmento Fc existente nas células epiteliais das glândulas mamárias e o consecutivo transporte para o colostro (KACSKOVISC,2004). Um receptor para o C1q do complemento localiza-se no segmento dois da cadeia pesada em ambas sub-classes, as quais são capazes de ativar o complemento homólogo, mas somente a IgG1 é capaz de fixar complemento heterólogo *in vitro*. Enquanto IgG2 apresenta comportamento heterogêneo em testes sorológicos e de mobilidade eletroforética, IgG1 comporta-se como uma única sub-classe. As imunoglobulinas constituem o maior componente da imunidade humoral, onde a IgG é a principal classe de anticorpos presente no sangue, na linfa, nos fluidos peritonal e cérebro-espinal, além de constituir 75% das imunoglobulinas do soro. Diferentes sub-classes de IgG existem em diferentes espécies, e a constituição bioquímica oferece as bases para as funções biológicas efectoras. A caracterização molecular e sorológica das sub-classes das IgGs bovina revelou a existência de variações alotípicas, proporcionando marcadores genéticos do polimorfismo das imunoglobulinas com conseqüências funcionais.

A IgG1 apresenta características únicas: a) constitui 90% das imunoglobulinas colostrais, proporcionando proteção ao neonato, e o não menos importante papel instrutivo do sistema imune deste; b) é transportada de forma seletiva pelo receptor FcRn (fragmento cristalizável de recém nascido), existente no epitélio do alvéolo pulmonar e glândula mamária; c) liga-se a neutrófilos como a IgG2;d) é sintetizada localmente e liberada como imunoglobulina secretória nas mucosas (SAINI et al.,2007). Diferenças alotípicas entre animais da mesma espécie correspondem à capacidade de influenciar o sistema imune e/ou a resistência a infecções virais e bacterianas. O alotipo IgG2a manifesta-se antes que IgG2b durante o desenvolvimento de bezerras, sendo mais eficiente na ativação do complemento, mecanismo importante no controle de infecção por bactérias piogênicas. Proteínas sintetizadas por estas bactérias ligam-se ao alotipo (b) e não ao alotipo (a) (BASTIDA-CORCUERA, et al.,1999 a e b; CORBEIL,et al.,1997; SAZAKI, et al.,1977).

A heterogeneidade da IgG2 foi comprovada adicionalmente por anticorpos policlonais e monoclonais. Trabalhos utilizando material genético de IgG humana em provas de hibridização revelaram existir em bovino três sub-classes de IgG. Dois dos três genes bovinos que codificam IgG correspondem ao IgG1 e IgG2, enquanto que o terceiro gene codifica a IgG3, que não é reconhecido por anti-soro para IgG1 e IgG2. De acordo com o Comitê de Imunologia Veterinária da União Internacional das Sociedades de Imunologia, as três sub-classes de IgG bovina devem ser denominadas IgG1, IgG2 e IgG3. Determinantes alotípicos são encontrados em IgG1 e IgG2. Os alotipos melhores estudados são A1 e A2, existentes nas sub-classes IgG2 e eles são denominados por IgG2^a e IgG2^b (KACKSKOVICS et al.,1996). A seqüência de aminoácidos determinada pelo polimorfismo dos genes da cadeia pesada mostra diferenças em quatro regiões: 1) região em torno da ligação da cadeia leve e pesada; 2) região da flexibilidade; 3) sete aminoácidos na região do início; 4) uma substituição de arginina (ARG) por glutamina (GLU) na posição 419, da região 3 da cadeia pesada.

O alotipo A1 é um epítipo imunodominante e a maioria dos anticorpos heterólogos dirigidas para IgG2 bovina contém anticorpo para A1 e alguma atividade adicional para o isotipo IgG2. Para o alotipo A2 a resposta heteróloga se

dá exatamente de forma oposta ao A1. Esta diferença pode afetar a produção de reagentes e a correta avaliação da concentração de IgG2.

As sub-classes IgG1 e IgG2 ligam-se fortemente a proteínas de bactérias piogênicas, o que interfere com a ligação específica do anticorpo à bactéria com a ativação de complemento e fagocitose. O alotipo IgG2^b fixa complemento bovino no mínimo 2 vezes mais que o alotipo (IgG^a). Análise da flexibilidade da IgG2^b mostra ser esta mais rígida que o (IgG^a), o que pode parcialmente explicar a eficiência de fixação de complemento (BASTIDA-CORCUERA et al.,1999a; BASTIDA-CORCUERA et al.,1999b).

A região constante da IgG1 e IgG2 de bovino possui genes localizados no cromossoma 21q24 (GU et al.,1992). Acredita-se que a estrutura da região flexível regula o movimento dos fragmentos Fab em relação ao Fc. A estrutura da região flexível do Fc da IgG3 permite grande flexibilidade molecular, tornando-a mais efetiva nas ligações cruzadas durante a formação de complexos imunes.

Deve ser observado que a mesma nomenclatura das sub-classes (IgG1, IgG2 e IgG3) entre diferentes espécies animais freqüentemente nos conduz ao erro de entender que as sub-classes são homólogas e possuem as mesmas funções. Isto é verdadeiro para as classes IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, mas não se aplica às sub-classes. A hipótese de que a derivação das espécies precedeu as sub-classes prevalece como mais aceita (KEHOE & CAPRA, 1974).

2.1.3 Propriedades Funcionais dos Isotipos

A função efetora de um anticorpo está associada diretamente à exigência de um receptor da região Fc (FcR). A recombinação de genes que codificam a região variável da cadeia pesada com genes que codificam a região constante da mesma cadeia permite a combinação da atividade de se ligar ao antígeno com diferentes funções imunológicas, tais como: complemento, opsonização e outras. Em adição, permite a disseminação do anticorpo em diferentes fluidos do corpo e também a transferência através de superfícies epiteliais. As imunoglobulinas G são encontradas em diferentes concentrações nos diversos fluidos de bovinos normais. Os dados referentes à IgG2 contém informações que são comuns à IgG2 e IgG3

(Quadro 2). Os dados mencionados no quadro 2 foram publicados antes da IgG3 ter sido identificada (PASTORET, 1998).

QUADRO 2 CONCENTRAÇÃO (mg/mL) DE CLASSES E SUB-CLASSES DE IMUNOGLOBULINAS EM FLUIDOS CORPÓREOS DE BOVINOS

	IMUNOGLOBULINAS			
Fluidos Corpóreos de Bovinos	IgM	IgG1	IgG2	sIgA *
Bile		0.10	0.09	
Fluído Bronqueoalveolar	0.03	0.13	0.24	0.24
Colostro	6.77	46.4	2.87	5.36
Fluído Intestinal	Resíduos	0.25	0.06	0.24
Leite Natural	0.086	0.58	0.005	0.081
Secreção Nasal	0.04	1.56	Resíduos	2.81
Saliva	0.006	0.034	0.016	0.34
Fluido Seminal	Resíduos	0.13	0.11	0.13
Soros	3.05	11.2	9.2	0,37
Fluido Sinovial	0.37	2.02	1.20	0.68
Lágrimas	0.176	0.32	0.01	2.72
Urina	Resíduos	0.009	Resíduos	0.001

sIgA - imunoglobulina A secretória. FONTE: PASTORET (1998).

Uma característica comum da imunidade de mucosas em ruminantes é a elevada concentração de IgG1 em relação à IgA na secreção das glândulas mamárias (colostro). Enquanto a IgG1 é transportada do soro para o colostro, a IgA é sintetizada localmente no úbere e secretada tardiamente no leite. Nos bovinos, a transferência de anticorpos maternos para o feto via placentária não existe, em conseqüência a transferência passiva de imunidade se deve à elevada concentração de IgG1 no colostro. A IgA está mais concentrada em secreções intestinais, nasal e lacrimal. No intestino, a IgA é produzida localmente enquanto a

IgG é derivada do soro. Na saliva, a IgA presente é seletivamente transferida do soro pela presença de um receptor de um epitélio glandular.

As duas principais sub-classes de IgG apresentam diferenças na habilidade para fixar complemento heterólogo e induzir fagocitose por neutrófilos e monócitos. A IgG2 não fixa complemento heterólogo, somente o do bovino, sendo importante para os testes de fixação de complemento *in vitro*. A IgM fixa 10-20 vezes mais complemento do que IgG, e isto explica a elevada concentração no soro bovino em relação a outras espécies.

A ligação do Fc de uma imunoglobulina ao respectivo receptor em uma célula fagocítica com a subsequente ingestão e digestão do complexo imune consiste num relevante mecanismo de defesa de imunidade induzida. A IgG1, embora apresente elevada concentração no colostro, não apresenta receptor em neutrófilos e monócitos não ativados. O uso de citometria de fluxo revelou a existência de receptores de IgM e IgG2 em neutrófilos, o que para IgG1 somente foi possível com o tratamento de neutrófilos com interferon gama (Quadro 3).

Anticorpos homocitotrópicos são responsáveis pela hipersensibilidade imediata e pertencem à classe IgE, também são secretados no colostro e possuem receptores nos mastócitos que estão envolvidos em processos alérgicos e resistência a parasitos. Embora anticorpos policlonais para cadeia pesada de IgE tem sido produzidos, sua disponibilidade é limitada devido ao custo e aos intensivos processos de adsorção para assegurar a especificidade. Anticorpos monoclonais proporcionam reagentes padronizados sem limitações dos policlonais (THATCHER et al.,1988).

QUADRO 3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA CADEIA PESADA DAS CLASSES E SUB CLASSES DAS IMUNOGLOBULINAS DE BOVINOS

	IgM	IgG1	IgG2 ^a	IgG2 ^b	IgE	IgA
Ligação à Proteína A	-	-	Fraca		-	-
Ligação à Proteína G	-	++	++			-
Ligação ao Complemento						
Bovinos	+	+	+			
Cobaias	+	+	-			
Coelhos	+	+	-			
Anafilaxia Passiva Cutânea						
Homóloga (pele de Bovino)		+	+			
Heteróloga (pele de rato)		+	-			
Ligação ao receptor-Fc						
Neutrófilos	-	-	+			
Monócitos em sangue fresco	-	-	+			
Monócitos cultivados	+	+	+			
Macrófagos alveolares		+	-			
Fagocitose por Neutrófilos						
Eritrócitos	-	-	+			
<i>S. aureus/E. coli</i>	+	-	-			
<i>Trypanossoma theileri</i>	+	-	-			
<i>Mycoplasma bovis</i>	-	-	+			
FcR- ligação à Ig						
Sangue com Neutrófilos	+	-	+			
Neutrófilos + IFN- γ	+	+	++			

^a A nova nomenclatura proposta substitui a terminologia IgG2a e IgG2b por IgG2 e IgG3. Os experimentos com IgG2 foram realizados antes da identificação da IgG3, portanto alguns dados provavelmente estão inclusos nas duas sub-classes. FONTE: PASTORET (1998).

2.1.4 Genes Codificadores da Região Variável

Existe uma significativa homologia entre o DNA complementar da região variável de cadeias leves existentes nos linfócitos B e os mesmos genes existentes nas células germinais. A falha em detectar diversidade no material genético de células germinais sugere pouca participação das cadeias leves no reconhecimento do antígeno. Tem sido sugerido que pseudogenes para região variável de cadeias leves podem se constituir em doadores para conversão genética. Tem sido observado também que mutações pontuais aumentam com a idade do animal. O modelo atualmente mais aceito está baseado na conversão genética seguida por hipermutação somática como responsáveis pela diversidade da região variável de cadeias leves (PARNG et al., 1995). As regiões variáveis das cadeias pesadas apresentam alto grau de homologia de nucleotídeos (85-90%) e de aminoácidos (70-80%), o que sugere existir uma única família de genes para a região variável das cadeias pesadas. Esta família de genes possui uma elevada homologia de seqüência com a família de genes para região variável de cadeias pesadas em ovinos, com a família V_H -Q52 em camundongos e com a região V_H4 dos humanos. Hipermutação somática se constitui num importante mecanismo para geração de diversidade de aminoácidos em bovinos (FIGURA 3) (Quadro 4).

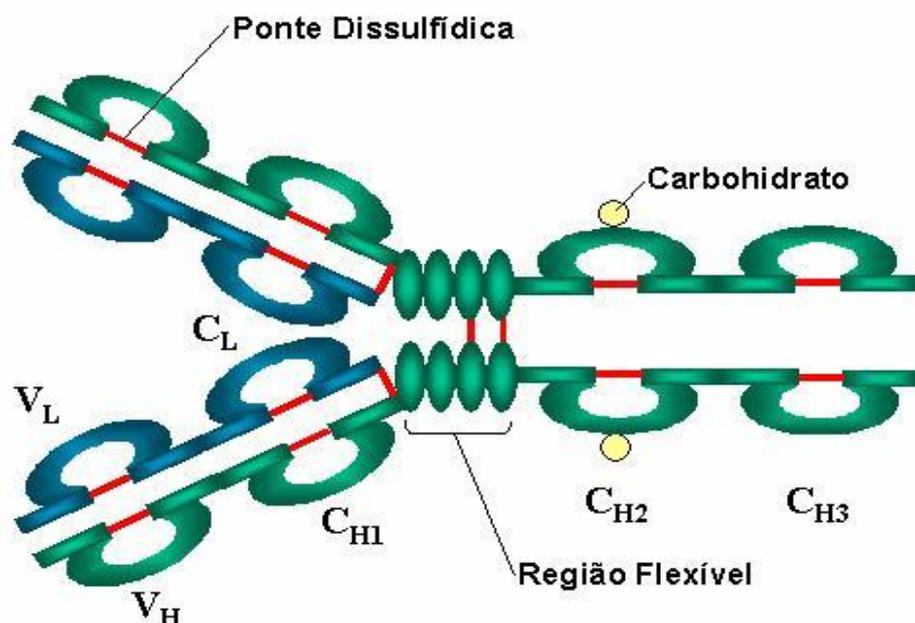


FIGURA 3 – Região variável da IgG FONTE: www.southcarolinauniversity , acessado em 24.03.07

QUADRO 4 -MECANISMOS DA GERAÇÃO DA DIVERSIDADE DE ANTICORPOS

1.	Células germinais: segmentos múltiplos dos genes variáveis – V
2.	Combinatorial:
	a) Diferentes combinações dos genes V-(D)-J
	b) Diferentes combinações dos genes V_H e V_L
3.	Juncional: variações nas conexões de V-J; V-D e D-J
4.	Mutação pontual somática: substituição de nucleotídeos na região V

FONTE: MILSTEN (1984).

3 ANTICORPOS MONOCLONAIS

3.1 ANTICORPO

Conjunto de cadeias protéicas em que suas estruturas são especificadas por uma unidade genética de informação: “GENE”. Cada gene que especifica a estrutura de cada anticorpo não está presente como tal nas células germinais (espermatozóide e óvulo) ou nas células iniciais do embrião. Estas células contêm fragmentos de genes que são agrupados nos linfócitos B, durante a ontogênese. Esta recombinação genética associada a mutações individuais produz a diversidade. Anticorpos, como outras proteínas, são compostos de subunidades chamadas aminoácidos. Existem 20 aminoácidos que em diferentes associações formam a cadeia protéica. A composição de aminoácidos e a seqüência em que são colocados na cadeia determinam a estrutura tridimensional da molécula e a interação com outras proteínas. Imunoglobulina, a molécula de anticorpo, tem características estruturais que refletem sua função. São formadas de duas cadeias protéicas que são relacionadas, designadas cadeias pesadas e cadeias leves. A seqüência de aminoácidos nestas duas cadeias, quando comparadas em diferentes anticorpos, mostra uma propriedade peculiar, somente a primeira metade da cadeia (NH_2) mostra variação, no restante da proteína a seqüência de aminoácidos é praticamente a mesma.

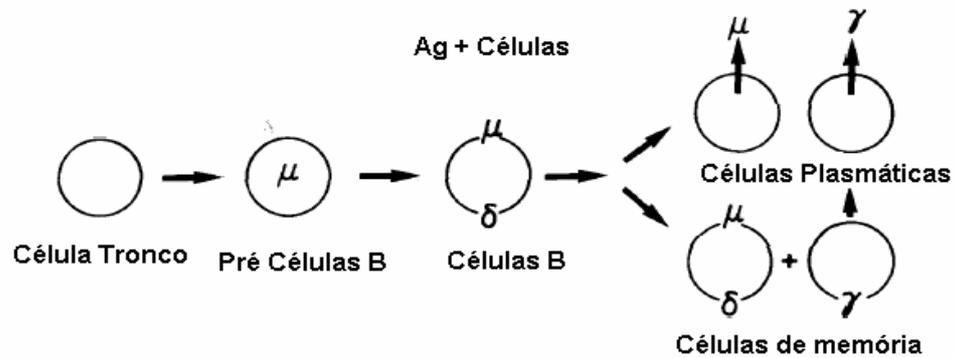


FIGURA 4 - Ontogênese do Linfócito B.FONTE: MILSTEIN (1984)

As células precursoras das células produtoras de anticorpos não expressam imunoglobulinas, mas durante a diferenciação em pré-célula B e célula B, elas expressam primeiro a cadeia pesada e depois a cadeia leve. O primeiro anticorpo produzido é ligado à membrana e funciona como molécula receptora que recebe os sinais do antígeno. Estas células estimuladas se dividem e se diferenciam em células produtoras de anticorpos e células de memória, estes eventos ao nível celular estão correlacionados com mudança na estrutura do DNA. O material genético das células germinais contém genes para regiões variáveis e constantes em diferentes fragmentos do ácido nucleico. Cadeias leves e pesadas somente podem ser transcritas e traduzidas quando certos fragmentos (nas cadeias leves aparece um fragmento da região variável e outro da região de junção; nas cadeias pesadas aparecem os fragmentos das regiões variável, diversidade e junção) são integrados por um mecanismo de recombinação. Durante este processo de integração é gerado uma enorme diversidade de anticorpos.

Von Behring & Kitasato (1890) (appud JERNE,1984) foram os primeiros a descobrir a molécula de anticorpo no soro de animais imunizados e o fato de que estes anticorpos poderiam neutralizar as toxinas da difteria e do tétano. Eles também demonstraram a especificidade dos anticorpos: antitoxina tetânica não pode neutralizar a toxina da difteria e vice-versa. Nos 30 anos subseqüentes, a maioria dos imunologistas acreditaram que todas as células do corpo seriam capazes de produzir anticorpos, conceito que se estendeu até a década de 1950. Foi na década de 60 que se conseguiu mostrar que somente os linfócitos produziam

anticorpos. O número de linfócitos representa aproximadamente 1% do total do peso do animal (JERNE,1984). É importante salientar que o número de linfócitos no sistema imune é, pelo menos, uma ordem de magnitude maior que o número de neurônios no sistema nervoso (JERNE,1984).

Na década de 60, foram bastante produtivas as descobertas imunológicas: 1) a estrutura do anticorpo foi tornada clara; 2) a demonstração da afirmação de Burnet, de que todas as moléculas de anticorpo sintetizadas são idênticas; 3) finalmente foi feita a distinção entre linfócitos B e T e foi possível definir que somente linfócitos B secretam anticorpo (JERNE,1984).

Os linfócitos B possuem receptores em sua superfície (em torno de 10^5 receptores idênticos para células B). Estas células quando estimuladas se dividem e maturam. A sua descendência vai secretar aproximadamente 2000 moléculas idênticas de anticorpos por segundo (JERNE,1984).

A região variável de uma molécula de anticorpo é, ela própria, antigênica e induz a produção de anticorpos. Anticorpos monoclonais de mieloma, quando injetados em outro animal, induzem anticorpos específicos, os quais reconhecem um anticorpo particular de mieloma, mas não reconhecem anticorpos de outro mieloma isolados de outros animais. Jacques Oudin (appud JERNE,1984), demonstrou que anticorpos normais, quando produzidos em animais imunizados, são antigênicos e induzem a formação de anti-anticorpos específicos (JERNE,1984). Em outras palavras, a região variável de uma molécula de anticorpo constitui não somente o seu sítio de ligação, mas também apresenta um perfil antigênico chamado idiotipo, contra o qual anticorpo anti-idiotipo pode ser induzido em outro animal.

A teoria da seleção clonal formulada por Burnet diz: “um antígeno seleciona um linfócito que é reconhecido por seu receptor e estimula esta célula a proliferar, a maturar e a secretar anticorpos com sítio de ligação específico para o epítipo do antígeno”.

Outro aspecto importante é o número de diferentes moléculas de anticorpos que um único animal pode produzir. Este número tem sido estimado a ultrapassar 10 milhões, e esta enorme diversidade tem sido designada de repertório dos linfócitos B. Este repertório tem sido caracterizado como completo, o que significa

que o sistema imune pode responder com a formação de anticorpos específicos para qualquer molécula existente no mundo, inclusive aquelas que o sistema imune nunca teve oportunidade de encontrar.

Um aspecto quantitativo importante, que deve ser enfatizado no que concerne a diversidade de moléculas de anticorpos, é o fato de que em seres humano são produzidos aproximadamente 10.000 diferentes proteínas, tais como: enzimas, hormônios, proteínas de membrana e outros. Ao mesmo tempo é estimado que o sistema imune mantém um repertório que excede a 10.000.000 diferentes proteínas chamadas de anticorpos. Isto significa 1.000 vezes mais do que todas as outras proteínas juntas.

Humanos e camundongos possuem aproximadamente 10 mg de anticorpos em 1 mL de sangue, então um ser humano normal possui entre 50 e 100g de anticorpos circulando livremente, são as chamadas imunoglobulinas (Ig). Se dividíssemos este número por 10^7 , de diferentes especificidades, seriam 10 milhões de diferentes especificidades, o que significa 5 a 10 μg para cada especificidade, representando uma média de 3×10^{13} anticorpos monoclonais de cada especificidade (JERNE,1984).

3.2 LINHAGENS CELULARES DE MIELOMAS

As linhagens de mielomas mais freqüentemente usadas são: P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NOS/1. Todas células murinas que perderam a capacidade de sintetizar cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas são derivadas da linhagem parental MOPC21 (Mineral Oil Plasmacitoma Cell). Potter e Boyce (1962) (appud BARNES et al., 2000) descobriram que óleo mineral injetado na cavidade peritoneal de camundongo Balb/c produzia células tumorais (mieloma). Estas células foram selecionadas (clonadas) para deficiência na enzima HPRT-hipoxantina fosforibosil transferase, de onde surgiu a linhagem P3X63Ag8.653. Esta foi fundida com linfócitos de baço de camundongo Balb/c imunizados com hemácias de carneiro e que, por sucessivas subclonagens, gerou a SP2/0-Ag14. A linhagem NOS/1 também teve a mesma origem diferenciando-se pelos processos de subclonagem (BARNES et al.,2000; YOO et al.,2002), (FIGURA 5).

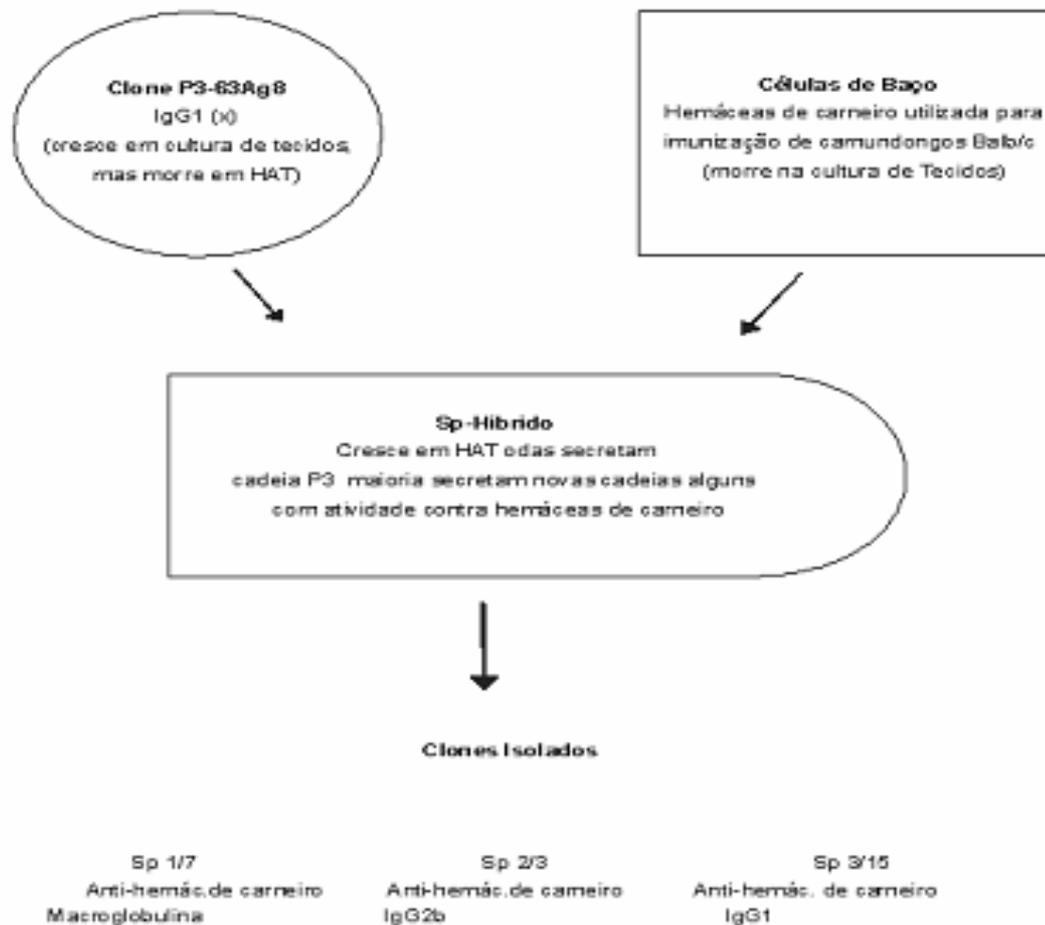


FIGURA 5 – Híbridos anti-hemácias de carneiro. FONTE: MILSTEIN, (1984).

O primeiro hibridoma preparado com sucesso foi feito a partir de células de camundongos imunizados com hemácias de carneiro. Estas foram fundidas com mielomas que produzem a proteína IgG MOPC21, que crescem em cultura de tecido, possibilitando a obtenção de anticorpos direcionados contra diferentes determinantes antigênicos e se tornam resistentes a Azaguanina. Os híbridos foram selecionados em meio HAT. Quando um animal é injetado com um imunógeno, seu sistema imune responde produzindo uma enorme diversidade de anticorpos direcionados contra diferentes determinantes antigênicos e também diferentes anticorpos direcionados contra estes mesmos determinantes antigênicos. Uma vez produzidos, estes anticorpos são liberados na circulação, e é quase impossível separar cada componente presente no soro. Cada anticorpo é produzido por uma célula individual. A imortalização de células produtoras de anticorpos pela fusão

somática de célula seguida pela clonagem apropriada do híbrido permite a produção de cada anticorpo em cultura separadas, estas células podem ser injetadas em um animal (camundongo), que desenvolve tumores semelhantes a mielomas. O soro e o líquido ascítico dos animais portadores dos hibridomas contêm grande quantidade de anticorpos monoclonais. O sistema imune reconhece as substâncias como estranhas, e linfócitos B são induzidos a produzir anticorpos. Estes anticorpos são secretados e misturados no soro (FIGURA 6).

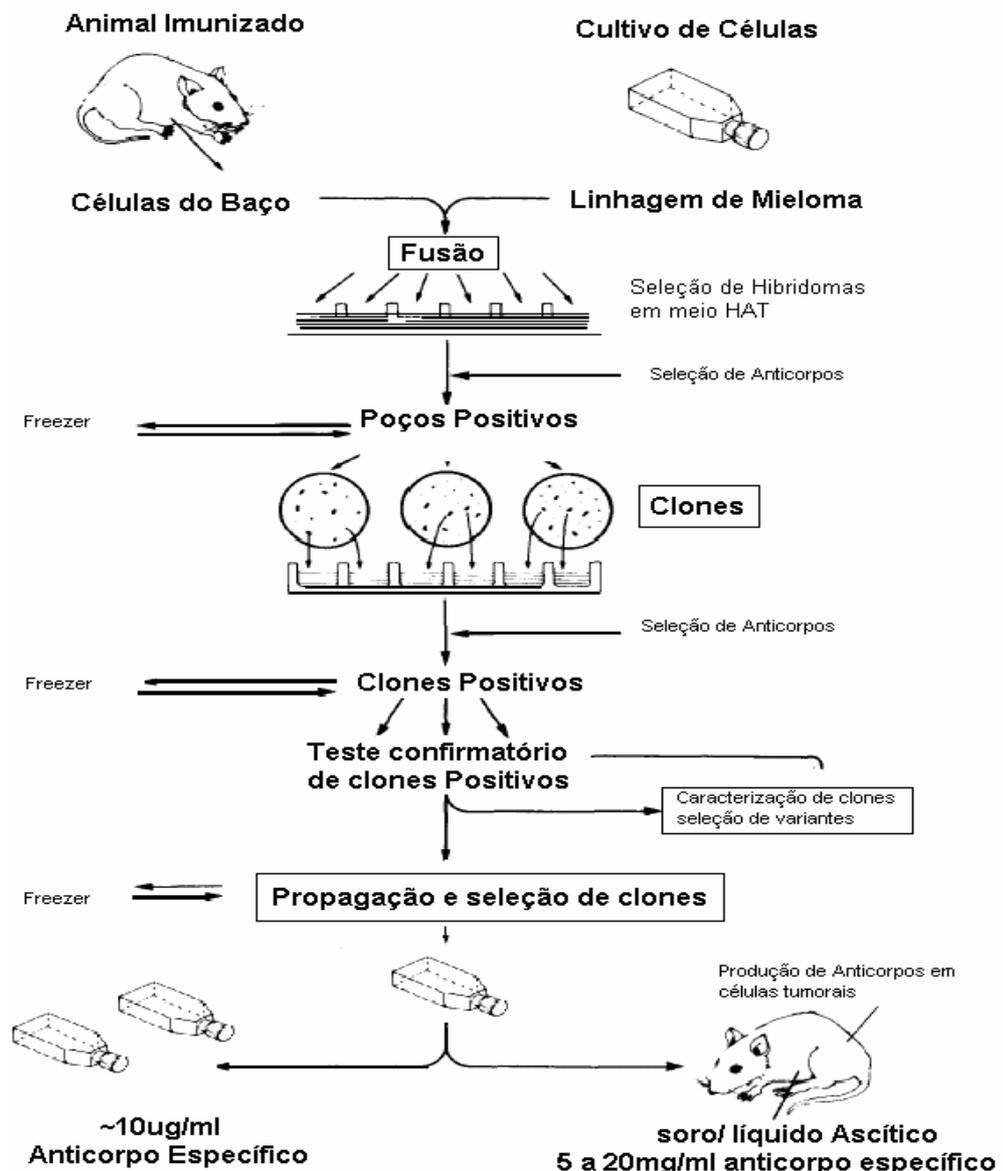


FIGURA 6 - Fluxograma para Geração de Anticorpos Monoclonais.FONTE: MILSTEIN,, (1984).

As moléculas de anticorpos são extremamente semelhantes e, uma vez misturadas, não podem ser separadas uma das outras, por esta razão, até o aparecimento da tecnologia dos hibridomas, não era possível estudar a diversidade dos anticorpos para um imunógeno (FIGURA 7). A derivação de células híbridas imortais resolveu este problema porque ela oferece anticorpos individuais produzidos separadamente em culturas. Isto permite a discriminação de componentes individuais de um antígeno. Anticorpos monoclonais preparados a partir de componentes celulares ou de microrganismos podem ser utilizados para identificar sua função, para atuar como reagentes de diagnóstico e também para agir com fins terapêuticos (MILSTEN, 1984).

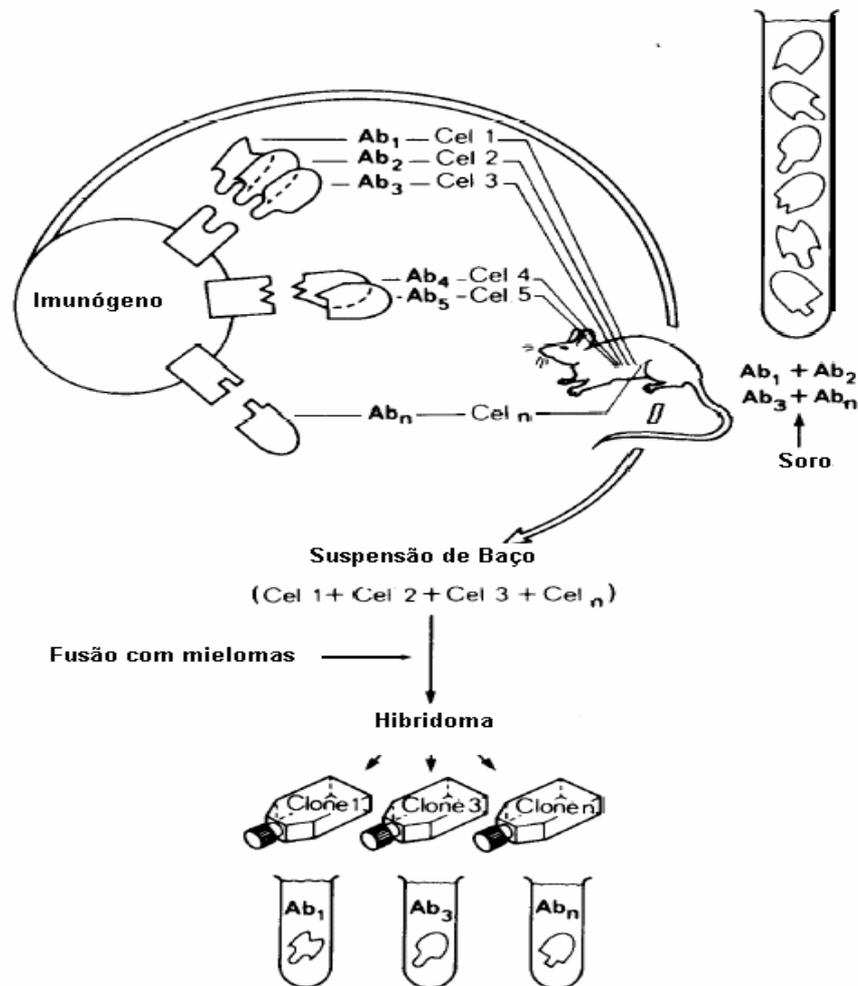


FIGURA 7 Discriminação da resposta imune pelo uso da tecnologia de hibridoma. FONTE: MILSTEN, (1984)

Um camundongo pode produzir 10 milhões de anticorpos, cada um sintetizado pelo seu próprio linfócito B. Aproximadamente 1000 anticorpos diferentes são capazes de reconhecer um único determinante antigênico. Quando se tenta restringir a heterogeneidade de anticorpos para um único determinante, por adsorções apropriadas ou imunizações alogênicas, o soro do animal apresenta quatro desvantagens: 1) baixo título; 2) anticorpos específicos para um único determinante, mas heterólogo; 3) produção limitada; 4) a mesma combinação de anticorpos específicos é impossível de reproduzir em outro animal.

Estas limitações são inexistentes quando se produz anticorpos monoclonais que apresentam as vantagens seguintes: 1) alto título; 2) especificidade única, cada híbrido produz um único anticorpo; 3) ilimitada produção de anticorpos, os híbridos são imortais como células tumorais, secretam de 10 a 50 µg/mL de anticorpos em cultivo celular e títulos de 1 a 10 mg de anticorpo por mL em fluido ascítico; 4) antígenos impuros levam à produção de anticorpos puros. Os anticorpos monoclonais, por definição, caracterizam um único antígeno dos muitos injetados no camundongo; todas as especificidades podem ser recuperadas. A observação empírica parece ser aquela de que se uma resposta imune pode ser induzida em um camundongo, hibridomas específicos podem ser derivados; 5) linfócitos B específicos parecem ser raros na população de células do baço de um camundongo imunizado. Eles são encontrados em número aumentado de 10 a 100 vezes na população de hibridomas; 6) hibridomas secretam altos níveis de anticorpos, independentemente de a célula B normal ser ou não de alta produção; 7) as células de hibridomas podem ser induzidas à mutação para produzir anticorpos não encontrados na natureza; 8) anticorpos monoclonais podem ser utilizados para definir, purificar, detectar, quantificar, mapear, modificar, selecionar e localizar antígenos; 9) uma das grandes vantagens das linhagens de hibridoma reside não somente na produção de anticorpos monoclonais, mas na disponibilidade da maquinaria que os produz.

Pode-se diversificar uma única molécula de anticorpo selecionando uma molécula mutante, introduzindo novas cadeias leves e pesadas dentro das linhagens de hibridomas, clonando e mutando genes por técnica de genética reversa e reintroduzindo estes genes dentro de linhagens de células ou dentro das

células germinais de camundongo. As variantes produzem informações sobre o relacionamento de estrutura e função da proteína, do RNA e do gene. As análises das variantes têm permitido hipóteses mais especulativas sobre interações de cadeias leves e pesadas em famílias multigenéticas (KÖHLER,1984).

O desenvolvimento da tecnologia de hibridomas, com seu potencial para uso em processos terapêuticos, tem permitido a indução do sistema imune a produzir anticorpos eficazes no combate a doenças infecciosas e tumorais. A natureza xenogênica dos anticorpos de camundongos tem se constituído em fator limitante do seu uso em outras espécies. A criação de quimeras, pela biologia molecular, provou ser uma alternativa com perspectiva concreta de uso clínico. Uma vez que anticorpos terapêuticos são exigidos por um grande número de pacientes, e em doses elevadas, tornou-se imperativo o desenvolvimento de eficientes tecnologias de produção de proteínas recombinantes. Cultura de células animais como sistema de expressão tem sido um dos métodos de escolha para produção comercial de monoclonais, chegando a concentração que excede a 5 g/L (POLLOCK et al,1999; BIRCH,2006).

3.2.1 Biotecnologia no Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias

3.2.1.1 Detecção de Proteínas

3.2.1.1.1 Imuno-histoquímica

Como um complemento ao isolamento de organismos patogênicos dos tecidos, a imuno-histoquímica está se tornando rapidamente um instrumento padrão nos laboratórios de diagnóstico para identificação de antígenos associados a vírus, bactérias e protozoários. A detecção de antígenos em tecidos fixados oferece diversas vantagens sobre outras técnicas de diagnóstico: a) facilidade no envio de amostras; b) segurança no manuseio de patógenos potenciais para humanos; c) possibilidade de estudos retrospectivos de amostras armazenadas; d) rapidez; e) detecção de organismos não viáveis. Como o número de anticorpos monoclonais para antígenos definidos e também para isotipos de classes de imunoglobulinas

usadas em conjugados continua a crescer, o uso da imuno-histoquímica para identificação de microrganismos e outros marcadores específicos de auto-imunidade tende a aumentar (GORHAN et al.,2004).

3.2.1.1.2 Imunoblot

Esta técnica tem sido realizada principalmente em laboratório de diagnósticos para identificar e/ou caracterizar agentes infecciosos com base na especificidade para antígenos, ou para utilizar antígenos conhecidos na busca da resposta sorológica específica. Um resultado falso positivo ou falso negativo obtido em outros ensaios pode ser resolvido por este método. O imunoblot tem sido usado freqüentemente para determinar a especificidade de um anticorpo monoclonal específico. Polipeptídeos purificados podem ser transferidos para membrana de nitrocelulose e serem analisados quanto a sua reatividade frente a soros específicos para proteínas individuais. O sistema de revelação reside no uso do conjugado anti-espécie elaborado a partir de anticorpos monoclonais ou policlonais (GORHAN et al.,2004).

3.2.1.1.3 Ensaio Imunoenzimático - ELISA direto

Com captura de antígeno: facilita a detecção de antígenos diretamente do animal, antecipadamente ou durante o curso da doença. A configuração deste ensaio consiste em um anticorpo de captura e outro de detecção, pode ser um anticorpo monoclonal específico ou policlonal. O antígeno da amostra é capturado por um anticorpo adsorvido na fase sólida, e a sua presença é revelada por um segundo anticorpo que pode ser marcado por radioisótopo ou enzima. Se o anticorpo usado para detecção não for conjugado, então um conjugado anti-espécie, monoclonal ou policlonal é utilizado (GORHAN et al.,2004).

3.2.2 Detecção de Anticorpos

3.2.2.1.ELISA indireto

O substrato sólido é sensibilizado com antígeno para o qual se busca avaliar a resposta imune humoral (anticorpos) induzida por agente infeccioso ou vacinal. Um segundo anticorpo, monoclonal ou policlonal associado a uma enzima e dirigido a um isotipo, é utilizado para detecção. Em certas circunstâncias, a subclasse ou o alotipo predominante na resposta imune merece ser conhecido, restringindo-se o conjugado a anticorpos monoclonais.

3.2.2.2 Imunoensaio Competitivo

Este teste tem substituído o ELISA indireto na discriminação e vigilância soro-epidemiológica. Neste teste, soros de diferentes espécies podem ser avaliados sem a necessidade de um conjugado espécie-específico. Neste procedimento, antígenos pouco purificados podem ser utilizados desde que o anticorpo de detecção tenha especificidade desejada. O princípio deste ensaio para detecção de anticorpos é a competição entre o soro teste e o anti-soro de detecção. A ligação específica do anticorpo de detecção é revelada pelo uso de conjugados antígeno específico, monoclonal ou policlonal. A redução na coloração obtida se deve à ligação de anticorpos de soro teste, os quais impedem a ligação do anticorpo de detecção (GORHAN et al.,2004).

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver reagentes para uso diagnóstico e para fins acadêmicos, aplicáveis ao estudo de agentes infecciosos e parasitários que comprometem a saúde dos rebanhos e/ou que trazem conseqüências à saúde humana.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Criar competências na produção de anticorpos monoclonais;

4.2.2. Produzir conjugados anti-espécie com base em anticorpos monoclonais para uso em testes imunoenzimáticos e de imunofluorescência;

4.2.3. Produzir *kits* de diagnóstico comercializáveis com qualidade mínima, capazes de assegurar sensibilidade e especificidade com custo de produção que estimule o seu uso em diagnósticos como instrumento de conhecimento de realidades da saúde animal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

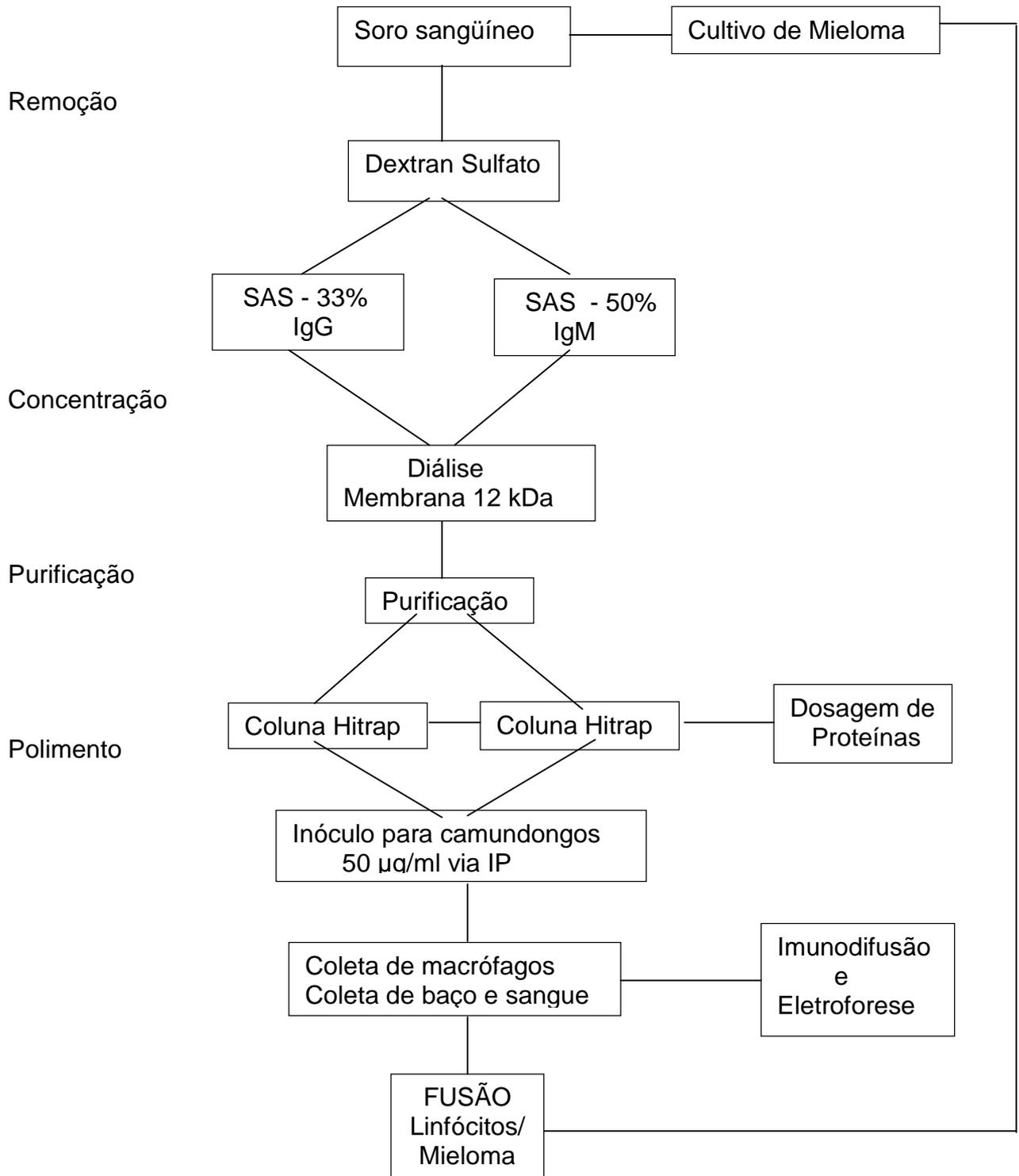


FIGURA 8 - Fluxograma das etapas de produção e caracterização de anticorpos monoclonais para a produção do conjugado antifragmento Fc de IgG de bovino

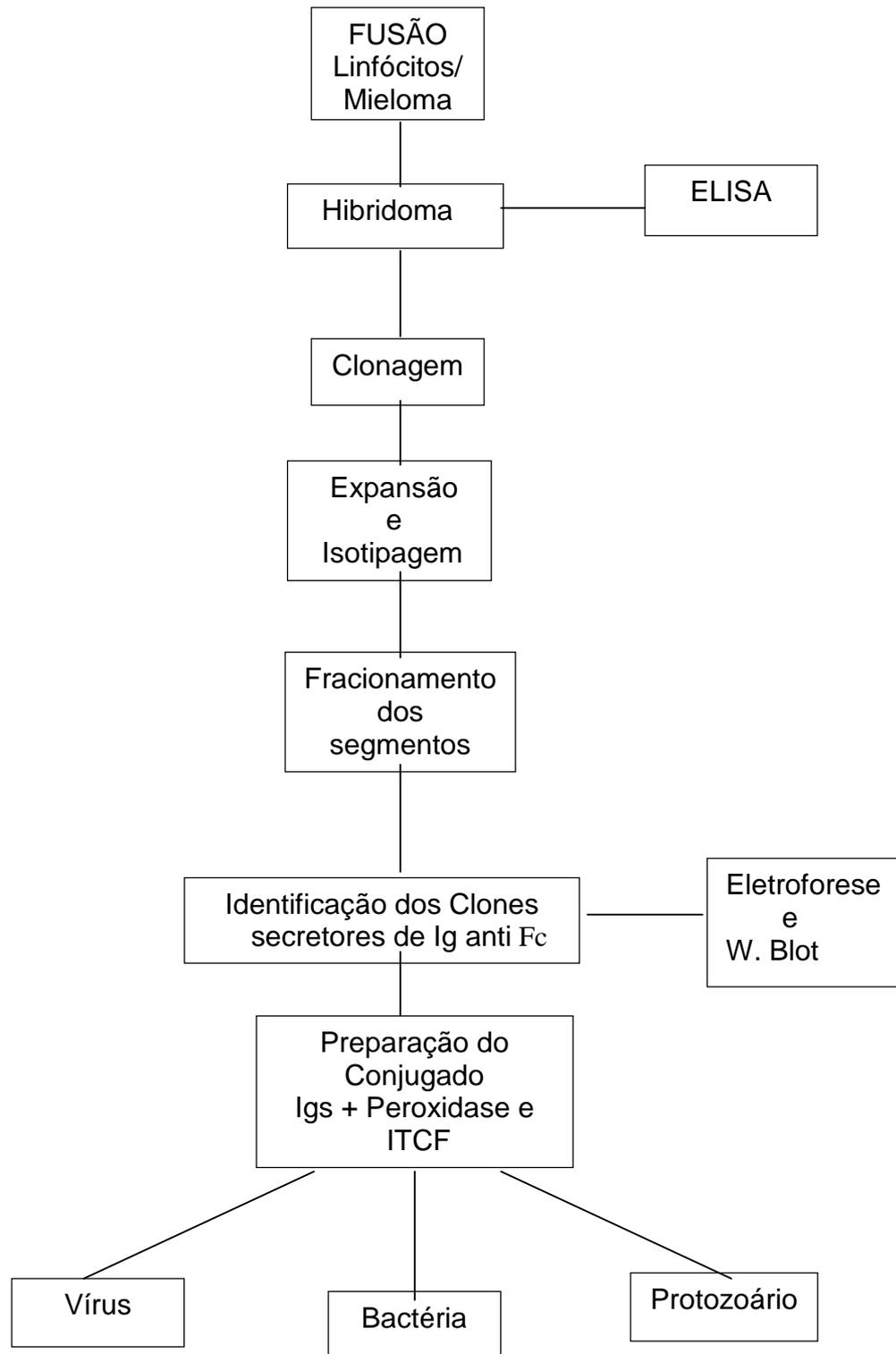


FIGURA 9 - Fluxograma das etapas de produção e caracterização de anticorpos monoclonais para a produção do conjugado antifrangmento Fc de IgG de bovino (continuação)

5.1 SORO SANGÜÍNEO

Soro sangüíneo foi obtido por punção da veia jugular de bovino do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná e de amostras remetidas para

exame ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti. Destes soros foi feito um *pool*, no qual foram verificadas a limpedez, a ausência de hemólise e, posteriormente, o soro foi submetido à centrifugação a 14.800g por 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi colhido, as amostras separadas para imunodifusão e eletroforese e o restante armazenado a -20 °C até o momento do uso.

5.2 REMOÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DO SORO

Este procedimento é recomendado para se obter maior durabilidade das colunas de cromatografia. Foram analisados dois procedimentos. O primeiro foi designado 1, quando do uso de PVP (Polivinilpirrolidona) a 3% (anexo 4) do volume de soro adicionado gradativamente sob agitação, a temperatura de 4 °C, por 4 horas. Ao término, o soro foi centrifugado a 14.800g por 30 minutos, em temperatura de 4°C. O sobrenadante colhido e conservado a 4°C para etapas subseqüentes. No desenvolvimento do trabalho foi utilizado o procedimento designado 2, face a citação feita pelo fabricante das colunas de cromatografia de ser este o procedimento de primeira escolha. Para tanto, utilizou-se solução de Dextran Sulfato 5% (anexo 5) na proporção 0,25% (1,25 mL para cada 25 mL de soro) adicionado gota a gota sob agitação, seguido de repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, com agitações a cada 10 minutos. Na seqüência, foi adicionada uma solução de Cloreto de Cálcio 11,1% (anexo 6), na proporção de 1% (2,25 mL para cada 25 mL de soro), gota a gota em agitação. Ao fim desta etapa, colocou-se a suspensão em banho de gelo em repouso por 30 minutos. Após esta etapa, o soro foi centrifugado a 14.800g por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi colhido, e foram separadas amostras para imunodifusão e eletroforese. O restante conservado a 4°C, como na etapa anterior.

5.3. PRECIPITAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

Conferida a quantidade do soro pré-preparado, seu volume foi duplicado com Tampão PBS (salina fosfato tamponado), (anexo 8). Ao volume final, soro mais PBS, foi adicionada a mesma quantidade de solução de sulfato de amônio saturada

(anexo 1) gota a gota, sob agitação em temperatura ambiente, precipitando todas as classes de imunoglobulinas com 50% da concentração final. A suspensão foi homogeneizada, durante 30 minutos em agitador magnético, logo após foi centrifugada a 14.800g durante 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi recuperado e ressuspenso em PBS ao volume original do soro.

5.3.1. Precipitação das Imunoglobulinas G

Nesta etapa, adicionou-se a solução de sulfato de amônio saturada para atingir a concentração final de 33% de saturação visando à precipitação apenas das IgGs. Este percentual de saturação foi calculado sobre o volume da suspensão de imunoglobulinas, conforme protocolo do item acima. Seguiu-se a agitação por 30 minutos à temperatura de 4°C, e em seguida, centrifugação a 14.800 g por 30 minutos. Conservado o sobrenadante à temperatura de 2°C a 8°C, o precipitado (IgG) foi ressuspenso em 5 mL de PBS e colocado em diálise contra PBS por 72 horas, com trocas a cada 12 horas à temperatura de 4°C.

5.4. DIÁLISE

Processo para separar um colóide de um soluto molecular ou iônico por meio de membrana permeável apenas ao soluto. Em nosso trabalho utilizou-se uma membrana que permite um limite de exclusão de 12 kDa para retenção da proteína e liberação do sulfato de amônio. As diálises foram feitas durante 3 dias em um frasco com 2 litros de PBS, com trocas a cada 12 horas. Após esta etapa, as imunoglobulinas G foram centrifugadas a 3.700g durante 15 minutos para remover as impurezas. Das soluções de IgG dialisadas foram separadas amostras para dosagem de proteína, imunodifusão e eletroforese. O restante foi conservado a -80 °C.

5.5. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foi usado o método físico de absorção de ondas ultra-violeta. O equipamento utilizado foi Espectrofotômetro Metrolab 1700, onde as leituras de absorvância

foram realizadas por detecção com raios U.V., em comprimento de ondas de 260 nm e 280 nm. Obedeceu-se a fórmula a seguir:

$$Y = (1,55 \times \text{leitura } 280\text{nm}) - (0,76 \times \text{leitura } 260\text{nm})$$

Y x diluição utilizada = resultado (concentração de proteína em mg/mL)

5.6. PURIFICAÇÃO DE IgG

Foram utilizadas colunas de cromatografia por afinidade hitrap G HT (sensibilizada com proteína G de *Staphylococcus aureus*), marca Amershan (anexo 20). A primeira etapa consistiu em equilibrar a coluna com 10 volumes de tampão de adsorção (20 mM de fosfato de sódio, pH 7,0) (anexo 20A). A seguir foi aplicado a amostra no volume de 1 mL. Na seqüência, a coluna foi lavada com 10 volumes do tampão de adsorção até não detectar proteínas adsorvidas com a U.V. 280 nm. O material foi eluído pela aplicação de 5 volumes da coluna do tampão de eluição (0,1M de glicina-HCl, pH 2,7), (anexo 20B). As frações de 1 mL cada foram submetidas ao teste de ácido tricloroacético 10% (anexo 23) e aquelas com maior concentração de proteínas foram separadas. A cada fração foram adicionados 100 µL do tampão de neutralização (1M de TRIS-HCl, pH 9,0) (anexo 20C). As colunas foram lavadas com 10 volumes de tampão de adsorção e conservadas com etanol a 20% (anexo 24) e a 4 °C (FIGURA 10).



FIGURA 10 - Purificação de imunoglobulina G em coluna de cromatografia por afinidade. FONTE: O Autor

5.7. PRECIPITAÇÃO DA IgG BOVINA COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO - TCA

Para verificação da presença de proteínas durante o processo de purificação foram coletadas amostras de 1 mL de IgG bovina purificada e distribuídas em placas de 96 poços, fundo plano, na quantidade de 50 μ L por poço. Ácido tricloroacético a 10% (TCA) (anexo 23), também na quantidade de 50 μ L, foi adicionado a cada poço. Das frações com maior turbidez, uma amostra foi colhida e diluída 1:20 para quantificação por fotometria, conforme escrito acima. Amostras para teste por eletroforese e imunodifusão também foram conservadas.

5.8. CAMUNDONGOS

Foram utilizados para as imunizações animais da linhagem Balb-c (Suiss) de colônia Inbred (SPF), fêmeas com 28 dias.

5.8.1. Protocolo de Imunizações de camundongos

Na primeira dose, cada camundongo foi imunizado com 50 μ g de proteína e 50% de adjuvante de Freund completo em volume final de 100 μ L. A emulsão, antígeno mais adjuvante, foi homogeneizada até não haver mais formação de gotículas de água, quando em repouso, ou até que uma gota não se dissolvesse na superfície da água de um recipiente. As emulsões contendo IgG bovina foram inoculadas em lotes de 10 camundongos, via intraperitoneal. A segunda e a terceira doses foram realizadas com intervalos de 15 dias e foi procedido como na primeira etapa. Apenas o adjuvante foi substituído por Freund incompleto. Ao término das imunizações de um camundongo de cada lote, foi coletado sangue total por punção cardíaca para obtenção de soro positivo a ser usado na avaliação da imunidade humoral por imunodifusão. Todos os camundongos foram mantidos em observação constante durante o cumprimento do protocolo de imunizações.

5.9. AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL PARA IgG POR IMUNODIFUSÃO

Foram utilizadas placas de 6 cm de diâmetro contendo 7 mL de gel de ágar (anexo 10). Os poços foram perfurados com um molde que dispõe de um poço central e 2 poços periféricos alinhados. O diâmetro de cada poço e a distância entre os poços é de 3 e 4 mm, respectivamente (FIGURA 11) . Ao poço central foram adicionados 25 µL de IgG bovina purificada. Nos poços periféricos, de forma alternada, foram colocados 25 µL de soro de camundongo imunizados com IgG bovina e soro de animais não imunizados. As placas foram incubadas em câmara úmida a 28°C por 48 horas. A leitura e a interpretação obedeceram ao critério de linhas de precipitação entre IgG bovina purificada e o soro do camundongo imunizado e, ainda a ausência destas entre os poços IgG bovina e o soro do animal não imunizado.



FIGURA 11 – Diagrama do teste de imunodifusão em gel. SP - soro positivo de camundongo anti IgG bovino; IgG - Imunoglobulina purificada de bovino. FONTE: O Autor

Amostra Positiva: formação de linha de precipitação nítida entre os poços que contêm o anticorpo anti IgG bovino e o antígeno IgG bovino purificada.

5.10. CULTIVO DE MIELOMAS

Utilizaram-se células SP2-O/Ag 14 e meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) (anexo 12), Gentamicina 40µg/mL, Anfotericina B 2,5 µg/mL e 8- Azaguanina 0,1mg/mL (anexo 13). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ (FIGURA 12).

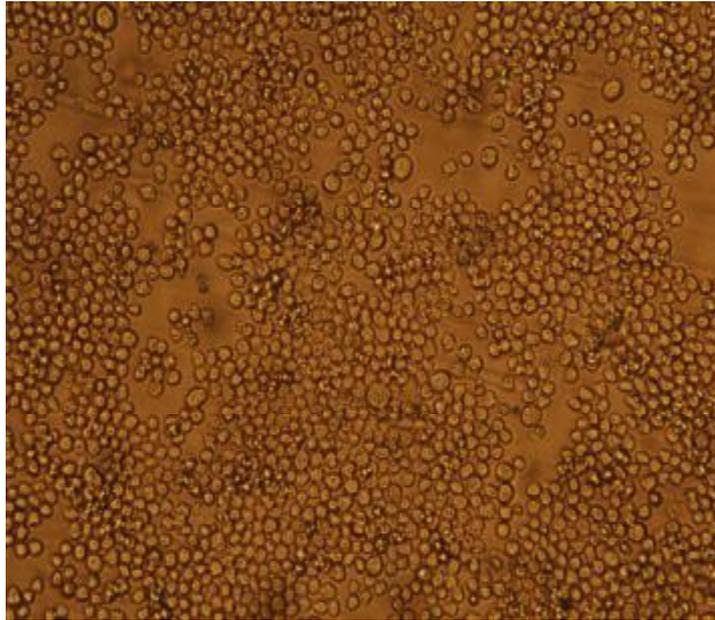


FIGURA 12 - Cultivo da linhagem de células SP2-O/Ag14. FONTE: O Autor

5.11. MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Com 24 horas de antecedência da fusão, foram sacrificados cinco camundongos para lavagem peritoneal com solução de sacarose 0,34 M (anexo 11), a fim de manter a isotonicidade. Em cabine de segurança biológica, assepticamente, foi aberta a pele do abdômen dos camundongos sem perfurar a membrana peritoneal. Foram inoculados 5 mL de solução de sacarose,. Os peritônios foram massageados para liberação dos macrófagos e a solução inoculada foi retirada. A suspensão de células foi centrifugada a 800g durante 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de meio de cultura RPMI. Uma amostra da suspensão de macrófagos foi diluída 1:20 e contada em câmara de Neubauer para obtenção de aproximadamente 5×10^5 células/ mL. A suspensão de macrófagos foi distribuída na quantidade de 100 μ L /poço, em cinco microplacas de fundo plano, incubadas a 37°C em estufa de CO₂ durante 24 horas (FIGURA 13).

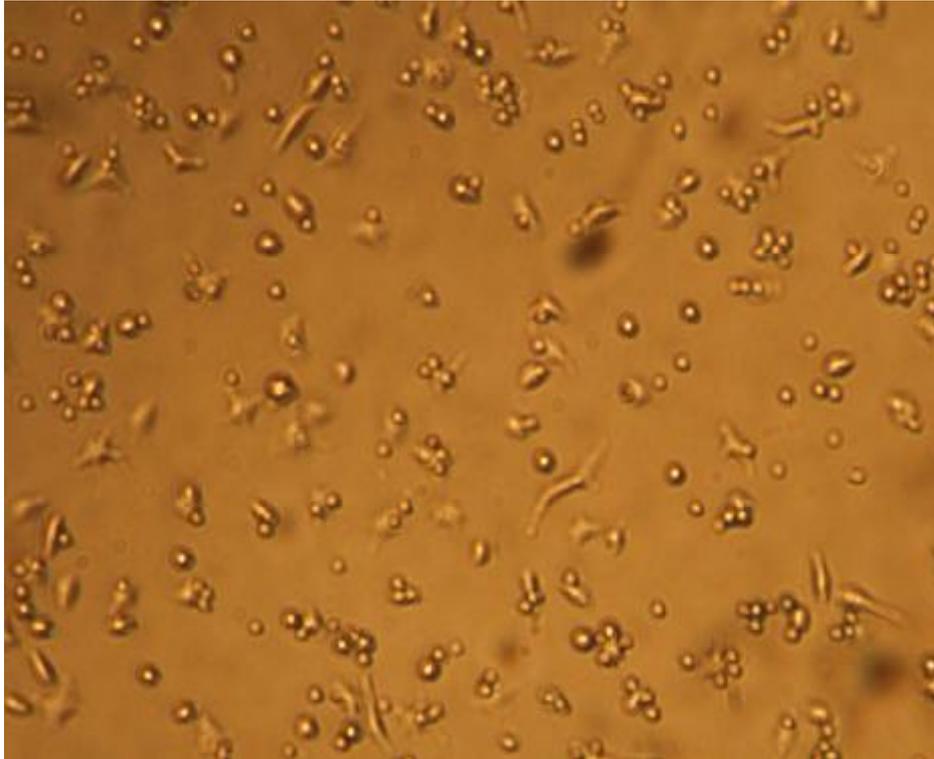


FIGURA 13 - Cultivo de macrófagos peritoniais de camundongo normal. FONTE: O Autor

5.12. OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS DO BAÇO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS

Os animais foram sacrificados por inalação de éter etílico. Realizada a assepsia com álcool 70 GL, o baço foi extraído por processo cirúrgico em capela biológica tipo II. O baço coletado foi colocado em placa de Petri com 5 mL de meio de cultura RPMI sem soro fetal (anexo 12). Com bisturi estéril, o baço foi desintegrado em minúsculos pedaços e triturado em gral com pistilo estéril sobre uma peneira de metal de malha fina. Os linfócitos liberados foram transferidos para um tubo de centrifuga com o mesmo meio de cultura e deixados em repouso aproximadamente 2 minutos, havendo precipitação dos blocos maiores de tecido do baço. O sobrenadante foi colocado em novo tubo de centrifuga, centrifugado a 800g durante 10 minutos a 4°C. Separado o precipitado contendo os linfócitos, o sobrenadante foi ressuscendido em 10 mL de meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino (anexo 12). As células foram contadas em câmara de Neubauer, obtendo-se uma fração de aproximadamente 10^8 /mL de linfócitos (esplenócitos).

5.13. FUSÃO

A suspensão de 10^8 /mL de linfócitos foi adicionada a uma suspensão contendo 10^7 /mL de mieloma SP2-0, mantendo-se uma proporção de 10:1. A suspensão linfócitos-mieloma foi centrifugada a 800g por 10 minutos. Após isso, o sobrenadante foi removido e o precipitado dissolvido com suaves batidas à mão. Em continuidade, adicionou-se 1 mL de PEG 6000 (anexo 16) previamente aquecido a 37°C, gota a gota, agitando sempre com movimentos suaves e rotativos por 1 minuto. Foi adicionado, em seguida, 1 mL de meio de cultivo RPMI sem soro fetal bovino (anexo 12), por mais um minuto, e, após, 2 mL em 1 minuto, totalizando 3 mL de meio de cultivo de células, sem soro a 37°C. Outros 7 mL de meio foram acrescentados em 2 minutos, mantendo a homogeneização suave durante mais 2 minutos. Finalmente, outros 10 mL de meio foram adicionados, totalizando um volume final de 20 mL. A suspensão de células fusionadas foi centrifugada a 400g durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante e ressuspensando as células fusionadas em 52 mL de meio de cultivo HAT (anexo 18). Uma suspensão de 100 μ L de células foi distribuída por poço em 5 microplacas de fundo plano, as quais foram previamente preparadas com uma cultura de macrófagos e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As placas foram observadas diariamente em microscópio invertido, substituindo-se 50% do meio de cultura até o 5º dia, quando foi possível observar a formação das primeiras colônias de hibridomas. A partir deste estágio as trocas de meio aconteceram a cada 48 horas até uma confluência celular de aproximadamente 70 a 80%.

5.14. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Utilizou-se o método indireto, para detectar anticorpos monoclonais anti IgG em meio de cultura de hibridomas. A suspensão foi ajustada a uma concentração de 1mg/mL, da qual 10 μ L de IgG bovina purificada foram adicionados a 1000 μ L de tampão de adsorção (anexo 9B). Esta concentração final é de aproximadamente 500ng de proteínas/50 μ L, adicionada a cada poço de cada uma das 5 placas de

96 poços incubadas a 4°C, por uma noite. As placas foram lavadas 5 vezes com 200 µL de tampão de lavagem (anexo 9H) e, a seguir, foram adicionados 50 µL de tampão de bloqueio (anexo 9C). Após a incubação e lavagem, foram adicionados 50 µL de sobrenadante dos hibridomas diluídos 1:2 em tampão bloqueio. As placas foram incubadas a 37°C por 90 minutos. Na seqüência, foram lavadas como acima e 50 µL de conjugado anti IgG de camundongo com peroxidase, diluído 1:3.200, foram adicionados a cada poço e incubados a 37°C por 90 minutos. Seguiu-se a lavagem padrão e posterior adição de 50µL do substrato/cromógeno (anexo 9F). Após 15 minutos a reação foi paralisada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 1M (anexo 9I). As placas foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. Os poços H9; H10 e H11; H12 foram utilizados para os controles negativos e positivos (soro hiperimmune), respectivamente. Uma titulação de antígenos e conjugados foi realizada previamente ao teste, diluindo-se o antígeno (IgG) de uma concentração inicial de 2 mg/ 50µL, coluna 1, com diluições de base 2 até a coluna 11. O conjugado foi diluído a partir de 1:400, fileira A, até a fileira H, diluições de base 2.(FIGURAS 14 e 15).



FIGURA 14 - Titulação do antígeno IgG bovina e do conjugado (comercial) por ELISA. Fonte: O Autor

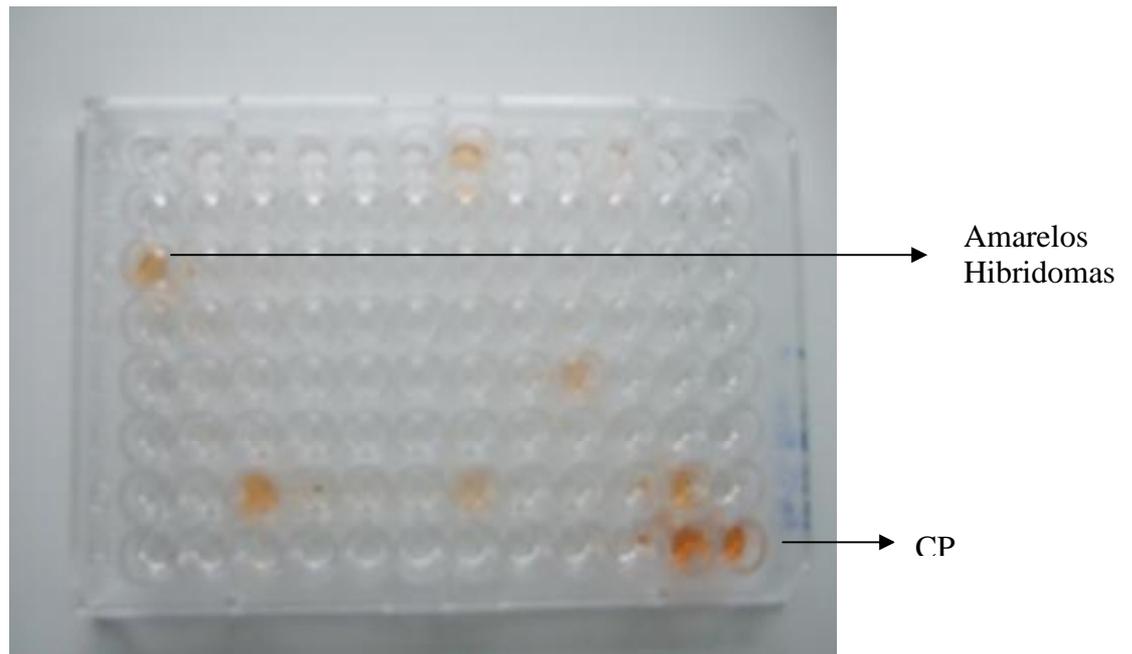


FIGURA 15 – ELISA indireto para a seleção de hibridomas produtores de anticorpos anti IgG bovina (Hibridomas produtores de AcMc estão nos poços corados em amarelo). Linhas H e colunas 11 e 12 são controle positivo. FONTE: O Autor

5.15. CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS

Preparou-se uma suspensão de 50 células híbridas em 20 mL de meio RPMI/OPI (anexos 12 e 29), distribuindo-se 200 μ L por poço em microplaca de 96 poços (estatisticamente menos de uma célula por poço). A microplaca foi colocada em estufa de CO₂ a 37°C por 10 dias. O sobrenadante dos poços com colônias foi testado por ELISA e os clones positivos foram expandidos posteriormente.

5.16. EXPANSÃO DO HIBRIDOMA

Foram realizados sucessivos repiques para microplacas de 24 poços, e 6 poços, depois expandidos para garrafas T25, T75 e T150.

Após o cultivo dos hibridomas em garrafas, verificou-se através do teste de ELISA indireto se estes eram produtores de imunoglobulinas anti IgG bovina. Após a constatação e o acompanhamento da formação das colônias de hibridomas produtores de imunoglobulinas anti IgG bovina, foram feitas diluições de 1:2 até

1:10 ou mais, com objetivo de isolar apenas um hibridoma por poço, o qual seria o clone selecionado. Após a obtenção do clone, este foi repicado em meio de cultura RPMI com 20% de SFB (anexo 12), visando ampliá-lo por meio de repiques para microplacas com 24 poços, e 6 poços, depois garrafas T25, T75 e T150. Os clones foram analisados por imunodifusão em gel de agarose, ELISA e *Western Blot*.

5.17. FRACIONAMENTO DAS IMUNOGLOBULINAS

As IgGs bovinas precipitadas à concentração de 33% com solução de sulfato de amônio saturada foram dialisadas e submetidas a um tratamento enzimático com papaína (anexo 25) para digestão e, conseqüentemente, o fracionamento dos fragmentos Fab e Fc das moléculas de imunoglobulina. Foi preparada uma solução de imunoglobulinas com aproximadamente 5 mg/mL de uma solução de acetato de sódio a 10 mM, pH 5,5. A seguir, adicionou-se 1/20 do volume original de uma solução estoque de cisteína 1M e 1/20 da solução estoque de EDTA 20 mM. A cada mg de anticorpo foram adicionados 10 mg de papaína. A solução foi incubada a 37°C, em banho-maria, durante 16 horas. Após o término da incubação, iodocetamida foi adicionada a uma concentração final de 75 mM e incubada novamente por 30 minutos em temperatura ambiente (HARLOW et al., 1988).

Com os fragmentos obtidos foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. As bandas obtidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em teste de *Western Blot* e testadas frente a anticorpos de camundongos para confirmar a separação do fragmento Fc de IgG bovino do fragmento Fab e também a sua especificidade anti Fc (fragmento cristalizável). Os clones secretores de imunoglobulinas anti Fc bovino serão utilizados na produção de insumos para diagnóstico de doenças bovinas. (FIGURA 16).

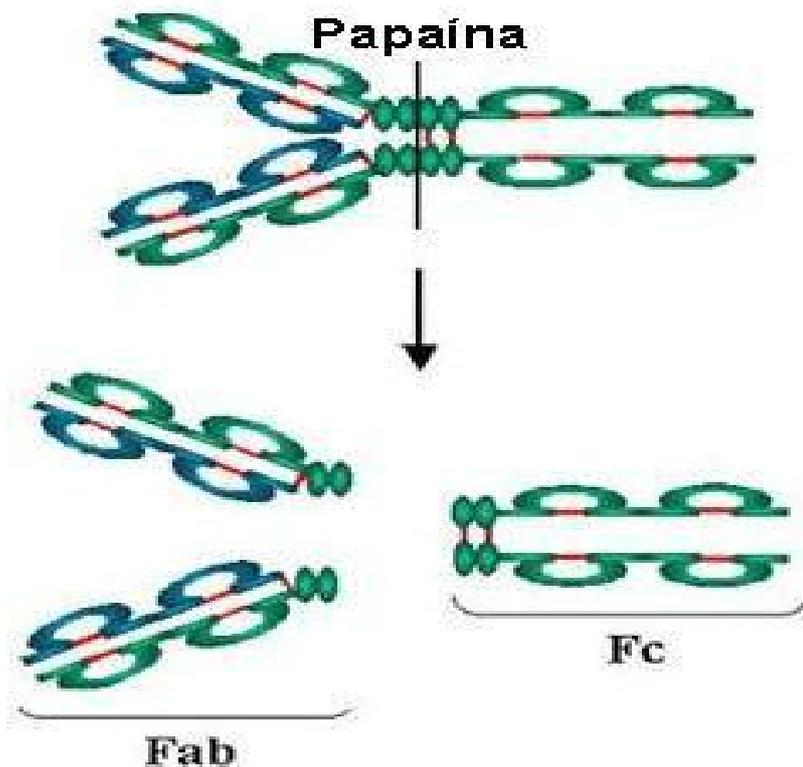


FIGURA 16 – Fragmentação de IgG. 1) Fab: Ligação Ag; Valência = 1; Especificidade determinada pela V_H e V_L ; 2) Fc: Funções Efetoras. Fonte: www.southcarolinauniversity.edu.

5.18 ISOTIPAGEM DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR IMUNODIFUSÃO

Para a isotipagem foi aplicada a técnica de imunodifusão em gel seguindo o protocolo anteriormente descrito. Foram adicionados 25 μ L de soro de camundongo anti IgG ou IgM bovino a fim de determinar a classe, subclasse ou cadeia leve do fragmento em cada poço da periferia do anel na lâmina. Foram adicionados 25 μ L do sobrenadante da cultura de tecido no poço situado no meio da lâmina. A placa foi incubada em câmara úmida por uma noite em temperatura de 22 °C.

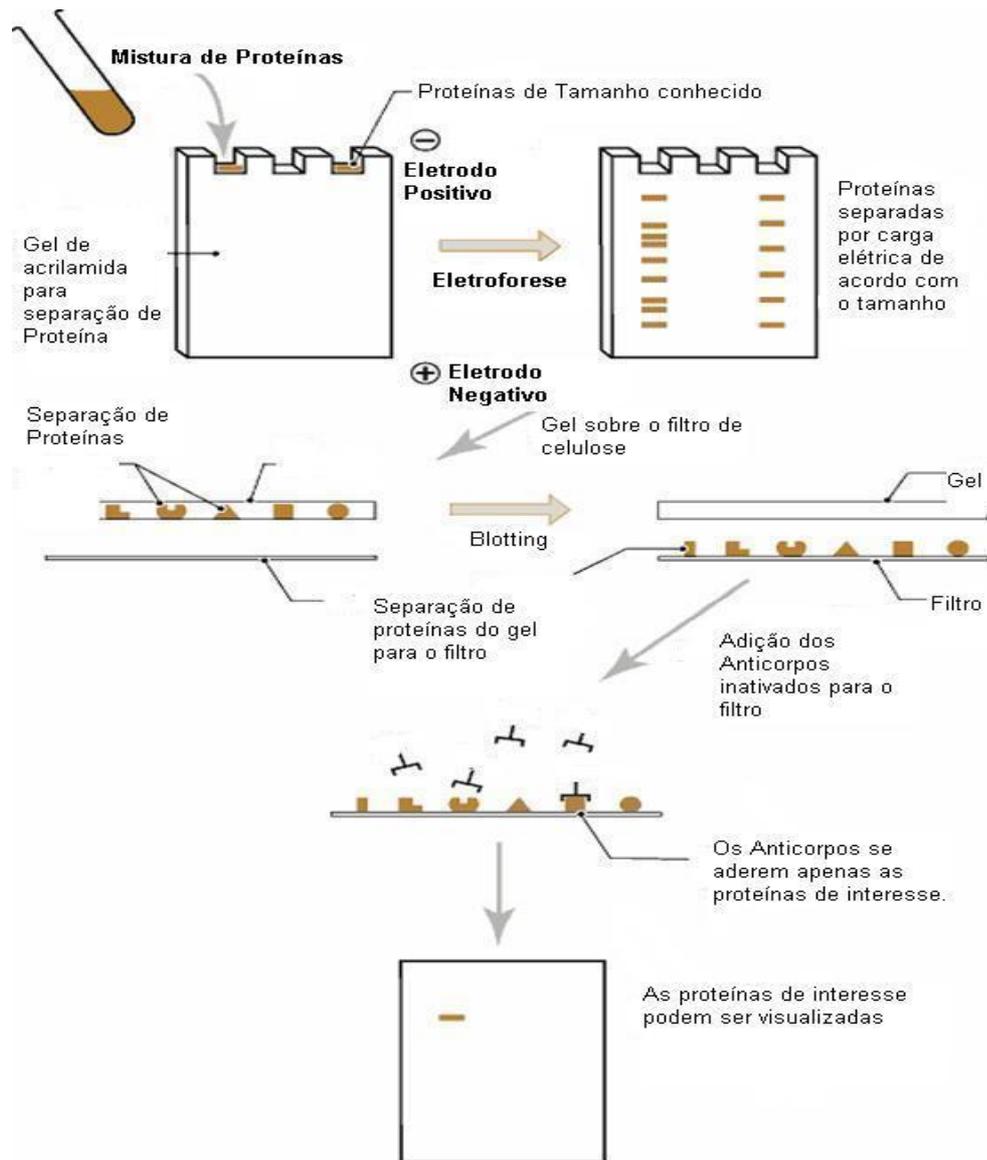
5.19. CARACTERIZAÇÃO DE IgG BOVINA POR SDS-PAGE E WESTERN BLOT

Amostras de soro fetal bovino, IgG pré-purificadas (33%) e purificadas, foram submetidas a eletroforese de SDS-PAGE (MARTINEZ et al., 2003) e Western Blot, seguindo o protocolo descrito. Amostras tiveram a concentração de

proteínas inicialmente ajustada de forma a ter 150 µg em 25 µL, ou seja, 6 mg/mL de tampão de amostra (anexo 2E). Foram fervidas por 5 minutos e aplicadas ao gel. No gel também foram aplicados os marcadores de massa molecular Bench Marck e Magic Marck, marca Amershan, com proteínas com massa molecular de 20 a 220 KDa, sem serem fervidos.

Para o SDS-PAGE, foi utilizado procedimento padrão, com sistema contínuo e concentração acrilamida bis-acrilamida de 10% (anexo 2A) e o gel concentrador 5%. O tampão de corrida utilizado foi tris-glicina (anexo 2F) e a migração ocorreu a 70 V por 90 minutos. Ao término, o gel foi corado com coomassie blue R250 (anexo 2C) por 60 minutos e descorado (anexo 2D) por 60 minutos.

As proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose aplicando-se 20 a 30 V, durante a noite, a 4°C. As membranas foram removidas e coradas com ponceau S (anexo 3B) por 5 minutos, e lavadas com água ultra-pura para remover o excesso de corante. Na etapa subsequente, as membranas foram bloqueadas (anexo 3E) sob agitação por 90 minutos. O anticorpo monoclonal anti IgG bovina foi diluído 1:50, adicionado às fitas de nitrocelulose e incubado por 90 minutos a 37°C. As membranas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (anexo 3E). O conjugado anti Fc de IgG de camundongo foi adicionado na diluição de 1:1000 e incubado por 90 minutos a 37°C. As membranas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem, e o cromógeno 4-cloro-1-naftol e o substrato (anexo 3D) foram adicionados e permaneceram por 15 minutos (FIGURA 17).



Source: Konrad Bishop, BSE Inquiry, London, 2000

FIGURA 17 -Etapas do *Western Blot*. FONTE: Konrad Bishop, BSE Inquiry, London,2000.

Os resultados foram interpretados pela comparação entre as bandas do marcador com as bandas das amostras testes.

5.20. CONJUGAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL COM FITC PARA TESTES DE IMUNOFLUOSCÊNCIA INDIRETA - IFI

Anticorpo monoclonal, previamente testado e reagente com cadeia pesada de IgG bovina, foi extraído do meio de cultura de hibridomas. Primeiramente o meio foi clarificado por centrifugação a 3.700 g, por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante teve o volume medido, ao qual se adicionou solução de sulfato de amônio saturada (anexo 1) a uma concentração final de 33%. Solutos e solventes permaneceram em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, o material foi submetido à centrifugação a 14.400 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de PBS, dialisado em PBS (anexo 8) por 72 horas com trocas a cada 12 horas. A seguir, as imunoglobulinas foram centrifugadas a 1.330 g, por 10 minutos a 4 °C. A concentração de proteínas foi determinada por espectrofotometria (Aparelho Spectro UV 2000 - Metrolab).

Em Erlenmeyer sob agitação, adicionou-se o isotiocianato de fluoresceína dissolvido em tampão carbonato (anexo 9A) à solução de imunoglobulinas na proporção de 1,6 µg para cada 1 mg, respectivamente, permanecendo em agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Sephadex G 25, após a hidratação em água purificada por 4 horas, foi lavado 5 vezes em salina borato (anexo 26) e transferido para coluna de filtração em gel, obtendo-se um volume final que obedeceu à proporção de 20 mL de gel para 1 mL de conjugado. A fração inicial (conjugado) foi eluída por adições sucessivas de salina borato. Uma vez purificado, o conjugado foi dialisado em salina borato por 48 horas. Removido da diálise, foi centrifugado a 1.330 g, por 10 minutos a 4 °C. A razão de fluorocromo-proteína foi estabelecida e o conjugado foi aliquoteado e armazenado a -20°C (HARLOW & LANE, 1988) (FIGURA 18).

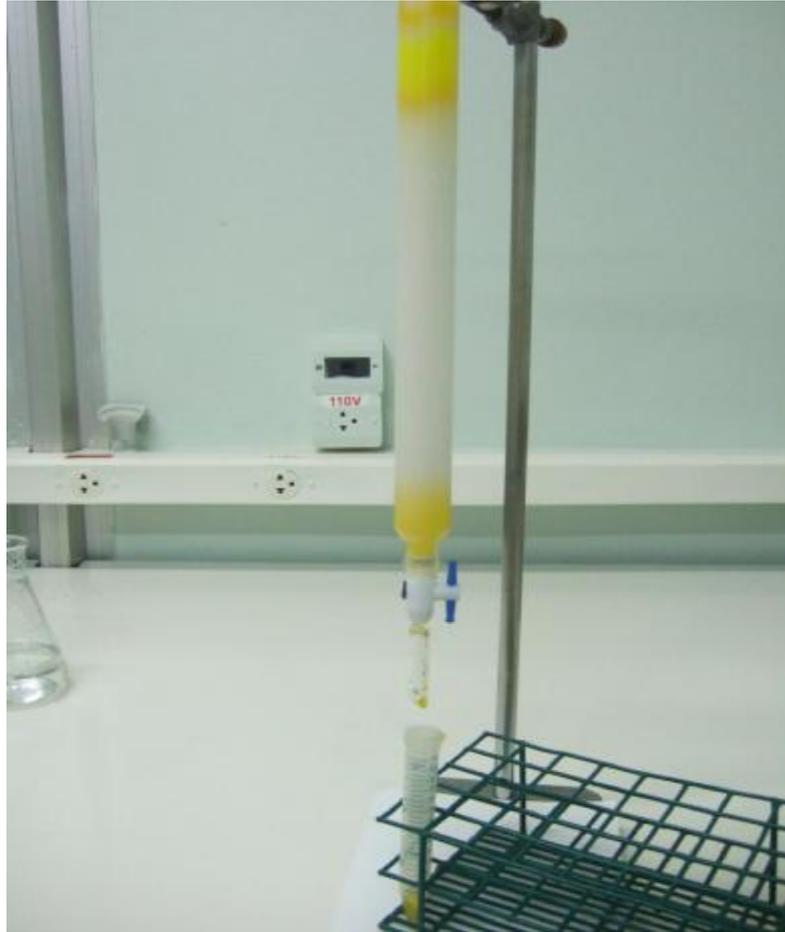


FIGURA 18 - Coluna de cromatografia por filtração em gel utilizada para a purificação do conjugado FITC. FONTE: O Autor

5.20.1. Caracterização de Vírus e/ou Anticorpo por Imunofluorescência (IFI)

Células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) foram tripsinizadas (anexo 27A), e de uma suspensão contendo $2,5 \times 10^4$ células por ml, 100 μL foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços. Vinte e quatro horas após, uma diluição do BHV-1 (Herpes Vírus Bovino 1) de 10^{-3} foi adicionada a cada poço na quantidade de 100 μL , restando como controle os poços da coluna 12 A a 12 H. As placas foram incubadas a 37 °C por 90 minutos em estufa com 5% de CO_2 . O inóculo foi removido e foram acrescentados 100 μL de meio de crescimento F10/199 com 10% de Soro Fetal Bovino (anexo 27B). Aproximadamente 24 horas depois, o meio de cultura foi recolhido e uma lavagem com 100 μL de PBS por poço foi efetuada. Três diferentes fixadores foram utilizados: Acetona 70% (anexo 27C), Acetona-Metanol

50:50 (anexo 27D) e Formaldeído a 2% (anexo 27E) em PBS. Soro bovino positivo para BHV-1, com título em soroneutralização de 1:128 foi diluído 1:10 e adicionado a cada poço na quantidade de 100 µL, a placa foi incubada por 90 minutos a 37 °C. O conjugado foi removido, três lavagens de PBS executadas e 100 µL de glicerol tamponado (anexo 27F) foram colocados em cada poço. As placas foram lidas em microscopia de fluorescência invertida com U.V. (FIGURA 19)

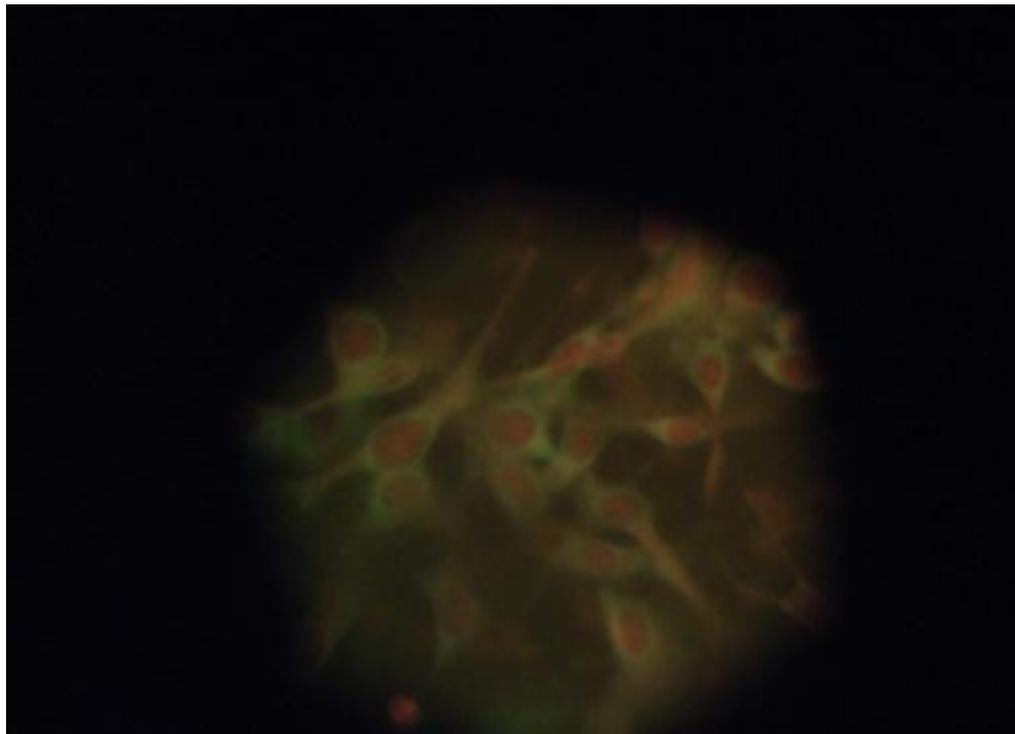


FIGURA 19 - Teste do conjugado-FITC anti Fc de IgG bovina em imunofluorescência indireta para o herpesvírus bovino 1. **FONTE: O Autor**

5.20.2 Caracterização de Bactéria e/ou Anticorpo por Imunofluorescência (IFI)

A cepa utilizada foi *Brucella abortus* 1.119 em uma suspensão 1:1000 diluída 10^{-3} . As cinco lâminas de imunofluorescência foram sensibilizadas com 20µL, incubadas a 37 °C por 10 minutos para secagem. Depois foram adicionados 15 µL da suspensão de *B. abortus* com hemácias de carneiro a 10 % (anexo 28A) diluídas 1:32. Novamente as lâminas foram incubadas a 37 °C e, 30 minutos após a sua secagem, elas foram fixadas, mergulhadas em Acetona-Metanol 50:50 (anexo 27D) durante 30 minutos a temperatura de – 20 °C. Para o teste foram adicionados

às lâminas 20 µL de soro positivo liofilizado reconstituído e diluído 1:20 (IgG e IgM de *B. abortus* L.001/03, título 1:200), e 20 µL soro negativo também diluído 1:20. As lâminas foram incubadas 30 minutos a 37 °C em câmara úmida, lavadas duas vezes com PBS com agitação mecânica suave e novamente secadas a 37°C. O conjugado foi diluído 1:32 em PBS, foram adicionados 20 µL em cada poço e as lâminas incubadas por 30 minutos a 37 °C. O conjugado foi removido, por três lavagens, duas em PBS e uma terceira em água purificada. As lâminas foram secas a 37°C por 30 minutos e 20 µL de glicerol tamponado (anexo 27F) foram colocados em cada poço. As placas foram lidas em microscopia de epifluorescência com U.V. (FIGURA 20 e 21).

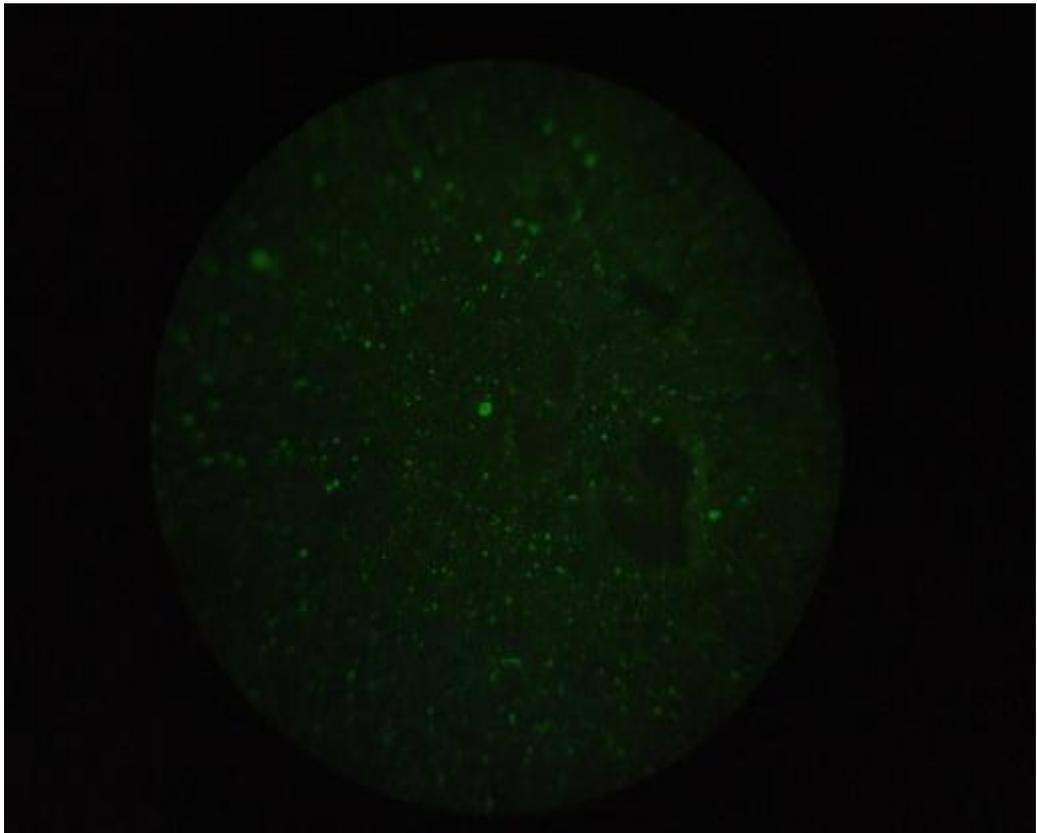


FIGURA 20 - Teste do conjugado-FITC anti Fc de IgG bovina em imunofluorescência indireta para o *Brucella abortus*. **FONTE: O Autor**

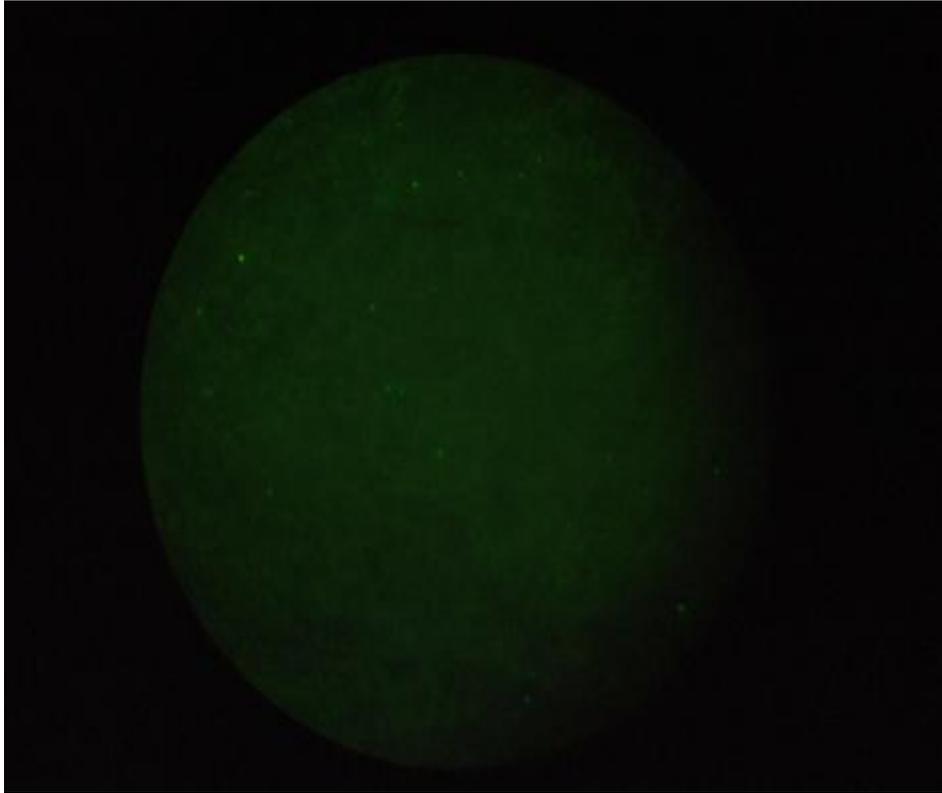


FIGURA 21 - Teste do conjugado-FITC anti Fc de IgG bovina em imunofluorescência indireta para o *Brucella abortus* (após a clarificação) **FONTE: O Autor**

5.20.3 Caracterização de Parasita e/ou Anticorpo por Imunofluorescência (IFI)

Fragmentos de metacésteo de *Taenia saginata*, aproximadamente 100 a 150 por campo, foram adsorvidos e fixados à lâmina, em acetona-metanol (1:1). Após isso, soros de bovino a testar, controle positivo e negativo diluídos 1:20 e 1:40, foram adicionados à amostra e incubados a 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, três lavagens sucessivas com PBS foram executadas. Conjugado anti Fc de IgG bovina foi adicionado de 1:160, incubado a 37°C por 30 minutos. Ao término desta incubação as lâminas foram lavadas em PBS, como antes mencionado, e montadas com glicerina tamponada e lamínula (FIGURA 36).

5.21. CONJUGAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL COM A PEROXIDASE PARA TESTE DE ELISA INDIRETO

Foi dissolvida a enzima HORSERADISH PEROXIDASE (HRPO- Sigma Tipo VI, RZ=3) (anexo 22F) em 1 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,3 M (anexo 22A), obedecendo a relação mg/mL contida na folha de dados da HRPO. Logo após foi adicionado 0,1 mL de uma solução de 1% (v/v) de fluorodinitrobenzidine em etanol absoluto (anexo 22B), misturados por 90 minutos, com agitação suave a cada 10 minutos. Foi acrescentado a esta mistura 1,0 mL de periodato de sódio 0,08M (anexo 22C), agitado suavemente por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação a cada 5 minutos. Depois foi adicionado 1,0 mL de etilenoglicol 0,16 M (etanodiol) (anexo 22D), misturado gentilmente por 90 minutos como no item acima. A solução foi colocada em diálise em tampão carbonato/bicarbonato 0,01M (anexo 22E) a 4 °C com 3 trocas a cada 12 horas. Adicionadas às imunoglobulinas dialisadas a uma razão de 5 mg para 1,33 mg da enzima ativada (se necessário, adicionar mais enzima ativada), são misturadas e deixadas em repouso, em temperatura ambiente, por 3 horas ou durante a noite. Depois foi adicionado 1 mg de borohidrato de sódio (anexo 22G) recém-preparado para cada mg de enzima utilizada (NAKANE et al., 1974). A suspensão de conjugado foi dialisado em PBS para remoção de produtos químicos. Opcionalmente poderiam ser separadas em colunas utilizando Sephadex G 100 ou G 200.

Após a conjugação com Peroxidase, foi realizada uma titulação do conjugado em ELISA direto. O conjugado foi diluído com base 2 a partir de 1:100. Utilizou-se como antígeno IgG bovina para sensibilização das placas com diluição fixa contendo 500 ng por poço, em tampão Carbonato-bicarbonato colocadas por uma noite a 4°C. No dia seguinte, estas placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (anexo 9H), A seguir foram adicionados 50 µL do tampão de bloqueio (anexo 9C). Após lavagem, 50 µL do conjugado anti IgG bovino foram adicionados no poço 1A na diluição de 1:100 diluído sucessivamente até 1:12.800. A placa foi incubada durante 90 minutos. Seguiram-se as lavagens e depois foram adicionados 50 µL do substrato/cromógeno (anexo 9F). A placa foi incubada em câmara escura

durante 15 minutos e posteriormente foram adicionados 50 µL de solução de ácido sulfúrico 1M (anexo 9I).

5.21.1 Caracterização de Parasita e/ou Anticorpo por ELISA indireto para detecção do Metacestódeo de *Taenia saginata*

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1000 ng/poço de proteínas do Metacestódeo de *Taenia saginata*. Removido o tampão de adsorção, quatro lavagens com tampão próprio, foram executadas com 200µL por poço. Após isso, 100 µL de soro bovino a testar, soro positivo e soro negativo diluído 1:100 foram adicionados e incubados a 37°C por 60 minutos. Um novo ciclo de lavagens como o precedente foi realizado. Na seqüência, 100 µL de conjugado anti Fc de IgG bovino, diluído 1:1.600, foi acrescido a cada poço . Uma segunda incubação a 37°C por 60 minutos foi executada. As placas foram lavadas como antes e 100 µL de substrato/cromógeno foram adicionados. Após incubação de 15 minutos, 100 µL de ácido sulfúrico 1M foram adicionado a cada poço para paralisar a reação. As placas foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490nm (FIGURA 33).

6. RESULTADOS

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados aproximadamente 100 mL de soro total de bovino em 4 lotes de 20 mL. Após a remoção das lipoproteínas, com precipitação das imunoglobulinas, foram obtidos aproximadamente 20 mL de IgG bovinas, as quais foram dialisadas e quantificadas. Aliado a isso, foram utilizados os dados referentes à IgG, dos quais foram obtidos as dosagens mostradas nos QUADRO 5 e QUADRO 6.

QUADRO 5 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS OBTIDAS APÓS PRECIPITAÇÃO COM SOLUÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SATURADA (33%)

Proteínas	Lote1 mg/mL	Lote2 mg/mL	Lote3 mg/mL	Lote4 mg/mL
IgG	81,2	86,8	142,4	142,96

FONTE: O Autor.

QUADRO 6 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS OBTIDAS APÓS PURIFICAÇÃO EM COLUNA HITRAP G

Proteínas	Lote1 mg/mL	Lote2 mg/mL	Lote3 mg/mL	Lote4 mg/mL
IgG	2,46	3,62	2,24	2,54

FONTE: O Autor.

Para a imunização foram utilizadas 10 fêmeas de camundongos, inoculadas com IgG purificada. Destas, foram utilizadas quatro para a retirada de 4 mL de sangue total, sendo foi obtido aproximadamente 0,4 mL de soro positivo anti IgG bovina de cada animal. Os soros foram analisados por imunodifusão em gel de agarose, mostrando resposta positiva frente aos antígenos purificados de IgG bovina (FIGURA 22).

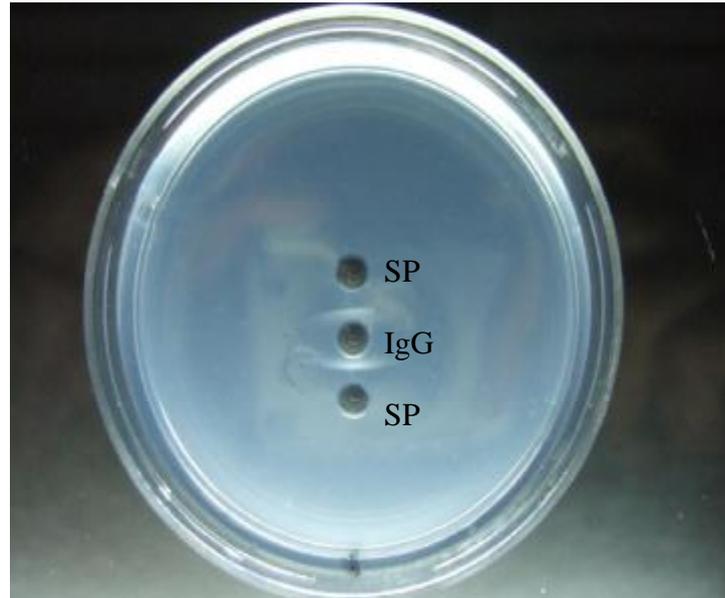


FIGURA 22 - Teste de imunodifusão para detecção de anticorpos anti-IgG bovina. SP - Soros Positivo anti IgG de bovina; IgG - Imunoglobulina purificada de Bovino. FONTE: O Autor.

Destes mesmos animais, logo após o sacrifício de 2 deles, foram retirados cirurgicamente os baços, que foram triturados. Obteve-se uma contagem de 10^8 /mL de linfócitos (esplenócitos) para a fusão com uma contagem de 10^7 /mL de mielomas pré-cultivados, isto é, uma proporção de 1 mieloma para 10 linfócitos (esplenócitos), os quais sofreram fusão (FIGURA 23).

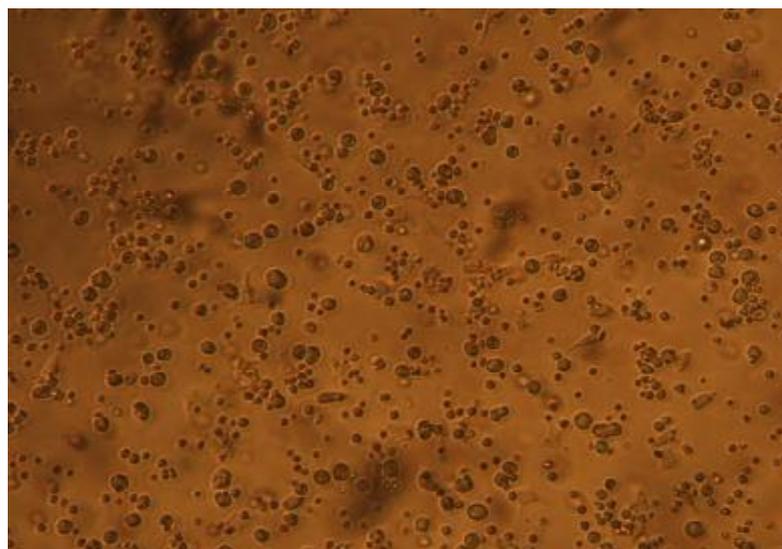


FIGURA 23 – Aspecto das células fusionadas que são os potenciais hibridomas. FONTE: O Autor.

As células fusionadas foram distribuídas em seis placas, totalizando 576 poços para formação e crescimento das colônias dos hibridomas (FIGURA 24).

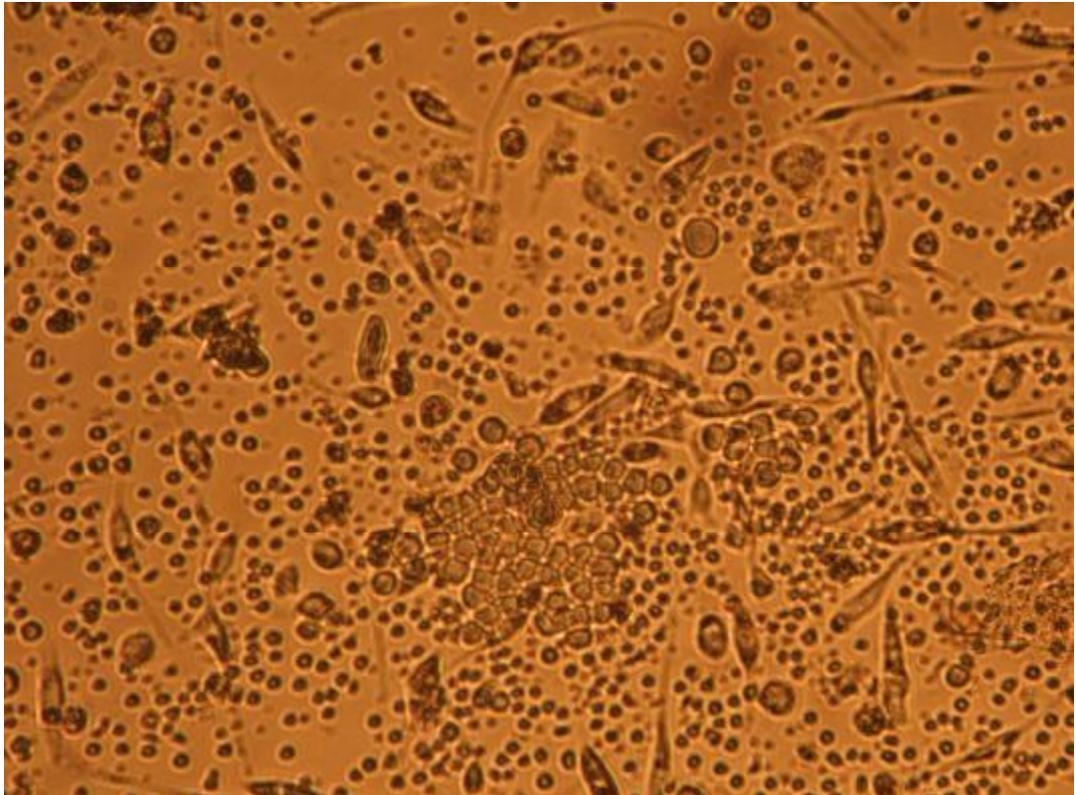


FIGURA 24 - Formação da colônia de hibridoma após sete dias de incubação. FONTE: O Autor.

Foram coletados os sobrenadantes dos 576 poços, os quais foram submetidos a uma avaliação por ELISA, a partir da qual obtivemos 125 colônias produzindo anticorpos anti IgG bovina. Das 125 colônias positivas, foram selecionadas sete com melhores resultados (coloração visível). Estas colônias foram expandidas (FIGURA 25).

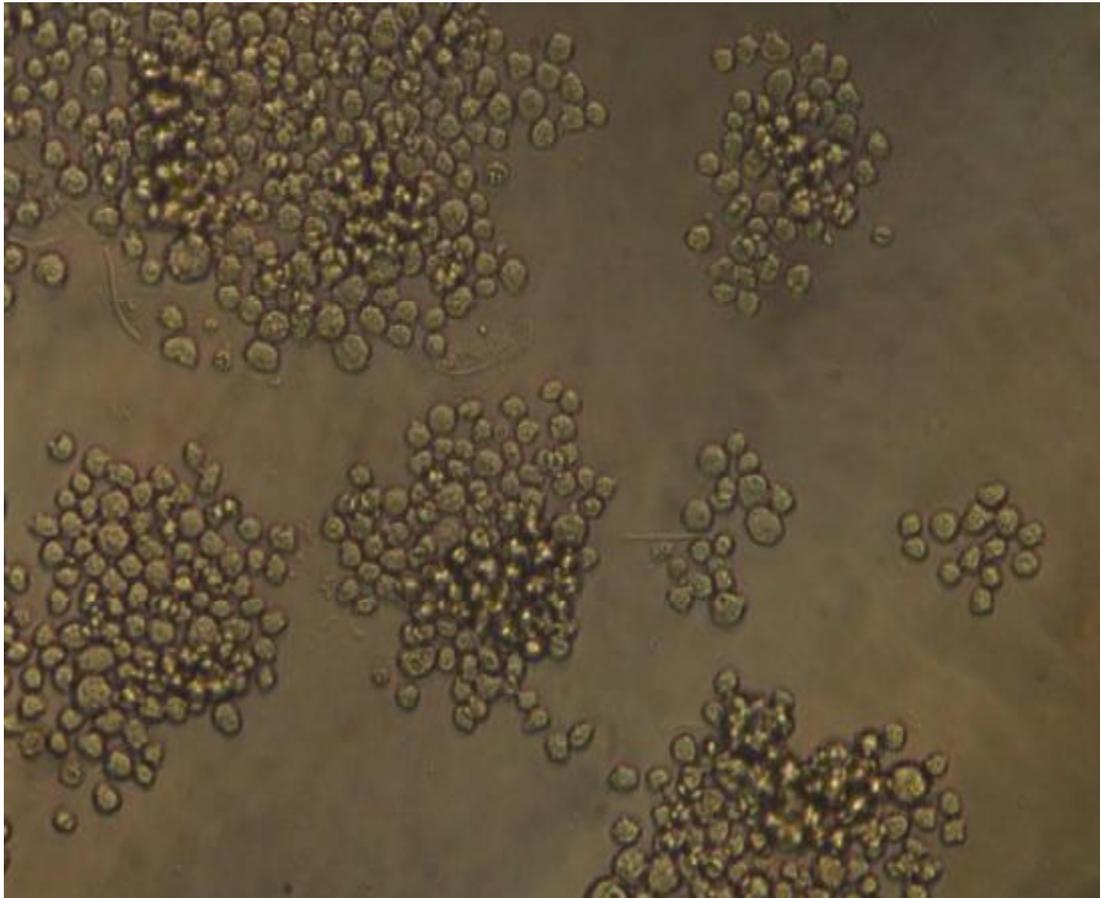


FIGURA 25 - Hibridoma em expansão após 10 dias de incubação e troca de meio. FONTE: O Autor.

O sobrenadante das colônias expandidas foi submetido a testes de ELISA e Eletroforese SDS-PAGE para verificação da produção de anticorpos anti IgG bovina. Nesta produção foram confirmados os resultados conforme descritos a seguir. Na seqüência mostramos a seleção do hibridoma produtor de anticorpos anti IgG bovina por ELISA (FIGURA 26), gel SDS-PAGE (FIGURA 27) que foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (*Western Blot*), em que foram confirmados os resultados da seleção de duas colônias de hibridomas: B3H12 e B4F11 (FIGURA 28) produtores de anticorpos monoclonais anti IgG bovina (QUADRO 7).

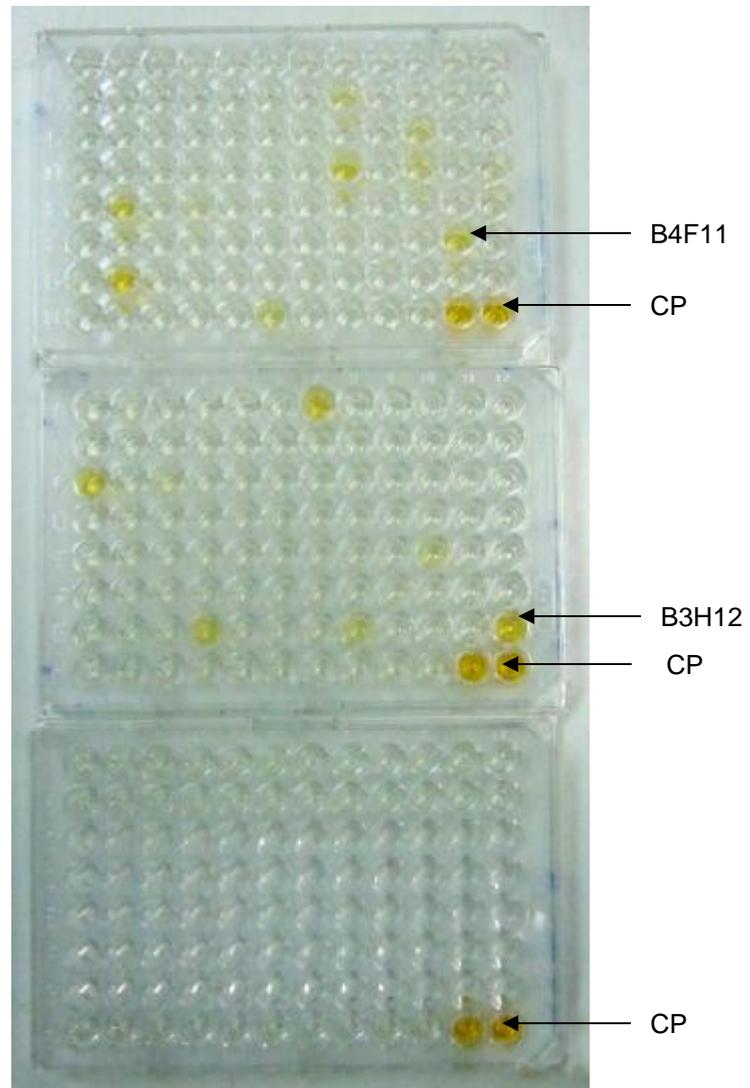


FIGURA 26 – Placas de ELISA indireto com sobrenadante de hibridomas produtores de AcMc anti IgG bovina em que foram identificados os clones B3H12 E B4F11 (os hibridomas produtores de AcMc estão nos poços corados em amarelo). CP- Controle Positivo, na linha H, colunas 11 e 12 (duplicata) em todas as placas. FONTE: O Autor.

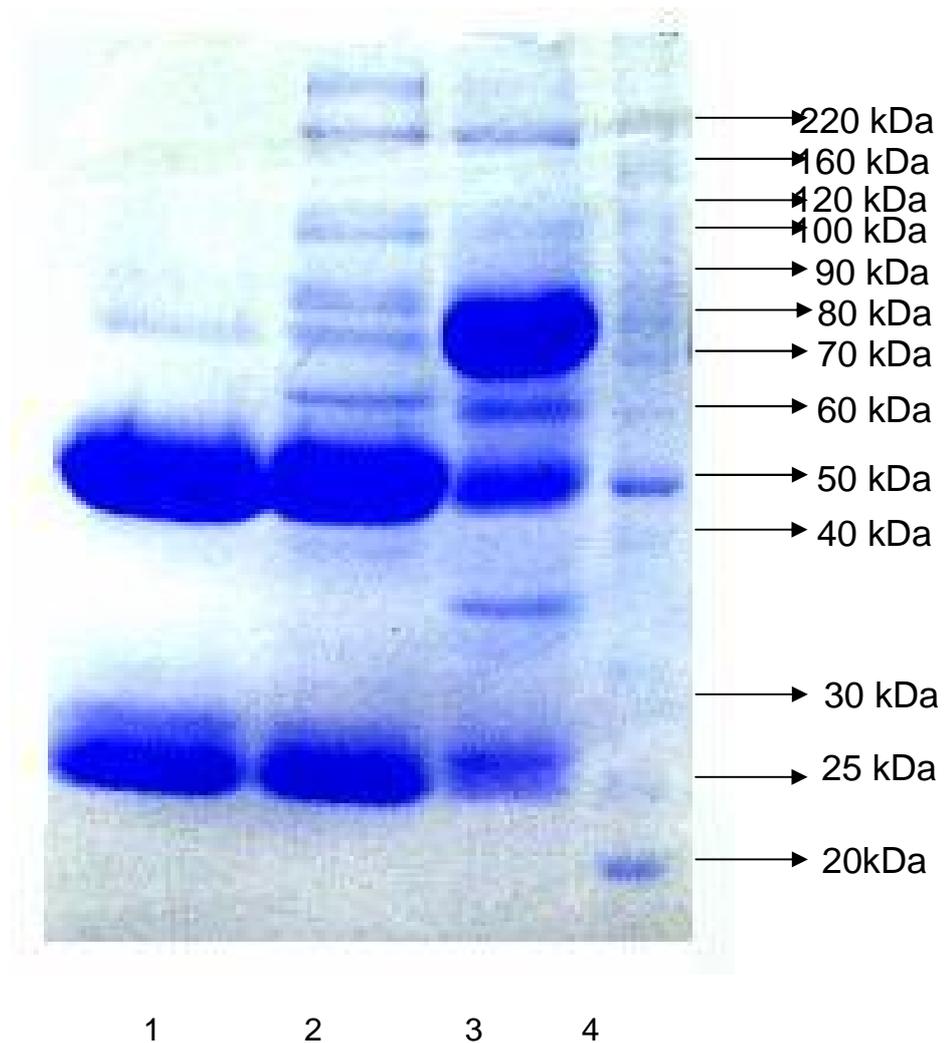


FIGURA 27 – GEL de SDS-PAGE a 10 % . 1) IgG bovina purificada; 2) IgG bovina semipurificada (33% SAS); 3) Soro bovino; 4) Marcador de massa molecular, com obtenção das bandas das cadeias pesadas na banda de 50 kDa e das cadeias leves na banda com 25 kDa. FONTE: O Autor.

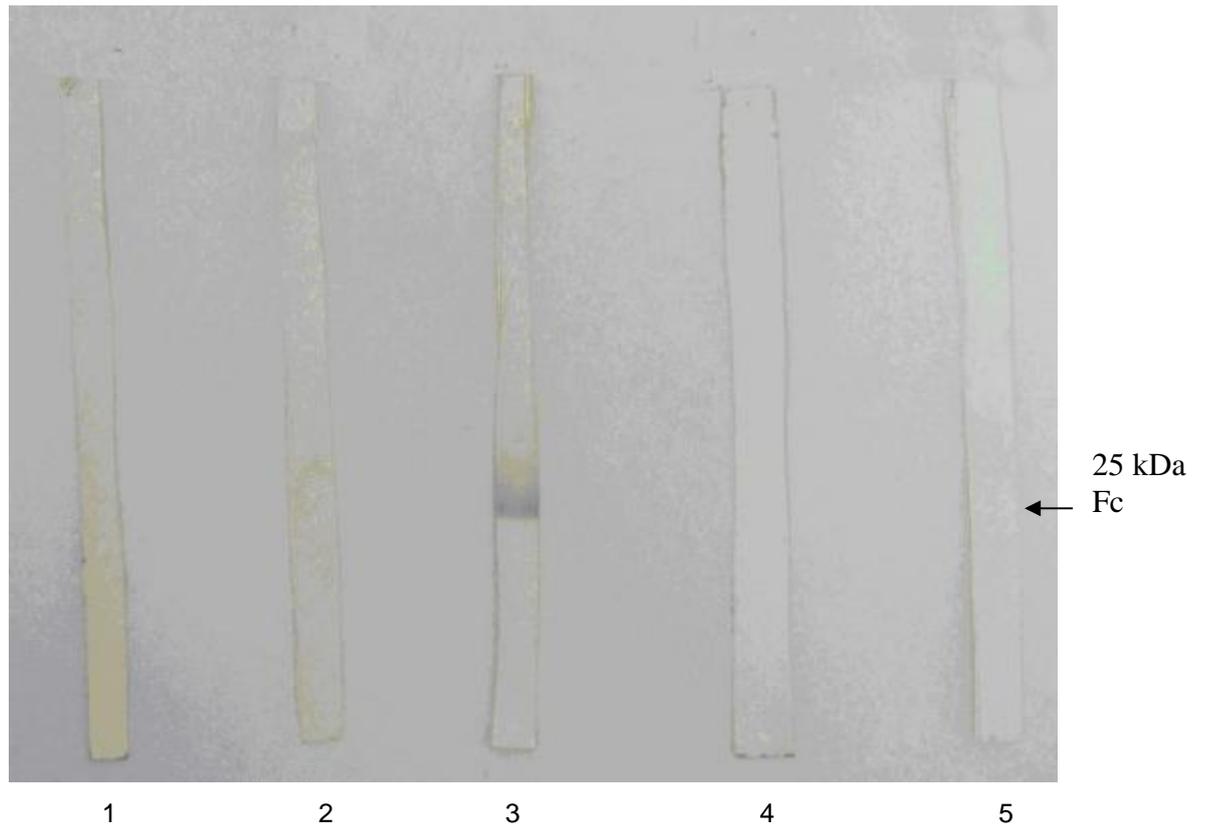


FIGURA 28 – Confirmação da produção dos anticorpos monoclonais anti IgG bovina B3H12 pela técnica de *Western Blot*. 1) Clone B4F11 precipitado com solução de sulfato de amônio a 33 % e digerido com papaína; 2) Clone B3H12 precipitado com solução de sulfato de amônio a 33% e digerido com papaína 3) Clone B3H12 precipitado com solução de sulfato de amônio a 33% e não digerido; 4) Clone B4F11 precipitado com solução de sulfato de amônio a 33% e não digerido; 5) Marcador de massa molecular Magik Marck (sigma). FONTE: O Autor.

QUADRO 7 - CLONE SELECIONADO PARA PREPARAÇÃO DO CONJUGADO

HIBRIDOMAS	ELISA	<i>WESTERN BLOT</i>
B3H12	Positivo	Positivo
B4F11	Positivo	Negativo

FONTE: O Autor

A colônia de hibridoma selecionada foi a B3H12, por ter respondido positivamente aos dois testes, mesmo após a redução para a dissociação da proteína com mercaptoetanol. Esta colônia foi expandida e, depois, foram coletados os 200 mL de sobrenadante para digestão com papaína. Uma amostra deixada durante 4 horas e outra com 16 horas de digestão, com o propósito de se obter anticorpos monoclonais anti-fração Fc da IgG que pudessem ser submetidos a teste de eletroforese SDS-PAGE (FIGURA 29).

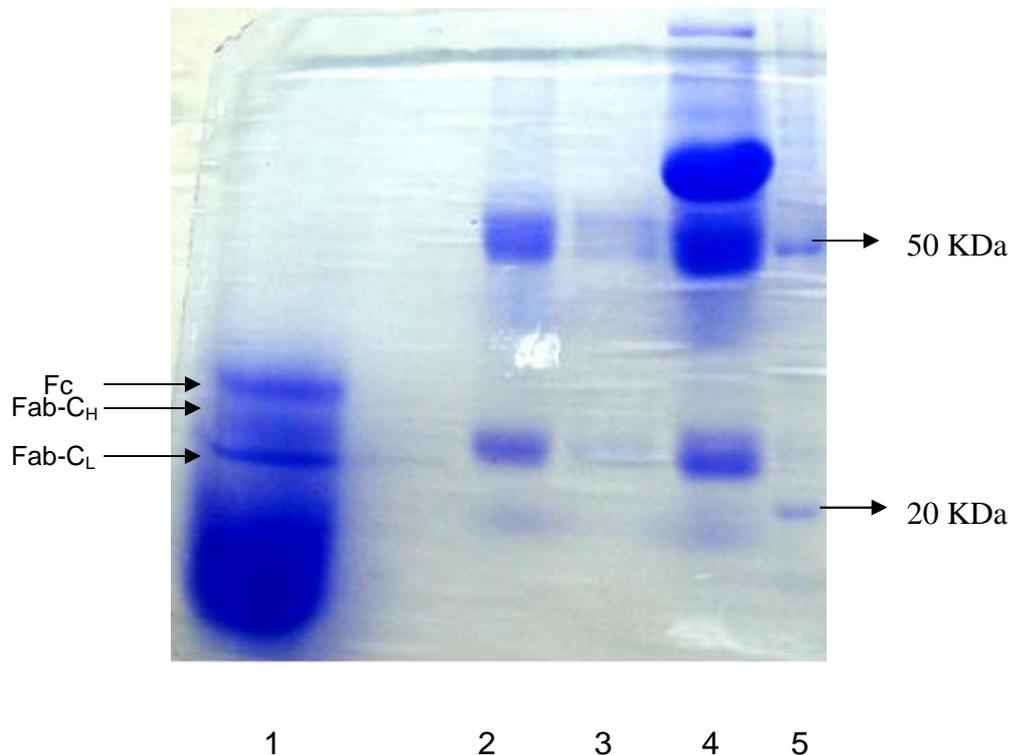


FIGURA 29 – Gel de SDS-PAGE a 10 % após o fracionamento com papaína. 1) Amostra fragmentada de C_L e C_H Fab e Fc de IgG bovina purificada; 2) IgG bovina purificada; 3) IgG bovina semi purificada; 4) Soro bovino; 5) Marcador de massa molecular. FONTE: O Autor.

Na reação de *Western Blot*, verificou-se a fração Fc da IgG bovina com 50 kDa nas fitas de nitrocelulose em tempos diferentes de digestão, separada das frações cadeia pesada (CH) e cadeia leve (CL) do fragmento Fab com 25 kDa que não foram transferidas para as fitas de nitrocelulose mesmo com um tempo maior de exposição para a transferência (FIGURA 30).

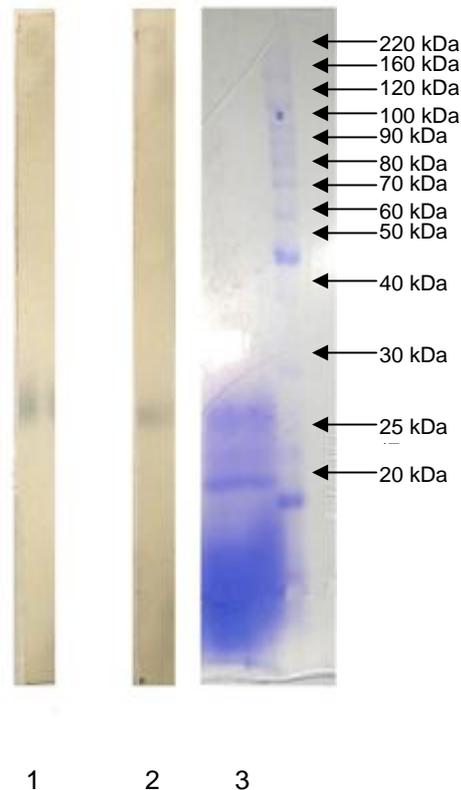


FIGURA 30 - Resultado do teste de *Western Blot*. 1 e 2) Fragmentos Fc de IgG bovina após 16 horas de digestão com papaína; 3) Marcador de massa molecular. FONTE: O Autor.

O sobrenadante, já analisado, foi precipitado com solução de sulfato de amônio a uma concentração final de 33%. O precipitado foi ressuspendido e realizada a dosagem de proteína por espectrofotometria, a qual revelou conter 67mg de proteína no total, correspondente a 6,0 mg/mL. A suspensão foi conjugada com peroxidase e/ou Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

Após a conjugação com Peroxidase, foi realizada uma titulação do conjugado preparado por ELISA direto, que foi diluído a partir de 1:100. Utilizou-se como antígeno IgG bovina com diluição fixa contendo 50 ng por poço. Obtivemos resultado muito bom no poço da diluição 1:1.600 para uma produção experimental. Para confirmação da titulação do conjugado, foi realizado mais um teste de ELISA direto com diluição seriada com base 2 partindo de 1:100 do conjugado peroxidase anti fragmento Fc de IgG bovino e do antígeno IgG bovina purificada com diluição fixa contendo 50 ng por poço, obtendo assim um resultado igual ao anterior, bom na titulação de 1:1.600, necessitando de ajustes na concentração para atingir um título

maior e um polimento evitando a formação de *background* (FIGURAS 31 e 32). Depois disso, este conjugado foi testado frente a um parasito, metacestódeo de *Taenia saginata* causadora da *Cisticercose bovina* (*C.bovis*) (FIGURA 33)

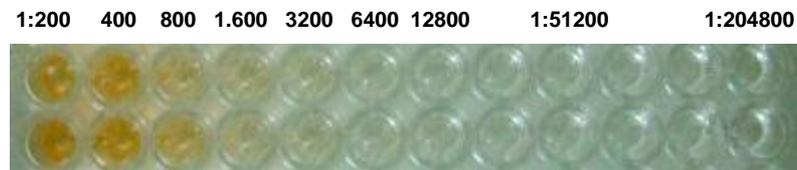


FIGURA 31 - Teste ELISA direto com anticorpo monoclonal anti IgG bovino conjugado com Peroxidase , título 1:1.600 partindo de 1:200 FONTE: O Autor (Foto ampliada).

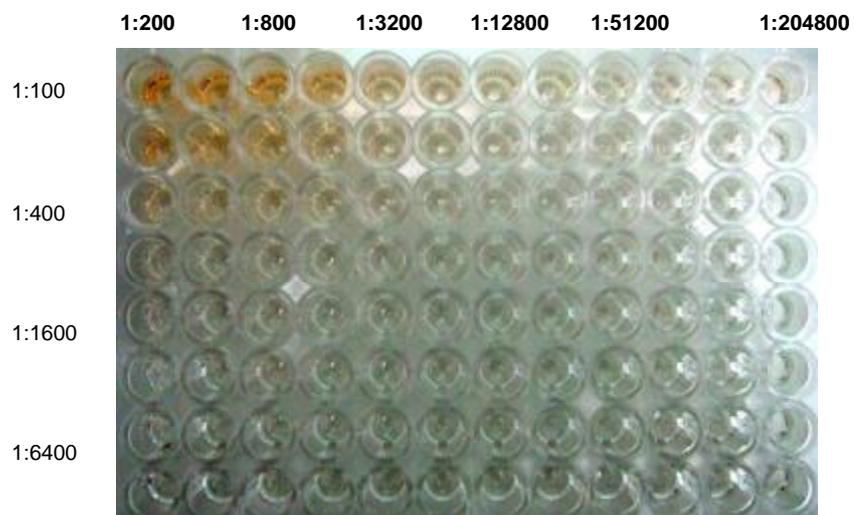


FIGURA 32 - Teste do conjugado com peroxidase produzido com AcMc anti-IgG bovino em ELISA indireto, título 1.1.600 partindo de 1:200 FONTE: O Autor.

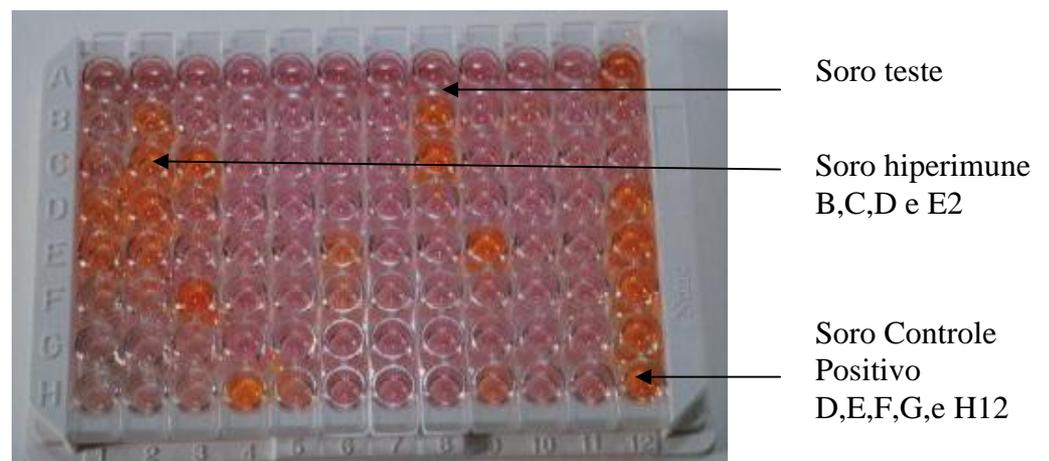


Figura 33 - Resultado do teste do conjugado com peroxidase produzido com AcMc anti-Fc de IgG bovina ELISA indireto partindo do título 1:1.600 com parasito metacestódeo de *Tânia saginata* (*Cistycercose Bovis*). FONTE:O Autor.

Na conjugação com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), também partiu-se da mesma suspensão com 67 mg de proteína, em volume final de 6 mL. Este conjugado foi titulado com diluições de base 2 partindo-se da diluição inicial de 1:8 até 1:128, escolhendo-se a diluição 1:32 para uso. O conjugado produzido passou por um polimento, onde foi centrifugado para retirada das impurezas e para montagem das lâminas. Para isso, foi utilizado uma incubação com de Azul de Evans evitando assim um falso positivo. Depois, este conjugado foi testado frente a um Herpes Vírus Bovino - HBV-1(FIGURA 34), uma bactéria, *Brucella abortus* (FIGURA 35) e um parasito, metacestódeo de *Taenia saginata* causadora da *Cisticercose bovina* (*C.bovis*) (FIGURA 36). Em todas as 15 lâminas (5 de cada) preparadas para teste, a fluorescência foi nítidamente POSITIVA.

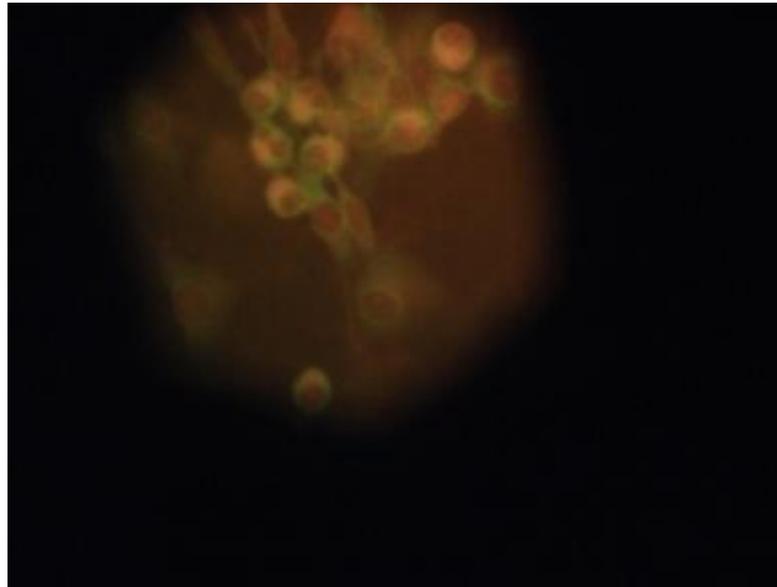


Figura 34 - Resultado do teste de imunofluorescência indireta com Herpes Vírus Bovino 1(HBV-1) utilizando o anticorpo monoclonal anti Fc de IgG bovina conjugado a fluoresceína.
FONTE: O Autor.

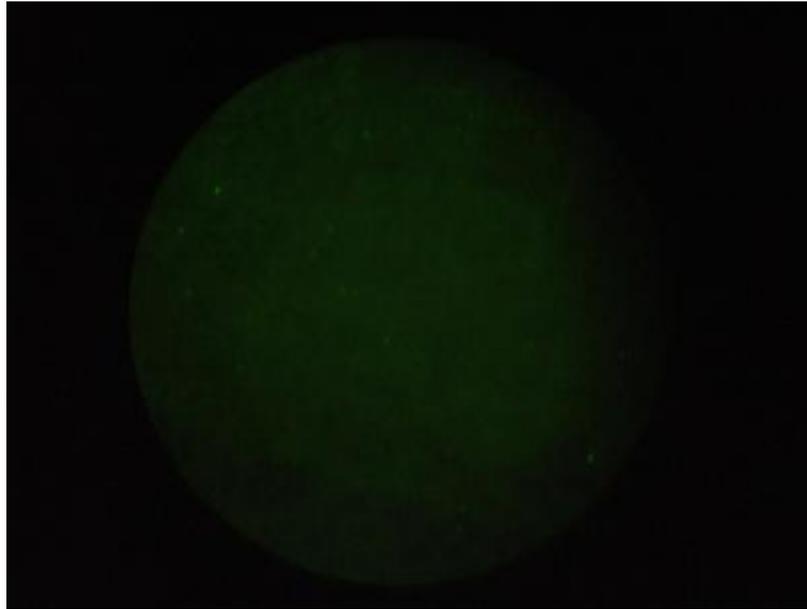


Figura 35 - Resultado do teste de imunofluorescência indireta com *Brucella abortus* utilizando o anticorpo monoclonal anti-Fc de IgG bovina conjugado à fluoresceína. FONTE: O Autor.

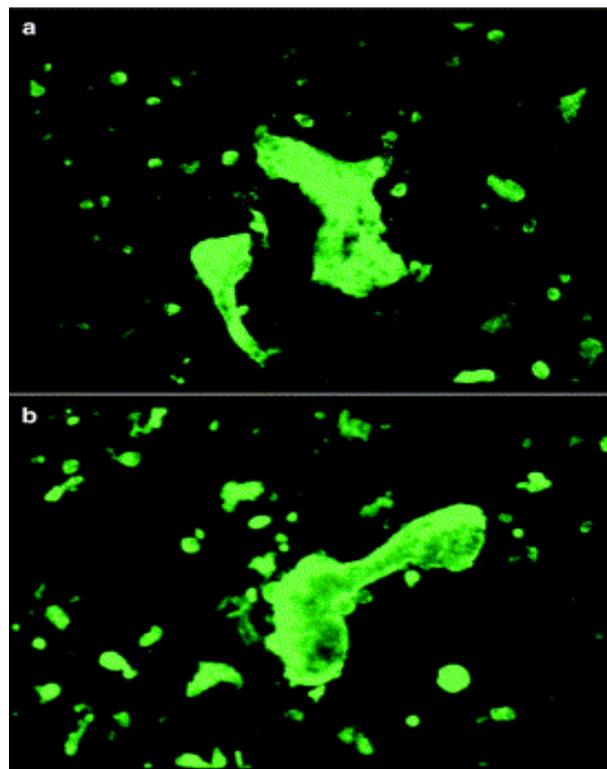


Figura 36 - Resultado do teste de imunofluorescência indireta com parasito metacetódeo de *Tânia saginata* utilizando o anticorpo monoclonal anti-Fc de IgG bovina conjugado à fluoresceína. FONTE: O Autor.

7 DISCUSSÃO

Amostras de IgG bovina foram purificadas por cromatografia de afinidade e quantificadas por espectrofotometria com absorção de raios ultravioleta. Foram obtidas concentrações que variaram de 2,2 a 3,6 mg/mL. Considerando-se que a capacidade de retenção das colunas é fixa (25 mg/mL), que a concentração de IgG no bovino gira em torno de 20 mg/mL e que o protocolo seguido foi o padrão em todos os procedimentos de purificação, as variações registradas nas concentrações podem ser atribuídas a diferentes graus de afinidade da proteína G às diferentes sub-classes de IgG, já que os soros utilizados constituíram-se em um agrupamento de soros procedentes de diferentes animais. A purificação foi precedida de uma pré-purificação com solução de sulfato de amônio saturado com uma concentração final de 33%, possibilitando uma concentração de IgG (mg/mL) bem maior que a capacidade da coluna.

Amostras obtidas que foram utilizadas nos protocolos de imunização foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com redutor, para que cadeias leves e pesadas fossem separadas e gerassem bandas com massas moleculares específicas a cada molécula, onde constatou-se a presença de bandas com massas moleculares equivalentes de 25 kDa a 50 kDa, condizentes com as cadeias leves e pesadas respectivamente (HARLOW & LANE, 1988). Foi possível também avaliar o grau de pureza das amostras obtidas. Apesar do método de coloração utilizar como corante Comassie Blue, o mesmo permitiu a detecção de proteínas em concentrações de 1,0 a 2,2 µg/mL. Não se constatou a presença de bandas extras àquelas que eram objeto de estudo.

O grau de pureza das amostras tem importância relativa no processo de imunização dos animais, pois a partir dos hibridomas gerados pode-se separar aqueles que secretam anti IgG bovina. Mas, considerando-se que as IgGs bovinas usadas para imunização seriam as mesmas a serem utilizadas para sensibilização das placas de ELISA a serem usadas no processo de seleção de clones anti IgG, teve-se especial cuidado para que as amostras fossem as mais puras possíveis.

Ao término do protocolo de imunizações, os camundongos foram avaliados em sua resposta humoral para IgG bovina, sendo que o método de avaliação

escolhido foi o de imunodifusão em gel de ágar. Amostras de soro sangüíneo obtidas por punção cardíaca de camundongo foram avaliadas frente a IgG purificada nos testes de imunodifusão. Após incubação de 48 horas, quando da interpretação dos resultados, constatou-se a presença de linha de imunoprecipitação entre os soros dos camundongos imunizados e IgG purificadas, e a ausência destas com soros de camundongos não imunes. Entendeu-se que linhas de precipitação intensa e nítida seriam uma evidência convincente de que os baços dos camundongos conteriam quantidades significativas de clones de linfócitos B sensibilizados. Uma vez que a imunodifusão trata-se de uma metodologia altamente específica e pouco sensível, ou seja, somente detecta grandes quantidades de proteína (3 a 20 µg/mL), nossos trabalhos revelaram linhas de precipitação intensa, o que seria um indicativo de que os animais estavam prontos para a fusão.

Os soros sangüíneos destes animais imunizados foram também utilizados nos testes de ELISA como controle positivo para discriminação de clones secretores.

Em nosso procedimento de fusão utilizamos a proporção de 10:1, linfócitos e mieloma, respectivamente, na quantidade de 10^8 para o primeiro e 10^7 para o segundo, originando uma população de células de 110×10^6 que foi distribuída em 5 placas com 96 poços, cada um com aproximadamente $22,9 \times 10^4$ células. Uma placa controle ou parte desta contendo somente o mieloma foi utilizada, e, como esperado, no sétimo dia após fusão todos os mielomas estavam mortos.

Constatou-se a presença de 125 poços com colônias de hibridomas que, quando atingiram 70 a 80 % da superfície do poço, tiveram os seus sobrenadantes retirados e submetidos ao teste de ELISA para avaliar a secreção de anticorpos anti IgG bovina. Sete clones com densidade óptica expressiva foram expandidos e mantidos em nitrogênio líquido.

Para a padronização do teste de ELISA, procedeu-se a titulação do antígeno, com diluições de base 2 e com concentração inicial de 500 ng na primeira fileira. O conjugado foi diluído também em base 2, partindo-se de uma diluição inicial de 1:800, utilizando-se as colunas. Optou-se por uma concentração de antígenos de 32 ng por poço e conjugado diluído a 1:3.200, o que gerou coloração imperceptível a olho nu para o sobrenadante negativo e densidade óptica compatível com o controle

positivo em poços com clones secretores. Utilizaram-se controles negativos e positivos em todos os testes.

Do conjunto de clones reagentes em ELISA, dois foram selecionados para os trabalhos de produção de reagentes para diagnóstico, os quais foram denominados B4F11 e B3H12. A escolha baseou-se em critérios de biologia celular, como eficiência de crescimento das colônias “in vitro”, tempo de duplicação e densidade óptica obtida nos sobrenadantes. Os anticorpos monoclonais produzidos por estes clones foram avaliados por imunodifusão para saber se eram precipitantes ou não.

Experimentos prévios realizados em outros laboratórios com anticorpos monoclonais anti espécie também não se revelaram precipitantes (LETESSON et al.,1985). A possível explicação reside na massa molecular da molécula alvo, ou seja, IgG bovina que possui 190 kDa, e o ângulo maior possível de ser formado pelas duas cadeias do Fab que não permitiria a ligação de duas moléculas justapostas.

Sub-classes de IgG bovina têm sido submetidas à digestão enzimática, utilizando-se diferentes enzimas, tais como papaína, pepsina e tripsina. De acordo com o sítio de clivagem, cinética enzimática e tempo de incubação produzem peptídeos com diferentes massas moleculares que atendem ao propósito do delineamento experimental (BUTLER, 1986). Para nosso interesse em que pretendíamos saber se nossos anticorpos monoclonais reagem com cadeias Fab ou região Fc da IgG bovina, escolhemos digerir com papaína, já que esta gera fragmentos quase idênticos para diferentes sub-classes de IgG. Em primeiro lugar digerimos por um período de quatro horas a 37°C, que gerou fragmentos não detectáveis em eletroforese, mas quando este tempo de incubação foi elevado para 16 horas em idêntica temperatura, como esperado, a clivagem resultou três bandas de aproximadamente 25 kDa. As proteínas do gel, após a transferência para membrana de nitrocelulose, houve incubação com nossos anticorpos monoclonais e revelação pelo conjugado com peroxidase e substrato, o que tornou possível detectar a ligação de um dos anticorpos (B3H12) ao Fc da IgG. Quanto ao segundo (B4F11), a reação não foi detectada. Os fragmentos gerados por proteólise e submetidos a eletroforese com redutor produzem um padrão de bandas que se ordena por pequenas diferenças de massa molecular cuja ordem se estabelece com

as de menor massa (as cadeias leves), mais próximas da extremidade final do gel. Em segundo lugar estão os fragmentos da cadeia pesada com a região variável e a primeira região constante, e em terceiro lugar está o fragmento de interesse, ou seja, a região Fc da IgG. Dada à inexistência de marcadores de massa molecular que produzissem bandas com diferenças menores de peso, e também devido ao fato de dois lotes de marcadores adquiridos por nosso laboratório não se mostrarem eficientes quando à transferência para a nitrocelulose, apesar de previamente escolhidos por suas especificações para *Western Blot*, não nos restou outra alternativa se não de estabelecer uma equivalência em milímetros, a distância entre a posição da banda e a extremidade final do gel e a banda corada no Blot foi de 30 mm. Quanto ao anticorpo monoclonal B4F11 que não reagiu com fragmentos da IgG após eletroforese com redutor e transferência, entendemos que este anticorpo é dirigido a um epítipo conformacional, que é desfeito quando há separação de cadeias por rupturas de pontes dissulfídicas intra e inter-moleculares. Em um próximo trabalho experimental, deveremos testá-lo em fragmentos de digestão, mas sem ação de redutores, em uma variação da proteína em sua forma nativa. Cabe salientar que este hibridoma apresenta excelente qualidade de crescimento com produção de anticorpos em níveis bastante desejáveis, constatados pelos valores de densidade óptica em ELISA.

Uma vez selecionado e caracterizado o anticorpo monoclonal a ser usado na produção de reagentes, começamos os procedimentos de conjugação, inicialmente com isotiocianato de fluoresceína e, posteriormente, com peroxidase. Do conjugado anti fragmento Fc de IgG bovina elaborado para imunofluorescência indireta, foram utilizadas diluições de 1:8 a 1:128, testadas para detecção de anticorpos do Herpes Bovino 1 (BHV-1), previamente cultivados em células de traquéia de feto bovino. Utilizaram-se soros controles positivos obtidos por soro neutralização com título de 1:128 e soro fetal bovino como controle negativo. A leitura revelou fluorescência citoplasmática, como esperado no uso de soro positivo, e fluorescência bastante discreta para o controle negativo. Escolhemos para diluição do trabalho aquela com melhor fluorescência e menor coloração inespecífica (diluição 1:16). Mesmo procedimento foi utilizado na detecção de anticorpos para a *Brucella abortus*.

Quanto ao conjugado com peroxidase, optamos por realizar apenas um ELISA direto, onde as placas foram sensibilizadas com IgG bovina e o conjugado aplicado em diluições que variaram de 1:100 a 1:12.800. Obtivemos leituras até 1:1.600.

Cabe salientar que estes procedimentos de produção de conjugados foram trabalhos experimentais iniciais, em que se pretendeu apenas avaliar a viabilidade de nossos reagentes, saber se eram funcionais e avaliar as metodologias por nós postas em prática. Apenas nos limitamos a utilizar sobrenadantes de cultura de hibridomas, concentrá-los e conjugá-los. A partir desta etapa estamos convencidos da escolha acertada de metodologias e procedimentos. Estaremos inaugurando uma segunda etapa de aprimoramento dos produtos. Já está em curso a produção de anticorpos monoclonais a partir de líquido ascítico, e a produção por culturas com maior tempo de duração, além de estar prevista a cultura de hibridomas em tubos de diálise. Procedimentos que levarão ao rendimento significativo na produção de anticorpo monoclonal que, associados a um maior domínio na metodologia de conjugação, permitirão a produção de conjugados com títulos de qualidade compatíveis com aqueles oferecidos pelo mercado.

O trabalho de que ora discutimos os resultados, trata-se de um começo de um projeto de importância acadêmica e econômica, em uma área que tem sido deixada à margem da produção acadêmica e que trata da produção de reagentes com qualidade para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias de animais de produção e de estimação. Estas considerações que antecedem se fazem necessárias para explicar o que segue, pois idealmente deveríamos ter buscado imunizações para produção de anticorpos monoclonais subclasse específicos, o que demandaria diferentes protocolos de purificações e caracterizações não compatíveis com o tempo disponível para elaboração desta dissertação. Fato importante também a considerar é a possibilidade da geração de anticorpos monoclonais chamados anti-ruminantes a partir de imunizações com IgG bovina.

O clone escolhido para elaboração de reagentes foi oB3H12, o qual deverá, em próximos trabalhos, ser avaliado para possibilidade de reagir com IgGs provenientes de outros ruminantes. Não menos relevante será a caracterização, em futuro próximo, do segmento da cadeia pesada, a qual se liga nosso anticorpo, que

poderá ser usado para estudos de isotipos, quantificação de IgG, ligação do Fc a proteínas bacterianas implicadas na evasão da resposta imune, assim como há possibilidade deste anticorpo ligar-se a epítomos glicoproteicos. Hoje, a glicosilação de anticorpos como participação de mecanismos de doença e eficiência de funções efetoras tais como ADCC (Antibody Dependent Cell Citotoxicity-Citotoxicidade Celular mediada por anticorpos), se constitui em área de intensa pesquisa.

CONCLUSÕES

Temos certeza de que estas metodologias escolhidas como compatíveis com nossa estrutura laboratorial se constituirão sem dúvida em fonte sólida de formação de competências e que estarão aptas a envolverem-se com procedimentos biotecnológicos outros e de síntese de anticorpos monoclonais em diferentes células de mamíferos, com propósitos diagnósticos e farmacêuticos.

Este trabalho estabeleceu as bases metodológicas para um procedimento de avaliação de imunidade humoral (imunoglobulinas) em bovinos que facilmente será estendido a outras espécies. Reagentes para quantificar e caracterizar isotipos, alotipos e sub-classes de imunoglobulinas poderão ser desenvolvidos para o diagnóstico e a pesquisa.

Da experiência gerada pelas diferentes etapas envolvidas no processo de produção de anticorpos, tais como cultivo de células, eletroforese, cromatografia, procedimentos para conjugação e especialmente o uso destes reagentes em caráter experimental, podemos afirmar que :

- a) A produção de anticorpos monoclonais é uma atividade factível em nossa instituição, TECPAR;
- b) Os conjugados produzidos em caráter experimental revelaram-se eficientes, necessitando ajustes apenas no que diz respeito a títulos. Este item é central ao TECPAR, que possui a responsabilidade de criar e adaptar metodologias com vistas ao desenvolvimento de meios e métodos de diagnóstico;
- c) O domínio de metodologia com maior capacidade de resolução, tais como anticorpos monoclonais, gera a possibilidade de desenvolver produtos que dependem de importação.

ANEXOS

Meios, Soluções e Reagentes

ANEXO 1. SOLUÇÃO SATURADA DE SULFATO DE AMÔNIO

Sulfato de Amônio	761 g
Água purificada qsp	1000 mL
pH	7,2

ANEXO 2. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE

A) Gel de separação 15%

Acrilamida-bis acrilamida 30:0,8 (30%)	5,0 mL
Tris-HCL 3 M pH 8,8	2,1 mL
SDS 10%	150 µL
Persulfato de amônio 20 % (APS)	37 µL
Temed	7,5 µL
Água purificada	7,5 mL

B) Gel concentrador (stacking gel) 5%

Acrilamida-bis acrilamida 30:0,8 (30%)	2,5 mL
Tris-HCL 1 M pH 6,8	1,0 mL
SDS 10%	150 µL
Persulfato de amônio 20 % (APS)	37 µL
Temed	7,5 µL
Água purificada	11,3 mL

C) Solução Tampão de Amostra para Eletroforese

Tris 1 M pH 8	4,0 mL
Glicerol 100%	4,0 mL
EDTA 0,5 M	0,2 mL
Azul de Bromofenol 1%	0,4 mL
Água purificada	11,4 mL
Mercaptoetanol	5 %

D) Solução de Coloração para Gel SDS-PAGE para Eletroforese

Azul de coomassie	0,1 mL
Metanol	45 mL
Ácido Acético	10 mL
Água purificada	45 mL

E) Solução de Descoloração para Gel SDS-PAGE para Eletroforese

Metanol	4 mL
Ácido Acético	7,5 mL
Água purificada	4 MI

F) Solução Tampão de Corrida Para Gel SDS-PAGE de Eletroforese

(Item 3A)

ANEXO 3. TRANSFERÊNCIA DE GEL SDS-PAGE PARA WESTERN BLOT

A) Tampão de Corrida de Gel SDS-PAGE de Eletroforese para W. Blot

Solução 10x concentrada

Tris-base	30,3 g
Glicina	144 g
SDS	5 g
Água purificada	1000 mL
pH 8,6 (com NaOH)	
Solução de Uso	
Solução 10x concentrada	100 mL
Água purificada	900 mL

B) Preparação da Solução Reveladora - Estoque

Substrato e Cromógeno para W. Blot

4-chloro-1-naphthol (4 C1N) Sigma C-8890)	42 mg
Peróxido de Hidrogênio 30% Sigma H-6520	0,4 mL
Metanol	15 mL

PBS 10X	10 mL
Água deionizada	80 mL

Dissolve o 4C1N no metanol, adiciona o PBS 10X e a água, mistura e adiciona o Peróxido de hidrogênio. Deixa em repouso por 90 minutos para estabilização em temperatura ambiente.

C) Preparação do Substrato e Cromógeno Para W. Blot - Para Uso

4-chloro-1-naphthol (4 C1N) Solução estoque	0,67 mL
Acetato de sódio 0,1 M	10 mL
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	10 µL

pH 5,2

Coloca o 4C1N e o acetato de sódio, mistura suavemente e filtra, logo após adiciona o peróxido de hidrogênio, novamente, homogeneiza suavemente e utiliza em seguida.

D) Solução Bloqueio BSA 0,2 mg/mL para W. Blot

Albumina Bovina fração V	0,02 g
Água purificada	100 mL

Homogeneizar a solução por inversão, lentamente, fracionar em criotubo de 2,0 mL, identificar e manter em temperatura de -20°C .

ANEXO 4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE PVP (POLIVINILPIRROLIDONA) 3%

PVP- (Polivinilpirrolidona)	3 g
Água purificada	100 mL

ANEXO 5. PREPARO DA SOLUÇÃO DE DEXTRAN SULFATO 5%

Dextran Sulfato	5 g
Água purificada	100 mL

ANEXO 6. PREPARO DA SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 11,1 %

Cloreto de cálcio	11,1 g
Água purificada	100 mL

ANEXO 7. PREPARO DA SOLUÇÃO DE PBS 50X

Fosfato de sódio dibásico	60 g
Fosfato de Potássio monobásico	10 g
Cloreto de Potássio	10 g
Água purificada	1000 mL

ANEXO 8. PREPARO DA SOLUÇÃO DE PBS – PARA USO

Cloreto de Sódio	40 g
PBS 50x	100 mL
Água deionizada	5000 mL

ANEXO 9. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA TESTE DE ELISA

A) Tampão de Adsorção - Solução estoque 0,2 M - Carbonato-bicarbonato

X - Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)	21,2 g
Água purificada	100 mL

Y - Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)	16,8 g
Água purificada	100 mL

pH 9,6

Adicionar a solução Y à solução X até atingir o pH desejado.

B) Solução Tampão de Adsorção - para uso

Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)	8 mL
Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)	17 mL
Água purificada	75 mL

Estocar em temperatura de 2 a 8 °C

C) Solução de Tween 20 com BSA (Bloqueio)

Albumina Bovina (BSA)	30 g
PBS	1000 mL
Tween 20	0,5 mL

pH 7,4

Adicionar o 100 mL do PBS sobre o BSA e deixar dissolver sem agitar, colocar o Tween 20, agitar suavemente completando com o PBS restante. Alicotar 100 mL por frasco e manter em temperatura de -20 °C.

D) Solução de Tampão Citrato

Ácido cítrico	5,11 g
Fosfato de Sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	9,15 g
Água purificada	1000 mL

pH 5,0

Estocar em temperatura de 2 a 8 °C

E) SOLUÇÃO REVELADORA CROMÓGENO-SUBSTRATO (OPD)

OPD	400 mg
Tampão Citrato	1000 mL

Obs. Esta solução deve ficar incolor ou marron bem claro. Fracionar 100 mL em frasco escuro. Estocar em temperatura de -20 °C.

F) Solução Reveladora com Peróxido de Hidrogênio

Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) 30 vol	5 µL
Solução reveladora (OPD)	100 mL

Usar imediatamente após a preparação.

G) Solução Lavagem (PBS)

Cloreto de Sadio (NaCl)	8,5 g
Fosfato de Sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	0,32 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	110 g
Água purificada	1000 mL

pH 7,2

H) Solução de Parada (STOP)

Ácido sulfúrico 1M (H ₂ SO ₄ = PM 98,08 g/mol)	9,80 g
Água purificada	100 mL

Estocar em temperatura Ambiente

I) Conjugado Anti-Mouse IgG (Sigma A 9044) com Peroxidase Titulado 1:3200

Conjugado anti-mouse IgG	3 mL
Água purificada	9,7 mL

J) Tampão de Amostra

Tris 1M pH 8,0	4 mL
Glicerol 100%	4 mL
EDTA 0,5 M	0,2 mL
Azul de Bromofenol 1%	0,4 mL
Água purificada	114 mL

Acondicionar em frasco escuro em pequenos volumes, manter a -20°C.

ANEXO 10. GEL DE AGAROSE PARA TESTE DE IMUNODIFUSÃO

Solução Tampão para Gel

Cloreto de sódio	42,5 g
Cloreto de potássio	0,1 g
Fosfato de sódio dibásico	0,6 g
Fosfato de potássio monobásico	0,1 g
EDTA (titriplex) dissódico	0,186 g
Azida Sódica	0.05 g
Água purificada	500 mL
pH 7,2)	
Àgar Noble	1,8 g

Fundir em banho-maria e solidificar em temperatura ambiente, depois manter em temperatura de 2°C a 8 °C.

ANEXO 11. SOLUÇÃO DE SACAROSE 0,34 M

Sacarose	11,6 g
Água purificada	100 mL

ANEXO 12. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS DE MIELOMA

A) Meio de Crescimento Completo – RPMI

Meio de RPMI 1 frasco	8,5 g
Bicarbonato de sódio	1,6 g
Água purificada	1000 mL
pH 7,2	

B) Meio de Enriquecimento

SFB (soro fetal bovino) 10 %	100 mL
Sulfato de Gentamicina 40µg/ mL	0,28 mL
Anfotericina B (2,5 µg/mL)	0,25 mL
8- Azaguanina 1 mg/mL	10 mL

Este meio tem uma alta taxa de glicose 4.5g/L

Filtrar em Membrana 0,22 µm, realizar teste de esterilidade, alicotar e armazenar de 2 a 8°C.

ANEXO 13. SOLUÇÃO ESTOQUE DE 8-AZAGUANINE 5 MG/ML (250X)

8-Azaguanina	10 mg
Água purificada	10 mL

ANEXO 14. SOLUÇÃO HIDRÓXIDO DO SÓDIO 1 M e 5M

A) NaOH 1 M	40 g
Água purificada	1000 mL

B) NaOH 5 M	200 g
Água purificada	1000 mL

ANEXO 15. SOLUÇÃO ESTOQUE DE HIPOXANTINA / TIMIDINA (100X)

Hipoxantina	6,8 mg
Timidina	1,94 mg
Meio Cultura base	10 mL

ANEXO 16. SOLUÇÃO DE POLIETILENO GLICOL - PEG 50% W/V

PEG 1.450	50 mL
PBS	50 mL

ANEXO 17. SOLUÇÃO ESTOQUE DE AMINOPTERIN (50X)

Aminopterin	0.088 mg
Meio de Cultura base	10 mL

ANEXO 18. SOLUÇÃO ESTOQUE

Hipoxantina	6,8 mg
Timidina	1,94 mg
Aminopterin	0,088 mg
Meio Cultura base	10 mL

ANEXO 19. MEIO DE CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

RPMI completo	40 mL
SFB Soro Fetal Bovino	50 mL
DMSO (dimetylsulfoxide)	10 mL

Preparar suspensão contendo 2×10^6 de células viáveis/mL de meio RPMI completo. Adicionar SFB e DMSO. Fracionar em criotubos de 2,0 mL. Congelar a -80°C , durante a noite e transferir ao Nitrogênio Líquido.

Para reconstituir pode-se imergir o frasco com as células em banho-maria. Homogeneizar bem e ressuspender as células em 5 mL de meio de crescimento. Transferir para o frasco de cultura. Após 24/72 horas, as células devem ser repassadas para uma garrafa com meio novo.

ANEXO 20. PROTOCOLOS DE PURIFICAÇÃO DE IgG

Purificação de IgG (AFFINITY CHROMATOGRAPHY)

Velocidade de escoamento 1 mL/ min para coluna de 1 mL ou 5 mL/min em coluna de 5 mL.

Preparação de Soluções para Purificação de IgG em Coluna Hitrap.

A) Tampão de Adsorção

x) Tampão de adsorção: 0,02 M de fosfato de Sódio

Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4 - PM 136,09) 2,72 g

Água purificada 1000 mL

pH 7,0

y) Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4 - PM 141,96) 0,02 M 2,84 g

Água purificada 1000 mL

Adicionar a solução X sobre a solução Y, até atingir pH 7,0.

B) Tampão de Eluição

Tampão de Eluição (separação) 0,1 M de Glicina-HCl

Glicina (PM 75,068) - 0,1 M 7,5 g

Água purificada 1000 mL

pH 2,7 (se necessário ajustar o pH com HCl)

C) Tampão de Neutralização

Tampão Neutralizante 1 M de Tris-HCl , pH 9,0

TRIS básico (PM 121,14) - 1M 121,14 g

Água purificada 1000 mL

pH 9,0 (se necessário ajustar o pH com HCl)

Obs.: Se utilizar o TRIS-HCl, ajustar o pH com NaOH

ANEXO 21. PURIFICAÇÃO DE IgM (AFFINITY CHROMATOGRAPHY)

Velocidade de escoamento 1 mL/ min para coluna de 1 mL

Preparação de Soluções para Purificação de IgM em Coluna Hitrap

A) Tampão de Adsorção

Tampão de adsorção: 0,02 M de fosfato de Sódio

Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4) 0,02 M	2,84 g
Sulfato de Amônia (NH_4) ₂ SO ₄ – 0,8 M (132,14)	105,7 g
Água purificada	1000 mL
pH 7,5 (Ajustar o pH com fosfato de Potássio)	

B) Tampão de Eluição

Tampão de Eluição (separação):

Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4) 0,02 M	2,84 g
Água purificada	1000 mL
pH 7,5 (Ajustar o pH com fosfato de Potássio)	

C) Tampão de Lavagem

Tampão de regeneração: 0,02 M de fosfato de Sódio

Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4) 0,02 M	2,84 g
ISOPROPANOL A 30 %	300 mL
Água purificada	700 mL

ANEXO 22. SOLUÇÕES PARA CONJUGAÇÃO COM PEROXIDADE

A) Bicarbonato de sódio 0,3 M	31,8 g
Água purificada	1000 mL
pH 8,1	

B) Solução de Fluorodinitrobenzidine 1%

Fluorodinitrobenzidine	1 mL
Etanol absoluto	99 mL

C) Periodato de Sódio (NaIO_4)

Periodato de sódio 0,08 M	17,11 mL
Água purificada	100 mL

D) Etileno Glicol (Etanodiol)

Etileno glicol 0,16 M	9,93 mL
Água purificada	1000 mL

E) Tampão Carbonato/Bicarbonato

Bicarbonato de sódio 0,01 M	0,84 g
Carbonato de Sódio 0,01 M	1,05 g
Água purificada	1000 mL
pH 9,5	

F) *HORSERADISH PEROXIDASE*

<i>Horseradish Peroxidase</i>	5 g
Bicarbonato de Sódio 0,03 M	1 mL

G) BOROHIURETO DE SÓDIO

Borohidreto de Sódio	9,84 mg
Água purificada	1 mL

ANEXO 23. ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 10%

Ácido tricloroacético (TCA)	10 g
Água purificada	100 mL

ANEXO 24. ETANOL 20 %

Etanol	20 g
Água purificada	80 mL

ANEXO 25. FRACIONAMENTO COM PAPAÍNA

A) Papaína (10 mg/mL)	0,05 mL
Cisteína 1M	0,05 mL
EDTA (20mM)	0,05 mL
Tampão Acetato de Sódio, pH 5,5	0,05 mL

B) Papaína	10 mg
Tampão Acetato de Sódio	1 mL
C) Cisteína (PM 121,0)	1,21 mL
Tampão Acetato de Sódio	10 mL
D) EDTA (Titriplex)	0,074 g
Tampão Acetato de Sódio	10 mL
E) Tampão Acetato de Sódio	
Acetato de Sódio	0,82 g
Água purificada	100 mL
pH 5,5 (ajuste com HCl ou NaOH)	

ANEXO 26. CONJUGAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA SALINA BORATO

Tampão Borato	15 mL
Salina fisiológica 0,85g	985mL

A) Tampão Borato	
Ácido Bórico	6,82 g
Bórax	8,6g
Cloreto de Sódio	8,32 g
Água purificada	1000 mL
pH 8,0	

ANEXO 27. TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM VÍRUS, BACTÉRIA E PROTOZOÁRIO

A) Trypsina	
Trypsina	0,1 g
EDTA 10%	0,25 mL
PBS	95,75 mL

B) Meio de Crescimento de Célula F10/199

F10 HAM	9,8 g
MEIO 199	10,6 g
Água purificada	1000 mL

C) Acetona 70%

Acetona	70 mL
Água Purificada	30 mL

D) Acetona-Metanol 50:50

Acetona	50 mL
Metanol	50 mL

E) Formaldeído 2%

Formaldeído (37%)	2 mL
Água Purificada	100 mL

F) Glicerol Tamponado

Glicerina	1 mL
PBS	9 mL

ANEXO 28. PREPARAÇÃO DA HEMÁCIA DE CARNEIRO 10%

A) Solução de Alsever

Dextrose	2,05 g
Citrato de Sódio	0,8 g
Ácido cítrico	0,055 g
Cloreto de Sódio	0,42 g
Água purificada	100 mL

B) Suspensão de Hemácia de carneiro com Alsever (50:50)

Solução de Alsever 50 mL

Sangue total de Carneiro 50 mL

Estabilizar deixando em repouso 3 dias, fazer 3 lavagens com PBS, 591 g durante 10 minutos, ressuspender no volume original com solução salina fisiológica (0,85%).

C) Suspensão de Hemácea A 10 %

Suspensão se hemácea em alsever (50:50) 1 mL

Solução Salina Fisiológica 9 mL

REFERÊNCIAS IBLIOGRÁFICAS

AFFINITY CHROMATOGRAFY, PRINCIPLE AND MÉTHODS. Purification of Specific groups of Molecules, **Amersham Pharmacia Biotech**, Edition AB 18-1020-90, Chapter 3: 32;39.

ARMOUR, K.L.; TEMPEST, P.R.; FAWCETT, P.H.; FERNIE, M.L.; KING, S.I.; WHITE, P.; TAYLOR, G. and HARRIS, W. J. Sequences of heavy and light chain variable regions from four bovine immunoglobulins. **Molecular Immunology**, v. 31, n. 17, p. 1369-1372, 1994.

BARNES, L.M.; BENTLEY, C.M. and DICKSON, A.J. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NSO expression system. **Cytotechnology**, v. 32, p. 109-123, 2000.

BASTIDA-CORKUERA, F.D.; BUTLER, J.E.; YAHIRO, S. and CORBEIL, L.B. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 71, p. 115-123, 1999a.

BASTIDA-CORKUERA, F.D.; NIELSEN, K.H. and CORBEIL, L.B. Binding of bovine IgG2^a and IgG2^b allotypes to protein A, protein G, and *Haemophilus somnus* IgBPs. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 71, p. 143-149, 1999b.

BIRCH, J.R. and RACHER, A.J. Antibody production. **Science Direct Advanced Drug Delivery** v. 58, p. 671-685, 2006.

BUTLER, J.E. Biochemistry and Biology of ruminant immunoglobulins. **Program Veterinary Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 1-53, 1986.

CORBEIL, L.B.; GOGOLEWSKI, R.P.; KACSKOVICS, I. NIELSEN, K.H.; CORBEIL, R.R.; MORRILL, J.L.; GREENWOOD, R; and BUTLER, J.E. Bovine IgG2a

Antibodies to *Haemophilus somnus* and allotype expression. **Canadian Journal Veterinary Review**, 61,207-213,1997.

GOLDSBY, R.A.; SRIKUMARAN, S.; ARULANANDAM, B.; HAGUE, B.; PONCE DE LEON, F. A.; SEVOIAN, M. and GUIDRY, A.J. The application of hybridoma technology to the study of bovine immunoglobulins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 17, p. 25-35, 1987.

GORHAN,I.; KNOWLESD, L.H. and PASTORET,P.P. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial Animals, **OIE, 5 th edition**, vol 1 e 2, chapter I 1.8, 2004.

GU, F.; CHOWDHARY,B.P.; ANDERSSON,L.; HARBITZ, I. and GUSTAVVSSON,I. Assignment of the bovine immunoglobulin gamma heavy chain (IGHG) gene to chromosome 21q24 by in situ hybridization. **Hereditas**, 117: 237-240, 1992.

HARLOW, E. D. and LANE, D. Antibodies A Laboratory Manual, **NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1988.

HOWARD C.J.; TAYLOR G. and BROWNLIE J. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. **Research in Veterinary Science**, v. 29, p. 128-130, 1980.

JERNE, N.K. The generative grammar of the immune system. **Nobelprize Organization, Nobel lecture, Physiology or Medicine**, 8 December 1984.

KACKSKOVICS, I. and BUTLER, J.E. The heterogeneity of bovine IgG2-VIII. The complete cDNA Sequence of bovine IgG2a (A2) and An IGg1. **Molecular Immunology**, v. 33, n. 2, p. 189-195, 1996.

KACKSKOVICS, I. Fc receptors in livestock species, mini-review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, p. 351-362, 2004.

KEHOE, J. M. and CAPRA, J.D. Nature and significance of immunoglobulin subclasses. **NY St. J. Med.** v. 74, p. 489-491, 1974.

KÖHLER, G. Derivation and diversification of Monoclonal Antibodies. **Nobelprize, Nobel Literature, Physiology or Medicine**, 8 December, 1984.

LETESSON, J.J.; LOSTRIE-TRUSSANT, N. and DEPELCHIN, A. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines. **Annual. Médecine Veterinary**, v. 129, p. 131-141, 1985.

MARTINEZ, J.; TOMÁS, G.; MERINO, S.; ARRIERO E. and MORENO, J. Detección de inmunoglobulinas en aves silvestres por ELISA directa: un estudio metodológico para validar la técnica en diferentes especies utilizando anticuerpos de gallina, **Funcional ecology**, 17,700-706, 2003.

MILSTEIN, C. From the Structure of Antibodies to the Diversification of the Immune Response. **Nobelprize, Nobel Literature, Physiology or Medicine**, 8 December, 1984.

NAESSESNS, J.; NEWSON, J.; WILLIAMS, D.J.L.; and LUTJE, V. Identification of isotypes and allotypes and allotypes of bovine immunoglobulin M with monoclonal antibodies. **Immunology**, v. 63, p. 569-574, 1988.

NAKANE, P.K. and KAWAOI, A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 22, n. 12, p.1084-1091, 1974.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES – OIE **Manual of Standards Tests and Vaccines** 2000. (www.oie.int).

PARNG,C.L.; HANSAL,S.; GOLSBY, R.A. and OSBORNE,B.A. Diversification of bovine λ -light chain genes. **Annual NY Academic Science**. 764, p.155-157, 1995.

PASTORET, P.P. **Handbook of Vertebrate Immunology, XIII-Immunology of Cattle**, Academic Press, 1998.

POLLOCK, D.P.; KUTZO, J.P.; WILSON, E.B.; WILLIAMS, J.L.; ECHELARD, Y. and MEADE, H.M. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. **Journal Immunological Methods**, v. 231, p. 147-157, 1999.

RABBANI, H.; BROWN, W.R.; BUTLER, J.E. and HAMMARSTRÖM, L. Polymorphism of the IGHG3 gene in cattle. **Immunogenetics**, v. 46, p. 326-331, 1997.

SAINI, S.S. and KAUSHIK, A. Origin of bovine IgM structural variants. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 389-396, 2001.

SAINI, S.S.; FARRUGIA, W.; MUTHUSAMY, N.; RAMSLAND, P.A. and KAUSHIK, A.K. Structural evidence for a new IgG1 antibody sequence allele of cattle. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, n. 1, p. 32-38, 2007.

SASAKI, M.; LARSON, B.C. and NELSON D.R., Kinetic analysis of the binding of immunoglobulins IgG1 and IgG 2 to bovine mammary cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 497, p. 160-170, 1977.

SYMONS, D.B.A.; CLARKSON, C.A. and BEALE, D. Structure of bovine immunoglobulin constant region heavy chain gamma 1 and gamma 2 genes. **Molecular Immunology**, vol.26, n°9, p. 841-850, 1989.

SOUTH CAROLINA UNIVERSITY, Immunology disponível em www.southcarolinauniversity/immunology., acesso em 24.03.07.

SOURCE KONRAD BISHOP, Western Blot Procedure. www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/westernblot.html. Acessado em 02.12.2004 BSE Inquiry, London, 2000.

TATCHER, E. F. and GERSCHWIN, L.J. Generation and characterization of murine monoclonal antibodies specific for bovine immunoglobulin E. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 18, p. 53-66, 1988.

VAN ZAANE, D. and IJZERMAN, J. Monoclonal antibodies against bovine immunoglobulin and their use in isotype specific ELISAs for rotavirus antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 72, p. 427-441, 1984.

WHO. Proposed rules for the designation of immunoglobulin of animal origin. **WHO Bulletin**, v. 56, p. 815-817, 1978.

WILLIAMS, D.J.L.; NEWSON, J. and NAESSENS, J. Quantitation of bovine immunoglobulin isotypes and allotypes using monoclonal antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 24, p. 267-283, 1990.

YOO, E.M.; CHINTALACHARUVU, K. R.; PENICHET, L. M. and MORRISON, S.L. Myeloma expression system. **Journal of Immunological Methods**, v. 261, p. 1-29, 2002.