



**Pós-Graduação em Biotecnologia  
Instituto de Ciências da Saúde  
Universidade Federal da Bahia**

**PRISCILLA CAROLINNE BAGANO VILAS BOAS**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA  
ANTÍGENOS SOMÁTICOS DE CEPA VIRULENTA DE  
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

Salvador  
2013

**PRISCILLA CAROLINNE BAGANO VILAS BOAS**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA  
ANTÍGENOS SOMÁTICOS DE CEPA VIRULENTA DE  
*Corynebacterium pseudotuberculosis***

Dissertação apresentada ao programa de Pesquisa e Pós- Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciência e Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lília Ferreira de Moura Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

Salvador  
2013

*A meus pais e irmãos, por serem minha base para tudo, a minha força, o meu desejo de ser cada dia o melhor que eu possa ser. Por jamais desacreditarem de mim, por acreditarem quando nem eu mesma acreditava. Pelas lágrimas que me vêm aos olhos só de pensar em agradecer por tudo.*

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, por todas as glórias que me foram concedidas até hoje. Por ter guiado meus passos e ter me iluminado todos os dias da minha vida.

**Aos meus pais**, Reinildo e Ilma, por serem o meu maior exemplo e o maior incentivo para os meus estudos. Obrigada por toda a base que me deram, por toda a fé que sempre depositaram em mim. Obrigada por sempre terem feito de tudo para que eu chegasse até aqui. Sem vocês, nada disso seria possível. Jamais vou conseguir demonstrar toda a minha gratidão.

**Aos meus irmãos**, Roniere, Pablo e Paloma, por todo o amor incondicional. Vocês são a razão dos meus melhores sorrisos, das minhas maiores alegrias, dos meus melhores sentimentos. Obrigada por terem me ensinado desde cedo os significados das palavras companheirismo, cumplicidade, amizade e amor. Vocês são a minha luz. Sem vocês, eu nada seria.

**Aos amigos** que, direta ou indiretamente, me deram apoio para enfrentar as dificuldades de uma forma mais positiva, sempre de cabeça erguida e com um sorriso no rosto. Em especial à Isabela, Mayana, Mariana, Nayara, Victor, Lucas, João, Fernanda, Renata, Isadora, Mirla, Luana, Carolina, Paula, Vivianne, Allan, Rodrigo e Bruna. Obrigada por fazerem minha vida mais leve e divertida!

**A Leandro**, por ser o companheiro perfeito. Por todo o carinho, amor e dedicação. Por ter sido o meu apoio, a minha força e a minha segurança de que tudo ia dar certo. Por ter enxugado as minhas lágrimas e me dado colo nos momentos de desespero. Por nunca ter me deixado desmorronar e muito menos desistir. Por me ajudar a cada dia ser uma pessoa melhor.

**À professora Lília**, por ter sido muito mais do que uma orientadora, por ter sido uma amiga. Obrigada pela paciência, pela dedicação, pela confiança no meu trabalho e por sempre ter acreditado em mim. Obrigada pelas palavras de apoio e sabedoria sempre que precisei. Não tenho como agradecer por tudo que pude aprender com a

senhora durante esses anos, não só como profissional, mas como pessoa. Obrigada por ser um exemplo para a minha vida.

**Ao professor Roberto Meyer** pela co-orientação, pelos ensinamentos, pelo apoio ao projeto, pela dedicação e compreensão.

**À professora Sílvia e ao professor Gúbio** por terem abraçado esse projeto e terem possibilitado que ele se concretizasse.

**Aos amigos e colegas do mestrado**, que dividiram comigo todas as agonias, inseguranças e correrias dessa jornada. Que passaram pelas mesmas coisas e me mostraram como enfrentar estes obstáculos. Em especial à Isabela, Fúlvia e Aryane, por terem sido, além de amigas, psicólogas! Obrigada por terem me aguentado!

**Aos meus companheiros do LABIMUNO**, Thaís, Rafaela, Tatiane, Marcos, Milton, Geraldo, Marivaldo, Danielle, Heidy, Andréia, Ricardo, Ítala, e em especial Bruno, Tadeu e Thiago. Obrigada por tornarem os dias de trabalho mais prazerosos, divertidos e descontraídos. Obrigada por muitas vezes mudarem o meu dia para melhor. E obrigada pela ajuda em todas as vezes que precisei. Vocês foram essenciais.

**À professora Vera**, por sempre se mostrar acessível e disposta a ajudar com sua experiência.

**Aos funcionários** Francisca (Dona Chica), Rafaela, Zilda, Manuel, José, Mário, Edmundo, Neila, Ivana e Clara por todas as vezes que me ajudaram de forma direta e indireta. Vocês foram essenciais para que eu pudesse realizar as atividades desse trabalho.

A todas as meninas do **Laboratório de Virologia**, em especial Isabela, Aryane, Fabiana, Marcelle e Carina. Vocês foram companheiras fantásticas e trabalhar com vocês tornava tudo mais fácil. Muito obrigada.

A todos os amigos do **LABEM**, em especial Luisa, Brena, Aldinéia, Luis, Roberta, Sueli e Leila, ao pessoal do **Laboratório de Alergia e Acarologia**, em especial Filipe, Leonardo, Ana e Márcia, ao **Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular** e ao **Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos**, por sempre estarem disponíveis no que fosse preciso e sempre se mostrarem muito solícitos.

**A todos os professores** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFBA, que tanto contribuíram para a minha formação e qualificação acadêmica.

**Às secretárias** Jéssica, Vanessa e Mariana, por toda a atenção e por serem tão solícitas e competentes no cumprimento de suas funções.

Ao biotério do **Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM)**, unidade Fiocruz de Salvador, e ao biotério da **Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)** pelo fornecimento dos camundongos utilizados neste trabalho.

Por fim, à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)**, pelo apoio financeiro aos meus estudos durante o Mestrado.

***“Tenho a impressão de ter sido uma criança à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”***

**Isaac Newton**

VILAS-BOAS, Priscilla Carolinne Bagano. Produção de anticorpos monoclonais contra antígenos somáticos de cepa virulenta de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2013. XXf. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## RESUMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico de diversas doenças crônicas infecto-contagiosas em diferentes espécies de mamíferos, sendo a linfadenite caseosa a mais importante delas, encontrada em caprinos e ovinos. Esta patologia leva à formação de granulomas nos linfonodos superficiais e internos, e em alguns órgãos como os pulmões, fígado e baço, acarretando em diversas perdas econômicas para a caprino-ovinocultura. Neste trabalho, camundongos BALB/c foram imunizados com proteínas de um antígeno somático hidrofóbico extraído de uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Os esplenócitos obtidos foram fusionados com células mielomatosas da linhagem SP2/0 e os hibridomas produzidos através desta fusão foram submetidos a testes de ELISA para identificação dos clones produtores de anticorpos específicos para o antígeno somático hidrofóbico. Foram selecionados quatro clones, posteriormente injetados intraperitonealmente em camundongos BALB/c, para produção de líquido ascítico. Os líquidos ascíticos foram testados por *western blotting*, usando o antígeno somático hidrofóbico submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5 e 15%. Em SDS-PAGE a 12,5% todos os líquidos obtidos reconheceram duas bandas, com pesos moleculares estimados em 31 e 34 kDa e o clone 3-12C CL9A, também reconheceu uma banda com peso molecular de 19 kDa. Em SDS-PAGE a 15%, o clone 1-6G CL10 manteve o reconhecimento de apenas duas bandas de 31 e 34 kDa. Os demais apresentaram reconhecimento de outras bandas, além destas duas. Bandas proteicas com pesos moleculares similares aos aqui encontrados, já foram descritas na literatura em estudos realizados com soro de caprinos e ovinos infectados por *C. pseudotuberculosis*. Os anticorpos produzidos neste trabalho possuem potencial para utilização em imunoenaios, visando o aprofundamento de estudos sobre a relação micro-organismo hospedeiro, assim como a possibilidade de produção de um kit para o diagnóstico da infecção.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, linfadenite caseosa, anticorpos monoclonais, antígeno somático hidrofóbico



VILAS-BOAS, Priscilla Carolinne Bagano. Production of monoclonal antibodies against somatic antigens of virulent *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In 2013. XXF. Dissertation (Master of Biotechnology). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## ABSTRACT

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of several chronic infectious diseases in different species of mammals, and caseous lymphadenitis in sheep and goats is the most important of them. This disease leads to the formation of granulomas in the superficial lymph nodes and in some organs such as the lungs, liver and spleen, resulting in economic losses for the raising of goats and sheep. In this study, BALB/c mice were immunized with a protein hydrophobic somatic antigen extracted from *C. pseudotuberculosis* virulent strain. The splenocytes were fused with myeloma cell strain SP2/0 and the resultant hybridomas were tested by ELISA in order to identify which clones expressed antibodies specific for the hydrophobic somatic antigen. The four clones selected were subsequently injected intraperitoneally in BALB/c mice to produce ascites. Ascites fluids were tested by western blotting using hydrophobic somatic antigen subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 12.5 and 15% concentrations. In SDS-PAGE 12.5%, all liquids recognized two bands obtained with estimated molecular weights of 31 and 34 kDa and clone 3-12C CL9A also recognized a band with a molecular weight of 19 kDa. In SDS-PAGE 15%, clone 1-6G CL10 maintained recognition of only two bands of 31 and 34 kDa. The others recognized other bands, besides these two. Protein bands with molecular weights similar to those found in this work have been described in the literature in studies with serum from goats and sheep infected with *C. pseudotuberculosis*. The resultant antibodies are potentially useful in immunoassays, in order to further studies on the relationship between microorganism and its host, and the possibility of producing a kit for the infection diagnosis.

**KEYWORDS:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caseous lymphadenitis, monoclonal antibodies, hydrophobic somatic antigen

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Granuloma de Linfadenite Caseosa em Linfonodo da Parótida.....28
- Figura 2** - Granuloma de Linfadenite Caseosa em: (A) Pulmão; (B) Baço; (C) Fígado; (D) Linfonodo Aórtico-lombar.....29
- Figura 3** - Figura 3: Perfil eletroforético após a aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%.....62
- Figura 4** - Perfil eletroforético após a aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%.....63
- Figura 5** - Fitas da membrana de nitrocelulose resultantes do teste de western blotting após aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%.....74
- Figura 6** – Fitas da membrana de nitrocelulose resultantes do teste de western blotting após aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%.....74

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos quatro camundongos imunizados com a fração somática hidrofóbica. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. CAM1 = camundongo 1. CAM2 = camundongo 2. CAM3 = camundongo 3. CAM4 = camundongo 4.....64

**Gráfico 2** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 1 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.....65

**Gráfico 3** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 2 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.....65

**Gráfico 4** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 3 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.....66

**Gráfico 5** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgM nos poços da placa 1 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.....66

**Gráfico 6** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgM nos poços da placa 2 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.....67

**Gráfico 7** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgM nos poços da placa 3 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.....67

**Gráfico 8** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 1 de cultura de células provenientes da clonagem dos híbridos. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....68

**Gráfico 9** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 2 de cultura de células provenientes da clonagem dos híbridos. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....69

**Gráfico 10** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 3 de cultura de células provenientes da clonagem dos híbridos. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....69

**Gráfico 11** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 1-10E. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....70

**Gráfico 12** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 1-6G. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....70

**Gráfico 13** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 2-4C. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....71

**Gráfico 14** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 2-11C. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....71

**Gráfico 15** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 3-12C. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.....71

**Gráfico 16** - Densidades óticas (D.O.) encontradas no ELISA indireto para a titulação dos níveis de anticorpos dos líquidos ascíticos produzidos.....73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AcM</b>	Anticorpos Monoclonais
<b>AHI ou BHI</b>	Teste de inibição da anti-beta-hemólise
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BR</b>	Branco
<b>CAM1</b>	Camundongo 1
<b>CAM2</b>	Camundongo 2
<b>CAM3</b>	Camundongo 3
<b>CAM4</b>	Camundongo 4
<b>CD</b>	Grupamentos (clusters) de diferenciação
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CLA</b>	Linfadenite Caseosa
<b>CN</b>	Controle Negativo
<b>CP</b>	Controle Positivo
<b>DAB</b>	3'3' Diaminobenzidine
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>D.O.</b>	Densidade Ótica
<b>EIA</b>	Ensaio Imunoenzimático
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>HAT</b>	Aminopterina, Hipoxantina e Timidina
<b>HGPRT</b>	Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase
<b>HT</b>	Hipoxantina e Timidina
<b>IgG</b>	Imunoglobulina classe G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina classe G subclasse 1
<b>IgG2</b>	Imunoglobulina classe G subclasse 2
<b>IgM</b>	Imunoglobulina classe M
<b>MP</b>	Meio Iscove's puro
<b>MQD</b>	Meio Quimicamente Definido
<b>PBS</b>	Tampão Salino Fosfato
<b>PBS-T</b>	Tampão Salino Fosfato com Tween 20 a 0,05%
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PLD</b>	Fosfolipase D
<b>RIA</b>	Rádio Imunoensaio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
<b>SFB</b>	Sore Fetal Bovino
<b>SHI</b>	Teste da inibição da hemólise sinérgica
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
<b>TPP</b>	Three-Phase Partitioning

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	19
	2.1 OBJETIVO GERAL	19
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
	3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIAIS E CULTIVO DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	20
	3.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	22
	3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LINFADENITE CASEOSA	22
	3.4 TRANSMISSÃO DA DOENÇA	26
	3.5 OS ANTÍGENOS E OS MECANISMOS DE PATOGÊNESE	28
	3.6 O ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO	30
	3.7 ASPECTOS DA RESISTÊNCIA E IMUNIDADE	31
	3.8 TESTES DIAGNÓSTICOS PARA LINFADENITE CASEOSA	34
	3.9 PREVALÊNCIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA LINFADENITE CASEOSA	35
	3.10 ANTICORPOS MONOCLONAIS	36
	<b>3.10.1 Definição</b>	37
	<b>3.10.2 Produção dos anticorpos monoclonais</b>	37
	<b>3.10.3 Anticorpos policlonais versus anticorpos monoclonais</b>	39
	<b>3.10.4 Aplicações dos Anticorpos Monoclonais</b>	40
	<b>3.10.5 Limitações no uso dos Anticorpos Monoclonais</b>	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
	4.1 LINHAGEM DE <i>C. pseudotuberculosis</i> E CULTIVO BACTERIANO	45
	4.2 ANIMAIS	45
	4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO	46
	4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO	46
	4.5 IMUNIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS SOROS PADRÕES	46
	4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	47
	<b>4.6.1 Imunização para obtenção dos esplenócitos</b>	47
	<b>4.6.2 Mieloma</b>	47



4.6.3 “Feeder cells”	47
4.6.4 Fusão	48
4.6.5 Seleção dos hibridomas	49
4.6.6 Clonagem e expansão dos hibridomas	50
4.6.7 Produção de líquido ascítico	50
4.6.8 Titulação dos líquidos ascíticos	50
4.7 TESTES DE ANTIGENICIDADE DO ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO	51
4.7.1 Teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para soros padrões	51
4.7.2 Teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para sobrenadante de cultura (IgG)	52
4.7.3 Teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para sobrenadante de cultura (IgM)	53
4.7.4 <i>Western blotting</i> (SDS-PAGE a 12,5%)	54
4.7.5 <i>Western blotting</i> (SDS-PAGE a 15%)	54
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>56</b>
5.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO E DOSAGEM PROTEICA	56
5.2 PERFIL ELETROFORÉTICO	56
5.3 OBTENÇÃO DOS SOROS PADRÕES	58
5.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	59
5.4.1 Seleção dos hibridomas	59
5.4.2 Clonagem e expansão dos hibridomas	62
5.4.3 Produção e titulação do líquido ascítico	67
5.5 <i>WESTERN BLOTTING</i>	68
5.5.1 <i>Western blotting</i> (SDS-PAGE a 12,5%)	68
5.5.2 <i>Western blotting</i> (SDS-PAGE a 15%)	69
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico de diversas doenças crônicas infecto-contagiosas em diferentes espécies de mamíferos, sendo a linfadenite caseosa (CLA) a mais importante delas (FONTAINE; BAIRD, 2008; BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962), encontrada em caprinos e ovinos de importantes áreas do mundo (DORELLA et al., 2006). Esta patologia leva à formação de granulomas nos linfonodos superficiais e internos, e em alguns órgãos como os pulmões, fígado e baço (PÉPIN et al., 1994; SIMMONS et al., 1998).

Para a caprino-ovinocultura essa doença se configura num sério problema, com perdas econômicas evidenciadas através da diminuição de produção de carne, leite e lã, da desvalorização da pele devido às cicatrizes, do custo das drogas e da mão de obra para tratar os granulomas superficiais, da condenação da carcaça e da diminuição da eficiência reprodutiva dos animais afetados (DORELLA et al., 2006).

Por ser uma doença crônica, a linfadenite caseosa em geral tem um longo período de incubação, além de poder se iniciar em linfonodos internos ou em outras vísceras, onde nenhum sinal ou sintoma da doença aparente se torna perceptível, dificultando ou impossibilitando o diagnóstico clínico precoce desta enfermidade e a separação entre animais infectados e não infectados (BATEY, 1986a; BATEY; SPEED; KOBES, 1986).

Os métodos diagnósticos e de controle da linfadenite caseosa não são satisfatórios, entretanto a vacinação é a maneira mais significativa de reduzir a infecção (PATON et al., 1995). Há muito tempo busca-se uma vacina capaz de induzir uma imunoproteção significativa. São diversas as tentativas feitas utilizando-se diferentes adjuvantes e antígenos, como bactéria inteira, viva, morta e parede celular (CARVALHO et al., 1990; BROGDEN; CUTLIP; LEHMKUHL, 1984; BROGDEN et al., 1990; MEDRANO et al., 2003).

A busca por antígenos imunoprotetores de *C. pseudotuberculosis* por pesquisadores tem sido desenvolvida em diversos países. Neste sentido, o Laboratório de

Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (Labimuno), tem como uma das linhas de pesquisa, o estudo da imunidade à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e tem desenvolvido trabalhos para maior compreensão da resposta imune induzida pelo patógeno em caprinos e ovinos inoculados experimentalmente (CARVALHO et al., 1990; MEYER et al., 2005; PAULE et al, 2003; MOURA-COSTA et al., 2008).

O Labimuno tem buscado determinar proteínas antigênicas que podem vir a se constituir potenciais imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Neste sentido, foram desenvolvidos métodos de produção e extração de antígenos de *C. pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA et al., 2002; PAULE et al., 2004; CERQUEIRA, 2006; MOURA-COSTA et al., 2008; PACHECO et al., 2011; REBOUÇAS et al., 2011; CARVALHO, 2012; SANTANA, 2012), entre elas, a extração dos constituintes hidrofóbicos da massa bacteriana, que visa à obtenção de constituintes proteicos e glicoproteicos da superfície do micro-organismo (membrana e parede celular), mais específicos, e, portanto mais eficazes (BASTOS, 2011).

A tecnologia dos Hibridomas, desenvolvida em meados da década de 1970 a partir do trabalho pioneiro de Köhler e Milstein (1975), operou uma fantástica revolução na área das Ciências Biológicas (CAMBROSIO; KEATING, 1992). Estas biomoléculas se tornaram uma grande ferramenta para a investigação científica, para os testes de imunodiagnóstico e para o tratamento de diferentes condições patológicas, especialmente no câncer (CHADD; CHAMOW, 2001).

Neste trabalho, buscou-se a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos obtidos a partir da extração da fração hidrofóbica de superfície da massa bacteriana de *C. pseudotuberculosis*. Desta forma, os anticorpos monoclonais serão de grande importância para uma fina caracterização de tais moléculas, gerando assim informações indispensáveis para uma adequada racionalização no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e de novos preparados vacinais. Estes anticorpos monoclonais também serão ferramentas valiosas para um melhor entendimento da interação micro-organismo hospedeiro, uma vez que estes anticorpos poderão ser marcados e usados no acompanhamento do processo infeccioso, em imunohistoquímica ou em citometria de fluxo, dentre outras aplicações.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos monoclonais contra antígeno somático de superfície de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtido por separação hidrofóbica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir hibridomas a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c hiperimunizados com frações proteicas de um antígeno somático hidrofóbico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtidos por separação hidrofóbica, usando como partner, células mielomatosas da linhagem SP2-0;
- b) Caracterizar, por *western blotting*, a reatividade dos anticorpos monoclonais obtidos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIAIS E CULTIVO de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi inicialmente isolada por Nocard em 1888 de uma lesão em bovino e teve a sua primeira descrição completa realizada por Preisz, que observou a semelhança do micro-organismo com o bacilo da difteria (DORELLA et al., 2006).

O gênero *Corynebacterium* pertence à família dos *Corynebacteriaceae* da ordem dos *Eubacteriales* (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962). *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria mesofílica, com temperatura ideal de crescimento em torno de 37°C (MOURA-COSTA, 2002), morfológicamente semelhante a outras corinebactérias isoladas de animais e homens (BATEY, 1986b). É um bacilo Gram-positivo (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; WILLIAMSON, 2001; MOURA-COSTA, 2002; BAIRD; FONTAINE, 2007), disposto em pares ou em paliçadas (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; MOURA-COSTA, 2002), apresentando assim um arranjo conhecido como “letras chinesas” (BROWN; OLANDER, 1987; BAIRD; FONTAINE, 2007). Frequentemente possuem grânulos metacromáticos (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; BROWN; OLANDER, 1987), são imóveis, não esporulados, não capsulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; DORELLA et al., 2006). São muitas vezes referidos como difteróides (BROWN; OLANDER, 1987).

*C. pseudotuberculosis* é um bacilo pleomórfico, medindo de 0,5 – 0,6 µm por 1,0 – 3,0 µm (BROWN; OLANDER, 1987; DORELLA et al., 2006; BAIRD; FONTAINE, 2007) podendo apresentar formas cocóides, em hastes filamentosas ou bastonetes. Em culturas jovens há a predominância de pequenos coco-bacilos com dimensões bastante uniforme, enquanto que, em culturas mais antigas, há uma tendência a apresentar a forma de bacilos (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962).

*C. pseudotuberculosis* é um micro-organismo Gram-positivo, mas há uma variação no grau de retenção do corante. Dessa forma, a coloração pode ser irregular, apresentando manchas (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Em meio sólido são observadas pequenas colônias circulares de coloração branco-acinzentada após 24 horas de incubação a 37°C. Após 48 horas, essas colônias possuem aspecto opaco, com uma protuberância arredondada no centro e de margem lisa ou ligeiramente irregular (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962). Alguns autores descrevem as colônias com coloração amarelada (BAIRD; FONTAINE, 2007). As colônias são secas, de consistência friável, sendo facilmente movidas pela superfície do ágar (BROWN; OLANDER, 1987; BAIRD; FONTAINE, 2007). Anéis concêntricos podem ser observados (DORELLA et al., 2006).

O crescimento é pobre em meio básico, sendo beneficiado pela adição de sangue ou soro (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; BAIRD; FONTAINE, 2007), pois se trata de um micro-organismo exigente do ponto de vista nutricional (MOURA-COSTA, 2002). A adição de 10% de soro ou sangue de boi ou cavalo propicia um crescimento mais abundante, mas não altera as características gerais das colônias (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962). Com a adição de sangue no meio, observa-se uma  $\beta$ -hemólise em volta das colônias, que pode ser visível apenas após 48-72 h de incubação, e a presença de um pigmento amarelo nas colônias (BAIRD; FONTAINE, 2007). *C. pseudotuberculosis* tem crescimento acentuado em ágar BHI e caldo BHI, principalmente quando há a adição de extrato de levedura, triptona ou lactoalbumina (MOURA-COSTA, 2002).

Devido à natureza hidrofóbica de sua camada exterior (BROWN; OLANDER, 1987), em meio líquido o crescimento é observado através da formação de uma camada frágil e fina na superfície do meio, sem aderência à parede do tubo, com coloração branco-acinzentada e apresentando um depósito granular ao fundo, sem causar turvação do meio. Ao realizar agitação, fragmentos da película são depositados ao fundo do tubo, sendo impossível obter uma suspensão homogênea, dificultando assim a contagem de células viáveis e padronização do inóculo. A formação de uma película mais densa, segundo alguns autores, está associada a uma maior virulência

(BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; MOURA-COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006).

### 3.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

*C. pseudotuberculosis* pode ser caracterizado por provas bioquímicas, apresentando produção de catalase (SONGER et al., 1988; MOURA-COSTA, 2002), produção de urease (MUCKLE; GYLES, 1982; MOURA-COSTA, 2002) e oxidase negativa, enquanto que a redução de nitrato em nitrito é variável (BROWN; OLANDER, 1987). A maioria das cepas de equinos e bovinos possui a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, ao contrário dos isolados de ovinos e caprinos (WILLIAMSON, 2001; BAIRD; FONTAINE, 2007), podendo assim dividi-los em biovar *equi* e biovar *ovis*, respectivamente (SONGER et al., 1988).

Nenhum dos processos de fermentação apresenta gás como produto metabólico, mas há produção de ácido a partir da glicose, manose, (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; MOURA-COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006) e galactose (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962). Benham, Seaman e Woodbine (1962) afirmam que os processos de fermentação são variáveis para maltose, lactose, sacarose e frutose. De acordo com Songer e colaboradores (1988), estas diferenças quanto à fermentação de carboidratos podem ser atribuídas à diversidade entre as linhagens ou às metodologias usadas pelos diversos autores.

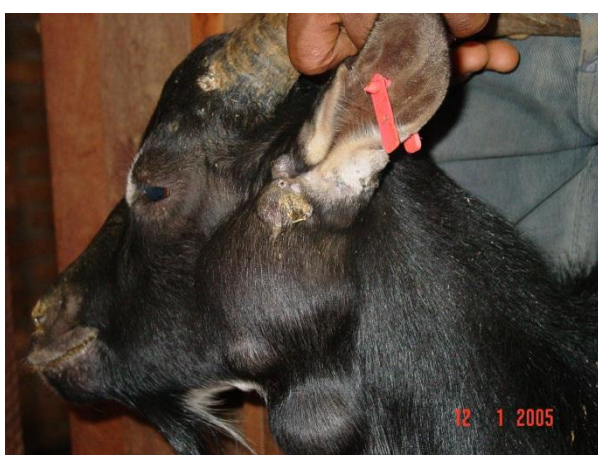
O Sistema API Coryne (bioMérieux) é um método utilizado para a identificação de bactérias corineformes, sendo composto de 20 tubos com substratos para a realização de 11 testes enzimáticos e 8 testes de fermentação de carboidratos. De acordo com este sistema de identificação 100% das linhagens de *C. pseudotuberculosis* fermentam a glicose, 80% fermentam a maltose e nenhuma linhagem fermenta sacarose ou lactose (DORELLA et al., 2006).

### 3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LINFADENITE CASEOSA

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico de infecções crônicas em diferentes espécies de mamíferos. A economicamente mais importante dessas é a linfadenite caseosa (CLA) (FONTAINE; BAIRD, 2008; BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962), encontrada em ovelhas e caprinos de diversas áreas do mundo (DORELLA et al., 2006).

A linfadenite caseosa é caracterizada pela formação de granulomas nos linfonodos superficiais e profundos podendo acometer outros órgãos como pulmões, baço e fígado (BATEY, 1986b, MOURA-COSTA, 2002; FONTAINE; BAIRD, 2008). O micro-organismo se espalha pelo sistema linfático para o sítio secundário, como linfonodos regionais e órgãos internos, onde acarreta o aparecimento de granulomas secundários (WILLIAMSON, 2001).

A manifestação externa da linfadenite caseosa (Figura 1) é a forma mais frequente da doença, causando a formação de granulomas nos linfonodos superficiais e no tecido subcutâneo (WILLIAMSON, 2001; FONTAINE; BAIRD, 2008). Estes granulomas aumentam de volume, apresentam necrose na sua parte interna e uma cápsula fibrosa à sua volta (FONTAINE; BAIRD, 2008).

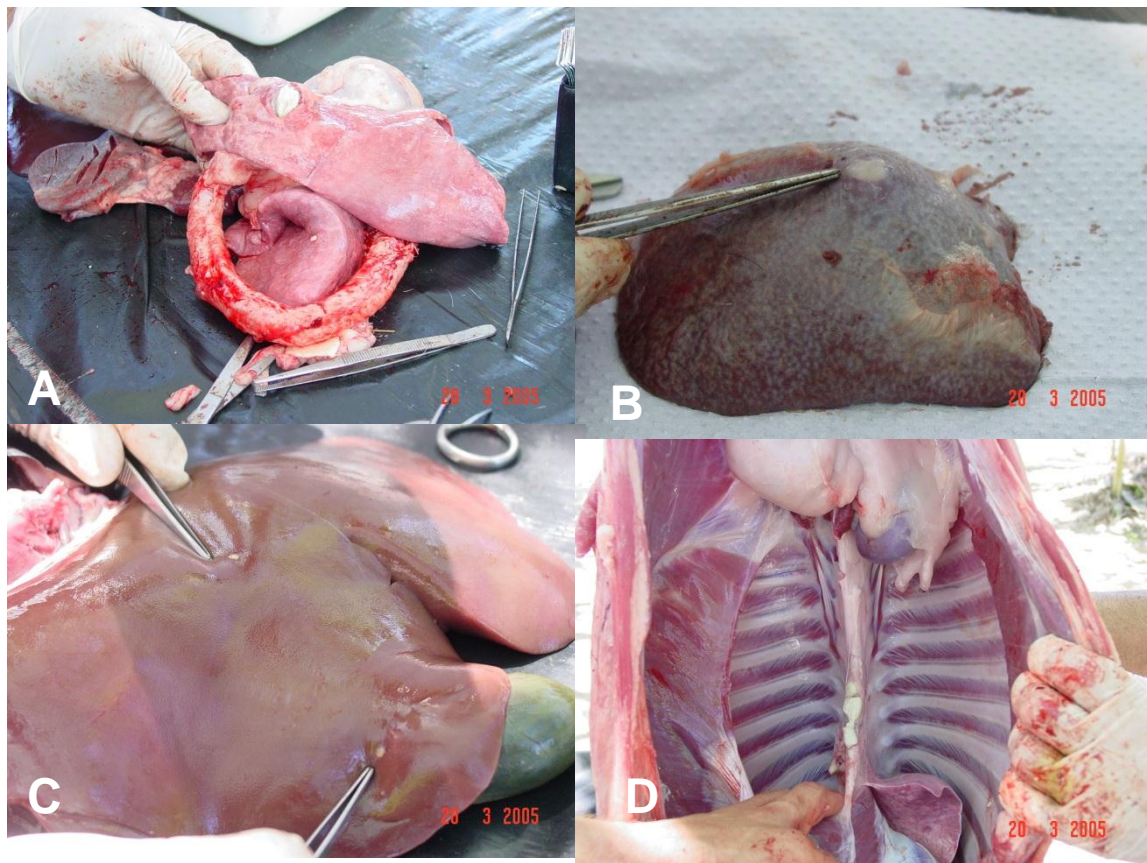


**Figura 1:** Granuloma de Linfadenite Caseosa em Linfonodo da Parótida (MOURA-COSTA, 2007)

A forma interna da doença (Figura 2) é caracterizada pela formação de lesões que não são externamente observadas, com o desenvolvimento de granulomas nos linfonodos internos. Essa forma da doença pode atingir órgãos como pulmões, rins,



fígado, baço (WILLIAMSON, 2001; DORELLA et al., 2006; FONTAINE; BAIRD, 2008), glândulas mamárias e, menos frequentemente, útero, testículos, cérebro, coração, medula espinhal e articulações (FONTAINE; BAIRD, 2008). Os ovinos são mais propensos a apresentar lesões pulmonares, hepáticas e renais do que os caprinos. As lesões pulmonares podem ser subclínicas ou associadas a sinais de broncopneumonia (WILLIAMSON, 2001). A manifestação interna é considerada a forma menos frequente, porém mais grave da doença (BROWN; OLANDER, 1987), podendo ser subclínica ou, comumente, associada com a perda de peso (WILLIAMSON, 2001).



**Figura 2:** Granuloma De Linfadenite em: (A) Pulmão; (B) Baço; (C) Fígado; (D) Linfonodo Aórtico-lombar (MOURA-COSTA, 2007)

A CLA externa é mais comumente encontrada em caprinos, ocorrendo com mais frequência nos linfonodos externos da cabeça e do pescoço, enquanto que os ovinos tendem a desenvolver a forma visceral da doença, principalmente nos linfonodos subilíaco e cervical superficial (WILLIAMSON, 2001).

O tamanho das lesões é variável e, provavelmente, depende de vários fatores, incluindo o número inicial de micro-organismos, a quantidade de lipídios citotóxicos acumulados durante o desenvolvimento e a taxa de multiplicação (BATEY, 1986b).

A infecção pode vir a produzir poucos sinais clínicos, sendo identificada somente após ter sido realizado um exame post-mortem. Os animais infectados são muitas vezes aparentemente saudáveis (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; DORELLA et al., 2006).

Os granulomas podem sofrer ruptura, drenando o material caseoso através de fístulas. A ferida sofre cicatrização lenta, deixando no animal uma cicatriz no local em que houve a ruptura da lesão. Todo animal deve ser cuidadosamente inspecionado antes da adição ao rebanho, sendo rejeitado caso haja granulomas ou cicatrizes externas sobre centros linfáticos (WILLIAMSON, 2001).

A doença pode apresentar recidiva como resultado da disseminação de *C. pseudotuberculosis* após um período significativo de aparente latência (FONTAINE; BAIRD, 2008). Os granulomas muitas vezes recorrem meses ou anos mais tarde, no mesmo animal, como resultado da incapacidade deste em eliminar totalmente a infecção (WILLIAMSON, 2001).

Além das manifestações mais frequentes de infecção por *C. pseudotuberculosis*, o micro-organismo pode ser o agente causador da mastite e também tem sido associado como causa de aborto em ovinos (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; BROWN; OLANDER, 1987; FONTAINE; BAIRD, 2008). *C. pseudotuberculosis* já foi identificado em tecidos e dentro do conteúdo do estômago de fetos ovinos (FONTAINE; BAIRD, 2008).

*C. pseudotuberculosis* também é conhecido como o agente causador da linfangite ulcerativa em equinos, além de provocar granulomas peitorais, inguinais e abdominais nestes animais (BROWN; OLANDER, 1987; WILLIAMSON, 2001). O micro-organismo já foi relatado em infecções em outros animais como bovinos, búfalos, camelos, suínos, veados, mulas, rinocerontes, roedores, macacos e seres

humanos (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; WILLIAMSON, 2001; DORELLA et al., 2006).

Infecções humanas por *C. pseudotuberculosis* são raras e normalmente ocorrem durante uma exposição ocupacional (WILLIAMSON, 2001), ocorrendo em pastores de ovelhas e trabalhadores de matadouros (BROWN; OLANDER, 1987). A infecção geralmente se manifesta como aumento de volume dos linfonodos axilares ou linfonodos inguinais superficiais, de acordo com a inoculação do membro correspondente (BROWN; OLANDER, 1987). Na maioria dos casos, o tratamento consiste na retirada cirúrgica dos linfonodos afetados, seguido de antibioticoterapia (WILLIAMSON, 2001; ABREU et al., 2008).

A associação da penicilina ou da eritromicina com a rifampicina torna-se a melhor escolha de tratamento, pois a rifampicina é altamente lipossolúvel, conseguindo penetrar nas massas piogranulomatosas. A eritromicina mostrou melhores resultados para o tratamento das infecções em humanos do que a penicilina (WILLIAMSON, 2001).

Granulomas são bastante resistentes a antibioticoterapia devido à presença da cápsula espessa. Para diminuir a probabilidade de recidiva de granulomas externos e para o tratamento de manifestações internas é necessário um período de quatro a seis semanas com antibioticoterapia sistêmica (WILLIAMSON, 2001).

### 3.4 TRANSMISSÃO DA DOENÇA

A principal porta de entrada de *C. pseudotuberculosis*, de acordo com a maioria dos autores, é a pele, decorrente da presença de pequenas feridas e abrasões e tendo a distribuição dos granulomas nas carcaças como indício deste fato (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; BATEY, 1986b; FONTAINE; BAIRD, 2008). Williamson (2001) afirma que o micro-organismo também pode penetrar através das mucosas ou até mesmo da pele intacta.

A ruptura das lesões superficiais é um fator importante para a transmissão da doença (BATEY, 1986b; DORELLA et al., 2006), pois o número de micro-organismos viáveis contidos no material purulento das lesões rompidas está entre  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^7$  por grama de material caseoso (BROWN; OLANDER, 1987). A ruptura desses granulomas causa a contaminação da pele e da lã dos animais, podendo assim gerar a infecção cruzada entre os animais do rebanho, pois o micro-organismo permanece vivo na lã após a supuração (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; FONTAINE; BAIRD, 2008).

Os aparelhos de corte utilizados no tratamento dos animais podem servir para a transmissão da doença, caso não sejam devidamente descontaminados. Feridas superficiais contaminadas ocorridas durante os procedimentos de corte, castração, marcações auriculares e lutas dentro do rebanho, além de eventos traumáticos, também acarretam na propagação da doença (WILLIAMSON, 2001; FONTAINE; BAIRD, 2008).

O procedimento de mergulho dos animais para a eliminação de ectoparasitas é outro fator de risco para a propagação do micro-organismo, pois este consegue permanecer vivo na solução de imersão por um período de 24 horas, sendo esta muitas vezes reutilizada para diversos animais. A transmissão ocorre pela penetração através da pele molhada, mesmo na ausência de feridas superficiais (WILLIAMSON, 2001).

Lesões das amígdalas e em linfonodos retrofaríngeos em caprinos também podem servir como forma de disseminação (BATEY, 1986b). A infecção por *C. pseudotuberculosis* também pode ocorrer através da inalação (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; BROWN; OLANDER, 1987; WILLIAMSON, 2001), evidenciado pela preponderância do comprometimento pulmonar na presença de lesões internas (BROWN; OLANDER, 1987), ou pela ingestão do micro-organismo, que pode penetrar através de lesões na mucosa oral ou ser ingerido (WILLIAMSON, 2001).

A introdução de um animal infectado em um rebanho leva ao aparecimento de granulomas nos animais em um período de dois a três anos, tornando-se muito difícil a erradicação da infecção (AYERS, 1977).

A remoção cirúrgica dos granulomas evita a contaminação do meio ambiente, sendo que o material purulento deve ser coletado em uma luva plástica ou saco e devem ser eliminados através da incineração. O animal deve ser isolado por 30 dias, até a cicatrização completa da lesão, para evitar contaminação cruzada entre os animais (WILLIAMSON, 2001).

*C. pseudotuberculosis* possui a capacidade de sobreviver durante várias semanas no ambiente, contribuindo para a propagação no interior do rebanho (DORELLA et al., 2006). A sobrevivência do micro-organismo é reforçada quando misturado com determinados fômites como madeira, palha e fezes, e em condições de umidade, baixas temperaturas e sombra (WILLIAMSON, 2001).

### 3.5 OS ANTÍGENOS E OS MECANISMOS DE PATOGÊNESE

*C. pseudotuberculosis* produz uma potente exotoxina, conhecida como fosfolipase D (PLD), que tem sido considerada como o maior fator de virulência desse micro-organismo (DORELLA et al., 2006). Ela hidrolisa a esfingomiéline (um dos lipídeos da membrana celular) a fosfato de ceramida e colina, resultando em uma desorganização da membrana suficiente para causar a lise celular (BROWN; OLANDER, 1987). A exotoxina é um importante fator de aumento da permeabilidade vascular (WILLIAMSON, 2001) e a saída de plasma de pequenos vasos sanguíneos no local da infecção aumenta a probabilidade do micro-organismo se espalhar para os nódulos linfáticos regionais (BROWN; OLANDER, 1987).

Segundo alguns autores, a atividade da enzima fosfolipase sobre membranas celulares locais poderia induzir a permeabilidade e facilitar a captação pelos fagócitos e a transferência via sistema linfático. A inflamação em ovinos têm demonstrado o aumento da permeabilidade vascular, do fluxo linfático, dos níveis de prostaglandinas e de polimorfonucleares no linfonodo local, facilitando a dispersão do micro-organismo através dos canais linfáticos (BATEY, 1986b).

A fosfolipase D provoca lesão dermonecrotica, danos e destruição de macrófagos e, em maiores doses, é letal para diferentes espécies de laboratório e animais domésticos (DORELLA et al., 2006).

A PLD é capaz de inibir a hemólise causada pela beta-lisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* (BATEY, 1986b; BROWN; OLANDER, 1987) possivelmente por competitivamente pelo sítio alvo na membrana do eritrócito, visto que as duas toxinas são esfingomielinases (BROWN; OLANDER, 1987).

Quando a fosfolipase D de *C. pseudotuberculosis* age em conjunto com alguns tipos de fosfolipases C, ocorre a chamada hemólise sinérgica. A fosfolipase C causará uma degradação ainda maior da fosfo-ceramida, proveniente da clivagem da esfingomielina pela fosfolipase D (BROWN; OLANDER, 1987).

A quantidade de exotoxina produzida varia entre diferentes linhagens e experimentos evidenciam que a utilização de uma antitoxina é capaz de neutralizar a ação da fosfolipase D (BROWN; OLANDER, 1987), impedido a disseminação de *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, mas sendo incapaz de prevenir o desenvolvimento dos granulomas (DORELLA et al., 2006).

*C. pseudotuberculosis* não produz cápsula como proteção, mas em vez disso desenvolve uma camada de ácido corinemicólico na superfície da parede celular (BAIRD; FONTAINE, 2007) que fornece proteção mecânica e, possivelmente, bioquímica ao micro-organismo (WILLIAMSON, 2001). O alto teor lipídico da parede celular funciona como fator piogênico, além de permitir que ele resista à digestão por enzimas celulares e persista como um parasita intracelular facultativo, resultando assim na formação do granuloma. Além disso, essa camada lipídica possui propriedades tóxicas necrosantes que desempenham um importante papel na patogenicidade (BROWN; OLANDER, 1987; WILLIAMSON, 2001; BAIRD; FONTAINE, 2007).

A toxicidade dos lipídios extraídos da parede celular tem sido demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias. Um estudo realizado em ratos com 25 isolados de *C. pseudotuberculosis* propôs uma relação

direta entre a percentagem de lipídios de superfície com a indução de granulomas (DORELLA et al., 2006).

De acordo com a literatura, a remoção dos lipídios da parede celular não diminui a viabilidade do micro-organismo e a atenuação gerada por repiques sucessivos pode estar relacionada a um estreitamento desta camada lipídica (MOURA-COSTA, 2002).

Ao contrário do ácido micólico quimicamente semelhante de *Mycobacterium tuberculosis*, que é letal em injeção em animais, os lipídios de *C. pseudotuberculosis* são limitados em seus efeitos à citotoxicidade local e não produzem evidências de toxicidade sistêmica nem mesmo em grandes doses aplicadas em cobaias, que seriam altamente suscetíveis ao organismo viável ou à exotoxina (BATEY, 1986b).

É provável que a fosfolipase D e a superfície lipídica da parede celular estejam conjuntamente envolvidas na estimulação da resposta do hospedeiro à infecção intensa, mas qualquer um deles seria suficiente para induzir a inflamação, mesmo que isoladamente (BATEY, 1986b).

O progresso da infecção envolve fagocitose, multiplicação intracelular de *C. pseudotuberculosis* e degeneração celular das células do hospedeiro, constituindo a base das lesões crônicas (BATEY, 1986b).

### 3.6 O ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO

Antígenos não-proteicos podem ser promissores no desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico e vacinas, como evidenciado em estudos realizados com *Mycobacterium tuberculosis*. A estrutura da parede celular das corinebactérias contém ácidos corinemicólicos, peptidoglicanos, glicolipídeos e arabinogalactanos, componentes que apresentam importantes funções imunológicas (HAMASUR et al., 2003; MISHRA et al., 2007; MISHRA et al., 2008). Os glicoconjugados são constituintes da bicamada lipídica das membranas celulares e são formados pela

associação de resíduos de açúcares com proteínas e/ou lipídeos. Os glicoconjugados têm sido alvo de pesquisas pelo fato de serem mediadores da relação dos patógenos intracelulares com as células hospedeiras, sendo importantes para o reconhecimento, adesão, invasão e modulação da resposta imune (ROPERT; GAZZINELI, 2000).

Giraldo e colaboradores (2002) aplicaram uma metodologia de extração de glicoconjugados da superfície de *Toxoplasma gondii*, utilizando essas moléculas para posteriores testes de imunodiagnóstico como ELISA e imunofluorescência. Nos testes com os glicoconjugados, os resultados apresentaram especificidade e capacidade de discriminar entre a fase aguda da infecção e a persistência do protozoário no organismo. Além disso, foram capazes de eliminar resultados falso-positivos, encontrados nos testes comercialmente disponíveis. Este estudo demonstrou que os glicoconjugados são antígenos reconhecidos pelo sistema imune desde a fase aguda das infecções.

Baseando-se nos estudos que evidenciam os potenciais biotecnológicos dos glicoconjugados, Bastos (2011) adaptou a metodologia aplicada por Giraldo e colaboradores (2002), estabelecendo um protocolo de extração que foi utilizado para a avaliação do perfil das moléculas estruturais hidrofóbicas de *C. pseudotuberculosis* de cepas de baixa e alta virulência. Neste experimento foram identificados antígenos promissores para o desenvolvimento de testes de diagnósticos, com moléculas estruturais com reatividade no *immunoblot* e no ELISA indireto. O protocolo de extração das moléculas estruturais hidrofóbicas gera quatro frações de antígenos diferentes: F1, F2, F3 e F4, sendo F3 a fração mais proteica.

### 3.7 ASPECTOS DA RESISTÊNCIA E IMUNIDADE

Após invadir o hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* é fagocitado e sobrevive no interior do macrófago, escapando da destruição mediada pelo sistema imune do indivíduo e gerando uma infecção persistente (FONTAINE; BAIRD, 2008).



A natureza da imunidade protetora foi primeiramente estudada a partir da administração de números variados de *C. pseudotuberculosis* em camundongos, quando se pôde observar a presença de macrófagos maduros e ativados nas lesões durante a eliminação da infecção. A partir desse experimento foi possível concluir que a imunidade celular estava associada com o aparecimento da resistência adquirida (BROWN; OLANDER, 1987).

A imunidade a *C. pseudotuberculosis* parece ocorrer tanto pela resposta humoral quanto mediada por células (MOURA-COSTA et al., 2008). A primeira foi evidenciada pelo efeito protetor de anticorpos após imunização. Já a resposta imunológica mediada por células pôde ser constatada através do surgimento de macrófagos ativados durante infecção e reinfecção (BATEY, 1986b).

A resposta mediada por células (linfócitos e macrófagos) é provavelmente a grande responsável pela eliminação do micro-organismo, fazendo com que a ativação desta resposta seja necessária para suprimir uma infecção recente (WILLIAMSON, 2001).

Em estudo realizado com camundongos, ficou evidenciando a importância de linfócitos T CD 4 e T CD 8 no processo de resistência à infecção, através da produção de interferon- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e da lise de células infectadas. Neste trabalho, a administração de anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-interferon- $\gamma$  e anti-TNF- $\alpha$  levou ao aumento da disseminação de *C. pseudotuberculosis* pelo organismo e, conseqüentemente, o aumento da letalidade da infecção nos murinos (LAN et al., 1998).

No processo de fagocitose, *C. pseudotuberculosis* sobrevive dentro do macrófago. Essa sobrevivência é decorrência da presença da espessa camada lipídica, que impede o processo de digestão pelo macrófago (WILLIAMSON, 2001; BROWN; OLANDER, 1987). Inicia-se então o processo de formação do granuloma, que consiste de um centro necrótico, circundado por uma camada de macrófagos, seguida de uma camada de linfócitos, e por fim, delimitado por uma cápsula de tecido fibroso (PÉPIN et al., 1994). A presença dos granulomas tem como principal função limitar a disseminação do micro-organismo, diminuindo assim a propagação da infecção (BATEY, 1986a).

Diversos estudos investigaram a resposta imune humoral contra *C. pseudotuberculosis*, identificando as frações antigênicas responsáveis pela produção de anticorpos protetores. Ellis e colaboradores (1991) utilizaram proteínas extraídas do sonicado da massa bacteriana de cultura como antígeno em um *western blotting* para a avaliação de soros de ovinos naturalmente infectados. Foi possível identificar a presença de 11 antígenos com pesos moleculares de 20kDa, 22,4kDa, 31,6kDa, 35,5kDa, 36,3kDa, 39,8kDa, 45,7kDa, 56,2kDa, 63,1kDa, 79,4kDa e 100kDa. Quando utilizado o sobrenadante da cultura, 5 antígenos de pesos moleculares de 20kDa, 25,1kDa, 31,6kDa, 39,8kDa e 63,1kDa foram identificados.

Vale e colaboradores (2003) utilizaram extratos obtidos a partir de sonicado de cultura de uma cepa selvagem e uma cepa considerada atenuada (1002) de *C. pseudotuberculosis* como antígeno em *western blotting* com soros de caprinos, comparando-se o padrão de reconhecimento antigênico de animais naturalmente infectados e animais imunizados ao longo de 12 meses. Os dois grupos apresentaram o mesmo padrão de reconhecimento, com a detecção de bandas proteicas com pesos moleculares de 21 kDa, 24 kDa, 28 kDa, 31.5 kDa, 36 kDa, 68 kDa, 72 kDa, 76 kDa e 92 kDa.

Mecanismos de defesa inata são capazes de eliminar infecções precoces, porém, uma infecção estabelecida pode persistir no animal, apesar de uma ativa imunidade humoral e celular (WILLIAMSON, 2001).

Estudos demonstraram que a imunização por uma linhagem atenuada foi capaz de induzir uma resistência efetiva na cavidade peritoneal de camundongos. A infecção metastática do baço por desafio peritoneal em camundongos pôde ser prevenida através da prévia infecção dos mesmos sobre a pele (BATEY, 1986b).

A vacinação de caprinos com exotoxina formalizada, ou seja, com PLD inativa, impediu a propagação de bactérias após desafio experimental (DORELLA et al., 2006). Os anticorpos anti-exotoxina protegem contra danos teciduais e

disseminação do micro-organismo (WILLIAMSON, 2001). Especula-se o efeito protetor causado pela antitoxina (BATEY, 1986b).

As vacinas atualmente disponíveis comercialmente têm como principal função ativar uma resposta humoral, servindo para limitar a disseminação de *C. pseudotuberculosis* ou impedir o estabelecimento de infecção em animais vacinados antes da exposição ao micro-organismo. A vacinação tem se mostrado útil para limitar a propagação de *C. pseudotuberculosis* em rebanhos de ovinos, quando utilizada juntamente com o abate de animais infectados. Vacinas de DNA foram estudadas em ovinos e apresentaram resultados iniciais promissores (WILLIAMSON, 2001).

### 3.8 TESTES DIAGNÓSTICOS PARA LINFADENITE CASEOSA

A cultura bacteriológica é utilizada como padrão ouro para confirmar o diagnóstico de linfadenite caseosa e distinguir *C. pseudotuberculosis* de *Actinomyces pyogenes*, outro micro-organismo responsável pela produção de granulomas. A amostra pode ser obtida através da raspagem do material caseoso proveniente da ruptura do granuloma ou pela aspiração asséptica de um granuloma externo fechado (WILLIAMSON, 2001).

Uma das primeiras tentativas de criar um teste capaz de avaliar a resposta humoral à exotoxina foi realizada através da injeção por via intradérmica de pequenas doses da exotoxina de *C. pseudotuberculosis* em 100 ovelhas com a CLA, mas os resultados foram pouco confiáveis por terem apresentado reações irregulares (BROWN; OLANDER, 1987).

O teste da inibição da anti-beta-hemólise (AHI ou BHI) é realizado adicionando a hemolisina estafilocócica em diluições de soro teste incubadas com uma quantidade determinada de exotoxina. A ocorrência de hemólise irá evidenciar a presença de anticorpos, pois a exotoxina de *C. pseudotuberculosis* não terá como ocupar o sítio

do receptor de membrana do eritrócito e impedir que a hemólise ocorra na presença da beta-lisina (BROWN; OLANDER, 1987).

Outro teste diagnóstico é a inibição da hemólise sinérgica (SHI). Neste teste, são colocados discos de papel filtro contendo o soro teste com uma quantidade padrão da exotoxina de *C. pseudotuberculosis* em placas de ágar sangue com exotoxina de *Rhodococcus equi*. A ocorrência da hemólise em torno do disco é indicativa da ausência de anticorpos. O teste apresenta resultado positivo até mesmo em animais na fase subclínica da doença e possui uma sensibilidade de 98% em caprinos e 96% em ovinos (BROWN; OLANDER, 1987). Títulos a partir de 1:512 são altamente correlacionados a granulomas internos, mas qualquer título superior a 1:4 é sugestivo de exposição e, possivelmente, infecção (WILLIAMSON, 2001).

Um estudo comparativo entre seis antígenos diferentes de *C. pseudotuberculosis* para utilização em diagnóstico por ensaio imunoenzimático (ELISA) concluiu que a detecção de anticorpos para a exotoxina foi o método mais sensível (BROWN; OLANDER, 1987).

Outros testes de ELISA utilizando antígenos somáticos ou secretados por *C. pseudotuberculosis* foram propostos para diagnóstico da linfadenite caseosa. Carminati e colaboradores (2003) desenvolveram um teste de ELISA usando o antígeno secretado pela cultura de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI e determinaram a sensibilidade e a especificidade, respectivamente, de 93,5 e 100 %, em caprinos.

Os anticorpos maternos podem dar um resultado falso-positivo em animais com até seis meses de idade em rebanhos infectados, assim como este mesmo resultado também pode ser encontrado em animais previamente vacinados. Animais com acometimento pulmonar podem ser diagnosticados através de radiografia e aspiração transtraqueal. Granulomas em outras vísceras exigem ultra-sonografia para visualização (WILLIAMSON, 2001).

### 3.9 PREVALÊNCIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA LINFADENITE CASEOSA

Existe uma alta prevalência de linfadenite caseosa nos rebanhos de caprinos do Nordeste do Brasil, resultando em grandes prejuízos nesta área do país, visto que a caprinocultura é uma das principais atividades econômicas dos pequenos criadores da região (RIBEIRO et al., 1988). A doença também é descrita em países de outros continentes onde existe a criação de ovinos e caprinos como na Europa, Oriente Médio, Leste da Austrália, África e nas Américas (FONTAINE; BAIRD, 2008).

A linfadenite caseosa é causa de significativas perdas econômicas em todo o mundo devido à redução de carne, lã e produção de leite, diminuição da eficiência reprodutiva dos animais afetados e condenação de carcaças e peles (DORELLA et al., 2006).

As infecções por *C. pseudotuberculosis* em diferentes partes do mundo podem ter tido uma origem única e podem ter sido disseminadas pelo mundo através da exportação de ovinos por potências coloniais, baseando-se em evidências da relação genotípica muito próxima entre isolados de caprinos e ovinos de diversas partes do mundo (FONTAINE; BAIRD, 2008).

A Austrália possui uma média de prevalência de linfadenite caseosa de 26% em ovinos adultos, enquanto que em matadouros canadenses foi encontrada uma taxa de 25% de animais infectados entre os ovinos abatidos (DORELLA et al., 2006).

Devido à densa cápsula que reveste os granulomas, o controle da doença por meio do uso de antibióticos fica bastante limitada, pois o acesso destes às bactérias viáveis é muito difícil (BROWN; OLANDER, 1987; DORELLA et al., 2006). Dessa forma, as melhores alternativas para o controle da doença são a identificação e a remoção dos animais infectados nos rebanhos e a vacinação dos animais saudáveis (DORELLA et al., 2006).

### 3.10 ANTICORPOS MONOCLONAIS

### **3.10.1 Definição**

Um conceito inicial importante a ser considerado é que cada molécula de anticorpo é específica para um único epítipo. Além disso, cada anticorpo é o produto de um único clone de células B. Assim, um anticorpo de especificidade única, derivado de um único clone de células B, é denominado um anticorpo monoclonal (NELSON et al., 2000).

A tecnologia de produção dos AcM foi desenvolvida em 1975, por Georges Köhler e Cesar Milstein, a partir da imunização de um animal para obtenção de células B produtoras de anticorpos e a posterior fusão destes linfócitos B com uma célula de mieloma, gerando um hibridoma, que é capaz de viver por tempo indeterminado e secretar anticorpos da especificidade desejada (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

### **3.10.2 Produção dos anticorpos monoclonais**

Métodos de conferir imortalidade para as células B têm sido investigados. Com efeito, a imortalidade pode ser realizada por meio de transformação viral (por exemplo, utilizando o vírus Epstein-Barr) ou por fusão com células cancerosas para gerar híbridos ou hibridomas. Em geral, a transformação viral é utilizada para a imortalização de células de sangue periférico e produção de anticorpos monoclonais humanos, enquanto que as células de mieloma são essencialmente utilizadas para a produção de anticorpos monoclonais murinos (NELSON et al., 2000).

Neste último procedimento, camundongos BALB/c são imunizados com um antígeno conhecido ou uma mistura de antígenos conhecidos, juntamente com um adjuvante, age como potenciador não-específico do sistema imune. Os exemplos típicos incluem os adjuvantes completo e incompleto de Freund e Titer-Max<sup>®</sup>. As células de baço dos camundongos são fundidas com uma linhagem celular de mieloma deficiente na enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRT)

(NELSON et al., 2000), usando substâncias que facilitam a fusão das membranas plasmáticas, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG). Essa fusão permite a formação de células híbridas que detêm cromossomos dos dois tipos celulares originais. É importante salientar que o mieloma utilizado não secreta suas próprias imunoglobulinas. É necessário permitir a sobrevivência apenas dos híbridos imortalizados, que serão então cultivados em clones celulares únicos e avaliados quanto à secreção do anticorpo de interesse (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

O meio de seleção contém hipoxantina, aminopterina e timidina e é, portanto, denominado HAT. A maioria das células apresenta duas vias de síntese de purina, a via de novo, que precisa de tetra-hidrofolato, e a via secundária, que usa a enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT). Células de mieloma que não possuem HGPRT são usadas na fusão, e normalmente sobrevivem utilizando a síntese de novo de purina. Na presença de aminopterina, o tetra-hidrofolato não é sintetizado, danificando a síntese de novo de purina e também a biossíntese de pirimidina. As células híbridas recebem HGPRT dos esplenócitos e apresentam a capacidade de proliferação incontrolável do mieloma; caso recebam hipoxantina e timidina, estas células podem sintetizar DNA na ausência de tetra-hidrofolato. Assim, apenas células híbridas sobrevivem no meio HAT (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011, p. 98).

Infelizmente, alguns hibridomas são instáveis. Desta forma, uma atenção meticulosa deve ser dada para o exame visual de hibridomas utilizando um microscópio invertido (NELSON et al., 2000).

Uma etapa de triagem é necessária para identificar e selecionar os hibridomas que produzem anticorpos da especificidade apropriada. É utilizado um sistema de rastreio rápido, como o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), que utiliza o sobrenadante da cultura do hibridoma para testar a reatividade e especificidade do anticorpo. Os hibridomas selecionados passam por um processo de expansão, necessária não só para manter o bem-estar dos hibridomas, mas também para fornecer células suficientes para a criopreservação e sobrenadante para futuras investigações (NELSON et al., 2000).

Antes de qualquer trabalho adicional, é muitas vezes necessária a reclonagem dos hibridomas (por diluição limitante), porque uma cultura original pode conter pelo menos duas populações de células B fundidas. Em consequência desta situação, poderiam ser obtidos resultados ambíguos de anticorpos de diferentes classes, especificidades e afinidades. Por este motivo, a determinação do isotipo serve não só para definir a classe de imunoglobulina murina ou subclasse, mas também ajuda a identificar a presença de um único isotipo, por exemplo, IgG1, ou uma mistura, tal como IgM e IgG2b. Além disso, o conhecimento do isotipo de um anticorpo monoclonal ajudará a ditar a técnica de purificação em coluna mais apropriada, por exemplo, a proteína G para IgG1 (NELSON et al., 2000).

Em última análise, os anticorpos monoclonais são produzidos apenas quando necessário, porque a sua produção é um processo moroso e complexo (NELSON et al., 2000).

### **3.10.3 Anticorpos policlonais versus anticorpos monoclonais**

Após infecção natural ou imunização, o sistema imune recebe um estímulo antigênico responsável pela produção de anticorpos a partir de numerosos clones de células B, com diferentes especificidades e afinidades. Isto é, o imunógeno levará à produção de anticorpos policlonais. Estes detectam uma multiplicidade de epítomos, reconhecendo diferentes regiões de um determinado antígeno ou antígenos diferentes. Isto pode ser importante em certos ensaios em que a detecção de um antígeno seria comprometida pela utilização de um único epítopo (NELSON et al., 2000).

Além disso, o soro policlonal é relativamente simples e barato de produzir, com um curto prazo de produção em comparação com os anticorpos monoclonais. Além disso, o uso de animais maiores, tais como cavalos, cabras e coelhos, permite a recuperação de um grande volume (por exemplo, 60 ml de um coelho) de soro rico em anticorpos. No entanto, caso haja necessidade de uma nova produção destes anticorpos policlonais, podem ocorrer variações na reatividade e na titulação,



fazendo com que o soro policlonal sofra com uma falta de reprodutibilidade. Em contraste, a cultura contínua de hibridomas de células B oferece um fornecimento reprodutível e potencialmente inesgotável de anticorpo com especificidade requintada (NELSON et al., 2000). Sendo assim, anticorpos monoclonais possuem vantagens em relação aos anticorpos policlonais quanto a homogeneidade e consistência, fazendo com que a obtenção de um determinado hibridoma seja uma fonte constante e renovável destes anticorpos. Em contraste, diferentes animais imunizados com um mesmo antígeno apresentam diferenças nos policlonais produzidos, além disso a quantidade destes anticorpos obtidos é limitada pelo tamanho do animal e pelo seu tempo de vida (LIPMAN et al., 2005).

Os anticorpos monoclonais podem ser altamente susceptíveis a pequenas alterações de pH e concentração de sais, enquanto que os policlonais são mais estáveis a variações nestas condições (LIPMAN et al., 2005).

Em geral, os anticorpos IgG monoclonais são preferidos porque são menos propensos a degradação, e podem, potencialmente, ser mais úteis como reagentes terapêuticos (NELSON et al., 2000).

#### **3.10.4 Aplicações dos anticorpos monoclonais**

Os anticorpos monoclonais possuem muitas aplicações práticas na pesquisa e no diagnóstico e na terapia de doenças. Algumas das suas aplicações são:

- a) Identificação de marcadores fenotípicos únicos a determinados tipos celulares. O reconhecimento de populações celulares por meio de anticorpos monoclonais específicos tem sido usado como ferramenta básica para a classificação dos linfócitos e de outros leucócitos. Estes anticorpos têm sido usados na definição dos grupamentos (*clusters*) de diferenciação (CD) de diversos tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Isto também conduziu à sua utilização como marcadores de células ou de tecidos no diagnóstico histopatológico de linfomas. Os anticorpos monoclonais têm

permitido a identificação de moléculas de células previamente desconhecidas (NELSON et al., 2000).

- b) Atividade catalítica: AcM podem ser usados como catalisadores químicos, servindo como uma alternativa enzimática de fácil produção e manipulação, em alguns casos (LERNER; BENKOVIC; SCHULTZ, 1991).
- c) Imunodiagnóstico. O diagnóstico de muitas doenças infecciosas e sistêmicas é baseado na detecção de anticorpos ou antígenos específicos em tecidos ou na circulação, utilizando anticorpos monoclonais em imunoenaios padronizados e seguros (NELSON et al., 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Os anticorpos monoclonais servem como ferramentas poderosas para a investigação de macromoléculas e células, e têm-se revelado eficazes reagentes em termos de especificidade para os testes de diagnóstico clínico (NELSON et al., 2000).
- d) Anticorpos biespecíficos: Várias técnicas têm sido desenvolvidas para preparar anticorpos biespecíficos híbridos com uma larga utilidade, unidos a outros domínios funcionais, tais como toxinas, enzimas ou citocinas, criando assim anticorpos bifuncionais (KRIANKUM et al., 2001).
- e) Detecção de tumores. Neoplasias podem ser detectadas através da utilização de anticorpos monoclonais específicos contra tumores em técnicas de diagnóstico por imagem e coloração de tecidos com imunoglobulinas marcadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). A aplicação de anticorpos monoclonais no diagnóstico histopatológico é muito utilizada, e estas moléculas podem classificar os tecidos e tumores de acordo com a expressão de certos marcadores definidos que refletem um tecido ou gênese celular. Os anticorpos monoclonais têm-se revelado particularmente úteis para a distinção entre lesões morfológicamente semelhantes, tais como entre o mesotelioma e adenocarcinoma. Esta abordagem também é útil na determinação do órgão de origem ou tecido com metástases indiferenciadas. A detecção de metástases ocultas por análise imunocitológica de aspirados de medula óssea e outros tecidos, bem como os nódulos linfáticos, também

provou ser viável com o uso de anticorpos monoclonais. Certos marcadores detectados por anticorpos monoclonais podem fornecer informações sobre o prognóstico em pacientes com câncer (NELSON et al., 2000).

- f) Terapia. Devido à sua grande especificidade, os anticorpos monoclonais podem ser direcionados a células e moléculas identificadas por seu envolvimento na patogênese de muitas doenças. Hoje, diversos anticorpos monoclonais são usados no tratamento de doenças (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Reagentes monoclonais murinos e os seus homólogos humanizados foram usados para o tratamento clínico com vários graus de sucesso. Os anticorpos monoclonais podem também ser úteis para a avaliação da resposta a um tratamento em casos individuais (NELSON et al., 2000).
  
- g) Análise funcional de moléculas secretadas ou ancoradas à superfície celular. Devido à sua capacidade de se ligarem às moléculas de superfície celular e estimularem ou inibirem as funções celulares, os anticorpos monoclonais são utilizados na pesquisa biológica como ferramentas valiosas para a definição dos papéis destas moléculas, incluindo receptores para antígenos. Os anticorpos monoclonais são também muito usados na purificação de populações celulares selecionadas de misturas complexas, facilitando o estudo das propriedades e funções destas células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).
  
- h) Outras aplicações clínicas: Os possíveis usos clínicos dos AcM são variados. Podem ser utilizados em rádio imunoensaio (RIA) e ELISA para mensurar substâncias em fluidos biológicos, como hormônios e toxinas; AcM conjugados a toxinas tem sido usados na remoção de células T da medula óssea antes de transplantes e também tem sido usados em uma variedade de condições imunológicas, tais como artrite reumatóide, rejeição de transplantes e como reagentes antitrombóticos (VALLERA et al., 1983; GLENNIE; JOHNSON, 2000).

### 3.10.5 Limitações no uso dos anticorpos monoclonais

A cultura contínua de hibridomas para a produção de AcM oferece como vantagens um suplemento inesgotável de imunoglobulinas com alta reprodutibilidade e altos títulos. Entretanto, o custo da sua produção, a ocorrência de alguns relatos de toxicidade durante a sua utilização terapêutica e o funcionamento apenas sob determinadas condições, como a preservação dos epítomos a serem reconhecidos pelos anticorpos, ainda são problemas a serem superados (GLENNIE; JOHNSON, 2000).

Um aspecto crucial a se considerar refere-se à caracterização de anticorpos monoclonais em diferentes sistemas de ensaio. Isto é particularmente pertinente para o potencial do anticorpo como um reagente de diagnóstico, pois alguns anticorpos monoclonais apresentam um bom desempenho em alguns sistemas, mas não em outros. Este fenômeno, chamado de ensaio de restrição, tem o intuito de estudar como se relaciona um anticorpo no reconhecimento do seu epítomo alvo no contexto do sistema de ensaio utilizado. Este estudo se torna uma ferramenta relevante, pois um epítomo pode ser mascarado, desnaturado ou torna-se inacessíveis pelo procedimento de imobilização adotado dentro uma determinada técnica (NELSON et al., 2000).

É importante salientar que apesar de um hibridoma ser o produto fundido de uma única célula B e produzir um anticorpo monoclonal de excelente especificidade, este mesmo anticorpo pode apresentar reação cruzada com outros antígenos ou exibir dupla especificidade. Esta consequência surge quando um sítio de combinação de anticorpo reconhece mais de um determinante antigênico, ou por causa de alguma semelhança na forma ou composição química. Além disso, as nuances de um sistema de ensaio também pode enviesar a exposição de um determinante antigênico específico ou epítomo. Por conseguinte, a avaliação rigorosa de um determinado anticorpo monoclonal e o seu epítomo alvo é necessária, a qual pode, portanto, incluir mapeamento de epítomos. Além disso, o mapeamento de epítomos de anticorpos monoclonais, em conjunto com a modelagem molecular pode permitir a visualização e localização de regiões antigênicas principais de uma molécula.

Essas informações podem ajudar a elucidar as relações estrutura-função de proteínas, carboidratos e outras moléculas de relevância clínica (NELSON et al., 2000).

Como anticorpos monoclonais são mais facilmente produzidos por meio da imunização de camundongos, a utilização destas imunoglobulinas em terapias pode acarretar na indução de uma resposta humana antianticorpo de camundongo. Nesta situação, pacientes tratados com anticorpos monoclonais murinos podem sintetizar anticorpos contra as imunoglobulinas destes animais. Estes anticorpos anti-imunoglobulinas eliminam o anticorpo monoclonal administrado, podendo inclusive provocar a doença do soro. Para minimizar essa limitação, técnicas de engenharia genética são usadas para expandir a utilidade dos anticorpos monoclonais ao criar um anticorpo humanizado. Nesta técnica, um gene híbrido é criado ao se “costurar” o DNA complementar (cDNA) que codifica a proteína (Ig) humana do mieloma ao cDNA que codifica as cadeias polipeptídicas do sítio de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal murino. Dessa forma, ao ser expressa, a proteína híbrida resultante possui a especificidade antigênica do anticorpo monoclonal murino original, mas apresenta estrutura central de imunoglobulina humana. Dessa forma, existe uma menor probabilidade destes anticorpos humanizados estimularem uma respostas antianticorpo, quando comparados com os anticorpos monoclonais murinos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi submetido à avaliação e posteriormente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (protocolo 0021/2011).

### 4.1 LINHAGEM DE *C. pseudotuberculosis* E CULTIVO BACTERIANO

As bactérias utilizadas neste trabalho são de uma linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* (VD57), mantida no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do ICS-UFBA. A VD57 é considerada uma cepa de alta virulência devido ao constante desenvolvimento de granulomas em caprinos e ovinos experimentalmente infectados. A bactéria foi cultivada em 500 ml de caldo BHI (*Brain-heart infusion*) a 37°C por 72 h; a massa bacteriana foi recolhida após a centrifugação por 30 min a 10.000 g; três lavagens foram realizadas por ressuspensão em tampão fosfato (PBS).

### 4.2 ANIMAIS

Para a obtenção dos soros padrões foram utilizadas quatro fêmeas de camundongos BALB/c com seis semanas de idade, cedidas pelo biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), unidade Fiocruz de Salvador. Para a obtenção dos esplenócitos foram utilizados dois machos de camundongos BALB/c com seis semanas de idade, cedidos pelo biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para a produção do líquido ascítico, foram utilizados oito camundongos BALB/c com seis semanas de idade, também cedidos pela UEFS. Para obtenção de “*feeder cells*” foi utilizada uma ratazana Wistar com seis semanas de idade, cedida pelo biotério do Laboratório de Neurociências da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

#### 4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO

A massa bacteriana da VD57 foi submetida à extração três vezes com 35 ml de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) por quatro horas sob agitação, seguida de centrifugação a 4.500 g por 40 min a 4°C; O sedimento obtido após a extração foi seco sob gás N<sub>2</sub> e extraído três vezes com 35 ml de solução de butanol a 9% em água, sob agitação por 3 horas, seguida de centrifugação a 4.500 g por 40 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em rotaevaporador até chegar a 8 ml de volume. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando soro albumina bovina como padrão. Este protocolo de extração do antígeno somático hidrofóbico foi realizado a partir das metodologias utilizadas por Giraldo e colaboradores (2002) e Bastos (2011), utilizando-se apenas a fração F3 no final do processo, por se tratar da fração mais proteica.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO

A fração obtida foi submetida ao procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% e 15% com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE); posteriormente, o gel foi corado utilizando-se nitrato de prata. A análise do perfil eletroforético em SDS-PAGE foi conduzida através do software GelAnalyzer v.2010, sendo estabelecidos os pesos moleculares estimados do antígeno somático hidrofóbico, através da comparação com as bandas encontradas no padrão de peso molecular submetido ao mesmo procedimento de SDS-PAGE.

#### 4.5 IMUNIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DOS SOROS PADRÕES

Quatro fêmeas de camundongos BALB/c com seis semanas de idade foram imunizadas subcutâneamente com 50µg de proteínas do antígeno somático hidrofóbico. Na primeira imunização foi utilizado adjuvante completo de Freund (SIGMA). As três imunizações subsequentes foram realizadas com intervalo de 21 dias, utilizando adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). Quatro dias após a quarta imunização, foi coletado o soro policlonal dos quatro camundongos e testados, separadamente, por ELISA indireto.

## 4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

### 4.6.1 Imunização para obtenção dos esplenócitos

Dois machos de camundongos BALB/c com seis semanas de idade foram imunizados subcutâneamente com 50µg de proteínas do antígeno somático hidrofóbico. Na primeira imunização foi utilizado adjuvante completo de Freund (SIGMA). A imunização subsequente foi realizada com intervalo de 10 dias, utilizando adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). Quatro dias após a última imunização, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical para a obtenção dos esplenócitos.

### 4.6.2 Mieloma

Foram utilizadas células mielomatosas da linhagem SP2/0 Ag.14, cultivadas em meio Iscove's com 10% de SFB e 1% de solução de antibiótico.

### 4.6.3 “Feeder cells”



Para obtenção de “feeder cells” foi retirado o timo de uma ratazana Wistar com seis semanas de idade. A ratazana foi eutanasiada e posteriormente submetida à retirada do órgão.

#### 4.6.4 Fusão

Os camundongos imunizados foram eutanasiados por deslocamento cervical e submergidos em álcool iodado. O baço, removido assepticamente, foi transferido para uma placa de Petri contendo uma solução PBS estéril. O órgão foi divulsionado em pequenos pedaços e macerado suavemente para liberação de células. As células foram lavadas três vezes com PBS estéril, centrifugadas a 1400 RPM por 5 min, a temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, as células foram ressuspensas e determinado o número de células e sua viabilidade, utilizando a coloração por exclusão de Azul Tripán 0,5% em câmara de Neubauer.

As células mielomatosas da linhagem SP2/0, utilizadas na etapa de fusão celular, encontravam-se em crescimento exponencial. Para isso, 24 horas antes, a monocamada celular foi ressuspensa com suaves golpes (sem usar tripsina) e realizou-se uma nova passagem em frascos de 250 cm<sup>3</sup> (NUNC) com meio de crescimento Iscove's modificado (SIGMA) a uma concentração de soro fetal bovino (SFB, SIGMA) de 20% e incubado em estufa a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, as células SP2/0 foram ressuspensas suavemente, centrifugadas a 1400 RPM por 5 min, a temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, foram realizadas duas lavagens, obedecendo ao mesmo procedimento de centrifugação, utilizando-se meio Iscove's sem SFB. Em seguida, as células foram ressuspensas e determinado o número de células e sua viabilidade, utilizando a coloração por exclusão de Azul Tripán 0,5% em câmara de Neubauer.

Os esplenócitos foram ajustados para um total de  $324 \times 10^6$  e as células SP2/0 para  $40,8 \times 10^6$ , em uma relação aproximada de 8:1, e colocadas em um mesmo tubo falcon de 50 ml em Meio Iscove's modificado, sem SFB, e centrifugadas a 1500 RPM por 5 min, tendo o sobrenadante removido. 1 ml da solução de polietilenoglicol

(PEG) (SIGMA), previamente aquecida a 37°C em banho-maria, foi adicionada homogeneizando-se de forma contínua durante 1 minuto com suaves golpes, com o tubo estéril submerso em banho térmico a 37°C. Em seguida, foram adicionados 20ml do meio Iscove's sem SFB, também homogeneizando-se de forma contínua durante 10 minutos com suaves golpes. A seguir, foi realizada uma centrifugação a 1500 RPM por 5 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas, suavemente, em meio Iscove's modificado (SIGMA) com 20% de SFB e 1% de solução de antibiótico contendo gentamicina e estreptomicina, após o que foram adicionadas  $40 \times 10^6$  células de timo de ratazana jovem, com o objetivo de funcionar como "feeder cells". A suspensão foi então estabelecida em 40ml de meio Iscove's com 20% de SFB e 1% de solução de antibiótico, e em seguida realizado o plaqueamento, colocando-se 100 µl da suspensão em cada poço de uma placa de microcultivo de 96 poços, obtendo-se  $1,012 \times 10^6$  células por poço. Foram utilizadas 4 placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e após 24h foi acrescido 100 µl do meio Iscove's com 20% de SFB, 1% de solução de antibiótico, 1% da solução contendo HAT (aminopterin, hipoxantina e timidina) (SIGMA) e acrescido de glutamina.

#### **4.6.5 Seleção dos hibridomas**

As células foram monitoradas diariamente utilizando microscópio invertido, trocando-se parcialmente o meio de cultura a cada 48 ou 72 horas, como necessário, utilizando o meio suplementado com HAT. Depois de evidenciado o crescimento de clones e morte das células não híbridas, o meio Iscove's HAT foi recolhido para iniciar o processo de triagem dos poços contendo hibridomas positivos para a produção de anticorpos contra o antígeno utilizado nas imunizações dos camundongos. Esta triagem foi realizada por meio de um teste de ELISA indireto. A partir de então, o meio Iscove's HAT foi sendo substituído gradativamente pelo meio Iscove's contendo 10% de SFB, 1% de solução de antibiótico, 1% da solução contendo HT (hipoxantina e timidina) (SIGMA) e acrescido de glutamina. O teste de ELISA indireto foi repetido semanalmente a fim de acompanhar o nível de produção de anticorpos pelos hibridomas. À medida que as células se expandiam, o meio

Iscove's HT foi sendo substituído gradativamente pelo meio Iscove's contendo apenas 10% SFB, 1% de solução de antibiótico e acrescido de glutamina.

#### **4.6.6 Clonagem e expansão dos hibridomas**

Os poços contendo células híbridas produtoras de anticorpos, detectadas no teste de ELISA indireto, tiveram seus conteúdos ressuspensos e retirados, os que foram diluídos de forma sucessiva para limitar a quantidade de células cultivadas por poço das placas de 96 poços. Os poços foram testados por ELISA indireto para a avaliação do nível de anticorpo produzido e seleção dos poços a serem expandidos. As células foram então ressuspensas e transferidas para placas de cultura de 24 poços e por fim para placas de 6 poços, a fim de expandir os hibridomas produtores de anticorpos específicos.

#### **4.6.7 Produção de líquido ascítico**

Os clones positivos no teste de ELISA e transferidos para expansão em placas de 24 e 06 poços foram coletados, centrifugados, ressuspensos em PBS estéril e injetados intraperitonealmente em camundongos BALB/c, dois camundongos para cada clone. Estes foram injetados, também intraperitonealmente, uma semana antes, com adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). Os camundongos foram avaliados diariamente até ser observada produção acentuada de ascite. O líquido ascítico produzido foi coletado diariamente durante uma semana ou pelo tempo que o camundongo resistisse. Após o período de uma semana, os camundongos que ainda estavam vivos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

#### **4.6.8 Titulação dos líquidos ascíticos**

Os líquidos ascíticos produzidos foram titulados por teste de ELISA indireto, utilizando-se as seguintes diluições: 1:50, 1:100, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000. Os controles negativo e positivo também foram testados para as mesmas diluições.

#### 4.7 TESTES DE ANTIGENICIDADE DO ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO

##### 4.7.1 Teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para soros padrões

O teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para soros padrões foi padronizado durante os experimentos deste trabalho. Foi estabelecido o seguinte protocolo: Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com antígeno somático hidrofóbico diluído em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,8), com uma concentração de 2µg de antígeno somático hidrofóbico por poço, diluído em 100µl do tampão. As placas foram incubadas a 4° C em câmara fria, *overnight*. Após descarte da solução de sensibilização, as placas foram lavadas 2 vezes com tampão salino fosfato (pH 7,2 – 7,4) acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T 0,05%) e bloqueadas com 200µl de uma solução de leite em pó desnatado (MOLICO – NESTLÉ) a 5%, diluído em PBS-T 0,05%, por 2 horas a 37°C. Após descarte da solução de bloqueio, as placas foram lavadas uma vez. Então, foram adicionados aos poços, 50µl de soros diluídos a 1:25 em PBS-T 0,05% com 1% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após descarte dos sobrenadantes, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T 0,05%. Em seguida, foi adicionado 50µl do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, diluído na proporção de 1:5.000 em PBS-T 0,05% com 1% de leite em pó desnatado, incubando-se por mais 1h a 37° C. Após 5 lavagens com PBS-T 0,05%, 50µl do substrato TMB foi adicionado e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, em local escuro. Foi então adicionado 25µl de solução de parada (ácido sulfúrico 4N) e realizada a leitura da densidade óptica em filtro de 490 nm em leitor de ELISA. Como controle positivo do teste foi utilizado um pool de soros de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por C.

*pseudotuberculosis*. Como controle negativo foi utilizado um pool de soros de camundongos sadios, não infectados por *C. pseudotuberculosis*.

#### **4.7.2 Teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para sobrenadante de cultura (IgG)**

O teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para sobrenadante de cultura (IgG) foi realizado com modificações do protocolo já estabelecido pelo Laboratório de Virologia da UFBA para sobrenadante de cultura, sendo estabelecido o seguinte protocolo: Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com antígeno somático hidrofóbico diluído em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,8), com uma concentração de 4µg de antígeno por poço, diluído em 100µl do tampão. As placas foram incubadas a 4° C em câmara fria, *overnight*. Após descarte da solução de sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão salino fosfato (pH 7,2 – 7,4) acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T 0,05%) e bloqueadas com 300µl de uma solução de leite em pó desnatado (MOLICO – NESTLÉ) a 5%, diluído em PBS-T 0,05%, por 2 horas a 37°C. Após descarte da solução de bloqueio, foram adicionados aos poços, 100µl dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas selecionados (sem diluição) e os controles (negativo e positivo) foram diluídos em PBS-T 0,05% com 0,5% de leite em pó desnatado, na proporção de 1:50. As placas foram incubadas em câmara fria a 4° C, *overnight*. Após descarte dos sobrenadantes, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-T 0,05% e mais uma vez com PBS. Em seguida, foi adicionado 50µl do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, diluído na proporção de 1:5.000 em PBS-T 0,05% com 0,5% de leite em pó desnatado (SIGMA CHEMICAL CO), incubando-se por mais 1h a 37° C. Após 2 lavagens com PBS-T 0,05% e mais uma lavagem com PBS, 100µl do substrato TMB foi adicionado e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, em local escuro. A leitura da densidade óptica foi realizada em filtro de 630 nm em leitor de ELISA. Como controle positivo do teste foi utilizado o pool com os soros dos quatro camundongos BALB/c imunizados com o antígeno somático hidrofóbico. Foram utilizados dois controles negativos: um pool com os soros de dois camundongos BALB/c não imunizados e o meio Iscove's puro.

#### 4.7.3 Teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para sobrenadante de cultura (IgM)

O teste ELISA com antígeno somático hidrofóbico para sobrenadante de cultura (IgM) foi realizado com modificações do protocolo já estabelecido pelo Laboratório de Virologia da UFBA para sobrenadante de cultura, sendo estabelecido o seguinte protocolo: Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com antígeno somático hidrofóbico diluído em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,8), com uma concentração de 4µg de antígeno por poço, diluído em 100µl do tampão. As placas foram incubadas a 4° C em câmara fria, *overnight*. Após descarte da solução de sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão salino fosfato (pH 7,2 – 7,4) acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T 0,05%) e bloqueadas com 300µl de uma solução de leite em pó desnatado (MOLICO – NESTLÉ) a 5%, diluído em PBS-T 0,05%, por 2 horas a 37°C. Após descarte da solução de bloqueio, foram adicionados aos poços, 100µl dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas selecionados (sem diluição) e os controles (negativo e positivo) foram diluídos em PBS-T 0,05% com 0,5% de leite em pó desnatado, na proporção de 1:50. As placas foram incubadas em câmara fria a 4° C, *overnight*. Após descarte dos sobrenadantes, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-T 0,05% e mais uma vez com PBS. Em seguida, foi adicionado 100µl do anticorpo anti-IgM de camundongo biotilado, diluído na proporção de 1:4.000 em PBS-T 0,05% com 0,5% de leite em pó desnatado, incubando-se por mais 1h a 37° C. Após 2 lavagens com PBS-T 0,05% e mais uma lavagem com PBS, foi adicionado 100µl/poço de Streptavidina-peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS-T 0,05% com 0,5% de leite em pó desnatado, incubando-se por 1h a 37°C. Em seguidas, foram realizadas 2 lavagens com PBS-T 0,05% e mais uma lavagem com PBS. 100µl/poço do substrato TMB foi adicionado e a placa incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, em local escuro. A leitura da densidade óptica foi realizada em filtro de 630 nm em leitor de ELISA. Como controle positivo do teste foi utilizado o pool com os soros dos quatro camundongos BALB/c imunizados com o antígeno somático hidrofóbico. Foram

utilizados dois controles negativos: um pool com os soros de dois camundongos BALB/c não imunizados e o meio Iscove's puro.

#### **4.7.4 Western blotting (SDS-PAGE a 12,5%)**

Os líquidos ascíticos induzidos pelos clones foram testados em *Western blotting*, usando o antígeno somático hidrofóbico. O antígeno somático hidrofóbico foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% durante 2,5 horas, a 100 volts, com 30µg do antígeno em cada poço de corrida. Em seguida, as proteínas somáticas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando uma cuba de transferência com tampão Glicina 192 mM, Tris 25 mM e Metanol 20%, durante 1 hora, a 100 volts. Para a verificação da eficácia da eletrotransferência, foi realizada a coloração com vermelho de Ponceau 10%. A membrana foi bloqueada com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora. Após este período, tiras da membrana foram incubadas com os mencionados líquidos ascíticos diluídos em PBS-T com 0,5% de leite em pó desnatado (as diluições dependeram das titulações encontradas no teste de ELISA), em temperatura ambiente, *overnight*. Em seguida, as fitas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (10 minutos para cada lavagem) e incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, diluído na proporção de 1:1.000 em PBS-T com 0,5% de leite em pó desnatado, incubando-se por mais 1h a 37° C. Posteriormente, foram feitas novas lavagens com PBS-T e 1 lavagem final com PBS. A revelação da reação foi realizada com uma solução com 3'3' Diaminobenzidine (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio (0,001%). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada e as membranas foram secas e fotografadas. Como controle positivo do teste foi utilizado o pool com os soros dos quatro camundongos BALB/c imunizados com o antígeno somático hidrofóbico. Para o controle negativo foi utilizado um pool com os soros de dois camundongos BALB/c não imunizados.

#### **4.7.5 Western blotting (SDS-PAGE a 15%)**

O antígeno somáticos hidrofóbico foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% durante 2,5 horas, a 100 volts, com 30µg do antígeno em cada poço de corrida. Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando uma cuba de transferência com tampão Glicina 192 mM, Tris 25 mM e Metanol 20%, durante 1 hora, a 100 volts. Para a verificação da eficácia da eletrotransferência, foi realizada coloração com vermelho de Ponceau 10%. A membrana foi bloqueada com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado, em câmara fria a 4°C, *overnight*. Após este período, tiras da membrana foram incubadas com os líquidos ascíticos diluídos em PBS-T com 1% de leite em pó desnatado em uma proporção de 1:100 (mesma diluição utilizada para os controles positivos e negativos), à 37°C, por 3 horas. Em seguida, as fitas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, diluído na proporção de 1:250 em PBS-T com 1% de leite em pó desnatado, incubando-se por mais 1h a 37° C. Posteriormente, foram feitas novas lavagens com PBS-T e 1 lavagem final com PBS. A revelação foi conduzida com cromógeno 4-cloro-1-naftol adicionado de substrato peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada e as membranas foram secas e fotografadas. Como controle positivo do teste foi utilizado o pool com os soros dos quatro camundongos BALB/c imunizados com o antígeno somático hidrofóbico. Para o controle negativo foi utilizado um pool com os soros de dois camundongos BALB/c não imunizados.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOMÁTICO HIDROFÓBICO E DOSAGEM PROTEICA

O antígeno foi preparado de acordo com a metodologia de extração de componentes somáticos hidrofóbicos, descrita anteriormente. Após a aplicação do método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), a concentração proteica foi estabelecida em 10,7 µg/µl.

### 5.2 PERFIL ELETROFORÉTICO

Após a aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5% e a 15%, foi possível traçar o perfil eletroforético do antígeno somático. A figura 3 apresenta o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12,5%, onde é possível visualizar predominantemente a presença de moléculas de pesos estimados em 130 kDa, 112 kDa, 98 kDa, 80 kDa, 67 kDa, 56 kDa, 46 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 25 kDa, 20 kDa e 19 kDa.

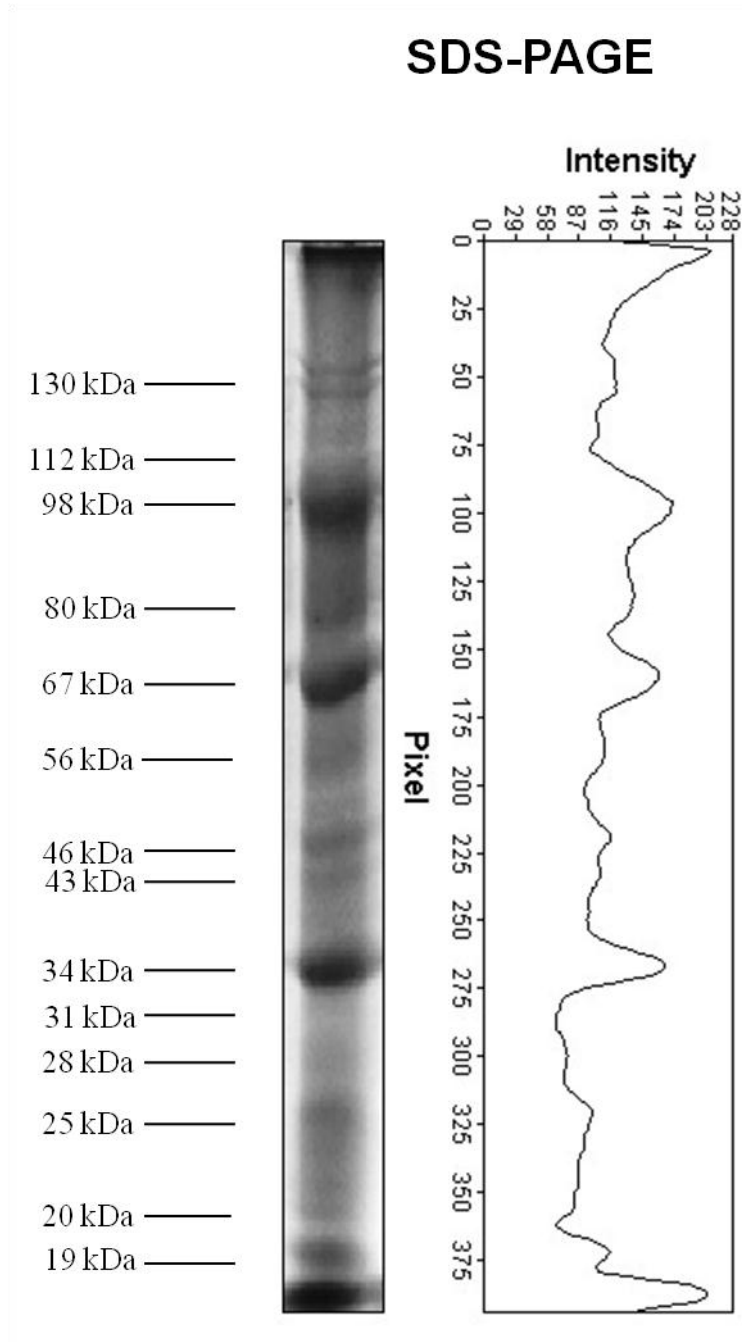


Figura 3: Perfil eletroforético após a aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%

A figura 4 apresenta o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15%, onde é possível visualizar predominantemente a presença de moléculas de pesos estimados em 86 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 46 kDa, 39 kDa, 31 kDa, 27 kDa, 25 kDa, 23 kDa, 21 kDa, 20 kDa, 19 kDa e 18 kDa.

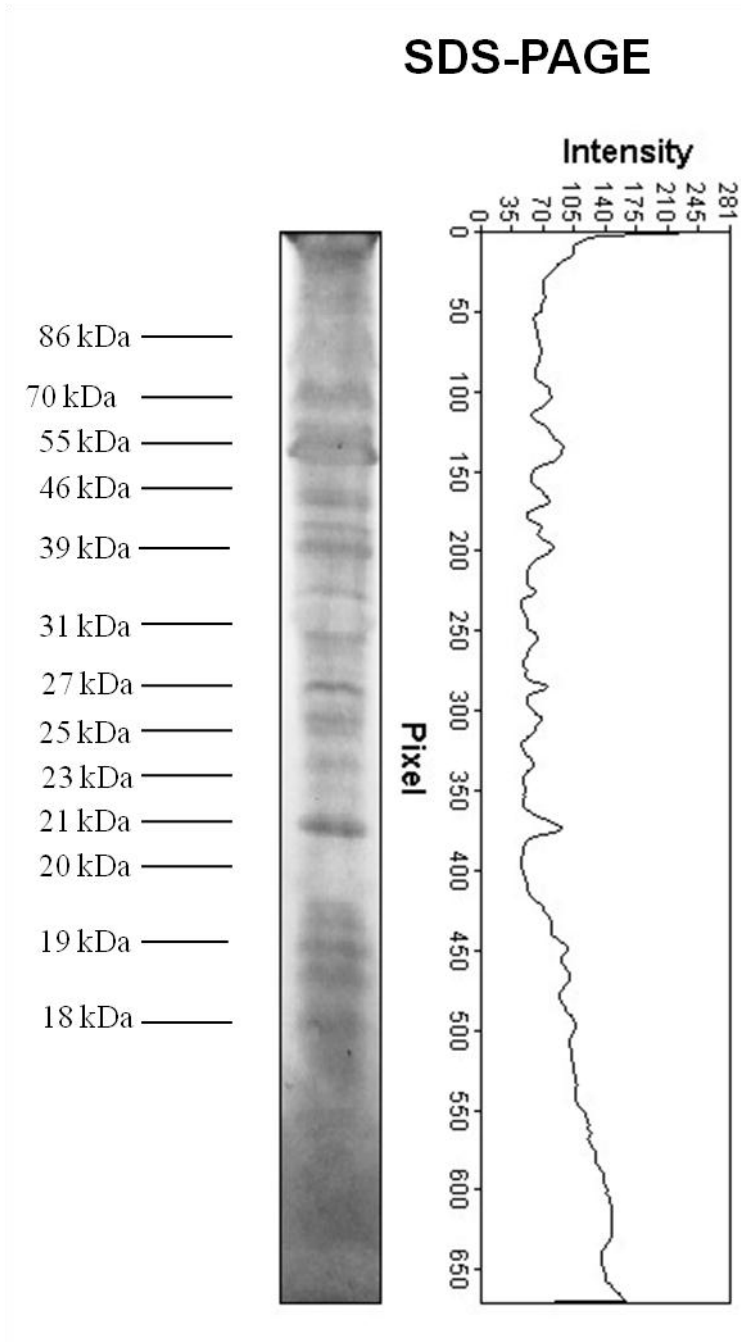


Figura 4: Perfil eletroforético após a aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%

### 5.3 OBTENÇÃO DOS SOROS PADRÕES

A partir de quatro camundongos BALB/c imunizados com a fração somática hidrofóbica, foi possível a obtenção de soro policlonal destes animais. O gráfico 1

apresenta os valores de densidade ótica (D.O.) encontrados nos soros dos camundongos após a realização de teste de ELISA indireto.

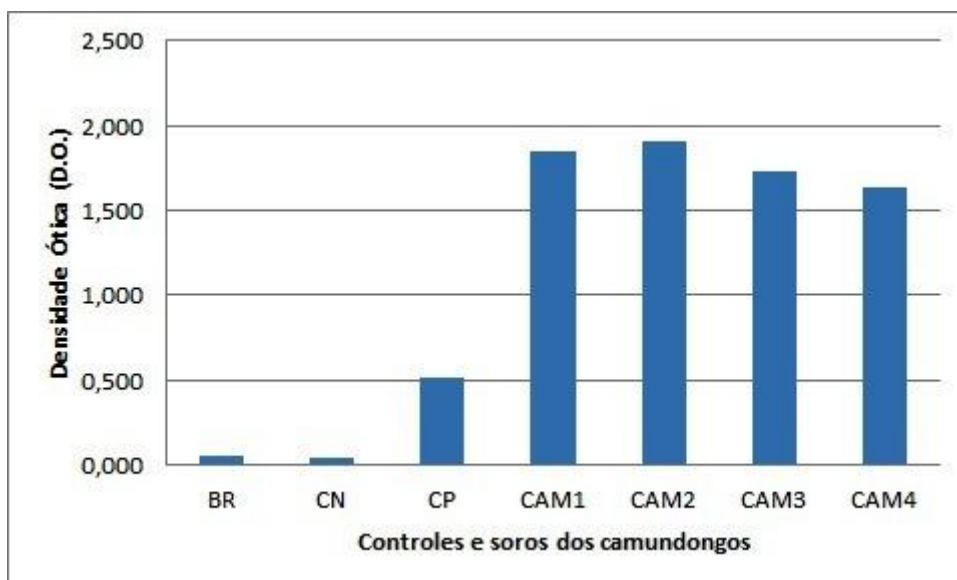


Gráfico 1: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos quatro camundongos imunizados com a fração somática hidrofóbica. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. CAM1 = camundongo 1. CAM2 = camundongo 2. CAM3 = camundongo 3. CAM4 = camundongo 4.

Como os quatro soros apresentaram altos valores de D.O., optou-se por fazer um *pool*, que foi utilizado posteriormente como controle positivo para os testes de triagem do ELISA indireto e *western blotting*. Como controle negativo, foi utilizado um *pool* com os soros de dois camundongos BALB/c não imunizados.

## 5.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

### 5.4.1 Seleção dos hibridomas

Após 17 dias de ação do meio seletivo Iscove's contendo HAT, foi possível visualizar a presença de clones em 71 dos 384 poços contendo células provenientes da fusão. Os 71 poços contendo clones foram testados por ELISA indireto para IgG e IgM. Para IgG, foram considerados positivos aqueles que apresentaram resultados de

absorbância superiores a 0,5. Para IgM, devido ao alto valor do controle negativo, foram considerados positivos valores de absorbância superiores a 2,0.

Os gráficos 2, 3 e 4 representam os valores de densidade ótica (D.O.) encontrados nos poços testados pelo ELISA indireto para detecção de IgG (os valores foram apresentados em três gráficos com escalas diferentes para melhor visualização dos resultados). A D.O. do poço 2-4C ultrapassou o limite máximo medido pelo espectrofotômetro, tendo o seu valor representado pela máxima leitura encontrada nesse trabalho (3,423).

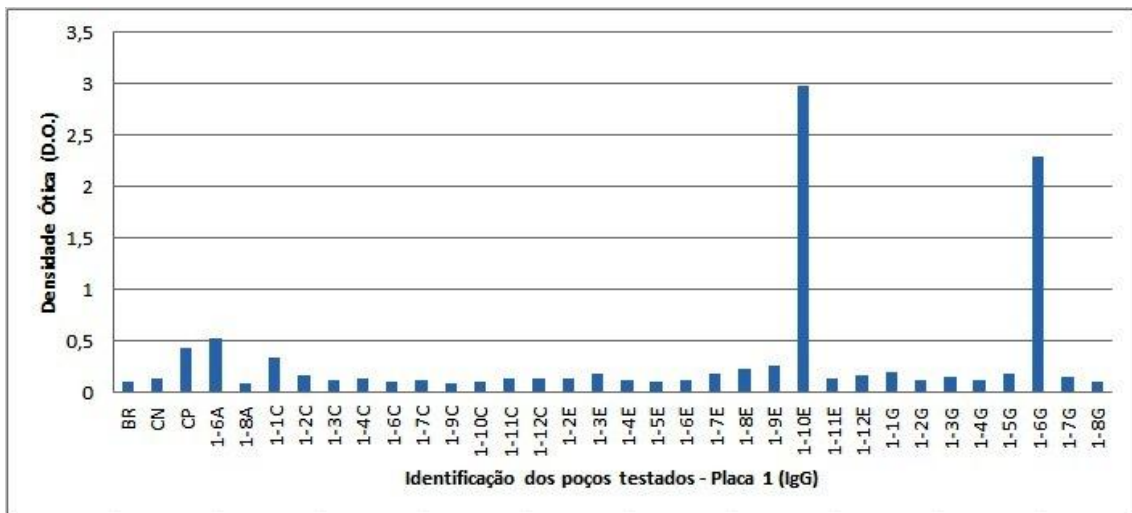


Gráfico 2: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 1 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.

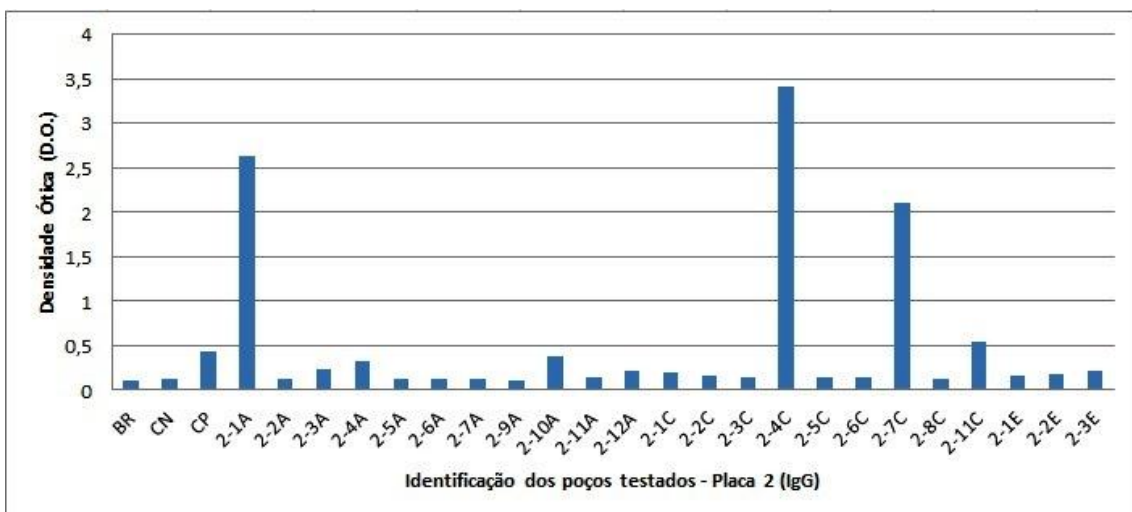


Gráfico 3: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 2 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.

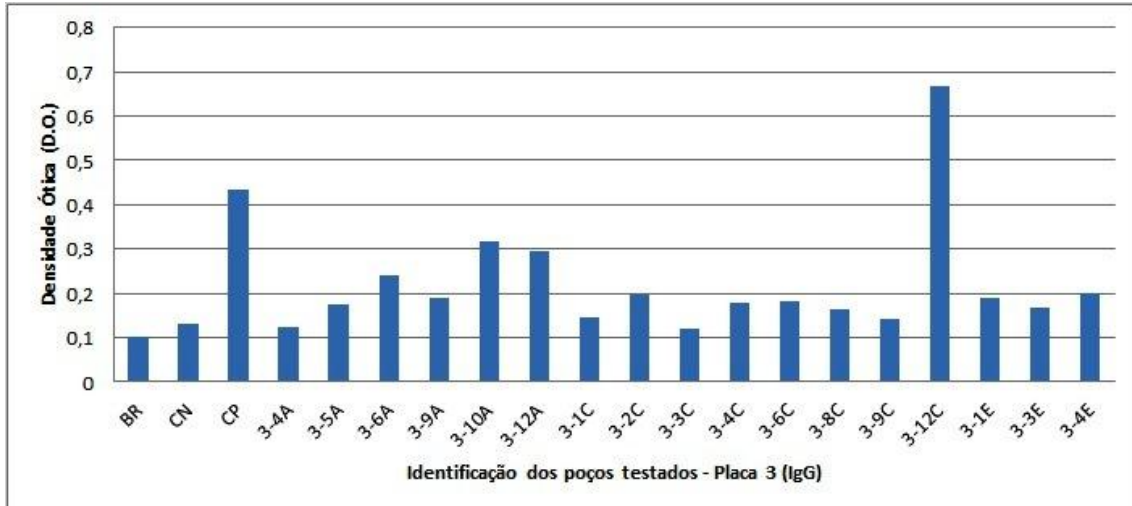


Gráfico 4: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 3 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.

Dos 71 poços testados pelo ELISA indireto para detecção de IgG, 8 apresentaram valores de D.O. superiores a 0,5 e foram considerados positivos.

Os gráficos 5, 6 e 7 representam os valores de D.O. encontrados nos poços testados pelo ELISA indireto para detecção de IgM (os valores foram apresentados em três gráficos com escalas diferentes para melhor visualização dos resultados). A D.O. do poço 1-1C ultrapassou o limite máximo medido pelo espectrofotômetro, tendo o seu valor representado pela máxima leitura encontrada nesse trabalho (3,423).

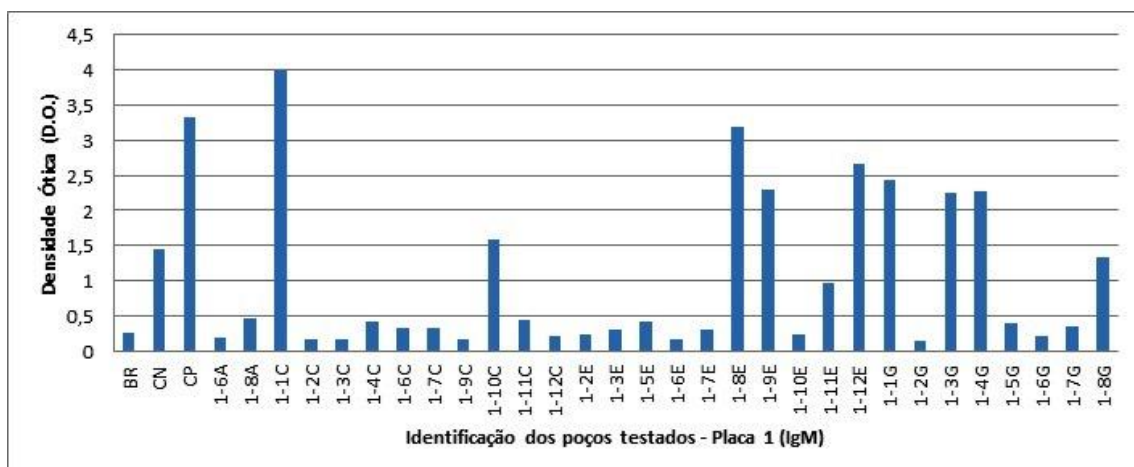


Gráfico 5: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgM nos poços da placa 1 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.

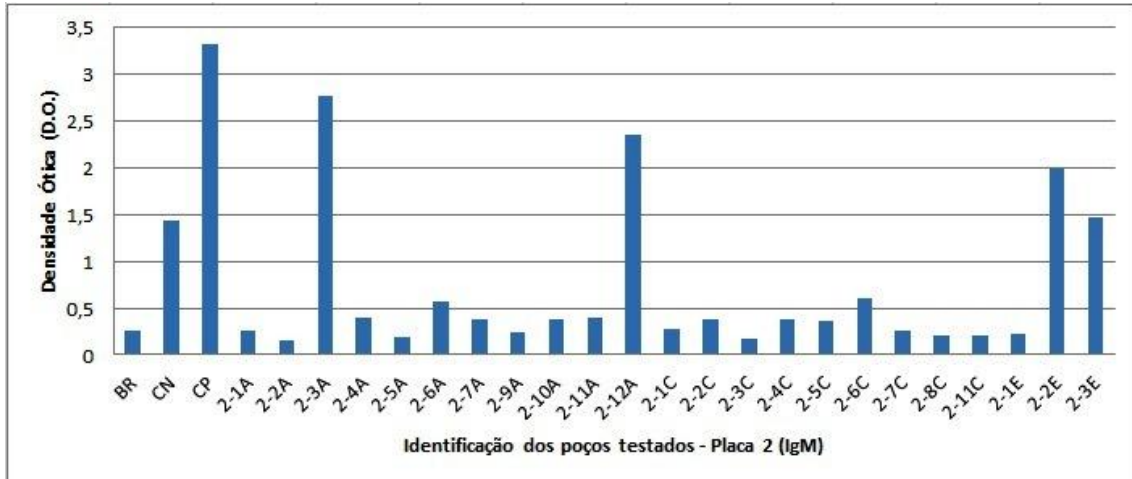


Gráfico 6: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgM nos poços da placa 2 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.

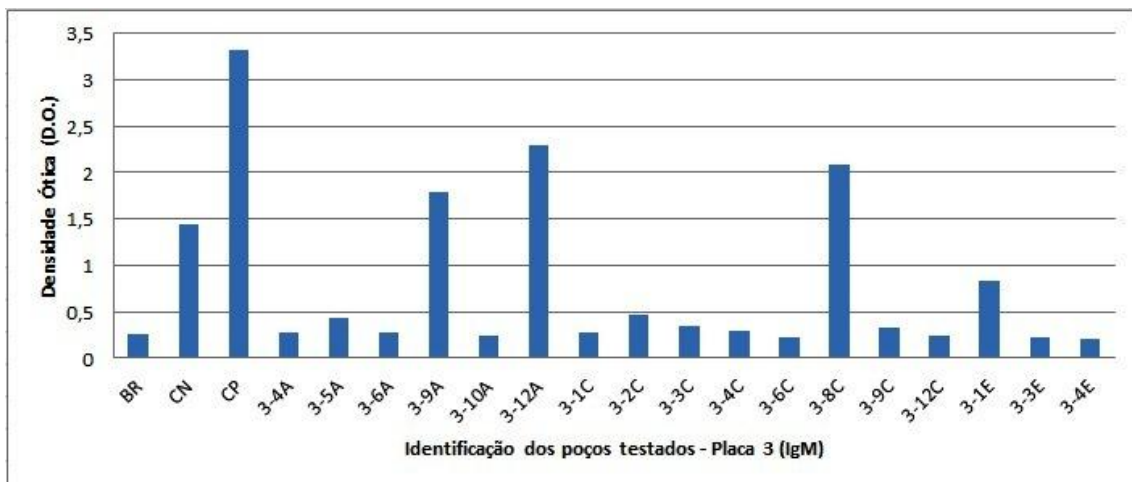


Gráfico 7: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgM nos poços da placa 3 de cultura de células provenientes da fusão. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo.

Dos 71 poços testados pelo ELISA indireto para detecção de IgM, 11 apresentaram valores de D.O. superiores a 2,0 e foram considerados positivos.

#### 5.4.2 Clonagem e expansão dos hibridomas

Após a triagem pelo teste de ELISA para a identificação dos poços contendo células híbridas positivas, foi possível selecionar cinco poços para a realização da clonagem. Para a escolha destes poços foram usados dois critérios de seleção: maiores leituras de D. O. e aspectos físicos que indicassem integridade dos clones e

viabilidade das células. Foram selecionados os seguintes poços: 1-6G, 1-10E, 2-4C, 2-11C e 3-12C. Os conteúdos dos poços foram ressuspensos e submetidos a diluições sucessivas. Os híbridos foram submetidos a constantes testes de ELISA para acompanhamento dos níveis de anticorpos produzidos.

Oito dias após as células serem submetidas ao processo de clonagem, foi realizado teste de ELISA nos poços em que as células já apresentavam crescimento considerável, podendo apresentar níveis detectáveis de anticorpos no sobrenadante. Os gráficos 8, 9 e 10 representam os valores de D. O. encontrados nos poços testados para ELISA indireto para detecção de IgG (os valores foram apresentados em três gráficos com escalas diferentes para melhor visualização dos resultados).

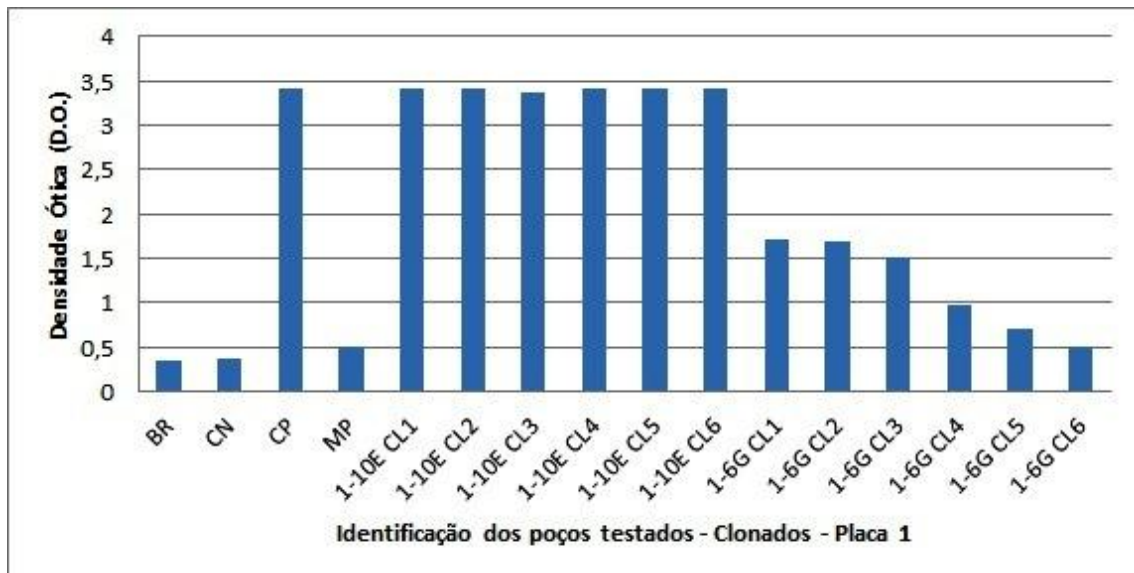


Gráfico 8: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 1 de cultura de células provenientes da clonagem dos híbridos. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.



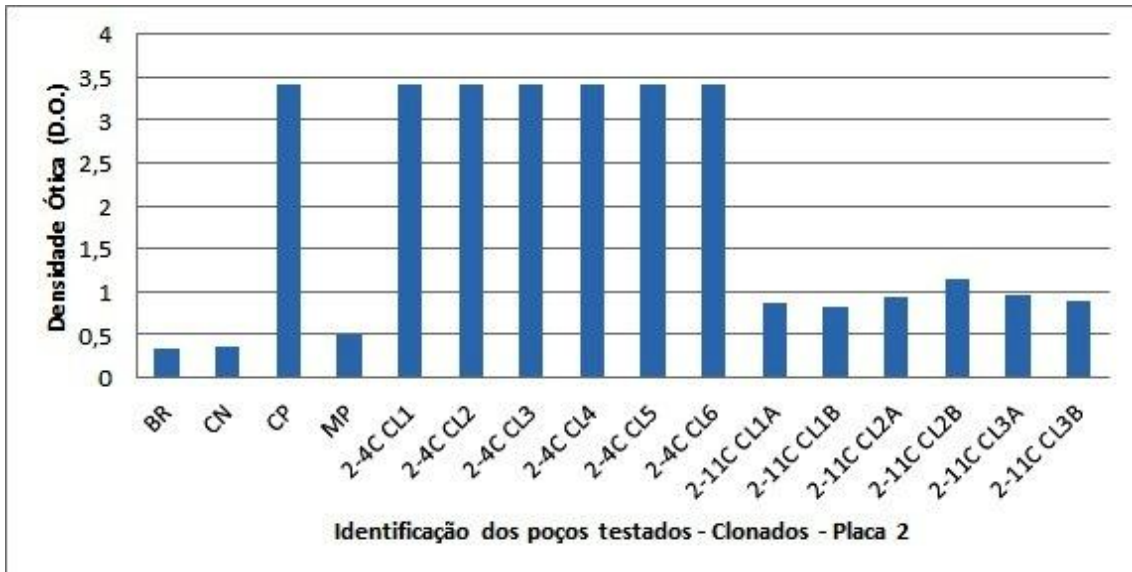


Gráfico 9: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 2 de cultura de células provenientes da clonagem dos híbridos. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

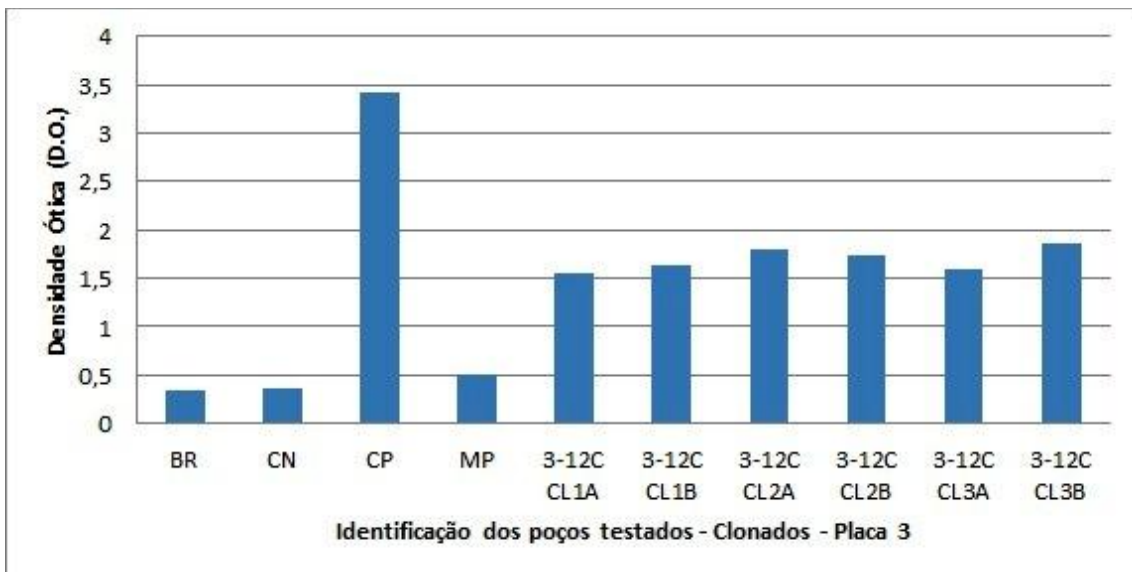


Gráfico 10: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços da placa 3 de cultura de células provenientes da clonagem dos híbridos. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

Quinze dias após as células serem submetidas ao processo de clonagem, foi realizado um novo teste de ELISA nos poços em que as células já apresentavam crescimento considerável. Os gráficos 11, 12, 13, 14 e 15 representam os valores de D. O. encontrados nos poços testados para ELISA indireto para detecção de IgG (os valores foram apresentados em cinco gráficos com escalas diferentes para melhor visualização dos resultados).

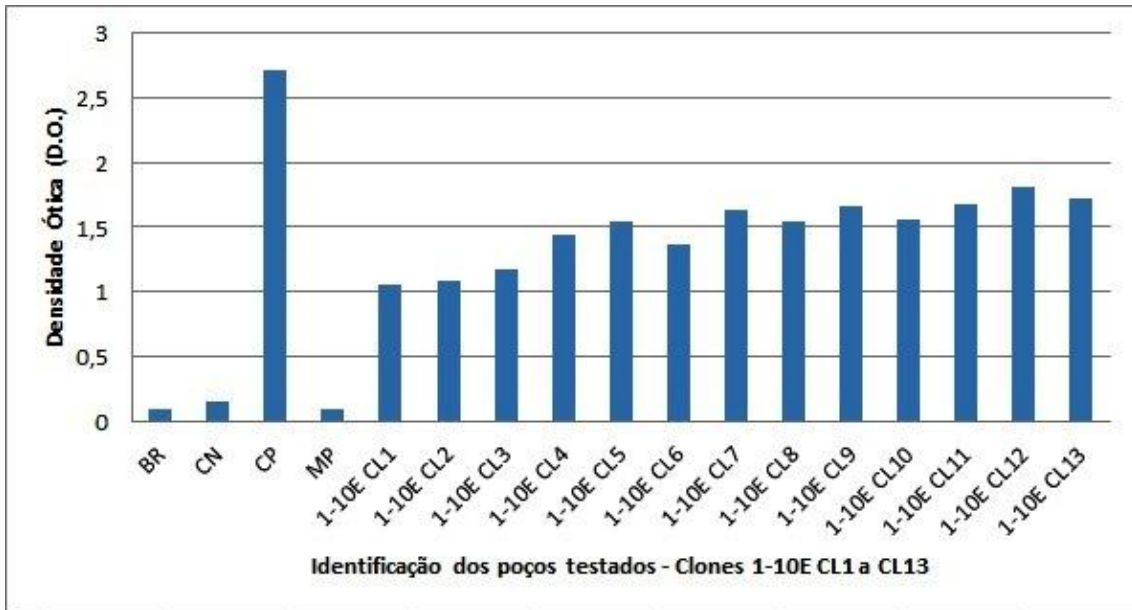


Gráfico 11: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 1-10E. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

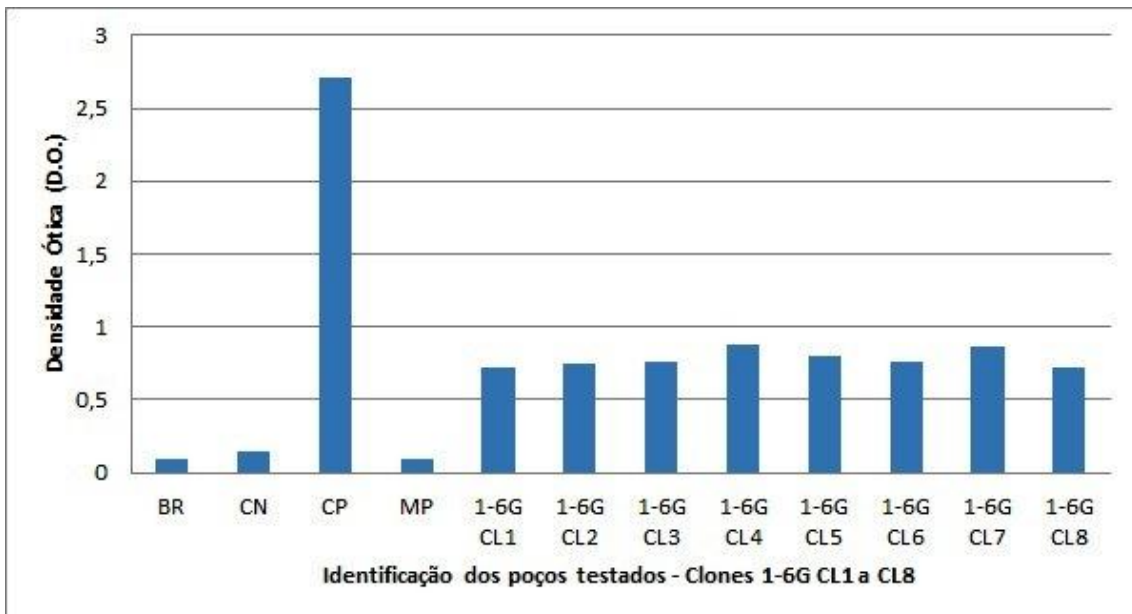


Gráfico 12: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 1-6G. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

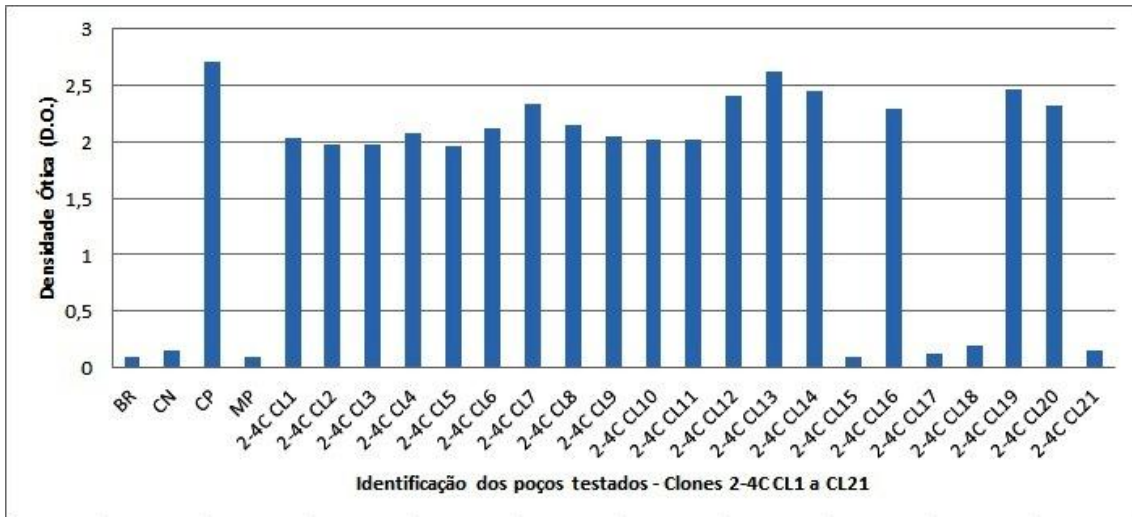


Gráfico 13: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 2-4C. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

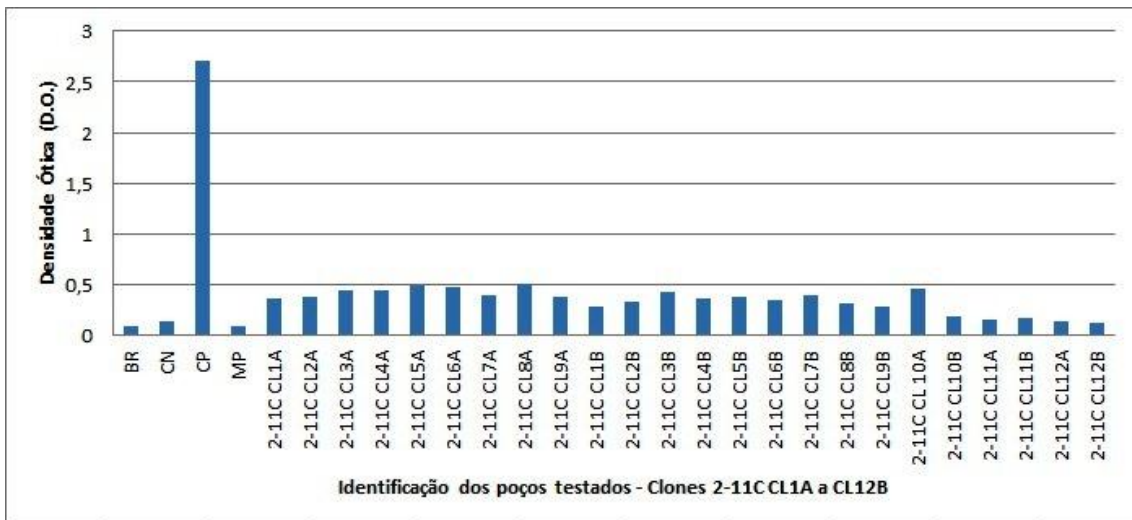


Gráfico 14: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 2-11C. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

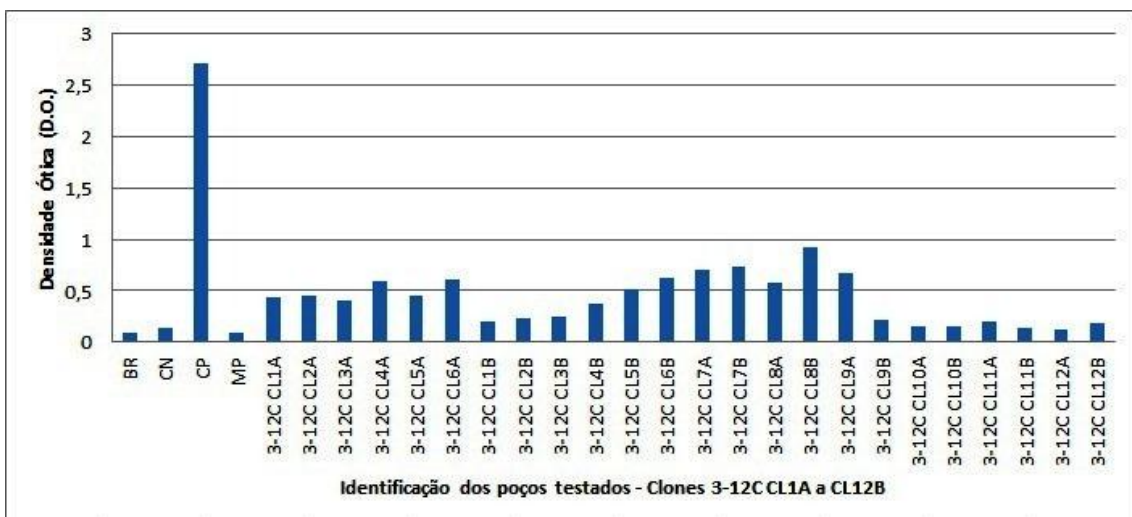


Gráfico 15: Densidades óticas (D.O.) encontradas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG nos poços de clonagem provenientes do híbrido inicial 3-12C. BR = Branco. CN = Controle negativo. CP = Controle positivo. MP = Meio Iscove's puro.

### 5.4.3 Produção e titulação do líquido ascítico

Após as sucessivas diluições realizadas com as células híbridas, apenas quatro apresentavam resultados positivos no ELISA. Dessa forma, as diluições provenientes do poço 2-11C foram descartadas. Das células híbridas restantes, foram selecionadas para a produção de líquido ascítico as diluições que apresentaram melhor resultado no ELISA e aspectos físicos que indicassem integridade dos clones e viabilidade das células, sendo elas: 1-6G CL10, 1-10E CL17, 2-4C CL14 e 3-12C CL9A.

Após a expansão para placas de 24 e 6 poços, parte das células foi congelada para uso posterior e o restante inoculado na cavidade peritoneal de camundongos para a produção do líquido ascítico. A partir do 6º dia após a inoculação das células, os camundongos começaram a apresentar ascite suficiente para a coleta. O líquido ascítico foi coletado até o 13º dia após a inoculação das células.

Ao final do processo, foram selecionados cinco líquidos ascíticos que possuíam menor grau de hemólise para dar continuidade ao trabalho.

No gráfico 16, temos os valores de D.O. encontrados no ELISA indireto realizado para a titulação dos níveis de anticorpos dos líquidos ascíticos produzidos.

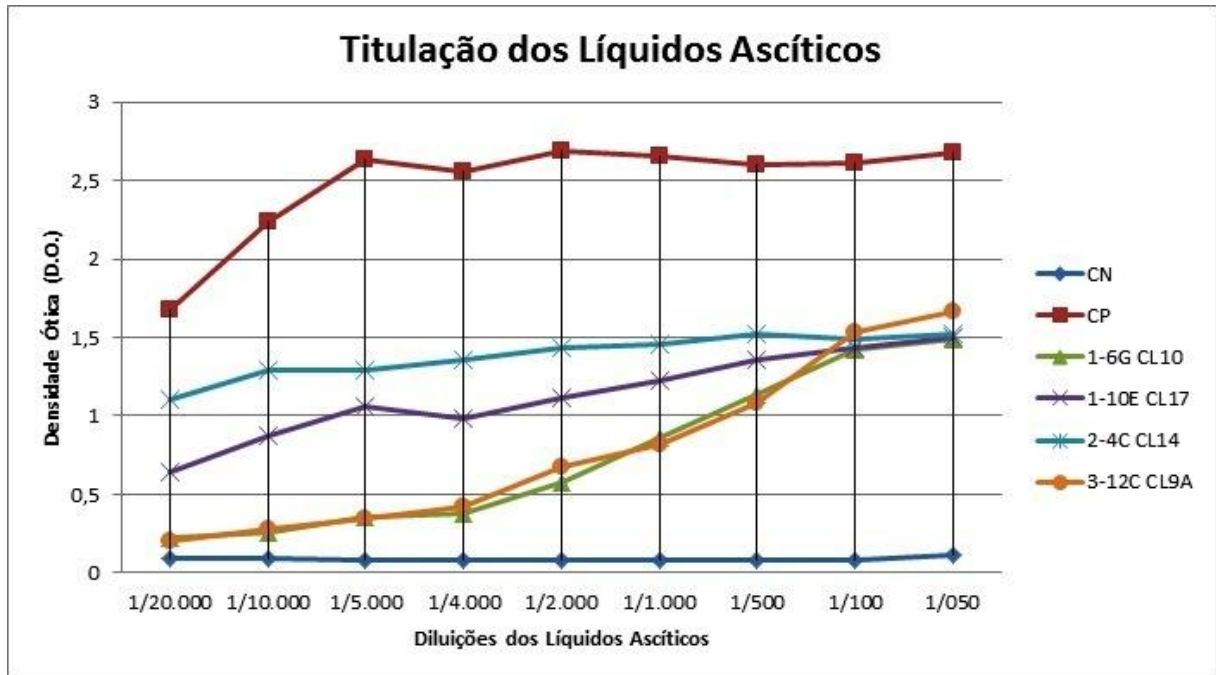


Gráfico 16: Densidades óticas (D.O.) encontradas no ELISA indireto para a titulação dos níveis de anticorpos dos líquidos ascíticos produzidos.

## 5.5 WESTERN BLOTTING

### 5.5.1 Western blotting (SDS-PAGE a 12,5%)

Após a produção e titulação dos líquidos ascíticos, os mesmos foram testados em *western blotting* com o antígeno somático hidrofóbico. No gel de poliacrilamida a 12,5%, o líquido ascítico induzido pelo clone 3-12C CL9A foi testado com a diluição 1/500 e os demais na diluição 1/800, incluindo os controles positivo e negativo. Na figura 5 temos a fotografia das fitas da membrana de nitrocelulose após revelação.

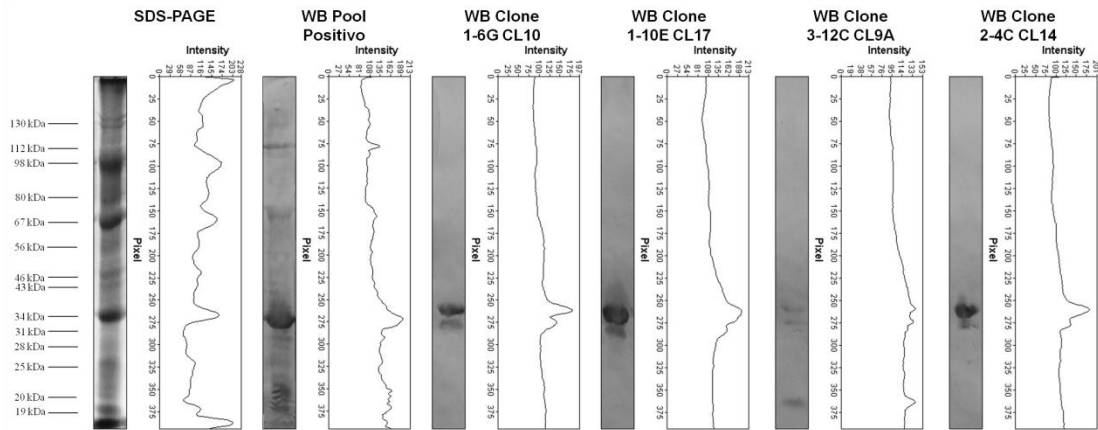


Figura 5: Fitas da membrana de nitrocelulose resultantes do teste de *western blotting* após aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%.

Para todos os líquidos ascíticos testados, foi possível visualizar o reconhecimento de duas bandas próximas, com os pesos moleculares estimados em 34 e 31 kDa. No líquido ascítico induzido pelo clone 3-12C CL9A, além destas duas bandas, também houve reconhecimento de uma banda com peso molecular estimado em 19kDa.

### 5.5.2 *Western blotting* (SDS-PAGE a 15%)

No gel de poliacrilamida a 15%, todos os líquidos ascíticos e controles foram testados com a diluição 1/100. Na figura 6 temos a fotografia das fitas da membrana de nitrocelulose após revelação.

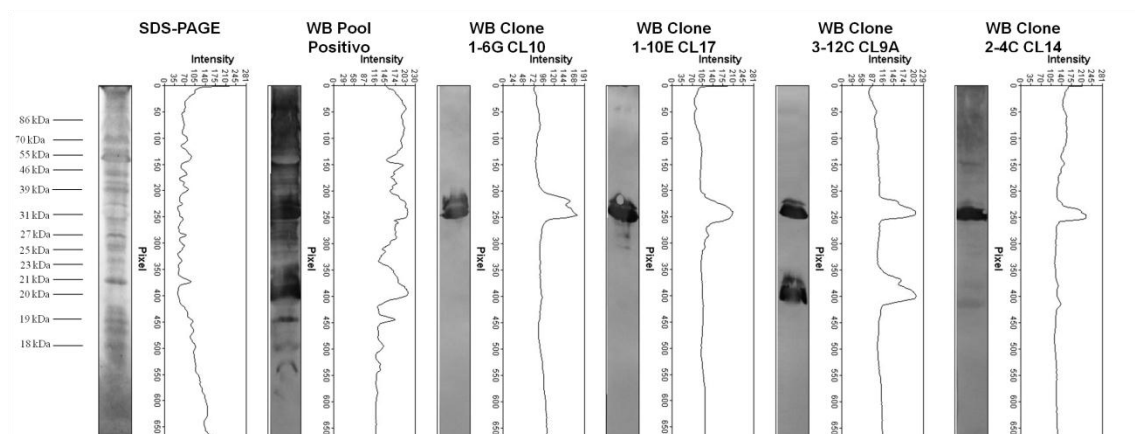


Figura 6: Fitas da membrana de nitrocelulose resultantes do teste de *western blotting* após aplicação da técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%.

O líquido ascítico induzido pelo clone 1-6G CL10 manteve o reconhecimento de duas bandas de 31 e 34 kDa. O 1-10E CL17 reconheceu bandas de 25 kDa, 27 kDa, 31 kDa e 34 kDa. O clone 3-12C CL9A induziu líquido ascítico que reagiu com as bandas de 20 kDa, 21 kDa, 31 kDa e 34 kDa. O líquido ascítico induzido pelo clone 2-4C CL14 reconheceu bandas de 20 kDa, 21 kDa, 31 kDa, 34 kDa e 55 kDa.

## 6 DISCUSSÃO

A aplicação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais através da fusão de células B com células mielomatosas possibilita a obtenção de um hibridoma que é capaz de viver por tempo indeterminado e secretar anticorpos de especificidade única para um determinado epítipo.

Os anticorpos monoclonais podem ser ferramentas valiosas no estudo e compreensão da interação de um micro-organismo com o seu hospedeiro, através da marcação destes anticorpos e posterior utilização em imunoenaios de imunohistoquímica, imunocitoquímica e em citometria de fluxo. Além disso, podem ser reagentes promissores para o desenvolvimento de novos testes para diagnóstico e novos preparados vacinais.

No presente trabalho, demonstrou-se através de SDS-PAGE a 12,5%, que o antígeno somático hidrofóbico apresenta 14 bandas com pesos moleculares estimados em 130 kDa, 112 kDa, 98 kDa, 80 kDa, 67 kDa, 56 kDa, 46 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 25 kDa, 20 kDa e 19 kDa. Já o perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15%, para o mesmo antígeno, detectou a presença de 13 bandas com pesos estimados em 86 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 46 kDa, 39 kDa, 31 kDa, 27 kDa, 25 kDa, 23 kDa, 21 kDa, 20 kDa, 19 kDa e 18 kDa. Como era de se esperar, a menor concentração de poliacrilamida favoreceu a detecção de moléculas com pesos moleculares mais elevados, como 130 kDa, 112 kDa e 98 kDa, enquanto que, a 15% foi possível uma melhor separação das proteínas de baixo peso molecular.

Em estudo realizado por Bastos (2011), usando massa bacteriana da mesma linhagem de *C. pseudotuberculosis* (VD57) deste trabalho, antecedeu a extração dos componentes hidrofóbicos com uma sonicação a 60 Hz (cinco ciclos de 60 s). O antígeno assim obtido foi submetido a SDS-PAGE a 15%, e foram encontradas 21 bandas com pesos estimados em: 86 kDa, 78 kDa, 72 kDa, 69 kDa, 56 kDa, 50 kDa, 48 kDa, 44 kDa, 41 kDa, 38 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 27 kDa, 26 kDa, 25 kDa, 24 kDa, 22 kDa, 21 kDa, 20 kDa, 19 kDa. Como a única diferença entre os métodos usados foi a sonicação prévia da massa, torna-se evidente que o tratamento com



ultrassom otimiza o processo de extração da fração hidrofóbica do antígeno somático.

Antes da realização das fusões, fez-se necessária a padronização de um teste de ELISA para soro de camundongos usando o antígeno somático hidrofóbico, a fim de detectar os níveis de anticorpos produzidos pelos camundongos imunizados.

Durante os experimentos desse trabalho, foram realizadas quatro fusões. Nas duas primeiras, os camundongos foram imunizados primeiramente com 50µg do antígeno, utilizando adjuvante completo de Freund. Em seguida, foram realizadas três imunizações com 50µg de antígeno e adjuvante incompleto de Freund, com intervalo de 21 dias entre as mesmas. A primeira fusão apresentou altos valores de D.O. no primeiro ELISA realizado, e em seguida estes valores foram declinando até ser observada a morte das células e resultados negativos no ELISA. A segunda fusão apresentou resultados negativos para todos os poços testados, em todos os testes de ELISA realizados. Optou-se então por um protocolo mais rápido, e, desta forma, na terceira fusão foi realizadas duas imunizações, com intervalo de 10 dias entre as mesmas. Desta terceira fusão chegamos aos resultados apresentados neste trabalho. Em paralelo à terceira, foi feita imunização para uma quarta fusão, com protocolo igual ao realizado na primeira e na segunda. A quarta fusão apresentou resultados semelhantes à segunda, com valores negativos para todos os poços testados em todos os ELISA realizados. Perda de todas as células híbridas em determinadas fusões também é descrita por outros autores, como Alves (2006) em trabalho para a produção de anticorpos monoclonais contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, que realizou quatro fusões utilizando células de baço fresco, mas apenas uma das fusões conseguiu hibridomas estáveis.

Neste trabalho, após 17 dias de ação do meio seletivo Iscove's contendo HAT, foi possível visualizar a presença de clones em 71 dos 384 poços contendo células provenientes da fusão, representando 18,48% do total de poços. Os 71 poços foram testados tanto para IgM quanto para IgG. Destes, 8 foram positivos para IgG e 11 positivos para IgM, representando 11,26% de positividade para IgG e 15,49% de positividade para IgM. Estes valores foram superiores aos encontrados por Freitas (2006) durante a produção de anticorpos monoclonais anti *épsilon* toxina de

*Clostridium perfringens* tipo D, aonde 6,68% dos poços testados apresentaram positividade para IgG quando utilizadas células da linhagem SP2/0 na fusão. Este mesmo autor ainda afirma que variações podem ser encontradas devido a diferenças nos métodos utilizados para selecionar os poços híbridos positivos. Alves (2006) encontrou 40% de positividade para IgG e IgM durante a fusão que seguiu fluxo normal.

Foram escolhidos apenas os hibridomas produtores de IgG em função de sua maior utilização como reagentes terapêuticos (NELSON et al., 2000). Os hibridomas produtores de IgM não foram mantidos.

Como alguns hibridomas são instáveis, uma atenção meticulosa deve ser dada para o exame visual de hibridomas utilizando um microscópio invertido (NELSON et al., 2000). Por esse motivo, apenas cinco dos oito poços positivos para IgG foram escolhidos para a clonagem (1-6G, 1-10E, 2-4C, 2-11C e 3-12C), avaliando maiores leituras de D. O. associadas aos aspectos físicos das células que indicassem integridade e maior viabilidade dos clones. Esta clonagem, realizada com diluições sucessivas, teve o intuito de tentar isolar em cada poço apenas células híbridas produtoras de um único tipo de anticorpo.

Após 15 dias da clonagem com as células híbridas, apenas quatro das cinco ainda apresentavam positividade em ELISA, representando 80% dos híbridos (1-6G, 1-10E, 2-4C e 3-12C). Os poços referentes às diluições do híbrido 2-11C foram todos descartados, pois apresentavam resultados negativos no ELISA. A perda da produção de anticorpos pelo híbrido deve-se justamente à instabilidade dos hibridomas, que sofre alterações durante o processo de cultura, e, principalmente após as diluições da clonagem. Freitas (2006) refere apenas 40% dos híbridos positivos após clonagem, relacionando sua baixa porcentagem a um problema apresentado especificamente pela linhagem de SP2/0 utilizada em seu trabalho.

Após o processo de clonagem, com as sucessivas diluições, os híbridos passaram a apresentar alterações nos seus aspectos físicos, diminuição da taxa de crescimento e da produção de anticorpos. Foi iniciado o protocolo para a produção do líquido ascítico, com o objetivo de não perder os híbridos positivos. Foram selecionados os

poços 1-6G CL10, 1-10E CL17, 2-4C CL14 e 3-12C CL9A, de acordo com os melhores resultados no ELISA e aspectos do crescimento celular.

Após 6 dias da inoculação das células na cavidade peritoneal dos camundongos, foi possível detectar ascite para a retirada do líquido. Freitas (2006) também observou ascite em seus camundongos após o 6º dia de inoculação, enquanto que Alves (2006) não observou ascite em nenhum dos camundongos inoculados, não havendo produção do líquido ascítico. Foram selecionados os líquidos ascíticos com menor grau de hemólise e realizada a titulação dos mesmos. Foi possível observar que, na menor diluição (1/50), todos os líquidos apresentavam D.O. acima de 1,4.

Os líquidos ascíticos foram submetidos a dois protocolos de *western blotting*. Em gel de poliacrilamida a 12,5% revelado com DAB foi possível a detecção de bandas de 34 kDa e 31 kDa (em todos os líquidos testados) e 19 kDa (líquido ascítico 3-12C CL9A). Já no gel de poliacrilamida a 15% revelado com cloro-naftol foi possível a detecção de bandas de 55 kDa (2-4C CL14), 34 kDa e 31 kDa (em todos os líquidos testados), 27 kDa e 25 kDa (1-10E CL17), 21 kDa e 20 kDa (3-12C CL9A e 2-4C CL14).

Ellis e colaboradores (1991) utilizaram proteínas extraídas do sonicado da massa bacteriana de cultura como antígeno em um *western blotting* para a avaliação de soros de ovinos naturalmente infectados. Foi possível identificar a presença de 11 proteínas com pesos moleculares diferentes, incluindo uma banda de 20kDa e outra com 31,6kDa. Quando utilizado o sobrenadante da cultura, cinco proteínas de pesos moleculares diferentes foram identificadas, entre elas, uma de 20kDa e outra de 31,6kDa.

Vale e colaboradores (2003) utilizaram extratos obtidos a partir de sonicado de cultura de uma cepa selvagem e uma cepa considerada atenuada (1002) de *C. pseudotuberculosis* como antígeno em *western blotting* com soros de caprinos, comparando-se o padrão de reconhecimento antigênico de animais naturalmente infectados e animais imunizados ao longo de 12 meses. Os dois grupos apresentaram o mesmo padrão de reconhecimento, com a detecção de 9 bandas proteicas, incluindo uma de 21 kDa e outra de 31.5 kDa.

Paule e colaboradores (2003) realizou *western blotting* com os soros de caprinos experimentalmente infectados por *C. pseudotuberculosis* e identificou o reconhecimento antigênico de 11 moléculas, constando entre elas as bandas de 34 kDa e 55 kDa. Este mesmo grupo publicou outro trabalho (2004b) aplicando soros de caprinos naturalmente infectados em técnica de *western blotting*, onde uma proteína de 31 kDa foi reconhecida quando utilizados antígenos secretados e somáticos.

Moura-Costa e colaboradores (2008) utilizaram proteínas extraídas do sonicado da massa bacteriana da cultura de uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* (T1) como antígeno em um *western blotting* com soros de caprinos experimentalmente infectados, sendo observado o reconhecimento de bandas com pesos moleculares diferentes, entre elas, moléculas de 21 kDa e 31 kDa.

Em estudo realizado por Bastos (2011), utilizando o processo de extração de antígeno somático hidrofóbico, foi aplicada a técnica de *western blotting* utilizando um pool de soros ovinos positivos para IgG anti-*C. pseudotuberculosis*, avaliando o perfil das moléculas estruturais hidrofóbicas de *C. pseudotuberculosis* de cepas de baixa e alta virulência. Foi possível detectar o reconhecimento de antígenos com pesos moleculares de 19 kDa, 20 kDa, 21 kDa e 25 kDa em cepa virulenta (VD57) e bandas de 19 kDa e 27 kDa em cepa atenuada (T1). O autor afirma que o antígeno somático hidrofóbico possui antígenos promissores para o desenvolvimento de testes de diagnósticos, com moléculas estruturais com reatividade no *immunoblot* e no ELISA indireto.

Vale (2005) produziu, a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com proteínas de antígeno somático total sonicado, anticorpos monoclonais contra uma proteína de 75 kDa de peso molecular. Testados em ensaios de imunoproteção, estes anticorpos foram capazes de aumentar de modo significativo a sobrevivência de camundongos infectados com uma linhagem virulenta deste micro-organismo. Porém, nos líquidos ascíticos obtidos em nosso trabalho não foi evidenciada a produção de anticorpos contra esta proteína de 75kDa, em nenhuma das duas técnicas de *western blotting* aplicadas.

Constata-se que todos os antígenos reconhecidos pelos líquidos ascíticos produzidos neste trabalho, nas duas técnicas de *western blotting* aplicadas, já foram identificados na literatura como moléculas antigênicas que são reconhecidas por anticorpos presentes em soro de caprinos e ovinos infectados por *C. pseudotuberculosis*, sendo assim consideradas moléculas imunogênicas com o potencial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

Apesar da identificação de diversas moléculas imunogênicas, muitas dessas proteínas ainda não foram caracterizadas, o que dificulta a sua utilização. Porém, vale ressaltar que a banda de aproximadamente 31 kDa corresponde à fosfolipase D, uma potente exotoxina hemolítica que permite a disseminação e a persistência de *C. pseudotuberculosis* no sistema linfático, sendo considerada como o maior fator de virulência desse microrganismo (BROWN; OLANDER, 1987; JOLLY, 1965; SONGER et al., 1990; HODGSON; BIRD; NISBET, 1990; MCNAMARA; BRADLEY; SONGER, 1994; DORELLA et al., 2006). A literatura indica que anticorpos antifosfolipase D presentes antes da infecção, exercem um efeito protetor, dificultando a disseminação da bactéria para os linfonodos e danos teciduais (YOZWIAK, SONGER, 1993; WILLIAMSON, 2001).

De acordo com a literatura, a banda de aproximadamente 31 kDa é detectada por *western blotting* tanto com a utilização de antígeno somático quanto com antígeno secretado. Isso pode estar relacionado, provavelmente, pelo fato da fosfolipase D ser uma exotoxina, e com isso precisar ser ligada à membrana da célula durante o processo de secreção. Este processo de ancoragem e posterior secreção foi descrito em *Corynebacterium diphtheriae*, bactéria do mesmo gênero e filogeneticamente próxima à *C. pseudotuberculosis* (COLOMBO et al., 2001). Dessa forma, a presença da PLD no antígeno somático hidrofóbico pode ser explicada pelo fato dela, provavelmente, estar ligada à membrana da célula durante o procedimento de extração.

Hodgson, Bird e Nisbet (1990), em um estudo sobre o sequenciamento do gene da PLD, encontraram, antecedendo este gene, uma pequena sequência codificante de 24 resíduos de aminoácidos que, segundo estes autores, poderia ser um peptídeo

sinal. Estes autores admitem que a PLD com 31,4 kDa corresponda à PLD madura, enquanto que a proteína com 34,1 kDa seria a PLD associada ao seu peptídeo sinal. Este trabalho é citado por Baird e Fontaine (2007), que também faz referência a este possível peptídeo sinal de 2,7 kDa.

O peptídeo sinal foi descoberto em proteínas secretadas que são translocadas através da membrana como um primeiro passo para a sua liberação da célula. Ao contrário das proteínas citoplasmáticas, as proteínas destinadas para secreção são marcadas na extremidade N-terminal com uma determinada sequência de aminoácidos, formando o peptídeo sinal. Este peptídeo extra é responsável por sinalizar o transporte da proteína para a membrana celular, sendo clivado por uma peptidase e removido da cadeia polipeptídica no momento da secreção da proteína, e não é, portanto, encontrado na proteína madura. Dessa forma, a proteína inicialmente sintetizada é ligeiramente maior do que a proteína madura secretada. De acordo com a literatura, há pouca homologia entre as sequências de sinal de diferentes proteínas secretadas e, geralmente, a porção N-terminal básica composta de 2 a 8 aminoácidos é seguida por uma cadeia de aminoácidos hidrofóbicos. Este sistema é encontrado tanto em células eucarióticas como em células bacterianas, de forma semelhante (ALBERTS et al., 2008; CLARK, 2005).

Dessa forma, é possível que todos os líquidos ascíticos induzidos pelos quatro clones produzidos neste trabalho possuam anticorpos que reconhecem tanto a fosfolipase D sintetizada com o peptídeo sinal (aproximadamente 34 kDa) quanto a forma madura da exotoxina (aproximadamente 31 kDa). Vale ressaltar que o líquido ascítico induzido pelo clone 1-6G CL10 reconhece apenas as duas bandas de 31 kDa e de 34 kDa, que correspondem aos pesos atribuídos à PLD e nenhuma outra proteína presente no antígeno somático hidrofóbico, o que caracteriza os anticorpos produzidos por este clone como monoclonais.

Hallas e colaboradores (1990) produziram dois anticorpos monoclonais (MAb1 e MAb2) contra a toxina diftérica através da imunização de camundongos BALB/c com o toxóide e fusão dos esplenócitos com células de mieloma de rato da linhagem JK-Ag8653. Após a conjugação dos anticorpos monoclonais com isotiocianato de fluoresceína (FITC), foi possível a realização de ensaios imunoenzimáticos (EIA) que

determinaram a eficiência do MAb2 como anticorpo de captura e o MAb1 como anticorpo de detecção, que foram utilizados em um imunoenensaio para a detecção de toxinas nos sobrenadantes de cultura de *Corynebacterium diphtheriae* e *C. ulcerans*. O ensaio teve 96% de correlação com o teste de Elek (reação de imunodifusão para detecção da toxina diftérica) e com a virulência em cobaias.

Glatman-Freedman e colaboradores (1996) produziram três anticorpos monoclonais a partir da imunização de camundongos BALB/c com células de *Mycobacterium tuberculosis* mortas pelo calor e fusão dos esplenócitos com células de mieloma murino da linhagem NSO. Todos os monoclonais produzidos eram específicos para epítomos de superfície de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo esta característica comprovada a partir das técnicas de ELISA de células inteiras, imunofluorescência indireta e por microscopia imunoelétrica. Os anticorpos apresentaram reatividade cruzada com outras micobactérias, porém não reconheceram antígenos em bactérias não pertencentes a este grupo. Dois anticorpos monoclonais produzidos foram utilizados em um ensaio de ELISA de captura modificado, onde um dos monoclonais foi usado como anticorpo de captura e um segundo foi usado como anticorpo de detecção.

A literatura apresenta diversas utilidades para os anticorpos monoclonais produzidos a partir da imunização de camundongos e fusão dos esplenócitos com uma célula de mieloma. Estes anticorpos são ferramentas importantes para o desenvolvimento de imunoenensaio através das técnicas de ELISA, imunofluorescência indireta e microscopia imunoelétrica, além de imunohistoquímica, imunocitoquímica e citometria de fluxo. Sendo assim, os líquidos ascíticos produzidos durante esse trabalho possuem anticorpos que são promissores para a realização de imunoenensaio que visam um melhor entendimento da patogênese da doença provocada por *C. pseudotuberculosis* e elaboração de um kit de diagnóstico da infecção utilizando anticorpos monoclonais.

## 7 CONCLUSÕES

- A aplicação da técnica de SDS-PAGE utilizando géis de poliacrilamida a 12,5% e 15% demonstrou que o gel a 15% favoreceu a separação de proteínas de baixo peso molecular.
- O processo de imunização usado, com apenas duas imunizações com um intervalo de 10 dias, propiciou a detecção de anticorpos das classes IgG e IgM.
- A inoculação das células híbridas na cavidade peritoneal dos camundongos acarretou numa rápida produção de líquido ascítico e com altas concentrações de anticorpos, apresentando D.O. acima de 1,4 no ELISA na diluição 1/50.
- Constata-se que todos os antígenos reconhecidos pelos anticorpos, nas duas técnicas de *western blotting* aplicadas, já foram referidos na literatura como moléculas antigênicas reconhecidas por anticorpos presentes em soro de caprinos e ovinos infectados por *C. pseudotuberculosis*.
- Todos os líquidos ascíticos possuem anticorpos contra uma molécula de 34 kDa e outra de 31 kDa, que correspondem ao pesos moleculares da fosfolipase D com seu peptídeo sinal e a fosfolipase D madura, respectivamente.



## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- O estudo dos hibridomas obtidos neste trabalho deve prosseguir com o objetivo de fazer outras diluições limitantes, tentando obter clones que secretem apenas um anticorpo monoclonal.
- Marcação dos anticorpos com marcadores fluorescentes para estudos que permitam o acompanhamento do processo infeccioso, através da aplicação destes anticorpos em ensaios de imunohistoquímica, imunocitoquímica e em citometria de fluxo.
- Elaboração de imunoensaios com o objetivo de produzir um kit de diagnóstico da infecção por *C. pseudotuberculosis*, utilizando os anticorpos monoclonais produzidos.
- Prosseguimento do estudo do antígeno somático hidrofóbico para a melhor caracterização do mesmo, incluindo, o sequenciamento das bandas reconhecidas pelos hibridomas produzidos, particularmente as de 31 e 34 kDa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap 5, p. 89-107.

ABREU, S. R. O. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 3, p. 502-509, dez. 2008.

ALBERTS, B. et al. Intracellular Compartments and Protein Sorting. In: **Molecular Biology of the Cell**. 5ª edição. NewYork: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008. Cap. 12:, p. 695-748.

ALVES, T. M. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***. 2006. 34 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.171, n.12, p.1251-1254, dec. 1977.

BAIRD, G. J; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**. v. 137, n. 4, p. 179-210, nov. 2007.

BASTOS, B. L. **Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de Quillaja saponaria como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico**. 2011. 92 f. Tese (Doutorado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

BATEY, R. G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. **American Journal of Veterinary Research**., v. 47, n. 2, p. 482-485, feb. 1986a.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**. v. 63, n. 9, p. 269-272, sep. 1986b.

BATEY, R.G.; SPEED, C.M.; KOBES, C.J. Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. **Australian Veterinary Journal**. v. 63, n. 2, p. 33-36, feb. 1986.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in disease of animals. **Commonwealth Bureau of Animal Health**. v. 32, n. 10, p. 645-657, out. 1962.

- BROGDEN, K. A. et al. Changes in ovine erythrocyte morphology due to sphingomyelin degradation by *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Microbial Pathogenesis**, v. 8, n. 2, p. 157-162, feb. 1990
- BROGDEN, K. A.; CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D. Comparison of protection induced in lambs by *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell and cell wall vaccines. **American Journal of Veterinary Research**. v. 45, n. 11, p. 2393-2395, nov. 1984.
- BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: A review. **Veterinary Bulletin**. v. 57, n. 1, p. 1-12, jan. 1987.
- CAMBROSIO, A.; KEATING, P. Between fact and technique: the beginnings of hybridoma technology. **Journal of the History of Biology**, v. 25, n. 2, p. 175 – 230, 1992.
- CARMINATI, R. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v. 2, n. 1, p. 88-93, jan./jun. 2003
- CARVALHO, D. C. et al. Avaliação do efeito imunoprotetor de diferentes vacinas contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 10, n. 314, p. 59-62, 1990.
- CARVALHO, R. D. O. **Avaliação da regulação transcricional do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta aos estresses nitrosativo e ácido**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- CERQUEIRA, R. B. **Avaliação da resposta humoral de caprinos infectados com duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através de diferentes testes elisa indiretos**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em imunologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.
- CHADD, H. E.; CHAMOW, S. M. Therapeutic antibody expression technology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 12, n. 2, p. 188-194, apr. 2001.
- CLARK, D. P. Protein Synthesis. In: **Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution**. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005. Cap. 8, p. 197-233.
- COLOMBO, A. V. et al. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiology Letters**. v. 197, p. 235-239, 2001.
- DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**. v. 37, n. 2, p. 201-218, mar-apr. 2006.
- ELLIS, J. A. et al. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis.

**Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v. 28, n. 3-4, p. 289-301, jul. 1991.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research.** v. 76, p. 42 – 48, 2008.

FREITAS, T. D. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti épsilon toxina de *Clostridium perfringens* tipo D.** 2006. 32 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

GIRALDO, M. et al. Immunoglobulin M (igm)-glycoinositolphospholipid enzyme-linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1400–1405, Apr. 2002.

GLATMAN-FREEDMAN, A. et al. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of Mycobacteria. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2795–2802, nov. 1996.

GLENNIE, M. J.; JOHNSON, P. W. M. Clinical trials of antibody therapy. **Immunology Today.** v. 21, n. 8, p. 403-410, aug. 2000.

HALLAS, G. et al. Detection of diphtheria toxin in culture supernates of *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans* by immunoassay with monoclonal antibody. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 247-253, aug. 1990.

HAMASUR, B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis. **Vaccine.** v. 21, p. 4081–4093, 2003.

HODGSON, A. L. M; BIRD, P.; NISBET, I. T. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D Gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Bacteriology.** v. 172, n. 3, p. 1256-1261, mar. 1990.

JOLLY, R. D. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Comparative Pathology.** v.75, n. 4, p.417-431, oct. 1965.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature.** v. 256, p. 495-497, aug. 1975.

KRIANKUM, J. et al. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. **Biomolecular Engineering.** v. 18, n. 2, p. 31-40, sep. 2001.

LAN, D. T. B. et al. Role of Endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology.** v. 42, n.12, p. 863-870, 1998.

LERNER, R. A.; BENKOVIC, S. J.; SCHULTZ, P. G. At the Crossroads of Chemistry and Immunology: Catalytic Antibodies. **Science.** v. 252, p. 659-667, may. 1991.

LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **Institute for Laboratory Animal Research**. v. 26, n. 3, p. 258-268, 2005

MCNAMARA, P.J.; BRADLEY, G. A .; SONGER, J.G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decrease virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**. v. 12, n. 6, p. 921-930, jun. 1994.

MEDRANO, G. G. et al. Evaluación de uma vacina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ratones albinos. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v.14, n.1, p. 61-67, 2003.

MEYER, R. et al. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 107, n. 3-4, p. 249-254, sep 2005.

MISHRA, A.K. et al. Identification of an  $\alpha(1-6)$  mannosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomannan biosynthesis, and identification of its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**. v. 65, p. 503–1517, 2007.

MISHRA, A.K. et al. Structural characterization and functional properties of a novel lipomannan variant isolated from a *Corynebacterium glutamicum* pimB' mutant. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 94, p. 277-287, 2008.

MOURA-COSTA L.F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**., v.1, n.1, p.105-115, 2002.

MOURA-COSTA L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002.

MOURA-COSTA, L. F. **Avaliação da resposta imunológica de caprinos da raça Canindé a diferentes antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2007. 140f. Tese (Doutorado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

MOURA-COSTA, L. F. et al. Evaluation of the Humoral and Cellular Immune Response to Different Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé Goats and their Potential Protection Against Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 126, n. 1-2, p. 131-141, nov. 2008.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v. 46, n. 2, p. 206-208, apr. 1982.

NELSON, P. N. et al. Monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology**. v. 53, p. 111-117, 2000.

PACHECO, L. G. et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiol**. v. 11, n. 12, 2011.

PATON, M. W. et al. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal**. v. 72, n. 7, p. 266-269, jul. 1995.

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.96, n. 3-4, p. 129-139, dec. 2003.

PAULE, B. J. et al. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein Expression and Purification**. v. 31, n. 2, p. 311-316, apr. 2004.

PÉPIN, M. et al. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 5, p. 666-670, nov. 1994.

REBOUÇAS, M. F. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 23, n. 2, p. 213-220, mar. 2011.

RIBEIRO, O. C. et al. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 8, n. 1-2, p. 27-29, out. 1988

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**. v. 3, p. 395 – 403, 2000.

SANTANA, M. M. O. **Avaliação da resposta imune humoral e celular de ovinos a antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* tratados com extrato aquoso de *Poincianella pyramidalis***. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos, na área de Saúde Animal). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SIMMONS C. P. et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**. v.66, n.2, p. 474-479, feb. 1998.

SONGER, J.G. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**. v. 49, n. 2, p. 223-226, feb. 1988.

SONGER, J. G. et al. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infection and immunity**. v. 58, n.1, p. 131-136, jan. 1990.

VALE, V. et al. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, v.2, n.2, p. 192-200, jul./dez. 2003.

VALE, V. L. C. **Aspectos da resposta imune murina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Tese (Doutorado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia, 2005.

VALLERA, D. A. et al. Anti-T-Cell Reagents for Human Bone Marrow Transplantation: Ricin Linked to Three Monoclonal Antibodies. *Science*. v. 22, p. 512-515, nov. 1983.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 17, n. 2, p. 359-371, jul. 2001.

YOZWIAK, M. L., SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**. v. 54, n. 3, p. 392-397, mar. 1993.

## APÊNDICE

A padronização do ELISA foi apresentada na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), com o trabalho intitulado “Development and Standardization of an ELISA for Detecting Antibodies Against a Glycoprotein Antigen of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Mice Sera”, com a autoria de: Vilas-Boas, P.C.B.; Bastos, B.L.; Portela, R.W.D.; Meyer, R., Moura-Costa, L.F.

**Desenvolvimento e padronização de um ELISA para detecção de anticorpos contra antígeno glicoproteico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em soro de camundongos.**

### 1 OBJETIVO:

Desenvolver e padronizar um ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra a porção glicoproteica da membrana de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em soro de camundongo.

### 2 METODOLOGIA:

#### 2.1 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO

Uma linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* (VD57) foi cultivada em caldo BHI (Brain-heart infusion) a 37°C por 72 h; a massa bacteriana foi recolhida após centrifugação, lavada em tampão fosfato (PBS) e sonicada a 60 Hz. O material foi submetido à extração com solução de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) para



processo de delipidação. O sedimento obtido após a extração foi seco sob gás N<sub>2</sub> e extraído com solução a 9% de butanol em água. Os sobrenadantes foram reunidos e rota-evaporados. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando soro albumina bovina como padrão.

## 2.2 PADRONIZAÇÃO DO ELISA

Para a determinação da fase sólida do ELISA indireto, foram testadas as concentrações de 0,5 µg, 1 µg, 2 µg e 4 µg de antígeno por poço. Para a determinação das concentrações de soro e conjugado foram utilizadas as seguintes diluições: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 para os soros, e 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 para o conjugado. O tempo de revelação para todas as etapas foi de 15 minutos.

## 2.3 APLICAÇÃO DO TESTE

Após a padronização, o teste foi aplicado em soro de 4 camundongos balb/c imunizados com o antígeno glicoproteico. Os camundongos passaram por 4 imunizações com 50 µg do antígeno, sendo a primeira utilizando adjuvante completo de Freund, enquanto que as três imunizações subsequentes foram realizadas usando adjuvante incompleto de Freund. Como controle positivo do teste foi utilizado um pool de soros de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *C. pseudotuberculosis*. Como controle negativo foi utilizado um pool de soros de camundongos negativos para infecção por *C. pseudotuberculosis*.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 CONCENTRAÇÃO DO ANTÍGENO E DILUIÇÃO DO SORO

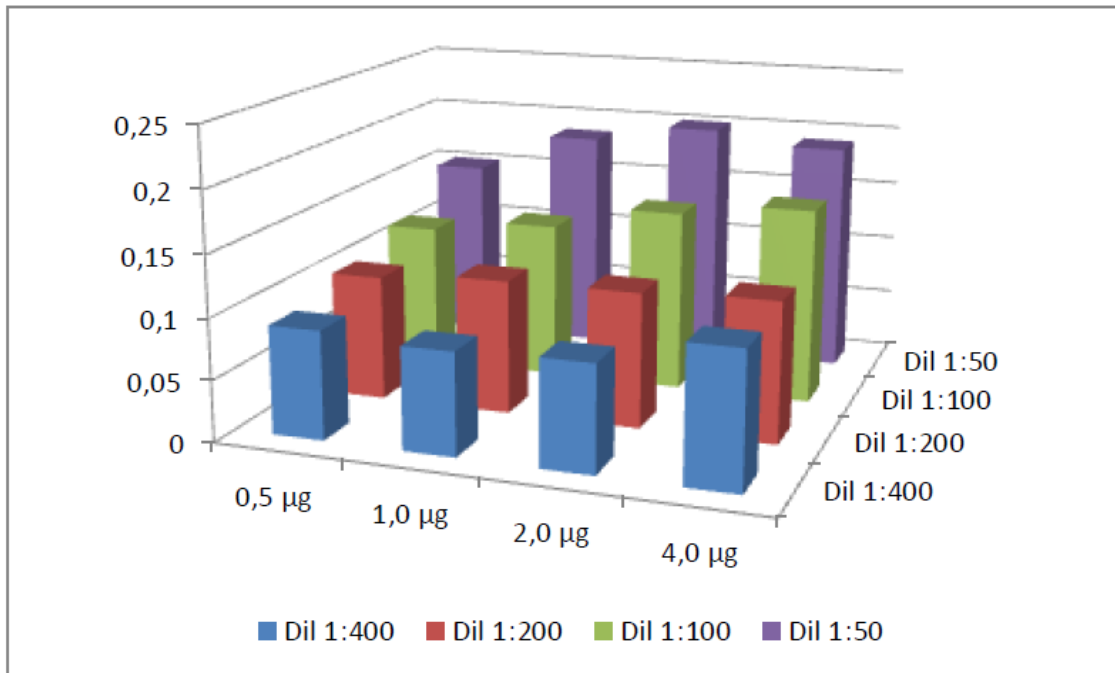


Figura 1: Densidades ópticas para 0,5 µg, 1 µg, 2 µg e 4 µg de antígeno por poço em placa de ELISA e diluições de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 para o soros. Utilizou-se 1:15.000 como diluição do conjugado.

### 3.2 DILUIÇÃO DO SORO E DILUIÇÃO DO CONJUGADO

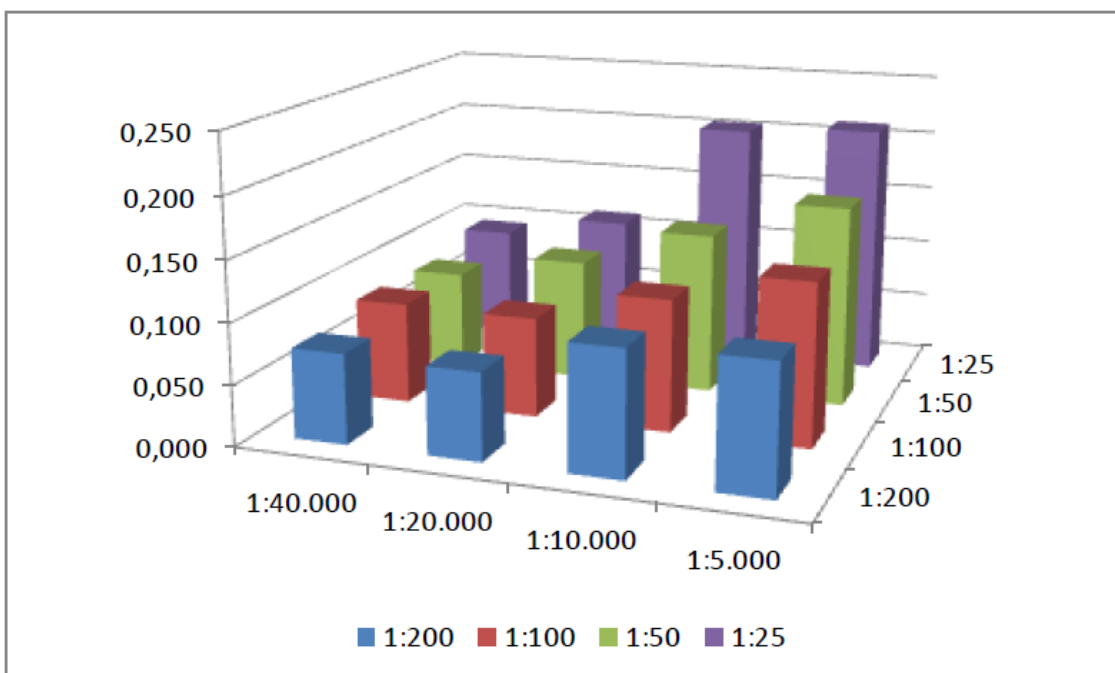


Figura 2: Densidades ópticas para 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 de diluição dos soros e 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 para diluições do conjugado. Utilizou-se , 2 µg de antígeno por poço.

### 3.3 APLICAÇÃO DO TESTE

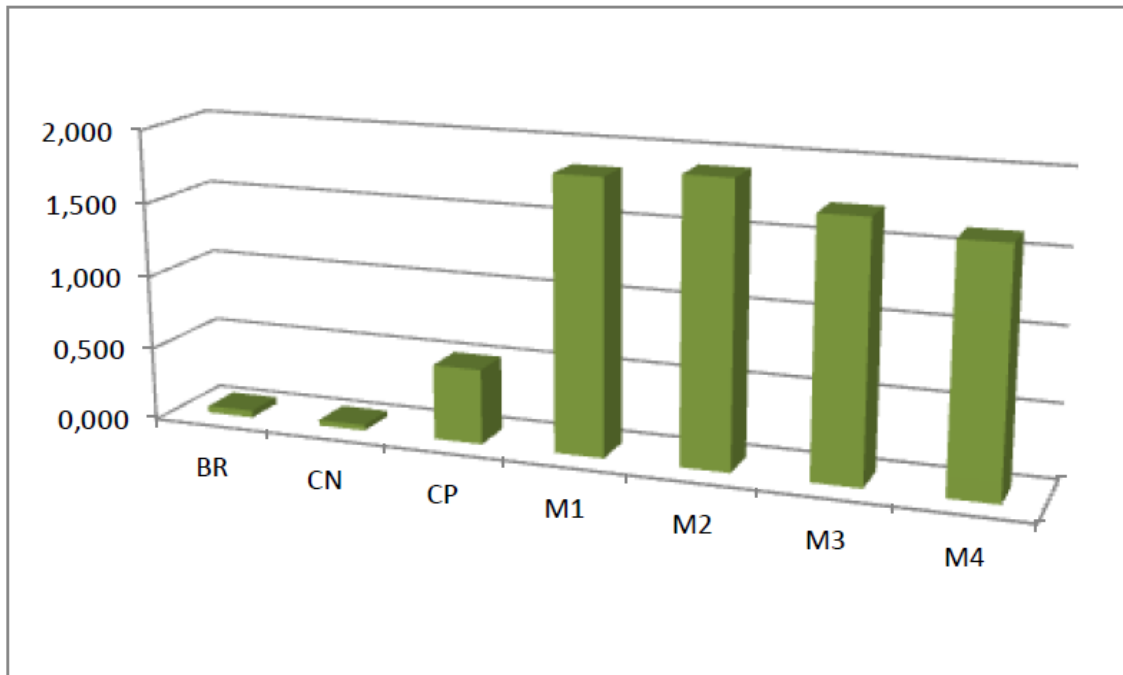


Figura 3: Densidades ópticas da aplicação do teste ELISA para o soro de quatro camundongos imunizados com o antígeno glicoproteico. Utilizou-se 2 µg de antígeno, diluições de soro e conjugado foram de 1:25 e 1:5.000, respectivamente.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a padronização, constatou-se que a concentração ótima do antígeno foi de 2 µg e as melhores diluições de soro e conjugado foram de 1:25 e 1:5.000, respectivamente. Testes para a detecção de anticorpos em processo de infecção de camundongos por uma linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* e avaliação de sensibilidade e especificidade do teste de ELISA estão em andamento.