

BRUNA ALVES DEVENS

**PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS E CLONES PARA OBTENÇÃO DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI - *Neospora caninum* Nc-1
(Apicomplexa, Sarcocystidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

In memoriam,

Ao meu papai Silvino Devens,
grande homem, que me ensinou
a amar os animais.

A minha mamãe,

que com seu amor e dedicação
me guiou em todos os momentos
da minha vida.

Aos meus irmãos,

Kleide, Julimara, José Elias, Lourdes, Carmen, Marilene, Luis Carlos e Anivaldo, que jamais me deixaram desistir dos sonhos e que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Bruno,

por ficar sempre ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pois pela fé consegui realizar tantos sonhos e ter força para chegar até o final da minha caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa pelos ensinamentos, pelo acolhimento e por ter sido berço das minhas realizações.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro que permitiu a realização dos trabalhos e a minha permanência em Viçosa.

À cidade de Viçosa, por ter me acolhido por esses sete anos e ter permitido que eu me sentisse como se estivesse em minha casa.

À Universidade Federal da Bahia pelo treinamento realizado em cultivo celular.

À minha orientadora Professora Marlene, por ter sido amiga, conselheira não só nos assuntos acadêmicos, mas também aos da vida.

Ao meu co-orientador Professor Joaquin, por ter me ensinado a ser uma pesquisadora, por ter me auxiliado nos momentos nos quais tanto precisei.

A todos os professores do Departamento de Veterinária que contribuíram para a minha formação acadêmica. Aos funcionários do DVT por todo o apoio no decorrer do curso.

Ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores por ter sido o berço da minha formação.

A secretária da pós-graduação Rose, pela amizade e pela ajuda sempre.

Ao Márcio Mendes pelo apoio técnico e principalmente pela amizade.

À minha tia Delza, meu tio Luciano, meu primo Juninho, a Gi, por sempre estarem comigo, mesmo com tamanha distância.

Ao meu cunhado Ton, foi capaz de tanto ajudar. Ao Fredy, quem o conhece sabe que esse foi um grande companheiro.

As minhas sobrinhas, sobrinhos, primos e primas, tios e tias, a todos meus familiares, que sempre acreditaram que um dia o meu sonho seria realizado.

Ao Karlos Kalks que muito apoiou nas atividades desenvolvidas e pela grande amizade.

Aos amigos, Ana Paula Peconick, Fabrício, Anna Paula, Carolina Murta, Carlos Henrique, Sandra, Hugo, Breno, Bianca, Carla, Gabriel Carvalho, Sidimar,

Gabriel Tafur, Stefany, Vitor, Leticia, Isabela, Leandro, Fátima, Mariana. Aos meus amigos espalhados pelo mundo.

Aos eternos amigos da VET 2002, Verônica, Melina, Rinara, Danillo e Vinícius.

À Vanusca por ter me acolhido em Salvador, quando fui ao treinamento na UFBA.

A todas as gerações dos 7 anos da república UPA pela amizade, pelo companheirismo.

E a todas as outras pessoas cujos nomes não estão aqui, mas que estiveram presentes e contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho,

Meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Bruna Alves Devens, filha de Silvino Devens e Maria Josilda Alves, nascida em 16 de julho de 1983, na cidade de Aracruz-ES. As minhas atividades escolares iniciaram na escola de 1º Grau Misael Pinto Neto, onde realizei as séries iniciais. Em seguida, pelo Placidino Passos e Zilca Nunes Vieira Bermudes, onde muito aprendi e que foram a base da minha formação, nelas conclui o ensino fundamental. O ensino médio foi concluído em 2000, no Centro Educacional Casa do Estudante, onde tomei a decisão de ser médica veterinária. Em 2002, iniciei uma nova etapa, com o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante a minha graduação envolvi-me nas atividades de pesquisa, em 2004 comecei com a iniciação científica e desde aquele momento descobri que me tornaria uma médica veterinária pesquisadora, descobrindo que lecionar era o meu futuro. Em março de 2007, o sonho foi realizado, tornei-me médica veterinária, mas sabia que era o começo de uma nova fase, e assim fui aprovada no curso de mestrado em patologia animal da UFV. E agora percebo que mais uma etapa chegou ao fim, porém novos desafios virão e estou disposta a enfrentar o mundo científico.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biologia e Ciclo de Vida.....	4
2.2. Controle da neosporose.....	8
2.3. Diagnóstico.....	9
2.3.1. Reação de Imunoflorescência Indireta.....	11
2.3.2. Western Blot.....	12
2.4. Epidemiologia e Impacto Econômico da Neosporose bovina.....	12
2.5. Imunologia da neosporose.....	14
2.6. Antígenos do <i>Neospora caninum</i>	15
2.7. Anticorpos monoclonais.....	19
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	25
4.1. Local de realização do experimento.....	25
4.2. Animais experimentais.....	25
4.3. Multiplicação do <i>Neospora caninum</i>	26
4.4. Purificação do <i>Neospora caninum</i>	27
4.5. Dosagem de Proteína.....	27
4.6. Sensibilização das lâminas para imunofluorescência indireta.....	28
4.7. Multiplicação do <i>Toxoplasma gondii</i>	28
4.7.1. Congelamento das cepas virulentas de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
4.7.2. Preparo de lâminas para imunofluorescência indireta de	

<i>Toxoplasma gondi</i>	29
4.7.3. Preparo de antígenos para eletroforese.....	29
4.8. Coleta de sangue	30
4.9. Preparo das amostras para inoculação e realização de eletroforese.....	30
4.10. Imunização dos camundongos.....	30
4.11. Imunofluorescência para avaliação da soropositividade ao	
<i>Neospora caninum</i>	31
4.12. Cultivo de Mieloma.....	32
4.13. Contagem celular.....	32
4.14. Eutanásia dos camundongos para preparo dos macrófagos.....	32
4.15. Esplenectomia e coleta de linfócitos.....	33
4.16. Fusão.....	33
4.17. Coleta de sobrenadante do cultivo celular.....	34
4.18. Imunofluorescência indireta para avaliação do sobrenadante...	35
4.19. Expansão e Clonagem dos hibridomas.....	35
4.20. Caracterização dos clones.....	38
4.20.1. SDS-PAGE.....	38
4.20.2. Coloração por Nitrato de Prata.....	38
4.20.3. Western blotting.....	39
4.21. Inibição da infecção por <i>Neospora caninum</i> em células VERO..	40
4.22. Isotipagem dos anticorpos monoclonais.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Multiplicação do <i>Neospora caninum</i>	42
5.2. Purificação do <i>Neospora caninum</i>	43
5.3. Dosagem de Proteína.....	43
5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	44
5.5. Imunização dos camundongos BALB/c.....	46
5.6. Fusão e clonagem.....	48
5.7. Reação da Imunofluorescência Indireta para a avaliação do sobrenadante dos clones.....	52

5.8. Reclonagem e avaliação do sobrenadante.....	53
5.9. Expansão dos clones.....	53
5.10. Western Blot para a avaliação da clonagem.....	54
5.11. Inibição da infecção por <i>Neospora caninum</i> em células VERO...	57
5.12. Isotipos dos anticorpos monoclonais.....	59
6. CONCLUSÕES.....	61
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Estrutura do taquizoítio do <i>Neospora caninum</i>	5
Figura 02- Ciclo de vida do <i>Neospora caninum</i>	7
Figura 03- Esquema da Via “de recuperação”.....	22
Figura 04. Clonagem por diluição limitante, RYAN (CORNING) – modificado..	36
Figura 05- Desenho esquemático da técnica utilizada para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos anti-Nc1.....	37
Figura 06- Cultivo do <i>Neospora caninum</i> em células VERO.....	42
Figura 07- Perfil eletroforético (SDS-PAGE- Gel de acrilamida 12%).....	45
Figura 08- Animal positivo ao <i>Neospora caninum</i> pela técnica de RIFI.....	48
Figura 09- Microfotografia, de células SP2/0.....	49
Figura 10 - Resultado da Imunofluorescência Indireta.....	51
Figura 11- Híbridos selecionados para clonagem por diluição limitante.....	51
Figura 13- Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao <i>Neospora caninum</i>	55
Figura 14- Coloração de GIEMSA das células VERO infectadas por <i>N.</i> <i>caninum</i>	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01- Relação dos híbridos positivos e negativos ao <i>Neospora caninum</i>	50
Gráfico 02- Relação de clones positivos e negativos ao <i>Neospora caninum</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Condições às quais os camundongos foram submetidos no experimento.....	25
Tabela 02- Concentração protéica do <i>N. caninum</i> íntegro e sonicado.....	44
Tabela 03- Resultados da imunofluorescência indireta dos animais submetidos à imunização.....	49
Tabela 04- Comparação entre o número de híbridos positivos e negativos ao <i>Neospora caninum</i> utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.....	50
Tabela 05- Comparação entre o número de clones positivos e negativos pela técnica de imunofluorescência indireta.....	52
Tabela 06- Nomenclatura Universal dos anticorpos monoclonais.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM: Anticorpos Monoclonais

cm²: centímetros quadrados

DAB: diaminobenzidina

D.O.: densidade óptica

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, teste imunoenzimático

FITC: isotiocianato de fluoresceína

°C: graus Celsius

HAT: hipoxantina aminopteridina tiamidina

HGPRT: hipoxantina guanina fosforibosiltransferase

HT: hipoxantina tiamidina

Ig: imunoglobulina

kDa: kilodalton

mL: mililitros

nm: nanômetros

Nc1: *Neospora caninum* cepa 1

OPD: o-phenylenediamine

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PEG 50%: Polietileno Glicol

P3x63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NS-1, NS-0: linhagens de células de mielomas

PBS: solução tampão fostato

RPM: rotações por minuto.

TK: Timidina kinase

µg: microgramas

µL: microlitros

RESUMO

DEVENS, Bruna Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Produção de hibridomas e clones para obtenção de anticorpos monoclonais anti -*Neospora caninum* Nc-1 (Apicomplexa, Sarcocystidae).** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vitoria. Co-orientadores: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Laércio dos Anjos Benjamin.

O *Neospora caninum* é um protozoário apicomplexa com implicação em abortamentos em muitos países. Estão inclusas nas perdas econômicas, os abortamentos, a proporção de vacas descartadas e a reposição de novos animais no rebanho, a queda na produção leiteira, bem como na produção de gordura no leite. Sabe-se que os kits diagnósticos existentes no mercado são de alto custo e não são produzidos no mercado nacional, necessita-se, oferecer alternativas de diagnóstico confiáveis, e rápidas, com tecnologia nacional. A proposta do presente trabalho foi a produção de anticorpos monoclonais (AcM) de alta afinidade contra o *Neospora caninum* (amostra Nc-1), para a utilização em testes de imunodiagnóstico como imunofluorescência, imunoistoquímica, ELISA e dot-ELISA. Para a produção dos AcM usou-se o protozoário sonicado, proveniente da cultura em células VERO e foi purificado por filtração, utilizaram-se os taquizoítos para a imunização dos camundongos BALB/c, usando como adjuvante a saponina, o que permitiu a obtenção de anticorpos policlonais. A fusão das células esplênicas, provenientes dos camundongos imunizados, com as células de mieloma SP2/0 resultou na obtenção de 72,4% de hibridomas secretores de anticorpos anti-Nc-1. Após a clonagem por diluição limitante obteve-se 78,2% dos clones secretores de anticorpos anti-Nc-1. Após a reclonagem por diluição limitante, foram obtidos 4 clones secretores de AcM da classe IgG. Os AcM IgG2a obtidos foram capazes de revelar as proteínas de massa molecular 25 kDa e 70 kDa por “western blotting” e inibirem a multiplicação dos taquizoítos em células VERO. Os anticorpos monoclonais produzidos poderão ser usados no desenvolvimento de testes mais sensíveis para estudos epidemiológicos da neosporose ou poderão ser utilizados na identificação de proteínas relevantes para o desenvolvimento de vacinas.

ABSTRACT

DEVENS, Bruna Alves, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2009. **Production of hybridomas and clones to obtain monoclonal antibodies anti - *Neospora caninum* Nc-1 (Apicomplexa, Sarcocystidae)**. Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-advisers: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo and Laércio dos Anjos Benjamin.

The *Neospora caninum* is a protozoan apicomplexan with implication in abortions in many countries. They are included in the economical losses, the abortament, the proportion of discarded cows and the replacement of new animals in the flock, the fall in the milk production, as well as in the fat production in the milk. It is known that the kits existent diagnoses in the healthy market of high cost and they are not produced at the national market, it is needed, to offer diagnosis alternatives reliable, and fast, with national technology. The proposal of the present work was the production of monoclonal antibodies (mAb) of high likeness against the *Neospora caninum* (sample Nc-1), for the use in immunodiagnostic tests as immunofluorescence, immunohistochemistry, ELISA and dot-ELISA. For the production of mAb the sonicated protozoan was used, originating from the culture in cells VERO and it was purified by filtration, it was used the tachyzoites for the immunization of the mice BALB/c, using as saponin adjuvant , what allowed the obtaining of polyclonal antibodies. The fusing of the esplenic cells of the immunized mice and the myelomas SP2/0 resulted in the obtaining of 72,4% of hybridomas secretors of antibodies anti-Nc-1. After the cloning for limiting dilution was obtained 78,2% of the clones secretors of antibodies anti-Nc-1. After the recloning for limiting dilution, they were obtained 4 clones secretors of mAb of the class IgG. Obtained mAb IgG2a were capable to reveal the proteins of mass molecular 25 kDa and 70 kDa for "western blotting" to inhibit the multiplication of the taquyzoites in cells VERO. The monoclonal antibodies produced can be used in the development of more sensitive tests, in the epidemic studies of the neosporosis or they can be used in the identification of relevant proteins for the development of vaccines.

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário que foi inicialmente reconhecido em cães por BJERKAS e colaboradores em 1984, que descreveram a enfermidade neurológica em filhotes de cães da Noruega, os quais apresentavam encefalomielite, miosite e paresia. Parasitos livres foram encontrados no cérebro e nos músculos dos cães, e formas encistadas no cérebro, que se assemelhavam a *Toxoplasma gondii*, porém, os testes sorológicos realizados foram negativos para o mesmo.

Pouco tempo depois, DUBEY et al. (1988) tornaram a analisar os cortes histológicos dos 23 cães mortos em 1984. Desses animais somente 13 foram confirmados para *T. gondii*, enquanto nos outros se identificou um novo gênero, *Neospora*, e uma nova espécie.

O novo gênero foi devido às diferenças observadas quando comparado a *T. gondii*. Primeiro, os sinais clínicos foram relacionados a paresia e paralisia dos membros pélvicos os quais não são observados na toxoplasmose. A espessura da parede do cisto de *N. caninum* é menos delgada que de *T. gondii* (DUBEY et al., 1988).

N. caninum foi relacionado, inicialmente, como agente patogênico para bovinos por THILSTED e DUBEY (1989) e, desde então, vem sendo associado a prejuízos econômicos consideráveis em toda a cadeia produtiva do leite.

A neosporose é uma das causas mais importante da falha reprodutiva, do abortamento e da mortalidade neonatal, e a doença representa um problema significativo para médicos veterinários, pois não apresenta um sinal clínico evidente que a caracterize, aparte o abortamento ou nascimento de um

bezerro doente. Além disso, as vacas infectadas por *N. caninum* têm três vezes mais chances de abortar do que as vacas soronegativas (JENKINS, 2005).

Segundo DUBEY et al. (2003) o *Neospora caninum* é o protozoário apicomplexa com maior implicação em abortos em muitos países. LINDSAY et al. (1996) observaram abortos entre o terceiro e o oitavo mês da gestação das vacas, sendo que a maioria dos fetos abortados examinados tinha idade gestacional entre quatro e seis meses.

Segundo JUNQUEIRA e ALFIERI (2006), no Brasil, uma vaca que não produz um bezerro por ano, em consequência de mortalidade embrionária precoce ou tardia, abortamento, mortalidade perinatal e mortalidade neonatal gera uma despesa sem retorno de US\$ 77,97, ocasionando prejuízos econômicos no ciclo de produção da pecuária bovina de corte.

Além disso, foi constatado por HERNANDEZ et al. (2001) que as vacas soropositivas produzem 1Kg/dia a menos de leite comparadas com as soronegativas, além dos custos associados com a repetição do cio, aumento do intervalo entre partos, e aumento do descarte das vacas. Os kits diagnósticos existentes no mercado são de alto custo e produzidos por laboratórios dos Estados Unidos da América, Canadá e alguns países da Europa, o que dificulta o seu uso.

O teste ELISA tem sido largamente utilizado no diagnóstico de infecções em Medicina Veterinária (WRIGHT et al., 1993), por ser rápido e de fácil análise dos resultados. O teste de ELISA de captura com anticorpos monoclonais pode se converter em uma ferramenta muito útil para o estabelecimento de estratégias de controle (ITO et al., 2001).

A biotecnologia é um ramo do conhecimento científico que faz uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social. Entre esses sistemas celulares, os hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcM) contra agentes microbianos são de grande interesse biotecnológico. Os AcM têm sido amplamente empregados na detecção e caracterização imunológica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos e na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas e animais, entre outros usos (LENAARS e HENDRIKSEN, 2005).

O objetivo deste estudo foi à produção de anticorpos monoclonais de alta afinidade contra *N. caninum*, para utilização em testes de imunodiagnóstico, tais como: imunofluorescência, imunoistoquímica ou ELISA de captura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia e ciclo de vida do *Neospora caninum*

Segundo DUBEY et al. (1996) *Neospora caninum* é um protozoário do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, que pode infectar canídeos selvagens, domésticos, ruminantes e eqüinos. De acordo com DUBEY et al. (2002) a neosporose é causada por *N. caninum* que foi descrito por DUBEY em 1988. *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídio intracelular obrigatório (NICOLLE e MANCEAUX, 1908 apud, BARBOSA, 2002) da família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (TAN, 1997), gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 1994).

N. caninum é um parasito morfologicamente semelhante a *Toxoplasma gondii*, diferindo deste apenas pela imunogenicidade e patogenicidade (DUBEY, 2003).

O *Neospora caninum* apresenta roptrias, multiplica-se por endodiogenia e possui formato ovóide, ou lunar (DUBEY et al, 1988). HEMPHILL e GOTTSTEIN (1996) determinaram que os parasitos são encontrados em células do sistema nervoso, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos, células do epitélio dos túbulos renais e hepatócitos dos animais infectados. Os taquizoítos penetram ativamente nas células hospedeiras, instalando-se em um vacúolo parasitóforo.

Os taquizoítos possuem em sua composição amilopectina, micronema, núcleos, roptrias, grânulo denso, como se pode observar na Figura 1.

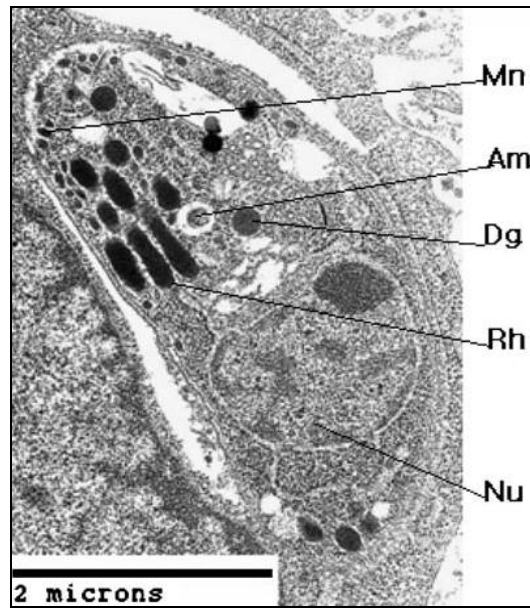


Figura 01- Estrutura do taquizoíta do *Neospora caninum*, Am Amilopectina, Mn micronema, Nu Núcleos, Rh Roptrias, Dg grânulo denso. Fonte:(KANG, et al., 2008)

DUBEY et al. (1996), verificaram que os cistos teciduais são arredondados ou elípticos e têm sido encontrados geralmente em células do sistema nervoso, como cérebro, medula espinhal, nervos, retina e musculatura esquelética dos hospedeiros intermediários. DUBEY et al. (1998) descreveram cistos tissulares de *N. caninum* em cérebro e lesões multifocais de miosite não supurativa, com a presença de taquizoítos no sistema nervoso, coração e musculatura esquelética de cães com neosporose. Além de também serem encontrados na língua e coração de ovinos por SOUZA SILVA (2005). No interior dos cistos encontram-se os bradizoítos, os quais são delgados, contendo as mesmas organelas dos taquizoítos, porém com um menor número de roptrias e maior número de grânulos de amilopectina (JARDINE, 1996).

Os oocistos contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, esporulando no meio ambiente, em 24 horas (McALLISTER et al., 1998).

MCALLISTER et al. (1998) e GONDIM et al. (2004) respectivamente, demonstraram experimentalmente que cães e coiotes são hospedeiros definitivos do *N. caninum*.

Neospora caninum possui diversos hospedeiros intermediários, DUBEY (2003) relatou como hospedeiros os seguintes animais: bovino, eqüino, cabra, ovelha, búfalo, veado e antílope. Tem-se o rato doméstico (*Rattus norvegicus*), descrito por HUANG et al. (2004), a raposa por ALMERIA et al. (2002) e

guaxinim por LEMBERGER et al. (2005), também considerados hospedeiros intermediários.

Cães e coiotes infectam-se ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies as quais contenham cistos, além da ingestão de oocistos esporulados livres no meio-ambiente, denominada de transmissão horizontal. Segundo TREES (1999), a transmissão vertical ou transplacentária é a forma mais freqüente de infecção por *N. caninum*, sendo uma importante forma de manutenção do agente nos rebanhos. DUBEY (2003) afirmou que assim como existe a transmissão vertical nos hospedeiros intermediários, neles também ocorre à transmissão horizontal pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos e cistos teciduais. ANDERSON et al (2000) determinaram que as fêmeas bovinas originadas de outras fêmeas infectadas podem assim nascer, a transmissão é denominada congênita e ocorre a manutenção do agente para seus descendentes em futuras gestações.

Um estudo recente realizado na Holanda por BARTELS et al. (2007) estimou que a probabilidade da ocorrência da transmissão vertical é de 62%, comparado com 3,3% da probabilidade da transmissão horizontal.

As galinhas são animais cosmopolitas que podem ser usadas na alimentação dos cães. COSTA et al. (2008) observaram que esses animais são hospedeiros intermediários para o *N. caninum*, demonstrando a sua importância epidemiológica já que confere uma distribuição ainda mais ampla do protozoário e a possibilidade de outras espécies de aves também serem naturalmente infectadas. Tendo-se em vista o exposto sobre o ciclo biológico do *N. caninum*, é possível observar na Figura 02 a representação deste ciclo.

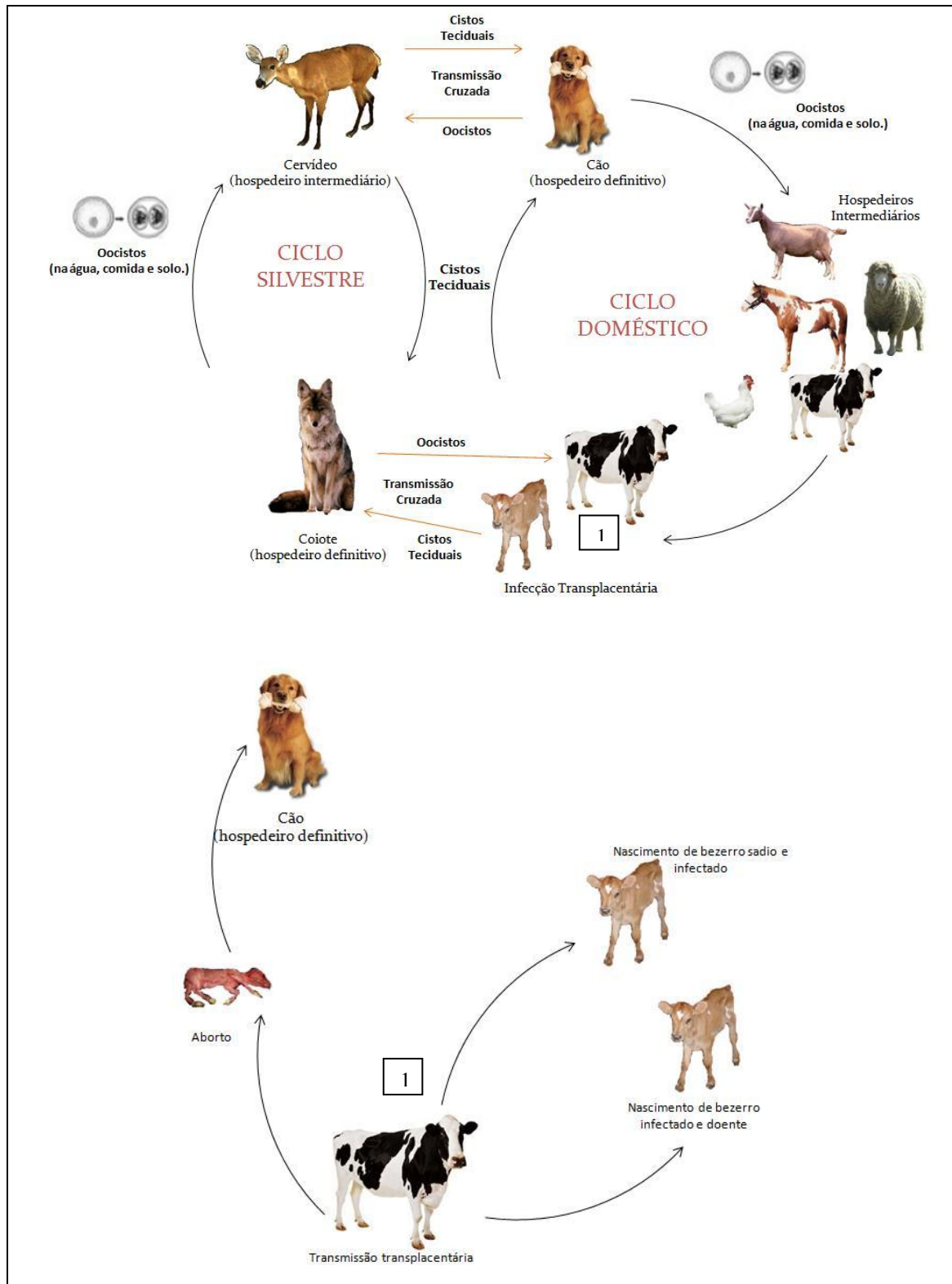


Figura 02- Ciclo de vida do *Neospora caninum*. Adaptado de DUBEY, 1999.

A transmissão pela conjuntiva é uma nova rota de infecção do *N. caninum* avaliada por YANIZ et al. (2007), demonstrando que por essa via existe a produção sistêmica de anticorpos e alterações patológicas tanto nas vacas prenhas como no feto.

A presença do DNA de *N. caninum* no sêmen de touros naturalmente infectados foi reportada em 2004 por CAETANO DA SILVA e colaboradores. SERRANO (2006) demonstrou o potencial da contaminação via inseminação artificial, e via intra-uterina pelo contato do sêmen contaminado. O estudo realizado por MASUDA et al. (2007) com camundongos demonstrou que os machos imunodeficientes mantinham os taquizoítos nos testículos e vesícula seminal, ocorrendo a transmissão venérea em fêmeas imunodeficientes e pôr conseqüência a transmissão transplacentária para os fetos.

2.2. Controle da neosporose

A fim de prevenir a infecção pelo *N. caninum* deve-se ficar atento com as medidas de controle revisadas por DUBEY et al. (2007), as quais seriam evitar que os cães contaminem o alimento e a água dos bovinos com as fezes, evitar que os cães alimentem-se com a placenta bovina, e por fim evitar a presença dos roedores nas fazendas.

Segundo REICHEL e ELLIS (2002), não há indicativos de agentes quimioterápicos efetivos que podem ser usados para prevenir a transmissão vertical da neosporose bovina e há preocupações que o tratamento longo com algumas drogas podem resultar em resíduos na carne e leite dos animais produtores.

A vacina comercial, Bovilis® Neoguard inclui uma preparação morta de taquizoítos do *N. caninum* com um adjuvante Spur® e está comercialmente disponível em vários países (INNES 2007). Dados da eficácia na vacina mostram que obteve ao redor de 50% de efeito protetor contra abortos que acontecem a 5-6 meses de gestação em gado na Costa Rica e em Nova Zelândia. O gado vacinado mostrou uma taxa de aborto global de 4,3% comparado com 5,7% dentro dos não vacinados (INNES 2007), evidenciando a não efetividade da vacina. ROMERO et al., 2004, afirmaram que a vacina é avaliada em muitos países do mundo, mas sua eficácia é discutida pela comunidade científica. Além disso, um programa de vacinação pode ser eficaz em um país, porém não ser efetiva em outro.

Segundo DUBEY (2004), a vacina possui efeito desconhecido na prevenção da infecção fetal, sendo assim, não há nenhuma eficácia conhecida contra infecções congênitas. Uma vacinação que produza a imunidade do

animal e impeça a infecção aguda por *Neospora caninum* de chegar à placenta provavelmente seria o procedimento mais confiável.

Além disso, apesar dos avanços imunobioquímicos no estudo de *N. caninum*, ainda não foi elaborada uma vacina eficiente para a prevenção da doença (DUBEY et al., 2007). Segundo INNES et al. (2007), ainda há muitos desafios para se chegar a vacinas efetivas contra a neosporose bovina, é preciso uma melhor compreensão da relação do hospedeiro e parasito durante a gravidez, desenvolver modelos de animais apropriados e protocolos para testar a eficácia de futuros candidatos a vacinas e a determinação das suas implicações imunológicas na infecção congênita. Assim as vacinas até então desenvolvidas para neosporose, não conferiram imunidade eficiente contra os abortamentos em bovinos.

GONDIM (2008) afirma que diante dos diferentes problemas apresentados, como a expansão do espectro dos hospedeiros do *N. caninum*, a indução das reações cruzadas por protozoários afins, como *Hammondia heydorni* e *Neospora hughesi*, outras prováveis vias de transmissão do parasito e a falta de vacinas eficientes tornam ainda mais complexo o controle da neosporose.

2.3. Diagnóstico

A presença de anticorpos num animal indica a exposição ao parasito ou a um parasito estritamente relacionado que permite a reação cruzada, não indicando necessariamente a existência de uma infecção ativa (VARDELEON, et al., 2001).

O diagnóstico da neosporose segundo WOUDA et al. (1997) baseia-se em exames histopatológicos dos fetos abortados, analisando as características das lesões dos tecidos fetais com testes de imunoperoxidase e PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). Realiza-se a observação microscópica das lesões dos tecidos, principalmente no cérebro, no entanto, não se considera um procedimento sensível (BOGER e HATEL, 2003). Estes mesmos autores consideram que em muitas situações por não haver a avaliação dos fetos abortados, a escolha são os diagnósticos sorológicos (WAPENAAR, et al., 2006). Os testes sorológicos utilizados com maior frequência são ELISAs

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência e immunoblot (HOANE, et al., 2006).

A imunofluorescência indireta foi o primeiro teste sorológico desenvolvido em 1988 por DUBEY. É a técnica mais comumente utilizada dos diagnósticos sorológicos, apesar de ser um teste subjetivo (DUBEY e LINDSAY, 1996). Enquanto nos diferentes tipos de ELISA são utilizados o extrato de taquizoítos, os taquizoítos inteiros, os antígenos de taquizoítos incorporados a um complexo imunoestimulante ou antígenos recombinantes (HEMPHILL e GOTTSTEIN, 2000). Os taquizoítos de cepas do *N. caninum* isoladas de bovinos e de cães são mantidos em cultivo *in vitro*, seguindo a técnica utilizada por ANDERSON et al. (2000). Não existem indicações de que pequenas diferenças antigênicas entre os isolados afetam a eficácia dos testes (BJÖRKMAN et al., 1999).

Há um grande número de testes sorológicos que têm sido desenvolvidos para a detecção dos anticorpos contra o *N. caninum*, mas não são generalizadamente aceitos. O direcionamento na escolha do ELISA deve-se a uma análise de um número maior de soros e a sua realização em um curto espaço de tempo. Ao mesmo tempo, os ELISAs não são testes padronizados e não possuem uma titulação de corte, tornando complexa e subjetiva a interpretação dos seus resultados (LASRI, et al., 2004). O ELISA de competição, utilizando anticorpos monoclonais dirigido ao antígeno de superfície de 65 kDa do taquizoíto do *N. caninum* é um método mais específico (BJÖRKMAN, et al, 1994), por usar proteínas purificadas específicas do *N. caninum* (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Neospora caninum possui proteínas de superfície que são responsáveis pelo processo de adesão e invasão na célula hospedeira. Dentre as proteínas tem-se a NcSRS2, que é predominante nos isolados do parasito e utilizada como antígeno para a realização do ELISA, tendo-se observado uma alta sensibilidade e especificidade (NISHIKAWA et al., 2000). Estão sendo estudados por INNES et al. (2002) os testes de ELISAs que distinguem as infecções recentes das infecções crônicas.

O NAT, teste de aglutinação para anticorpos anti-*N. caninum*, não exige anticorpo secundário marcado, sendo considerado de simples execução (CANADA et al., 2004).

A detecção de oocistos do *N. caninum* nas fezes também pode ser realizada. No entanto, por existir outros coccídios que possuem a mesma morfologia do *Neospora*, essa metodologia torna-se complexa de ser adotada. Diante disso, a descrição por métodos moleculares do parasito nas fezes, tem sido realizada por PALAVICINI et al. (2007), seguindo a técnica de PCR. Porém, a sensibilidade da PCR é baixa pelo pequeno número de oocistos encontrados nas fezes dos animais. O *N. caninum* e *Hammondia heydorni* apresentam oocistos morfologicamente indistinguíveis, no entanto, as técnicas de diagnóstico molecular e o sequenciamento do DNA são utilizados na diferenciação desses dois gêneros (SLAPETA, et al., 2002). Assim como pode realizar a identificação da quantidade do DNA do *N. caninum* presente nos tecidos infectados conforme os trabalhos de CAETANO DA SILVA, et al., (2004).

SILVA et al. (2004) por meio de Western Blotting ou Immunoblotting, que são testes de alta sensibilidade e especificidade, reconheceram quatro imunodomínios de 17, 29, 30 e 37 kDa do *N. caninum*, porém concluíram que não são técnicas de imunodiagnóstico para serem utilizadas na rotina.

Os anticorpos monoclonais têm sido utilizados para detecção da proteína de choque 70 (HSP70) assim como no estudo de vacinas e drogas para o controle do *N. caninum* (LIAO et al., 2005).

A neosporose é uma doença emergente que afeta animais em todo o mundo. Assim, é necessário um diagnóstico preciso para comprovar ou descartar a presença do *N. caninum* no animal. Além da sua importância na adoção de medidas adequadas de controle e estabelecimento da epidemiologia da infecção (BOGER e HATTEL, 2003).

2.3.1. Reação de Imunofluorescência Indireta

A técnica de RIFI foi a primeira técnica sorológica aplicada a neosporose e tem sido muito utilizada como prova de referência, sendo DUBEY em 1988 o pioneiro nessa metodologia para o *N. caninum*. DUBEY e LINDSAY (1996) utilizaram os taquizoítos cultivados em células VERO como antígenos para o preparo das lâminas para a RIFI. Contudo, existe uma série de dificuldades relativas à técnica, citadas por BJÖRKMAN e UGLA (1999), como a subjetividade na interpretação dos resultados e a necessidade de experiência

prévia do profissional para a realização da técnica e a sua leitura em microscópio de imunofluorescência.

O método de RIFI já foi utilizado no diagnóstico da neosporose por DUBEY et al. (1996) em várias espécies animais: cães, raposas, gatos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, eqüinos, roedores e primatas. A RIFI é considerada como padrão ouro, ou seja, padrão para calibrar e comparar com os novos testes adotados (BJÖRKMAN et al., 1999). É usada principalmente na detecção de anticorpos direcionados aos antígenos da superfície celular do parasito. Segundo VARDELEON et al. (2001), o método de RIFI é altamente sensível e identifica todas as amostras reagentes com o anticorpo secundário marcado com fluoresceína.

2.3.2. Western Blot

O método de Western Blot identifica especificamente as reações antígeno-anticorpo direcionadas às proteínas específicas. O Western Blot tem sido muito utilizado como teste confirmatório para *Neospora sp.* em muitas espécies animais, sendo considerado um teste específico. Assim, quando se associa esta técnica aos métodos de RIFI ou ELISA a prevalência da neosporose diminui, sugerindo que a infecção é menos comum quando comparada com os resultados dos demais testes sorológicos (HOANE et al., 2006).

ANDREOTTI et al. (2003) afirmaram que os métodos sorológicos devem ser utilizados com cautela no diagnóstico do abortamento por *N. caninum*, sendo a confirmação realizada pela demonstração do parasito ou do seu DNA no feto, preferencialmente em associação com a patologia característica da neosporose.

2.4. Epidemiologia e Impacto Econômico da Neosporose bovina

Muitos estudos epidemiológicos são realizados no mundo inteiro, assim como no Brasil. No sul do Brasil, CORBELLINI et al., (2002) demonstraram que 39,1% das causas de aborto em bovinos são referentes a *N. caninum*. Assim, em 2006, COBERLLINI afirma a importância da neosporose como causa de abortos em bovinos no Brasil.

ANDERSON et al., (1995) afirmaram que o *Neospora caninum* está distribuído pelos cinco continentes, existindo uma variação considerável entre os países, principalmente quanto ao tipo de produção que cada um realiza, exemplificando que a Califórnia possui na bovinocultura de leite 42,5% das causas de abortamento pela neosporose. Perdas na ordem de US\$ 35 milhões anuais foram relatadas por ANDERSON et al., (1991) neste país devido aos abortamentos e na Nova Zelândia as perdas econômicas anuais na indústria leiteira alcançaram US\$12 milhões. PFEIFFER et al., (1997) afirmaram que estão inclusas nestas perdas, os abortamentos, a proporção de vacas descartadas e a reposição de novos animais no rebanho, a queda na produção leiteira, bem como na produção de gordura no leite.

Para HADDAD et al., (2005), a indústria leiteira canadense obteve uma perda anual atribuída a *N. caninum* de aproximadamente US\$1.766,51 por 100 matrizes ou US\$18,00 por matriz infectada. Para rebanhos, assumindo um tamanho médio de 61 matrizes, foi estimada a perda de US\$1.426,11 por rebanho infectado, devido principalmente a influência da variação da prevalência animal dentro do rebanho. Aproximadamente 50% das perdas econômicas foram atribuídas a abortamentos.

No estado da Bahia, GONDIM et al., (1999), determinaram que a prevalência da neosporose foi de 14,09%. CORBELLINI et al., (2002) determinaram que no Rio Grande do Sul, as vacas com histórico de aborto apresentaram soropositividade de 23%, enquanto as que não tinham histórico de aborto a prevalência foi de 8,3%. OGAWA (1999) observou que na região norte do estado do Paraná existia um percentual de 11,69% de soropositividade para *N. caninum*. Assim como no Pará, a prevalência foi de 19,2% para bovinos de corte e 17,5% para bovinos de leite. MINERVINO et al, (2007) e GORETTI et al. (2002) identificaram que a prevalência de *N. caninum* nos soros fetais bovinos em Minas Gerais é de 11,5 % e RAGOZO et al. (2002) determinaram que os bovinos adultos em Minas Gerais possuíam uma prevalência de 29% para a neosporose.

No Brasil, há diversos tipos de infecções que provocam o abortamento. Foi demonstrado que muitos deles ocorrem na Diarréia Viral Bovina (BVD), na Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (Herpesvírus Bovino tipo1, BHV-1) e na

Neosporose. Observou-se no sul do Brasil que 39,01% dos fetos abortados tiveram como causa a neosporose (CORBELLINI et al., 2002). O diagnóstico da neosporose é considerado difícil, pois não há um método de rotina padronizado (DUBEY e SCAHRES, 2006). Assim, a pesquisa para desenvolver uma ferramenta para ser utilizada na investigação parasito-hospedeiro, no seu diagnóstico e no controle da doença é indispensável para o Brasil.

2.5. Imunologia da Neosporose

A resposta ao *N. caninum* é dependente de respostas imunes mediadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T CD4+ tipo 1 (Th1). Durante a infecção aguda, IL-12 é produzida por células fagocitárias infectadas, diferenciando linfócitos T CD4+ e CD8+ em subpopulações produtoras de citocinas pró-inflamatórias e estimulando células NK a produzirem IFN- γ (interferon gama), ativando macrófagos e eliminando células infectadas pelo parasito, por meio de mecanismos mediados por óxido nítrico (HEMPHILL, 1999).

A importância das células T na infecção por *N. caninum* foi demonstrada quando camundongos atímicos apresentaram 100% de mortalidade antes de completar 30 dias de infecção. A maior susceptibilidade destes animais sugere que as células T têm papel chave na supressão da propagação dos taquizoítos. Em contrapartida, a adição de IL-4 em culturas de macrófagos infectados com *N. caninum* e tratados com IFN- γ aumentou a viabilidade dos taquizoítos. Conseqüentemente, o balanço de IFN- γ e IL-4 é crucial para o controle da infecção (NISHIKAWA et al., 2003).

A infecção natural e experimental no gado é similar à resposta imune em camundongos, a qual foi observada por WILLIAMS et al. (2000), onde a principal resposta imune na proteção contra *N. caninum* foi do tipo T helper 1 (Th1) que se caracteriza por IFN- γ e IgG, que inibem a multiplicação dos taquizoítos.

Apesar dos bovinos demonstrarem sinais clínicos durante a infecção pelo *N. caninum*, os maiores problemas surgem durante a gravidez devido às mudanças no perfil das citocinas. A resposta imune predominantemente Th1 é incompatível com o sucesso da gestação (RAGHUPATHY, 1997). Para que o

feto e seus anexos possam ser reconhecidos como “próprios” durante o período gestacional, ocorre imunomodulação da resposta levando a expressão de citocinas para um padrão Th2 nos linfócitos T CD4+, sendo este perfil induzido principalmente pelos altos níveis de progesterona mantidos durante a gestação (INNES et al., 2002).

A fêmea é hábil para dar uma resposta efetiva do tipo Th1, com liberação de IL-2, IL-12 e IFN- γ que podem causar o aborto do feto no primeiro trimestre da gestação (ENTRICAN et al., 2001). No segundo trimestre da gestação, predomina a combinação da resposta Th2 e citocinas (INNES et al., 2002). A IL-10, liberada pelas células trofoblásticas do feto, diminui a taxa de produção de IFN- γ durante a infecção, o que estimula a multiplicação do parasito e infecção do feto (INNES et al., 2002).

A manifestação clínica da neosporose depende do equilíbrio entre a capacidade do taquizoíto em penetrar e multiplicar na célula hospedeira e a habilidade do hospedeiro na inibição do parasito (BUXTON et al., 2002). Assim, no primeiro trimestre da gestação o feto está vulnerável, pois o timo, baço e linfonodos periféricos estão em formação. Somente no terço final, que se tornam imunocompetentes e respondem ao parasito, porém esses animais nascem infectados e transmitem o parasito para as futuras gerações (INNES et al., 2002).

Segundo esses mesmos autores a participação efetiva das diferentes classes de imunoglobulinas na resistência à infecção por *N. caninum* é incerta. Especula-se que os anticorpos tenham um papel auxiliar no controle da infecção, participando da neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares, podendo, assim, reduzir a disseminação do agente.

2.6. Antígenos do *Neospora caninum*

A característica mais importante das formas invasivas de *N. caninum* é o complexo apical localizado na porção anterior do parasito que participa no reconhecimento e na penetração da célula hospedeira (BLACKMAN e BANNISTER, 2001).

A nomenclatura das proteínas de *N. caninum* foi confirmada por HOWE e SIBLEY em 1999, tendo sido determinada de acordo com a localização das proteínas no parasito. Assim a nomenclatura foi designada, onde as proteínas

de micronemas foram denominadas com as siglas: MIC ou MAP (proteínas associadas à micronemas), os grânulos densos de GRA, as proteínas das roptrias de ROP e aos antígenos de superfície de SAG (gene do antígeno de superfície) e SRS (seqüências relatadas da superfície).

A identificação dos antígenos dos taquizoítos baseia-se em diferentes técnicas, tais como: uso de anticorpos monoclonais, produção de soro policlonal contra o parasito inteiro, construção de bibliotecas de cDNA, fração subcelular do parasito e purificação com anticorpos de afinidade. A maioria dos antígenos encontrados é da superfície do parasito, de organelas secretoras, micronemas, roptrias e grânulos densos. Os antígenos detectados incluem os de superfície: NcSAG1 (Nc-p36) e NcSRS2 (Nc-p43), dos grânulos densos: NcGRA1, NcGRA2, NcGRA6, NcGRA7, dos micronemas: NcMIC10, a serino protease: Nc-p65 e finalmente uma hidrolase de nucleoside-3-phosphate (HEMPHILL et al., 1999).

Segundo HEMPHILL e GOTTSTEIN (1996) as proteínas da superfície celular são importantes para a sobrevivência do parasito, pois estão envolvidas com a adesão, invasão e estímulo da resposta imune do hospedeiro. Em 1994, BJÖRKMAN e colaboradores determinaram as primeiras proteínas de 17-18 kDa e 30-45 kDa da superfície do *N. caninum* que foram identificadas por Western Blot. Mais tarde, SCHARES et al. (1999) identificaram três antígenos de superfície de 19, 28 e 40 kDa.

HOWE et al. (1998) definiram a existência de dois antígenos de superfície que possuem aproximadamente 29 kDa e 35 kDa que são referidos, respectivamente, como p29 e p35. HEMPHILL e GOTTSTEIN (1996) haviam identificado essas proteínas, porém estes antígenos foram chamados de Nc-p36 e Nc-p43. A diferença na massa molecular dessas proteínas ao que foi determinado por HOWE et al. (1998) foi justificada pela alteração na migração em SDS-PAGE quando se usou o agente redutor β -mercaptoetanol, que quebra as pontes de dissulfeto e diminui a sua migração causando um aumento aparente no peso molecular. As proteínas p29 e p35 são antígenos de superfície do *N. caninum*, a qual se observa a interação do parasito na membrana da célula hospedeira.

Duas proteínas dos grânulos densos foram clonadas, NcGRA6, NcGRA7 com massa molecular de respectivamente 37 e 33 kDa. LALLY et al. (1996)

demonstraram a utilidade diagnóstica das NcGRA6 e NcGRA7 para o método de ELISA. Posteriormente, HEMPHILL et al. (1998) comprovaram que esta proteína é secretada na membrana do vacúolo parasitóforo, aparecendo mais tarde associada à matriz do vacúolo.

As proteínas de 29 e 67 kDa, denominadas de NcNTPase-I e NcGRA2 foram identificadas e caracterizadas, respectivamente, por ASAI et al. (1998) e ELLIS et al. (2000).

Somente BARTA et al. (1992) identificaram uma proteína de roptrias de 17 kDa, que foi considerada imunodominante. Foram caracterizadas três proteínas de micronema, NcMIC3 por SONDA et al. (2000), NcMIC2 por LOVETT et al. (2000) e NcMIC1 por KELLER et al. (2002) com massa molecular, respectivamente, de 38, 95 e 60 kDa. A proteína NcMIC4 é a segunda proteína de micronema, depois da NcMIC3 já descrita, que exhibe afinidade por glicosaminoglicanos e sulfato de condroitina. Ela é secretada no meio de cultura, na forma solúvel, quando se incubam taquizoítos extracelulares de *N. caninum* a 37° C (KELLER et al. 2004).

Em 2004, KELLER e colaboradores identificaram as proteínas de 70 e 55 kDa dos taquizoítos do *N. caninum* que foram purificadas pela cromatografia de afinidade lactose-agarose. São proteínas de micronema que desempenham um papel importante na primeira fase da adesão por mediar o contato entre o parasito e a célula hospedeira. A imunofluorescência e a microscopia eletrônica com anticorpos purificados por afinidade associam-se com os micronemas. A proteína de 70 kDa foi denominada por esses pesquisadores de NcMIC4 (*N. caninum* microneme proteína 4).

NISHIKAWA et al (2000) identificaram, pela primeira vez, a proteína de 70 kDa, a qual se estabeleceu a relação parasito e célula hospedeira. Os anticorpos monoclonais produzidos contra os antígenos dos taquizoítos do *N. caninum* levam o reconhecimento de três antígenos imunodominantes de 70 kDa, 42 kDa e 32-37 kDa, as quais são proteínas que levam à invasão da célula hospedeira.

Antígenos imunodominantes de 17 e 29-32 kDa foram selecionados por SILVA et al. (2006) como marcadores para o desenvolvimento do diagnóstico sorológico na infecção por *N. caninum*.

O reconhecimento da fração antigênica p-17 determina uma infecção com o *N. caninum*, principalmente porque não há reação cruzada com *T. gondii* (LOUIE, et al. 1997). Assim, essa fração antigênica foi selecionada por alguns autores para detectar e quantificar a produção de IgG, por Western Blot, permitindo que essa proteína possa ser utilizada nos testes diagnósticos (GARCÍA, et al., 2006)

Os trabalhos realizados por HALDORSON, et al. (2005), sobre a proteína imunodominante de superfície do taquizoíto do *Neospora caninum*, NcSRS2, de 42kDa, demonstraram que a mesma tem um papel importante na invasão das células hospedeiras. Além disso, constataram que os camundongos que foram imunizados com NcSRS2 tiveram uma redução da transmissão congênita perante o desafio com os taquizoítos. Os autores concluíram que a neutralização desse antígeno pode ser importante no controle da neosporose.

Segundo BASZLER et al. (1996), os soros de vacas com o histórico de abortamento, os fluidos dos fetos abortados e os bezerros congenitamente infectados com o *N. caninum* revelaram pela técnica de western blot a presença de três antígenos do protozoário de massa molecular de 25, 65, e 116 kDa.

GARCIA et al. (2005) determinaram em bovinos a presença de anticorpos contra antígenos dos bradizoítos, o NcSAG4 de massa molecular de 18,4 kDa. isto determinou o papel dessa proteína na indução da resposta imune, já que animais congenitamente infectados apresentaram anticorpos anti-NcSAG4, sendo a resposta estabelecida na infecção persistente, quando ocorre a maturação do taquizoíto a bradizoíto.

2.7. Anticorpos monoclonais

Segundo ABBAS et al. (2005) os anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone originado dos hibridomas. KÖHLER E MILSTEIN (1975) foram os primeiros a demonstrar a produção dos hibridomas, por meio da fusão dos linfócitos normais, secretores de anticorpos, com as células de mielomas não secretores de anticorpos. KÖHLER e MILSTEIN (1975) escolheram para o processo de fusão as células esplênicas que possuem baixa multiplicação *in*

vitro, porém produzem anticorpos e os mielomas que possuem multiplicação por período indeterminado.

A maioria dos roedores (ratos, camundongos) pode ser usada na produção dos anticorpos monoclonais, porém os camundongos BALB/c são os animais de eleição, pelo seu tamanho, fácil manejo, por serem compatíveis com as células de mieloma e por produzirem altos títulos de anticorpos (LITTLE et al., 2000)

SCHUNK e MACALLUM (2005) determinaram que a dosagem do imunógeno a ser inoculada nos animais varia de 10 a 50 µg de proteína por dose, emulsionados em adjuvante, com intervalos de inoculação de duas a quatro semanas.

As células sensíveis ao meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) e não produtoras de imunoglobulinas estão disponíveis para o desenvolvimento das pesquisas. Dentre elas têm-se: P3x63Ag8. 653 Sp2/0-Ag14, NS-1, NS-0 (SHULMAN et al., 1978).

A fusão entre a célula do mieloma e do linfócito B é conseguida pela ação do polietilenoglicol (PEG 50%). Esta substância realiza a fusão das membranas de células adjacentes, formando uma única célula com dois ou mais núcleos (HARLOW e LANE, 1988). Na fusão obtêm-se várias combinações, como células de mieloma e células de mieloma, células B e células B, células de mieloma e células B, sendo esta última a necessária para a continuidade do processo de produção de anticorpos monoclonais (PONTECORVO, 1976; HARLOW e LANE, 1988).

Os mielomas são selecionados na presença de drogas cuja base seja análoga a 8-azaguanina e 6-tioguanina. As células mutantes sobreviventes possuem um gene defeituoso para a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HGPRT'ase). Essa enzima é utilizada pela célula, quando a síntese "de novo" de purinas e pirimidinas é bloqueada e constitui parte da via DE recuperação para a síntese de ácidos nucléicos (LITTLE et al., 2000). A enzima HGPRTase transfere o fosforibosil da hipoxantina para a guanina, permitindo o aproveitamento de bases prontas (via de recuperação). O meio HAT contém aminopterina que bloqueia a via de recuperação e contém hipoxantina e timidina como bases disponíveis.

As células esplênicas possuem um ciclo de vida limitado em meio de cultura. As células de mieloma têm um crescimento ilimitado, assim para a sua eliminação utiliza-se um meio de cultura seletivo (HAT – hipoxantina, aminopterina e timidina) desenvolvido por LITTLEFIELD em 1964, que se baseia na deficiência da enzima HGPRT'ase na célula de mieloma necessária para a síntese de ácidos nucleicos (LITTLE et al., 2000).

Uma célula animal normal sintetiza nucleotídeos de purina e timidina na via “de novo”, a partir de fosforibosil pirofosfato e uridilato, respectivamente, em que está envolvida a transferência de grupos metil e formil de tetrahydrofolato ativado. Drogas como a aminopterina, que é um antagonista do ácido fólico, têm como característica promover o bloqueio da reativação do tetrahydrofolato, deste modo, inibindo a síntese de purina e timidilato (ABBAS et al., 2005). Esses componentes são necessários para o DNA, e a aminopterina bloqueia a síntese de DNA na via “de novo” como pode ser observado na figura 03.

As células normais tratadas com a aminopterina podem usar a via de recuperação onde a purina é sintetizada a partir de suplementação exógena de hipoxantina, desde que tenham a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase. As células de mieloma deficientes em HGPRT'ase não podem usar a via de recuperação e então morrem na presença do meio seletivo. Entretanto, se células normais são fusionadas com células HGPRT'ase negativas, os híbridos resultantes crescem normalmente em meio HAT e sintetizam DNA, visto que, a enzima HGPRT provém da célula normal (HARLOW e LANE, 1988)

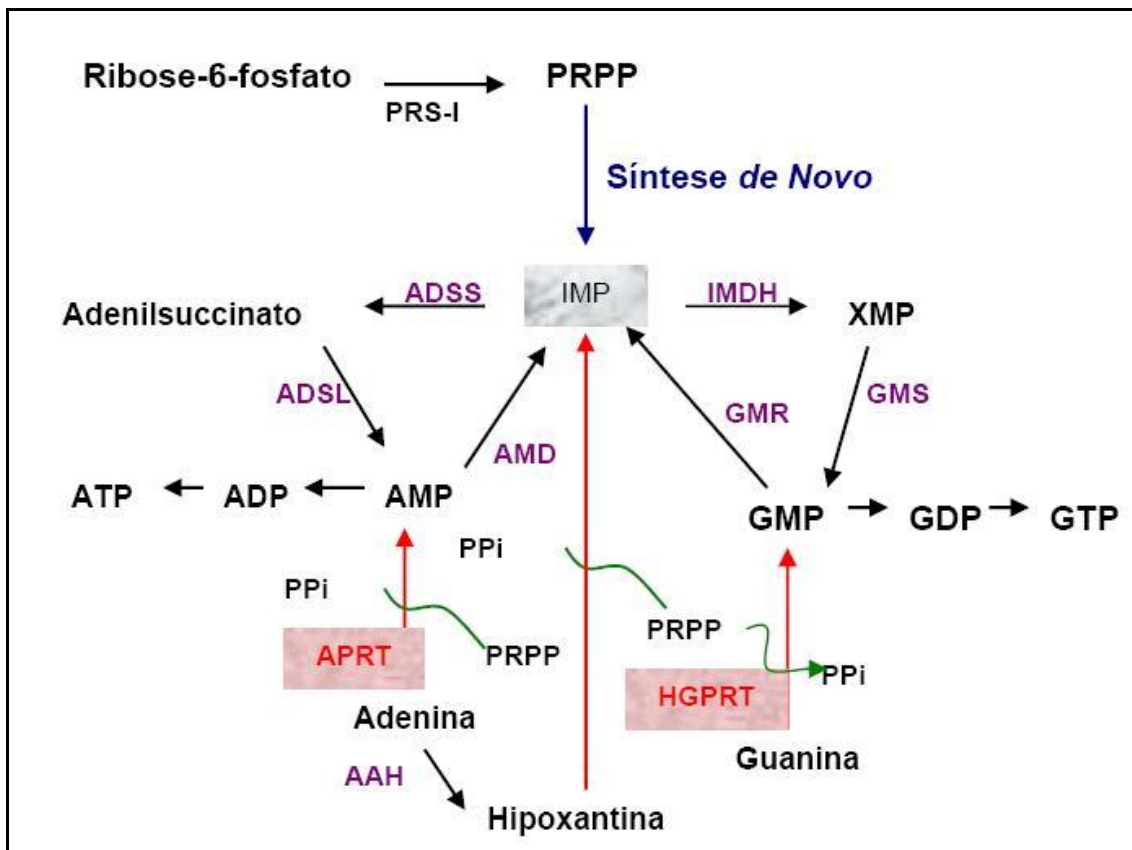


Figura 03- Representação da Via “de recuperação” – fonte: Rosas, 2005.

Abreviações: PRPP, 5-Fosforribosil-1-pirofosfato, IMP, Inosina Monofosfato, AMP, Adenosina Monofosfato, ADSS, Adenilsuccinato sintetase, ADSL, Adenilsuccinato liase, Ppi, Pirosofosfato inorgânico, APRT, adenina fosforribosil transferase, IMDh, IMP desidrogenase, XMP, Xantina monofosfato, GMS, Glutamina amidotransferase, GMP, Guanosina Monofosfato, GDP, Guanosina difosfato, GTP, Guanosina trifosfato, HGPRT, Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferase. A via de síntese “de novo” é apresentada em azul. Os substratos e os produtos das reações são apresentados em preto. As reações catalisadas pelas PRTases: APRT (adenina-fosforribosil-transferase) e HGPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase) são apresentadas em vermelho. Demais enzimas que participam das reações são apresentadas em violeta. As setas verdes mostram a liberação de pirofosfato (PPI) nas reações catalisadas pelas PRTases.

Segundo MORALES (1993) após a fusão os hibridomas são colocados em meio seletivo (HAT) os quais são selecionados através de testes diagnósticos para verificar quais híbridos estão produzindo anticorpos. As células que estiverem com produção de anticorpos são clonadas e propagadas em meios de cultura. Os clones podem ser injetados intraperitonealmente em camundongos BALB/c, onde podem se multiplicar como um tumor sólido, produzindo líquido ascítico. Os testes diagnósticos devem ser sensíveis, devido à pequena quantidade de anticorpos presente no meio de cultura, como foi afirmado por LIDDELL e CRYER (1991), que usaram para a seleção dos híbridos as técnicas de ELISA, dot-ELISA e imunofluorescência.

Com a clonagem dos hibridomas objetiva-se a produção de uma linhagem de células idênticas produtoras de anticorpos. O método baseia-se

em diluições sucessivas em placas de cultivo, de maneira que cada poço contenha ao final das diluições uma única célula. Com a confirmação da presença de células secretoras de anticorpos monoclonais, algumas amostras são estocadas em nitrogênio líquido, e outras são propagadas em meio de cultura ou in vivo, obtendo-se quantidades ilimitadas de anticorpos monoclonais (HARLOW e LANE, 1988).

Segundo LIDDELL e CRYER (1991), as células propagadas em meio de cultura devem ser monitoradas, por testes de imunodiagnóstico, para observar a fidelidade da produção de anticorpos contra o antígeno predefinido.

A célula híbrida secreta o mesmo anticorpo que o linfócito B normal e multiplica-se em cultura indefinidamente. Com as linhagens dos hibridomas assegura-se a disponibilidade permanente dos anticorpos monoclonais. Após a clonagem e expansão, as células podem ser estocadas em nitrogênio líquido, por um período indeterminado, constituindo fontes secretoras de anticorpos monoclonais (HARLOW e LANE, 1988).

Os trabalhos de GÓMEZ (2007) mostraram que os AcM, apesar da sua excelente afinidade, podem ter reação cruzada com outros antígenos ou exibir dupla afinidade. Isto pode ser devido ao reconhecimento de sítios combinados por similaridade na forma ou composição química. Conseqüentemente, uma rigorosa avaliação de um dado AcM e seus epítomos-alvo faz-se necessária.

LEE et al. (2002) identificaram que no cultivo do hibridoma a glicose e a glutamina, utilizados no enriquecimento do meio de cultura, atuam como substratos limitantes do crescimento, pois o ácido láctico e a amônia são subprodutos do metabolismo que prejudicam o desenvolvimento celular.

Segundo LEENAARS e HENDRIKSEN (2005) os anticorpos monoclonais podem ser selecionados para uma produção em grande escala e com boa qualidade para serem usados no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos, mais rápidos e de fácil realização.

LIPMAN et al. (2005) empregaram os anticorpos monoclonais em testes imunodiagnósticos e como agentes carreadores de drogas terapêuticas obtendo resultados satisfatórios.

A tecnologia dos hibridomas permitiu o estudo das moléculas de superfície dos linfócitos. A partir disso foi possível caracterizar fenotipicamente as diferentes subpopulações de linfócitos T e as células acessórias do sistema

imune, bem como detectar as citocinas (MICELI e PARNES, 1993). Os recrutamentos celulares durante a resposta imune e inflamatória são outros exemplos de estudos que se beneficiaram do uso de anticorpos monoclonais (KUPPER, 1990). Os anticorpos monoclonais são utilizados na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas, veterinárias ou vegetais (LIPMAN et al., 2005). Na indústria alimentícia, os anticorpos monoclonais são importantes na detecção de alimentos adulterados (ZOLA, 1995).

Conforme os trabalhos de AVENDAÑO (2006) os anticorpos monoclonais para fins terapêuticos estão em avanço através da engenharia genética, com a utilização de plantas para a produção de fármacos recombinantes. As vantagens deste meio de produção são o alcance para a produção industrial, a disponibilidade e inocuidade do produto final.

Os anticorpos monoclonais representam uma importante ferramenta de pesquisa e diagnóstico, pois oferecem pureza e disponibilidade ilimitada. Além disso, mostram maior sensibilidade e especificidade quando comparados com os anticorpos policlonais (MORALES, 1993).

SOUZA et al. (2002) utilizaram os anticorpos monoclonais para o diagnóstico do herpesvírus bovino tipo 1 e do tipo 5, e também no estudo da sua variabilidade antigênica, utilizando-os na classificação e diferenciação dos isolados do vírus.

HEMPHILL et al. (1999) desenvolveu estudos com o uso de anticorpos monoclonais para identificar e caracterizar os componentes moleculares antigênicos do *N.caninum* a fim de aprimorar o diagnóstico sorológico para a neosporose.

HALDORSON et al. (2005) produziram anticorpo monoclonal que reconheceu a proteína de superfície NcSRS2 e foi capaz de neutralizar o taquizoíto, sendo esta proteína, portanto, um antígeno que possui uma importância no controle da neosporose. NISHIKAWA et al. (2000) obtiveram a produção de anticorpo monoclonal anti-Nc-p43 e anti-Nc-p36, proteínas envolvidas na invasão da célula hospedeira. Neste estudo os autores constataram que essas proteínas são importantes na invasão da célula pelo parasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produção de anticorpos monoclonais contra o *Neospora caninum*, amostra Nc1.

3.2. Objetivos Específicos

- Estabelecimento do cultivo celular de *N. caninum* em células VERO;
- Imunização dos animais com o *N. caninum* para a produção de linfócitos B produtores de anticorpos específicos;
- Produção de hibridomas produtores de anticorpos policlonais anti- *N. caninum*;
- Identificação dos clones secretores por meio da Imunofluorescência indireta;
- Identificação das proteínas por meio de Western Blotting reconhecidos pelos anticorpos monoclonais;
- Isotipagem dos anticorpos produzidos;
- Testar a Inibição dos taquizoítos de *N. caninum* nas culturas de células VERO com os anticorpos monoclonais produzidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local da realização do experimento

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e no biotério do Departamento de Educação Física, ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), com uma duração de 12 (doze) meses.

4.2. Animais experimentais

Utilizaram-se dez fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, cedidos pelo Biotério Central do Departamento de Veterinária da UFV, com idade de seis semanas e com peso aproximado de 25 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Educação Física em gaiolas, com cama de maravalha, em condições adequadas de higiene, temperatura, umidade, ventilação e luz, como estão apresentadas na tabela 01. A dieta foi baseada em ração comercial e água à vontade.

Tabela 01 – Condições as quais foram submetidos os camundongos no experimento.

Temperatura do ambiente	21-22° C (+/- 2° C)
Umidade (UR)	50-55 %
Luz	12 horas
Ruídos	Baixa intensidade
Consumo de ração/dia/animal	5 gramas
Consumo de água/dia/animal	6 mL

4.3. Multiplicação do *Neospora caninum*

As células VERO (células de rim de macaco verde africano) foram utilizadas para a multiplicação do protozoário *N. caninum*. As células VERO foram cedidas pelo Laboratório de Neuroquímica da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e as técnicas do cultivo celular utilizadas foram as padronizadas pelo LBCHV.

No cultivo das células VERO utilizaram-se garrafas de poliestireno (CORNING), com 25 cm² de superfície, mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO₂ (Nuair Auto Flow Incubators, EUA) em 5 mL do meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) composto por Hepes (SIGMA): 2,4 g, Piruvato de Sódio (SIGMA): 0,11 g, D-glucose (SIGMA): 4,5 g, Bicarbonato de Sódio (SIGMA) 1,5 g, RPMI 1640 (SIGMA) 10,43g e água milliQ 1000 mL. O meio foi filtrado a vácuo usando filtro 0,22 µm (Millipore) e o pH do meio ajustado para 7,2. Suplementou-se o meio com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB-CULTILAB), 5% de sulfato de gentamicina (CULTILAB) e 2,5% de anfotericina B (SIGMA).

A cada 48 horas, as células foram observadas no microscópio invertido (Olympus IMT2, Japão) e os meios que se apresentaram acidificados foram substituídos por novos meios de cultura. Quando as células VERO formaram um “tapete” celular foram tripsinizadas com solução de 0,5% de tripsina e 0,2% de EDTA, transferiu-se uma alíquota das células para novas garrafas, enquanto outra parte foi congelada em nitrogênio líquido para a manutenção das amostras em estoque.

A cepa Nc1 isolada de cão (DUBEY et al., 1988), foi cedida pelo departamento de Medicina Veterinária da UFBA. Assim, com essa cepa do *N. caninum*, realizou-se a inoculação das células VERO quando apresentaram uma monocamada com 80% de confluência. A cada 48 horas observou-se, em microscópio invertido, o crescimento e a multiplicação dos taquizoítos.

A cada sete dias, mediante ruptura mecânica das células com ajuda de “Cell Scrapers” (CORNING), recolhiam-se as células e taquizoítos. A partir dessa suspensão, uma alíquota de 0,3 mL era utilizada para inocular uma nova garrafa de células VERO e outra alíquota para ser congelada a -70° C para ensaios posteriores.

Fazia-se o congelamento das células VERO inoculadas ou não com a solução de congelamento que continha 80% de SFB e 20% de dimetilsulfóxido

(DMSO), na proporção de 1:1 de suspensão celular e solução de congelamento.

4.4. Purificação do *Neospora caninum*

A purificação do *N. caninum* foi essencial para a obtenção das amostras livres de contaminantes das células VERO. Esse procedimento foi executado como é apresentado a seguir. A suspensão das células e dos taquizoítos foi colocada em tubos de centrífuga (CORNING) de 15 mL e centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com auxílio de uma seringa e agulha 0,55x20 (Becton, Dickinson and Company), em 5 mL de PBS pH 7,2 (NaCl: 7,2 g, Na₂HPO₄: 1,48 g, NaH₂PO₄: 0,43 g, água milliQ: 1000 mL). Em seguida, o conteúdo foi filtrado em filtro de 5 µm (Millipore). Este material filtrado foi centrifugado a 1.500 rpm durante 15 minutos, o “pellet” foi ressuspensionado em 1,0 mL de PBS pH 7,2, adicionou-se 10 mL de PBS e centrifugou-se novamente. O “pellet” foi homogeneizado em 1 mL de PBS, desse volume 10 µL foram colocados na câmara de Neubauer para contagem dos taquizoítos. O conteúdo purificado foi armazenado a -20° C em PBS 7,2 até o momento da sua utilização.

4.5. Dosagem de Proteína

Após a purificação, foi realizada a dosagem das proteínas pelo método de BRADFORD (1976). Primeiramente, os taquizoítos foram descongelados a 37° C, sonicados a 200 Watts/30 segundos, colocou-se em nitrogênio líquido por cerca de 10 minutos e novamente em banho-maria, tendo sido este ciclo repetido quatro vezes. Já as amostras com taquizoítos íntegros foram somente submetidas ao descongelamento e em seguida realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

O reagente do ensaio foi preparado dissolvendo 100 mg de Coomassie G250 Azul (SIGMA) em 50 mL de etanol 95%. A solução foi misturada com 100 mL de ácido fosfórico 85% e completou-se com milliQ para um volume final de 1000 mL. O reagente foi armazenado em frasco âmbar e mantido sobre refrigeração durante o decorrer do trabalho.

Foram usadas 900 µL do reagente de Bradford e 100 µL de PBS no ensaio branco. E para quantificar as proteínas do *N. caninum* utilizou-se 100 µL da amostra e 900 µL do reagente de Bradford, aguardou-se 10 minutos e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 562 nm.

4.6. Sensibilização das lâminas para imunofluorescência indireta

A técnica de sensibilização das lâminas com os taquizoítos é essencial para a realização da RIFI com os soros dos animais inoculados e dos sobrenadantes das culturas celulares. Os taquizoítos resultantes da purificação foram diluídos numa concentração de 1000 taquizoítos em 15 µL de PBS. Cada pocinho foi sensibilizado com 15 µL da suspensão. As lâminas foram mantidas até uma secagem total em estufa a 37° C, fixadas com metanol e posteriormente armazenadas a -20° C.

4.7. Multiplicação do *Toxoplasma gondii*

Utilizou-se a cepa RH de *T. gondii*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Toxoplasmose do Departamento de Parasitologia do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais. A cepa foi mantida na cavidade peritoneal de camundongos Suíços, após dois a três dias da infecção os parasitos foram coletados através da aplicação de 3 mL de PBS 7,2 estéril no peritônio e seguida da aspiração com agulha 0,55x20 (Becton, Dickinson and Company) e seringa, tendo sido esse ciclo repetido três vezes. Uma alíquota de 100 µL do conteúdo peritoneal aspirado foi diluída em 1 mL de PBS pH 7, 2 (1:10) e outros três animais receberam o inóculo. Para a separação das células e dos taquizoítos do *T. gondii* centrifugou-se a 1750 rpm/ 30 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 3000 rpm/ 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento tratado com 2 mL de solução de cloreto de amônia (NH₄Cl- 0,14 molar) por um período de 5 minutos. Após foi centrifugado a 2500 rpm/ 10 minutos, o sobrenadante foi eliminado e o “pellet” ressuspendido em PBS pH 7,2 estéril e novamente centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e “pellet” recolhido. Após a sua homogeneização em 1 mL de PBS pH 7,2, realizou-se a contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, realizaram-se as etapas apresentadas a seguir.

4.7.1. Congelamento das cepas virulentas de *Toxoplasma gondii*

Adicionou-se DMSO (SIGMA) na preparação a ser congelada até 10% do volume total, ou seja, para 2 mL da suspensão dos taquizoítos, adicionou-se 0,2 ml de DMSO (SIGMA) e homogeneizou-se lentamente. As cepas virulentas RH foram colocadas em criotubos (1,5 mL) e mantidas em freezer -70°C para a realização de estudos posteriores.

4.7.2. Preparo de lâminas para imunofluorescência indireta de *Toxoplasma gondii*

As lâminas preparadas foram utilizadas para testar uma possível reação cruzada do *T. gondii* com o sobrenadante dos hibridomas e dos clones.

As lâminas compostas de 12 orifícios foram fixadas com 10 µL de suspensão contendo 10³ taquizoítos em cada orifício. As lâminas foram fixadas em estufa a 37° C por 2 horas, e em seguida foram armazenadas a -20° C.

4.7.3. Preparo de antígenos para eletroforese

As amostras sonicadas foram mantidas em gelo até o momento da aplicação nas canaletas do gel da eletroforese.

4.8. Coleta de sangue

As atividades experimentais que envolveram os animais foram realizadas por médico veterinário durante todo o trabalho e seguindo o Código de Ética Profissional, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética do DVT/UFV, sendo certificado pelo processo de n° 17/2008.

A fim de avaliar os camundongos antes e após a imunização com *N. caninum*, foram coletadas amostras de sangue no plexo orbital, com auxílio de uma pipeta de Pauster. Após duas horas em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm/15 minutos. Os soros foram armazenados a -20°C até a realização da técnica de RIFI.

4.9. Preparo das amostras para inoculação e realização de eletroforese

Os taquizoítos purificados de *N. caninum* foram descongelados e aliqüotados para a inoculação dos camundongos do grupo que recebeu os taquizoítos íntegros, sendo mantidos em gelo até o momento da inoculação. Para o preparo das amostras de taquizoítos sonicados, os taquizoítos foram descongelados rapidamente em banho-maria a 37° C, e sonicados a 200 Watts/30 segundos e em seguida colocados em nitrogênio líquido por 10 min e novamente em banho-maria, sendo este ciclo repetido quatro vezes. As amostras sonicadas foram mantidas em gelo até o momento da inoculação dos animais ou aplicação nas canaletas do gel da eletroforese.

4.10. Imunização dos camundongos

Os camundongos foram divididos em dois grupos de três animais. O primeiro grupo foi inoculado com taquizoítos íntegros e o segundo grupo com os taquizoítos rompidos por sonicação. Os camundongos receberam, por via subcutânea, quatro doses do inóculo preparado com *N. caninum*, íntegro ou sonicado, com intervalo de 21 dias entre cada aplicação.

Inoculou-se um grupo com 50 µg de taquizoítos íntegros, 50 µL de adjuvante saponina (diluída em água milliQ) e 100 µL de PBS. O segundo grupo com 50 µg de taquizoítos sonicados, 50 µL de adjuvante saponina (diluída em água milliQ) e 100 µL de PBS. Realizou-se a última imunização, quatro dias antes da coleta do baço, sem o uso do adjuvante saponina.

4.11. Imunofluorescência para avaliação da soropositividade ao *Neospora caninum*

A avaliação dos níveis de anticorpos contra o *N. caninum* no soro dos camundongos foi realizada através da imunofluorescência indireta (BJÖRKMAN e UGGLA, 1999). As lâminas previamente sensibilizadas foram descongeladas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os pocinhos foram fixados com 10 µL de acetona por 15 minutos. Os soros dos animais foram diluídos a 1:50 em PBS 7,4. Adicionou-se em cada pocinho 5 µL dos soros diluídos e as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos. Transcorrido o tempo, as lâminas foram lavadas 3 vezes, sendo

cada lavagem de 5 minutos e sob agitação. Após a secagem das lâminas, o conjugado IgG de coelho anti-camundongo marcado com fluoresceína (SIGMA) foi preparado na diluição de 1:64, seguindo as instruções do fabricante. Assim, foram adicionados 5 µL do conjugado em cada pocinho e em seguida incubadas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos. Após a incubação, elas foram lavadas como descrito anteriormente. As lâminas foram secas, receberam em cada pocinho 3 µL de anti-FAD, colocaram-se as lamínulas e observaram-se em microscópio de imunofluorescência (Nicon Eclipse E-600).

4.12. Cultivo de Mieloma

As células de mieloma SP2/0 usadas neste trabalho foram obtidas da Escola Paulista de Medicina, no ano de 1996. Neste mesmo ano foram clonadas, expandidas e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido; contabilizando um total de seis passagens.

Os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e aquecidos a 37°C por 2 a 5 minutos, em banho-maria. As células foram transferidas para tubos de centrífuga e o seu volume completado para 10 mL com meio RPMI incompleto e centrifugadas a 1500 rpm/ 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e ao “pellet” foi acrescentado 1 mL de meio RPMI completo. As células foram colocadas em garrafa de cultivo celular na posição vertical e mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Por aproximadamente duas semanas as células foram replicadas a cada 48–72 horas até se obter o número suficiente de células para a realização do processo de fusão.

4.13. Contagem celular

Para os procedimentos de fusão, clonagem, congelamento dos mielomas e hibridomas foi preciso fazer a contagem das células viáveis utilizando-se a Câmara de Neubauer. Centrifugaram-se as suspensões celulares a 1500 rpm/ 5 minutos temperatura. Os sobrenadantes foram desprezados e os “pellets” ressuspensos em 1 mL de meio RPMI incompleto, após o que foram coletados 10 µL de cada suspensão celular e misturou-se com 10 µL de Azul de Tripán (fator de diluição 2), deixou-se à temperatura

ambiente por alguns minutos, colocando-se a mistura na Câmara de Neubauer e procedendo a contagem como segue:

$$\text{Células por mL} = X \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$$

X= número de células contadas nos quatro quadrantes das extremidades da câmara.

4.14. Eutanásia dos camundongos para o preparo da monocamada dos macrófagos

Os camundongos foram submetidos à técnica de deslocamento cervical, seguindo as normas do Comitê de Ética. Em seguida, foram mergulhados em álcool 70% durante 5 minutos para desinfecção em capela de fluxo laminar procedeu-se à remoção da pele da região abdominal injetando na cavidade peritoneal 5 mL de uma solução de dextrose-10% diluída em meio RPMI 1640 incompleto, mantida gelada. Sem retirar a seringa, o abdome foi massageado suavemente e o líquido aspirado. Esta suspensão celular foi transferida para tubos estéreis e centrifugada a 1500 rpm/ 10 minutos a 4° C.

O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuscitado em RPMI 1640-10% SFB-HAT e distribuído em placas de 96 pocinhos, cada poço recebeu 100 µL contendo $2,5 \times 10^4$ células/mL. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37° C, em estufa com 5% de CO₂.

4.15. Coleta de esplenócitos

Os animais positivos ao *N. caninum* confirmados pelo teste RIFI, foram eutanasiados e preparados como anteriormente descrito. Foi realizada a retirada do baço que foi fragmentado com bisturi em placa de Petri, e os fragmentos lavados em 5 mL de meio RPMI incompleto para a remoção das hemácias. Após isto, os fragmentos foram macerados com auxílio de um pistilo sobre uma peneira de metal de malha fina. O conteúdo resultante foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado três vezes a 1500 rpm/10 minutos a 4° C com solução de lise de hemácias (NH₄Cl: 8,29 g, KHCO₃: 1 g, EDTA: 0,0372 g, água milliQ: 1000 mL).

Após desprezar o sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 11 mL de meio completo RPMI 1640-10% SFB-HAT. Não foi necessário contar os

linfócitos do baço, pois se estima que em cada baço de camundongo há 10^8 linfócitos (SHULMAN et al., 1978).

4.16. Fusão

Nessa técnica, primeiramente, os mielomas foram coletados das garrafas de expansão e centrifugados a 1500 rpm/5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado em RPMI 1640 completo. Realizou-se a contagem celular. A mistura das células (linfócitos + mielomas) realizada na proporção de 10^8 (11 mL) de linfócitos para 10^7 (4,1 mL) células de mieloma foi colocada em tubo de centrífuga de 50 mL, sendo seu volume completado com meio RPMI-1640 incompleto, imediatamente foi centrifugada a 1500 rpm/10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi desprendido e colocado em outro tubo de centrífuga de 50 ml, o qual foi colocado em um becker com água a 37° c. imediatamente era adicionado gota a gota 1mL de polietilenoglicol 50% (PEG-SIGMA) durante 1 minuto, sob mistura circular constante com a ponta da pipeta. A mistura foi efetuada por mais 2 minutos adicionando 1 mL de RPMI 1640 incompleto previamente aquecido a 37° C, em mistura constante de 1 minuto. Foi adicionado mais 1mL do mesmo meio, com mistura constante de 1 minuto.

Posteriormente, por duas vezes seguidas, foi adicionado 1mL de meio RPMI 1640 incompleto, em mistura constante durante 30 segundos.

Em seguida, foram acrescentados 7 mL do mesmo meio, durante 2 minutos e mais 12 mL durante 5 minutos. Logo após, as células foram centrifugadas a 1500 rpm/ 10 minutos a 4° C o sobrenadante foi eliminado, e foi adicionado 49 mL de meio RPMI 1640 completo com 20% de SFB.

As células foram colocadas em microplacas de 96 pocinhos com volume de 100 μ L em cada poço, e incubadas a 37° C e 5% de CO_2 . Após 24 horas, as células receberam 100 μ L do meio RPMI 1640 completo suplementado com hipoxantina, aminopterina, timidina e glicina (meio HAT). Nos dias 4, 8 e 12 após a fusão, 50% do volume dos pocinhos das microplacas foi trocado por meio HAT. Após 15 dias, 50% do volume dos pocinhos das microplacas foram substituídos por meio contendo hipoxantina, timidina e glicina (meio HT).

4.17. Coleta de sobrenadante do cultivo celular

O sobrenadante da cultura celular foi coletado a fim de ser submetido à RIFI para o *N. caninum* e *T. gondii*. Decorridos 15 dias da fusão, foi realizada a transferência do sobrenadante de cada pocinho da microplaca, para outra placa de 96 pocinhos, mantendo a mesma disposição da placa de cultivo celular inicial. As placas com os sobrenadantes foram armazenadas a -20° C até a realização da RIFI.

4.18. Imunofluorescência indireta para a avaliação do sobrenadante

A técnica de imunofluorescência indireta realizada com os sobrenadantes das culturas dos hibridomas e posteriormente dos clones, teve como finalidade detectar a presença de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii*. As lâminas previamente sensibilizadas com os taquizoítos da cepa Nc1 e RH foram descongeladas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os pocinhos foram fixados com 10 µL de acetona por 15 minutos. Adicionou-se 5 µL do sobrenadante dos hibridomas em cada pocinho, seguindo a seqüência da placa de 96 poços, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37° C/ 2 horas. Transcorrido o tempo, as lâminas foram lavadas 3 vezes, cada lavagem foi de 5 minutos e sob agitação. Após a secagem das lâminas, o conjugado IgG de coelho anti-camundongo marcado com fluoresceína (SIGMA) foi preparado na diluição de 1:64, seguindo as instruções do fabricante. Assim, foram adicionados 5 µL do conjugado em cada pocinho e em seguida, incubadas em câmara úmida a 37°C/2 horas. Após a incubação, elas foram lavadas como descrito anteriormente. As lâminas foram secas e receberam em cada pocinho 3 µL de anti-FAD, em seguida colocaram-se as lamínulas e observaram-as em microscópio de imunofluorescência (Nikon Eclipse E-600).

4.19. Expansão e Clonagem dos hibridomas

Após a seleção dos híbridos produtores de AcM contra o *N. caninum*, estes foram expandidos para obtenção de um número suficiente para a clonagem. Assim o meio HAT foi substituído gradativamente pelo meio HT e este pelo meio RPMI 1640 com 10% de SFB.

Foi preparada com 24 horas de antecedência uma monocamada de macrófagos, como descrito no item 5.13, para que assim fosse realizada a clonagem por diluição limitante. Nesse processo utilizou-se meio HT, realizou-se a diluição para atingir uma célula/poço. Primeiramente, 100 μL de meio RPMI-10% HT foram colocados nos 96 pocinhos, exceto em A1 (poço da primeira linha e coluna). Adicionou-se 200 μL da suspensão de células (cerca de 2×10^3 de células) em A1, em seguida, transferiu-se 100 μL de A1 para B1 (poço da primeira coluna e segunda linha) e foi homogeneizado com uma pipeta, evitando a formação de bolhas. Essa diluição foi realizada em toda a coluna, descartando 100 μL do último pocinho da primeira coluna (H1), a fim de manter o mesmo volume em todos os poços, como se observa na Figura 04.

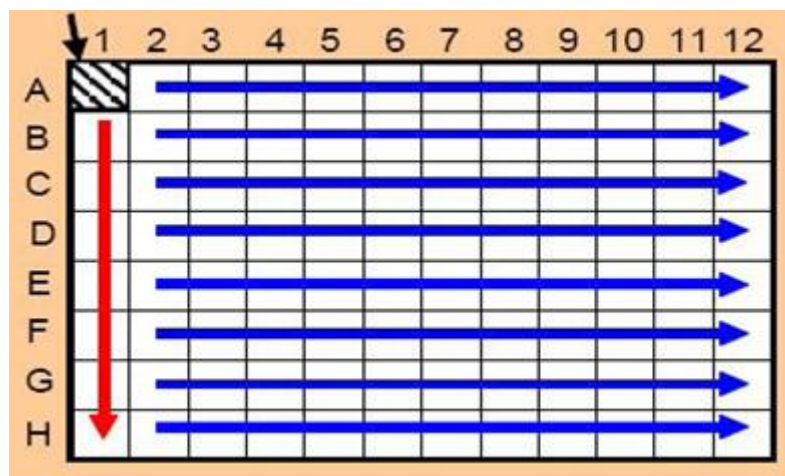


Figura 4. Clonagem por diluição limitante, RYAN (CORNING) - modificado

Em cada pocinho da primeira coluna adicionou-se 100 μL de meio, mantendo um volume final de 200 μL /poço. Em seguida, transferiu-se 100 μL da coluna A1-H1 para a segunda coluna A2-H2 e foi homogeneizado cuidadosamente. E assim sucessivamente até a coluna A12-H12. Por fim adicionou-se 100 μL em todos pocinhos da placa para manter o volume de 200 μL /poço.

As placas foram incubadas a 37° C e 5% de CO_2 , e trocou-se o meio a cada 48 horas. Após cinco dias realizou-se RIFI para verificar a secreção de anticorpos, e observaram-se no microscópio a multiplicação das colônias de clones.

Os clones foram transferidos para uma placa de cultivo celular de 24 POÇOS (CORNING) e adicionou-se 1 mL de meio RPMI 1640 completo. Ao

quarto dia as placas que continham os clones estavam prontas para a coleta do sobrenadante para a realização do Western Blotting.

Após a confirmação de que os hibridomas e os clones estavam sintetizando anticorpo anti-*Neospora caninum*. Amostras dessas linhagens celulares foram coletadas, preparadas com solução de congelamento, como descrito no item 5.3, e devidamente identificadas em criotubos para o congelamento em nitrogênio líquido.

As etapas que foram detalhadas nos itens anteriores sobre a produção dos anticorpos monoclonais anti-Nc1, estão resumidamente apresentadas na Figura 05.

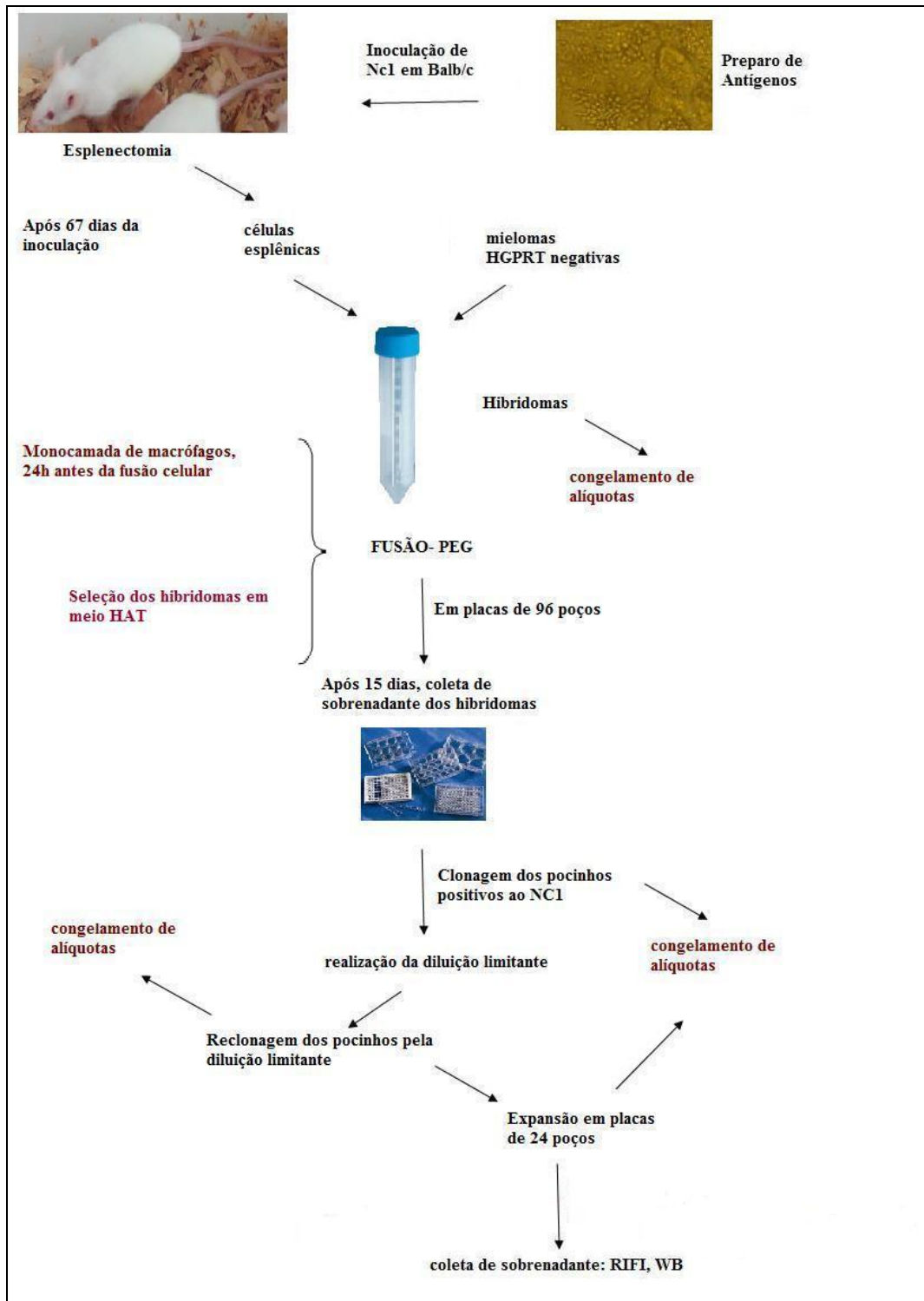


Figura 5- Fluxograma das etapas de produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos anti-Nc1. As fotos mostradas no esquema da figura foram reproduzidas durante a realização do trabalho.

A produção de anticorpos monoclonais possui um grande número de etapas que são dependentes umas das outras.

4.20. Caracterização dos clones

4.20.1. SDS-PAGE

A eletroforese teve como objetivo determinar o perfil das proteínas das células VERO, Nc1, *T. gondii*. Os géis foram montados entre placas de vidro separadas por espaçadores. Os géis de corrida foram utilizados na concentração de 12% (Gel de acrilamida 12%, 15 mL; H₂O: 5 mL; acrilamida 30%: 6 mL; Tris 1,5 M pH 8,8 (Tris: 36,33 g; SDS: 0,80 g; água milliQ: 100 mL): 3,8 mL, SDS 10%: 150 µL; APS (persulfato de amônio) 10%: 150 µL; TEMED: 6 µL). Os géis "Stack" de concentração 3% foram utilizados em um volume de 3 mL (H₂O: 2,1 mL; acrilamida 30%: 500 µL; Tris 1,5 M pH 6,8 (Tris: 12,10 g, SDS: 0,80 g, água MilliQ: 100 mL): 380 µL; SDS 10%: 30 µL; APS (persulfato de amônio) 10%: 30 µL; TEMED: 3 µL).

Misturou-se o antígeno a um volume igual de tampão de amostra (uréia 4M: 2,5 mL; Tris-HCl 1M pH 6,8: 0,625 mL; SDS 20%: 1mL; glicerol: 1,25 mL; mercaptoetanol: 0,5 mL; H₂O: 6 mL) e foram aquecidos por 5 minutos, evitando-as de serem fervidas. As amostras foram aplicadas em canaleta múltipla. Foram aplicadas as amostras de células VERO, taquizoítos de *N. caninum* sonificados (as amostras foram preparadas como descrito no item 5.9), e *T. gondii* sonificados (como descrito no item 5.7.3). Em todas as eletroforeses, foram utilizados marcadores padrões com as respectivas massas moleculares em kDa (FERMENTAS): 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10. Após a aplicação das amostras no gel, colocou-se o tampão de corrida (Tris: 6,06 g; Glicina: 28,8 g; SDS: 2 g; água milliQ: 2000 mL) e foi iniciada a corrida a 80 Volts, por 4 horas. Após a corrida das proteínas no gel, este foi cuidadosamente retirado das placas de vidro, para assim ser realizada a coloração por Nitrato de Prata.

4.20.2. Coloração por Nitrato de Prata

O gel preparado, como descrito no item 5.20.1, foi fixado em metanol 50% e formaldeído a 37% por uma noite. Realizaram-se três lavagens de 10 minutos em solução de etanol 50%. Adicionou-se para a lavagem uma solução de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto. Lavou-se o gel três vezes por 5 minutos com água, para retirada da cor amarelada do gel. Em seguida, foi corado em solução de nitrato de prata por 30 minutos sob agitação lenta. Posteriormente, foi lavado três vezes em água. Incubou-se com a solução

reveladora até o aparecimento das bandas. A reação foi paralisada com 50% de metanol e 50% de ácido acético quando foram observadas as bandas protéicas.

4.20.3. Western blotting

A técnica de Western blotting fez-se necessária para a identificação do peso molecular das proteínas que os sobrenadantes dos clones estariam reconhecendo. A eletrotransferência das proteínas do parasito nos géis de poliacrilamida para as membranas de nitrocelulose foi realizada de acordo com metodologia descrita por PEREIRA et al. (1998) com algumas modificações.

Ao terminar a eletroforese, o gel foi lavado em água pura e mergulhado por 30 minutos em tampão de transferência (3 g de Tris; 14,42 g de glicina; 200 mL de metanol em 1L de água milliQ). A membrana de nitrocelulose, com poro de 0,2 μm , (BIO-RAD), por ser extremamente hidrofóbica, foi imersa em metanol por 2 segundos para em seguida serem realizadas duas lavagens de 1 minuto em água milliQ. Incubou-se a membrana por 30 minutos em tampão de transferência, juntamente com seis pedaços de papel de filtro “Whatman” 3 mm (BIO-RAD), cortados do tamanho do gel e das espumas.

Realizou-se a montagem seqüencial sobre um suporte de acrílico na seguinte ordem: uma espuma, três pedaços de papel filtro, o gel da eletroforese, a membrana, os outros três pedaços de filtro e espuma. Na montagem evitou-se a formação de bolhas de ar entre as várias camadas e sempre foi utilizado luvas. O “sanduíche” foi colocado no aparelho de eletrotransferência, contendo tampão de transferência, de forma que a membrana ficasse entre o gel e o cátodo (pólo positivo). A transferência foi realizada à 4°C por 18 horas a 40 volts. Ao final desse período, para o controle da transferência das proteínas, a tira de nitrocelulose, que continha o padrão de massa molecular foi corada com solução de Ponceau-S (SIGMA) durante 1 minuto. Após a transferência, as membranas foram utilizadas na identificação das proteínas dos antígenos, reconhecidas pelos anticorpos monoclonais anti-*N. caninum*.

A membrana foi lavada em água milliQ e cortada em tiras de aproximadamente 0,5 cm de largura. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com tampão de bloqueio durante 2 horas. Após o bloqueio, as tiras foram

lavadas três vezes em PBS-Tween 20 a 0,5% pH 7,6 (NaCl: 4,25 g; Na₂HPO₄: 0,64 g; NaH₂PO₄.2H₂O: 0,08 g; Tween 20 (SIGMA): 500 µL e água milliQ: 500 mL) durante 15 minutos. Em seguida as tiras foram incubadas por 2 horas com os sobrenadantes das culturas dos clones, contendo os anticorpos monoclonais.

As tiras de nitrocelulose foram lavadas três vezes em PBS-Tween 20. A fim de padronizar a técnica utilizou-se como controle negativo o sobrenadante de cultura de células VERO, contendo o meio RPMI 1640 completo. Como controle positivo foi utilizado o soro de camundongo positivo ao *N. caninum*.

As membranas foram incubadas por 2 horas com anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (SIGMA) na diluição de 1:4.000 em PBS-Tween 80 a 0,05% e após este tempo foram lavadas novamente duas vezes em PBS-Tween 80 e uma vez com PBS. Em seguida, foram reveladas em substrato para peroxidase (DAB- diaminobenzidina: 10 mg; Tris 0,05M pH 7,6: 10 mL; NiCl₂ 0,3%: 1 mL; H₂O₂ 30%: 10 µL). A revelação foi interrompida com água destilada. Toda a reação foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação.

4.21. Inibição da infecção por *Neospora caninum* em células VERO

As células VERO mantidas em garrafas de 25 cm² foram expandidas para duas placas de seis poços, enquanto isso uma outra garrafa de células VERO recebeu uma amostra de Nc1 que estava congelada para ser ativada. A garrafa que continha os parasitos foi mantida por três dias, em seguida foram purificadas como apresentado no item 4.4. Após a purificação, se coletou uma alíquota com 10³ taquizoítos e adicionou-se em cada poço da placa com células VERO.

Assim, um poço de cada placa que possuía células infectadas com Nc1, foi mantido com meio RPMI completo, totalizando dois poços. Enquanto, quatro poços receberam para a manutenção da cultura os sobrenadantes dos clones que produziram os anticorpos monoclonais. A cultura foi mantida por cinco dias a 37° C e 5% de CO₂.

Cada poço recebeu uma lamínula, antes da passagem das células VERO para as placas. Portanto, com o decorrer dos cinco dias, as lamínulas foram retiradas e submetidas à coloração por GIEMSA. Primeiramente, as

lamínulas foram cobertas com 1 mL do corante por 1 minuto, em seguida adicionou-se o mesmo volume de tampão fosfato pH 6,6 (Na_2HPO_4 : 3,8 g; KH_2PO_4 : 5,47 g; 1L de água milliQ) e foram mantidas por 12 minutos. Após a secagem em temperatura ambiente, as lamínulas foram observadas em microscópio Nikon Eclipse E-600.

4.22. Isotipagem dos anticorpos monoclonais

A fim de determinar o isótipo do anticorpo monoclonal produzido, se utilizou o kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (SIGMA) e se realizou a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar. Primeiramente prepararam-se as placas de Petri com 4 mL de agarose 1% em PBS 7,2. Perfurou-se o ágar formando sete orifícios, sendo um central e seis periféricos. No orifício central aplicou-se 15 μL do sobrenadante da cultura dos clones e nos periféricos 10 μL de cada isótipo presente no kit. As placas foram mantidas em câmara úmida sobre temperatura ambiente, por um período de 24 horas, e em seguida foram analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Multiplicação do *Neospora caninum*

As células VERO, como citado no item 4.3, foram mantidas em cultura por um mês. Com a manutenção da cultura visava-se a verificação da presença de contaminações, a aderência das células nas garrafas com a formação da monocamada celular e a ausência de células mortas na cultura. Essas condições eram essenciais para obter a multiplicação desejada do parasita.

Após a obtenção das células em condições adequadas, realizou-se a sua inoculação com Nc1 como foi citado no item 4.3. As células VERO infectadas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37° C. Em dias alternados era observada a multiplicação dos taquizoítos e realizava-se a substituição dos meios de cultura. A presença do Nc1 em cultura de células VERO pode ser observada na figura 6.

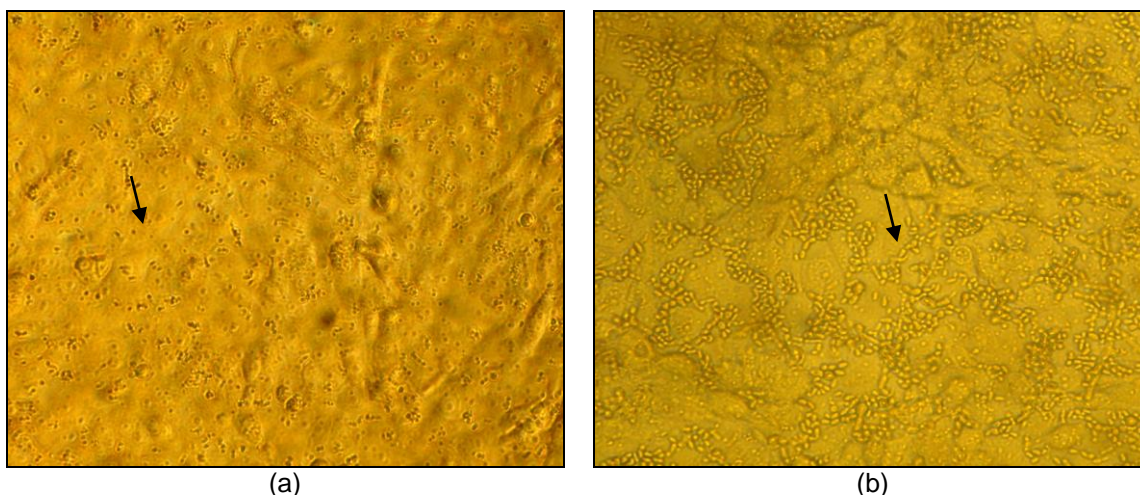


Figura 6 - Cultivo do *Neospora caninum* em células VERO, com aumento de 100x em (a) e aumento de 400x em (b) no microscópio invertido.

Durante seis meses foi possível realizar a manutenção das culturas de VERO sem e com a presença dos taquizoítos, para que fossem preparadas alíquotas para a imunização dos camundongos, preparo de lâminas para realizar a RIFI, realização da eletroforese e estoque do *N. caninum* para trabalhos posteriores. A obtenção de antígenos pela cultura celular permitiu a consolidação das amplas perspectivas propostas no trabalho. Durante o experimento não foram observadas contaminações por fungos e bactérias que pudessem levar a resultados não confiáveis dos anticorpos monoclonais que foram secretados pelos clones.

5.2. Purificação do *Neospora caninum*

Após a manutenção e a multiplicação do *N. caninum* em células VERO, no período de seis meses de cultivo celular, coletou-se 500 mL de sobrenadante das células VERO infectadas com o parasito. Segundo OMATA et al. (2006), é fundamental a purificação para a remoção das células VERO, e dos debris celulares, impedindo-se assim qualquer interferência nos passos sucessivos do trabalho. Tanto na imunização dos animais, afetando o desenvolvimento de resposta imune dos camundongos, como no preparo das lâminas de imunofluorescência.

Este procedimento foi realizado seguindo o item 4.4, no qual se obteve um volume final de 25 mL de concentrado do *N. caninum*, que foram alíquotados em eppendorfs e armazenados a -20°C . Em cada 1 mL de

suspensão purificada, em PBS 7,2, obteve-se 2×10^5 taquizoítos. Durante a contagem na câmara de Newbauer foi observada a homogeneidade e a pureza do conteúdo filtrado. A purificação é necessária para evitar os resultados falsos positivos dos soros dos animais e dos sobrenadantes das culturas de hibridomas e clones.

5.3. Dosagem de Proteína

Determinou-se uma concentração de proteína parasitária suficiente para o desenvolvimento de todo o experimento. Assim, fez-se necessário a determinação da concentração das proteínas para definir o volume da suspensão dos taquizoítos purificados para a inoculação dos camundongos.

A concentração das proteínas dos parasitos íntegros foi determinada em 1392 $\mu\text{g/mL}$ e os parasitos sonicados em 1108 $\mu\text{g/mL}$, como se observa na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração protéica do *Neospora caninum* mantido íntegro e o sonicado.

Amostra	Absorvância	Concentração Protéica ($\mu\text{g/mL}$)
Parasito íntegro	0,234 AU	1392 $\mu\text{g/mL}$
Parasito sonicado	0,179 AU	1108 $\mu\text{g/mL}$

Diante dos resultados apresentados, foi possível definir o volume de cada inóculo a ser aplicado nos camundongos, já que cada animal foi submetido a 50 μg de massa parasitária. A dosagem do imunógeno a ser inoculada nos animais seguiu a determinação de SCHUNK e MACALLUM (2005). Sugere-se que o parasito sonicado obteve uma menor concentração de proteínas, pelo fato de antígenos terem ficado ligados nas membranas e algumas proteínas terem sido destruídas com a realização da sonicação.

5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A técnica de SDS-PAGE foi realizada seguindo o protocolo apresentado no item 5.20.1. Nessa técnica realizou-se previamente o preparo das amostras do *N. caninum*, *T. gondii* e células VERO, como pode ser visto nos itens 4.7.3 e

4.9. Os perfis eletroforéticos dos antígenos de *N. caninum* cepa Nc1, *T. gondii* cepa RH e células VERO são observados no gel da eletroforese SDS-PAGE que foi corado com nitrato de prata como apresentado em 4.20. Assim, observaram-se comparativamente o perfil das proteínas na figura 07.

Na canaleta 6 foram aplicadas as células VERO. Realizou-se essa aplicação já que *N. caninum* foi multiplicado nessa linhagem celular e assim eliminaria as possíveis contaminações dessas células no perfil do Nc1. Nas canaletas 3, 5, 7 foram aplicadas amostras de *N. caninum* e, 2 e 4 de *T. gondii*. Esse último foi aplicado para observar quais proteínas são exclusivas e quais são compartilhadas entre ambos, já que esses parasitos pertencem à mesma família.

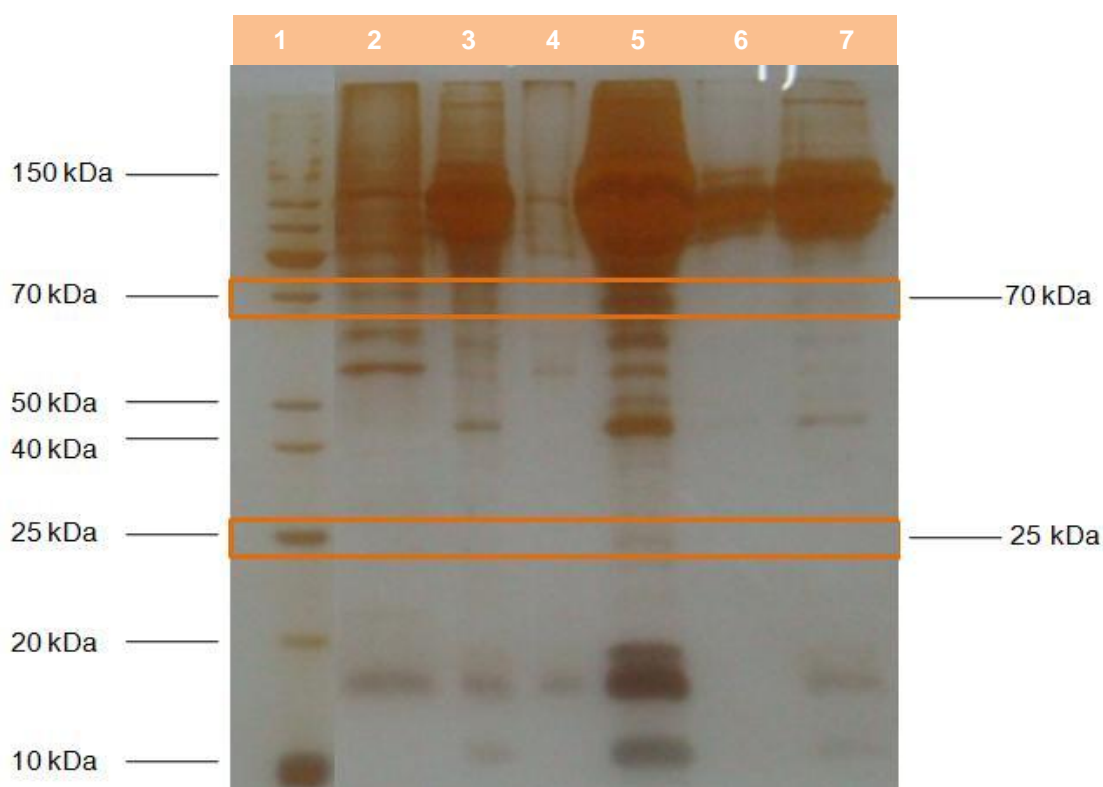


Figura 07 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE- Gel de acrilamida 12%) corado com nitrato de prata. 1- Marcador; 6- Células VERO; 3, 5 e 7- *Neospora caninum*; 2 e 4- *Toxoplasma gondii*.

Observou-se que as proteínas de 10 kDa e 40 kDa apareceram somente em Nc1, não sendo encontrada nas células VERO e nem no *T. gondii*, sendo, portanto proteínas de interesse para serem investigadas com maior acurácia. Segundo SCHARES et al. (1999) a proteína de 40 kDa é encontrada na superfície do parasito, o que faz com que seja uma possível candidata a trabalhos com vacinas e imunodiagnóstico.

As proteínas de 60 kDa e 70 kDa foram encontradas em Nc1 e não foram observadas no perfil das células VERO, não sendo, portanto, contaminação dessa linhagem celular. No entanto, em uma canaleta de *T. gondii* foi possível observar duas bandas com valor aproximado de 70 kDa e 60 kDa, sendo assim necessária em futuros trabalhos a verificação da afinidade do anticorpo a essas proteínas do Nc1. Segundo os trabalhos desenvolvidos por KELLER et al. (2004), observou-se que a proteína de 70 kDa é uma proteína de micronema de *N. caninum* de extrema importância na relação parasito hospedeiro.

Detectou-se a proteína de 25 kDa na canaleta 5, correspondente ao Nc1, a qual não foi vista nas canaletas do *T. gondii* e células VERO. Conforme BASZLER et al., (1996), essa proteína foi detectada por anticorpos de soros de animais positivos ao *N. caninum*, confirmando a sua presença nesse parasito. Assim como a proteína de 10 kDa citada anteriormente, a proteína de 25 kDa também é uma candidata a trabalhos com vacinas e imunodiagnóstico para a neosporose.

Portanto, observou-se que as proteínas de 10 kDa, 40 kDa, 25 kDa foram exclusivas do perfil do Nc1, não sendo contaminação das células VERO e nem sofrem reação cruzada com *T. gondii*.

5.5. Imunização dos camundongos BALB/c

Os camundongos BALB/c foram inoculados pela via subcutânea, seguindo as instruções do item 4.10. Para cada inoculação foram necessários 50 µg dos taquizoítos íntegros por animal do grupo 1 e 50 µg dos taquizoítos sonificados por camundongo do grupo 2. Para determinar o volume a ser inoculado em cada grupo, levaram-se em consideração as concentrações protéicas determinadas pelo método de Bradford, como podem ser vistas no item 5.3 e na tabela 01. Assim, foi possível pelo método de dosagem protéica determinar o volume necessário de cada suspensão para a inoculação dos animais.

Por meio do cálculo de C (concentração)= m/v (massa/volume) concluiu-se que era preciso a utilização de 36 µL da suspensão dos taquizoítos íntegros e 46 µL da suspensão dos taquizoítos sonificados, para que cada animal de ambos os grupos recebessem a mesma massa de antígenos.

No dia anterior à primeira inoculação e no dia em que foi realizada a quarta inoculação foi coletado sangue dos seis animais. O sangue foi preparado de acordo com o passo 4.7. Assim, foram obtidos os soros que foram armazenados a -20° C para serem submetidos à imunofluorescência indireta segundo o procedimento explicado no item 4.11.

Os resultados obtidos pela RIFI, como se esperava, a primeira coleta, foi negativa para *N. caninum* em todos os animais, uma vez que estavam mantidos em condições de isolamento e livres de qualquer contato com o parasita. Na segunda coleta, ou seja, quatro dias antes da realização da esplenectomia e fusão, observou-se pela imunofluorescência indireta que somente o animal 1B do grupo de taquizoítos íntegros mostrou-se positivo ao parasito. Enquanto no grupo de taquizoítos sonicados todos os animais mostraram-se positivos ao *N. caninum*, como pode ser observado na tabela 03, ilustrada abaixo.

Tabela 03- Demonstração dos resultados da imunofluorescência indireta dos animais submetidos à imunização com os taquizoítos íntegros e sonicados.

Animais	Coleta	
	1	2
1A	-	-
1B	-	+
1C	-	-
2A	-	+
2B	-	+++
2C	-	+

Legenda: 1A, 1B, 1C: camundongos inoculados com taquizoítos íntegros. 2A, 2B, 2C: camundongos inoculados com taquizoítos sonicados. Positivo: +, Negativo:-. 1: coleta de sangue realizada antes das inoculações; 2: coleta de sangue após a 4^o inoculação dos animais.

Pode-se atribuir aos animais que não responderam às imunizações a forma como cada um respondeu ao procedimento das inoculações. Os animais que receberam os taquizoítos rompidos tornaram-se infectados, confirmando os dados obtidos por OMATA et al. (2006), que demonstraram uma resposta

imune mais evidente no grupo que recebeu os taquizoítos rompidos do que o grupo que recebeu os taquizoítos íntegros. No animal 2B, positivo como os demais, foi observado pela imunofluorescência indireta um maior número de taquizoítos fluorescentes, inferindo que este estava apresentando uma resposta à infecção de forma mais evidente. Como vai ser discorrido no próximo item, o camundongo 2B foi o eleito para a coleta do baço para a realização da fusão dos esplenócitos com os mielomas.

5.6. Fusão e clonagem

Utilizou-se o animal 2B para a realização da esplenectomia, pois foi o camundongo que apresentou melhor positividade a *Neospora caninum*, como se observa na figura 08 o resultado positivo pela técnica de RIFI. O baço desse animal foi retirado como descrito em 4.15, para a realização da fusão das células esplênicas com os mielomas.

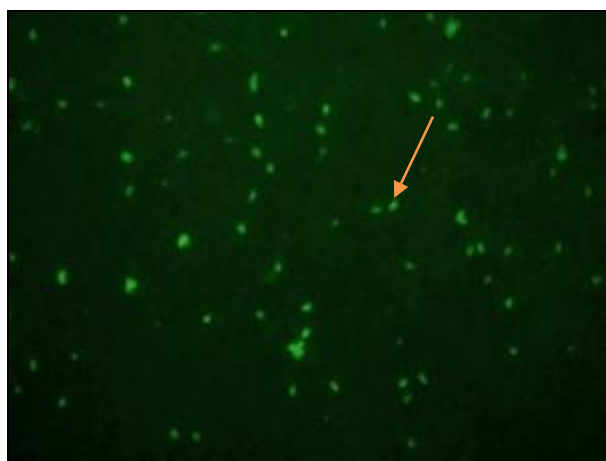


Figura 08- Demonstração do animal 2B positivo a *N. caninum* (RIFI, no aumento de 400x no microscópio de imunofluorescência).

O processo da fusão foi realizado seguindo a metodologia descrita em 4.16. Anteriormente, foi preparada uma monocamada de macrófagos que consistiu na técnica apresentada em 4.14. O preparo da monocamada foi feita em placas de 96 pocinhos e realizada com 24 horas de antecedência da realização da fusão.

No processo da fusão obtiveram-se cinco placas de 96 pocinhos com os hibridomas, sendo utilizadas três placas com a monocamada de macrófagos e

duas sem a monocamada. A utilização da monocamada de macrófagos demonstrou ser benéfica quando comparados os crescimentos dos híbridos cultivados em placas com a presença e ausência desta, pois houve estímulo do crescimento dos híbridos e a promoção da limpeza das culturas o que confirma os fatos relatados por SOUZA em 1999.

Nas cinco placas observadas em microscópio invertido a cada 72 horas notou-se a confirmação da ausência de contaminantes bacterianos e fúngicos, assim como a verificação da multiplicação dos hibridomas.

Após 15 dias da fusão dos linfócitos com os mielomas SP2/O (ilustradas na figura 09, retirou-se 100 µL do sobrenadante de cada pocinho que possuíam os hibridomas e este material foi mantido a -20° C até a realização da RIFI.



Figura 09- Demonstração de mielomas pela seta em aumento de 200x no microscópio invertido.

Os sobrenadantes coletados foram submetidos à RIFI para a verificação da produção de anticorpos anti-*N. caninum*. Todos os pocinhos das três placas que apresentaram crescimento celular satisfatório foram utilizados para a realização da técnica.

Como já foi explicado no item anterior, somente as placas que possuíam monocamada de macrófagos tiveram o crescimento dos hibridomas. Já que a monocamada permitia que cultivo celular ficasse livre das contaminações e das células mortas, pois realizavam a fagocitose dessas estruturas, e estimulavam a multiplicação dos híbridos. Observou-se que 72,4% dos híbridos verificados produziram anticorpo anti-*N. caninum*, como se verifica na tabela 04 e gráfico 01. Dessa porcentagem, foram escolhidos 50 pocinhos que apresentavam um

bom crescimento celular para congelamento a -70°C . O processamento dos híbridos seguiu a metodologia descrita em 4.3 sendo o congelamento das células executado em todas as etapas consideradas de risco, a fim de evitar perdas de material, além da sua manutenção para estudos posteriores.

Tabela 04- Comparação por porcentagem entre o número dos híbridos positivos e negativos utilizando a técnica de imunofluorescência indireta ao *Neospora caninum* para 100 pocinhos.

Híbridos \ Placas	1	2	3	Total
Positivos	70,6%	80,0%	58,4%	72,4%
Negativos	29,4%	20,0%	41,6%	27,6%

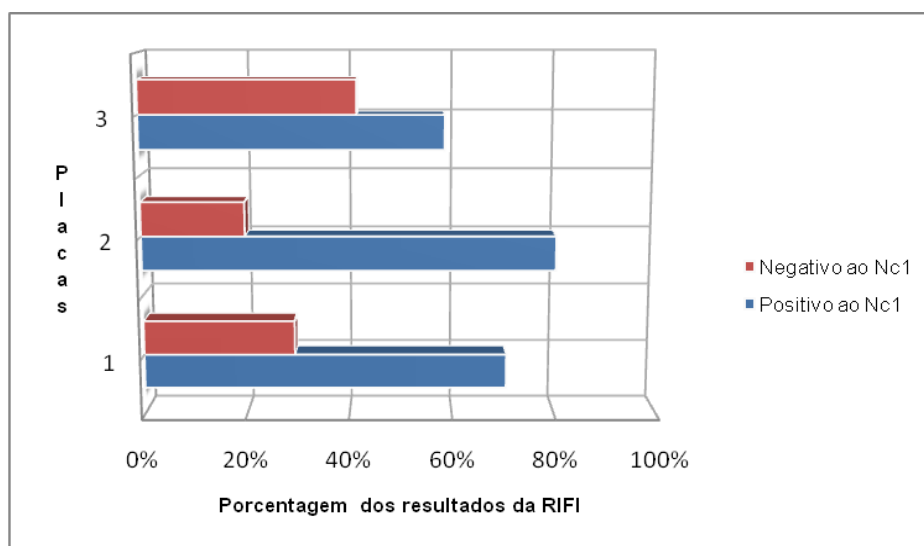


Gráfico 01- Relação dos híbridos positivos e negativos ao *N. caninum*.

Legenda: Os números no eixo y representam as placas 1, 2 e 3 de 96 pocinhos que continham os híbridos.

Foram escolhidos 42 poços positivos ao *N. caninum* para realização da técnica de RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, a qual foi realizada como descrita no item 4.17. Esta verificação fez-se necessária para observar a existência da reação cruzada entre esses dois parasitos, garantindo desta forma que o clone produzido secretasse somente anticorpo com afinidade a *N. caninum*. Desses poços testados, três foram positivos ao *T. gondii* e eles foram descartados da possibilidade de clonagem, já que seriam hibridomas que poderiam gerar clones com reação cruzada ao *T. gondii* e *N. caninum*. Na figura 10, observa-se um resultado da RIFI obtendo em (a) um resultado

positivo ao *N. caninum* e em (b) negativo ao *T. gondii* do híbrido denominado de 3H8.

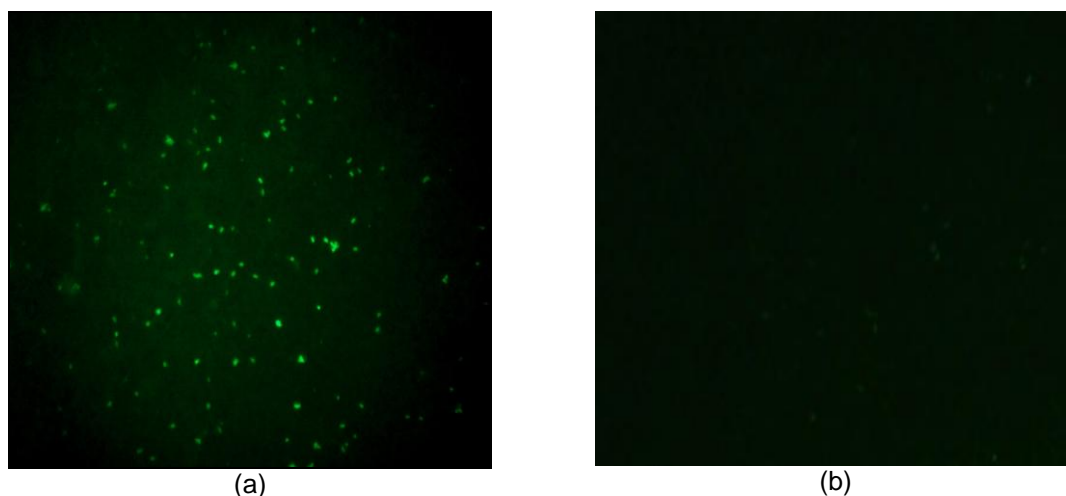


Figura 10 - Resultado da Imunofluorescência Indireta 200x (a) Resultado positivo a *Neospora caninum* do híbrido 3H8; (b) Resultado negativo a *Toxoplasma gondii* do híbrido 3H8.

Assim, a escolha entre os híbridos positivos ao *N. caninum* e negativo ao *T. gondii* foi baseada na multiplicação das células e na viabilidade celular. Os híbridos escolhidos para a clonagem foram 3H8, 2A2, 2G2, 1E1, como se observa na figura 11. Os híbridos selecionados para a clonagem foram submetidos ao método da diluição limitante, como descrito no item 4.18. Os demais híbridos foram congelados a -70° C.

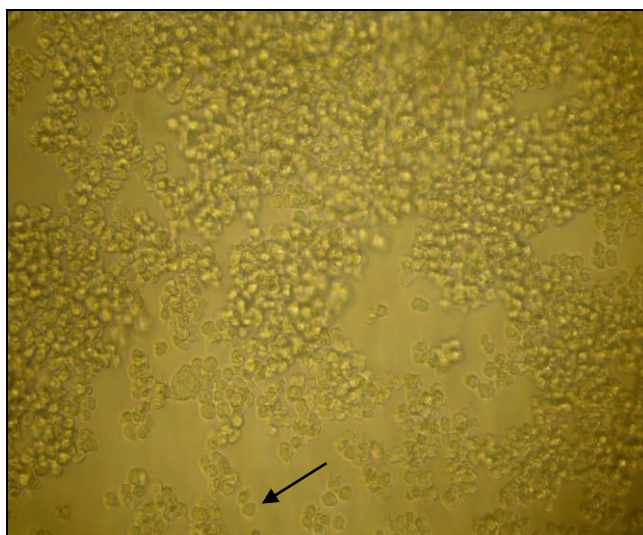


Figura 11- Demonstração do Poço 2G2, da placa de 96 pocinhos, com híbridos que foram selecionados para clonagem por meio da diluição limitante (100x).

Cada pocinho utilizado na diluição limitante possuía cerca de 2×10^3 híbridos e este procedimento teve um preparo prévio da monocamada de macrófagos, como descrito em 4.13.

5.7. Reação da Imunofluorescência Indireta para a avaliação do sobrenadante dos clones

Após sete dias da realização da clonagem, observou-se o crescimento celular nos pocinhos dos clones que, pela diluição limitante, teriam inicialmente uma única célula. Os que se apresentaram com clones viáveis, culturas livres de contaminações e com o poço com cerca de 80% de confluência foram selecionados para a coleta de 100 μ L do sobrenadante e para a realização da RIFI, como descrito no item 4.17. Obteve-se como resultado dessa técnica 78,2% dos clones positivos a *N. caninum* e 21,8% dos clones negativos ao parasito como se observa na tabela 05 e no gráfico 02.

Tabela 05- Comparação por porcentagem entre o número de clones positivos e negativos pela técnica de imunofluorescência indireta para 64 pocinhos.

Clones \ Híbridos	3H8	2A2	2G2	1E1	Total
Positivos	64,7%	72,8%	82,4%	84,4%	78,2%
Negativos	35,3%	27,2%	17,6%	15,6%	21,8%

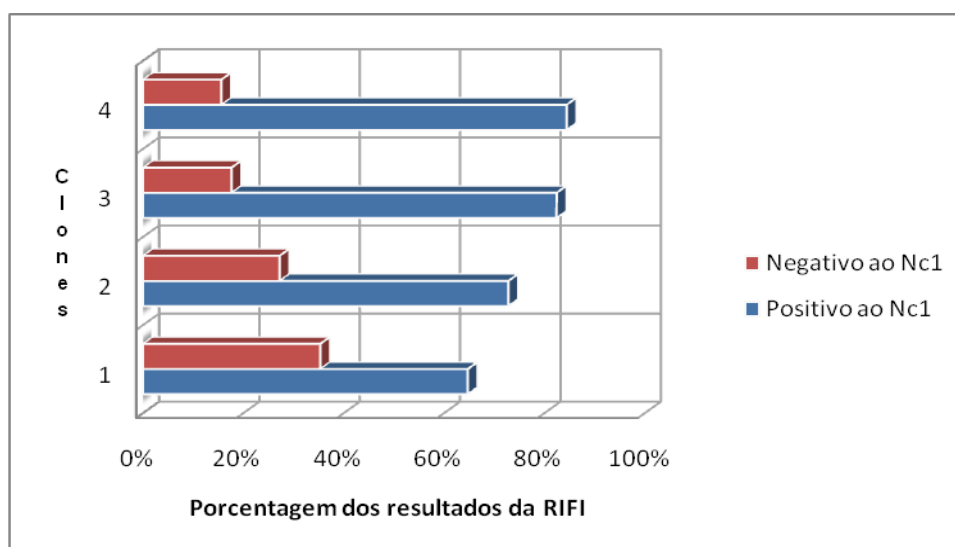


Gráfico 02- Relação de clones positivos e negativos ao *Neospora caninum*.

Legenda: Cada número no eixo y representa um híbrido que foi designado de 1) 3H8, 2) 2A2, 3) 2G2, 4) 1E1.

Dentre os sessenta e quatro clones das quatro placas dos clones, quatro foram escolhidos para a recloneagem, objetivando a garantia de que o clone final fosse originado de uma única célula.

5.8. Recloneagem e avaliação do sobrenadante

Seguindo as condições citadas no item anterior, foram selecionados os seguintes clones para a recloneagem. Dentre os selecionados, os clones: 1E1 E12, 3H8 E11, 2A2 12G, 2G2 12G, apresentaram-se positivos à RIFI e com um crescimento celular desejável. Para a realização da recloneagem, preparou-se, com 24 horas de antecedência, a monocamada de macrófagos para a realização da diluição limitante, como descrito no item 4.18. Esse passo foi fundamental como já citado, para a garantia da origem de um clone único. Passados sete dias da realização da recloneagem, realizou-se a RIFI dos pocinhos que possuíam uma única célula inicialmente e que estavam com o crescimento celular adequado. Assim, foram escolhidos para a expansão em placas de 24 poços os seguintes clones positivos ao *N. caninum*: 1E1 E12 A11, 1E1 E12 C9, 3H8 E11 C10, 2A2 12G 10G, 2G2 12G E12. A expansão foi essencial para a multiplicação dos clones e para permitir que se chegasse a um maior volume de sobrenadante para a realização do Western Blot.

5.9. Expansão dos clones

A expansão dos clones para as placas de 24 poços, que foram previamente preparadas com uma monocamada de macrófagos, como descrito em 4.13, foi necessária para obter um volume mínimo de 3 mL de sobrenadante para a realização do Western Blot. A passagem dos clones selecionados da placa de 96 pocinhos para a de 24 poços foi realizada suavemente com a homogeneização e a suspensão das células. As células foram cultivadas em meio RPMI completo. Cada orifício continha o volume de 1 mL de meio. Ao decorrer de sete dias, as placas foram observadas diariamente. Durante esse tempo foi observado uma multiplicação dos clones pela expansão e ocupação dos pocinhos como se observa na figura 12, a cultura estava límpida e livre de contaminações.

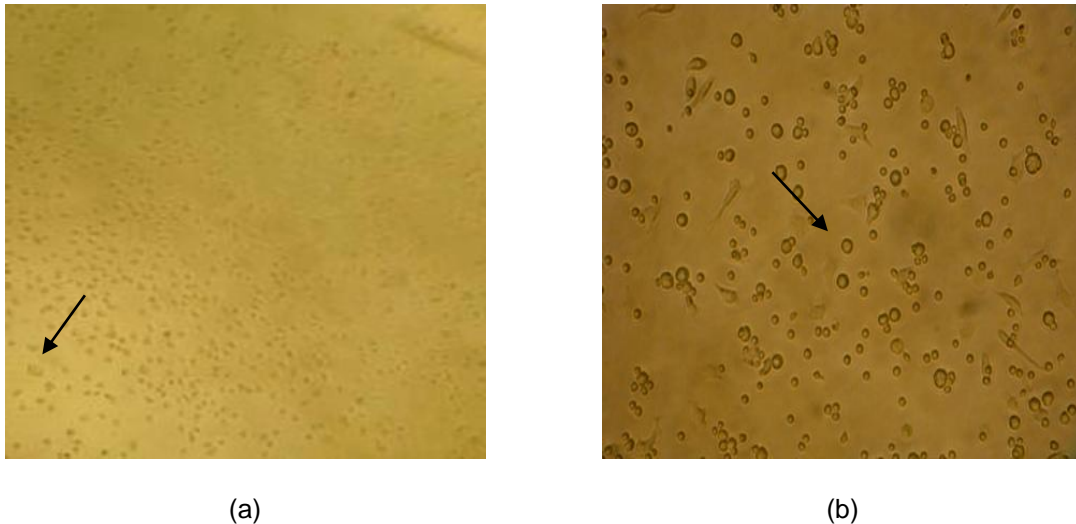


Figura 12- Clones 2A2 12G 10G em placa de 24 pocinhos. (a)- Os clones 2A2 12G 10G em menor aumento (40x); (b)- Os clones em um aumento maior (100x).

Os sobrenadantes dos clones foram coletados e armazenados a -20°C até a realização do Western Blot.

A fim de não existir perda do material e evitar que o trabalho fosse interrompido em algum passo, congelavam-se sobrenadantes, células, hibridomas, sempre quando se julgava necessário.

5.10. Western Blot para a avaliação da clonagem

Após a multiplicação dos clones e a observação de um crescimento adequado, foram coletados cinco vezes, em dias alternados, 1 mL de sobrenadante de cada clone, e adicionado mais 1 mL de meio RPMI 1640 completo em cada poço. Esse material, devidamente identificado, foi mantido a -20°C até o momento da realização do Western Blot. Neste ensaio, as proteínas do *N. caninum*, *T. gondii* e células VERO foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, como descrito no item 4.19.3, para avaliar com quais proteínas os anticorpos monoclonais sintetizados pelos clones estariam interagindo com maior afinidade. A técnica foi realizada com sucesso e houve o reconhecimento de duas bandas protéicas do Nc1 pelos anticorpos sintetizados pelos clones.

Os clones produzidos neste trabalho sintetizaram anticorpos monoclonais que reconheceram as bandas protéicas com massa molecular de 70 kDa e 25 kDa. Os clones 1E1 E12 A11 e 1E1 E12 C9, produziram anticorpos monoclonais que reconheceram a banda de 25 kDa, enquanto 3H8

E11 C10 e 2A2 12G 10G, reconheceram a banda de 70 kDa. Os anticorpos produzidos pelo clone 2G2 12G E12 não foram capazes de reconhecer bandas protéicas do *N. caninum*.

A baixa produção de anticorpos pelo clone 2G2 12G E12 justifica o não reconhecimento de bandas protéicas no Western Blotting. No entanto, como citado no item 5.7, esse clone é positivo ao *N. caninum* por RIFI.

Observou-se na figura 13 as bandas de 25 kDa e 70 kDa que foram reconhecidas somente nas canaletas do gel que receberam o Nc1. Os anticorpos não reconheceram nenhuma proteína do *T. gondii* como pode ser visto na canaleta 3. E na canaleta 4, em que foi utilizado soro policlonal de BALB/c como controle positivo, notou-se a presença da proteína de 25 kDa em seu perfil, o que confirma a sua presença como proteína do *N. caninum*. O reconhecimento da proteína com a massa molecular de 25 kDa confirma os dados apresentados por BASZLER et al. (1996). Em, 1996, BASZLER e colaboradores verificaram que a proteína de 25 kDa, assim como as de 65 e 116 kDa são reconhecidas por anticorpos dos soros de todos os animais Neospora-positivos. Sendo assim, é uma proteína a ser identificada de grande importância em testes de imunodiagnóstico para verificação em casos suspeitos de neosporose.

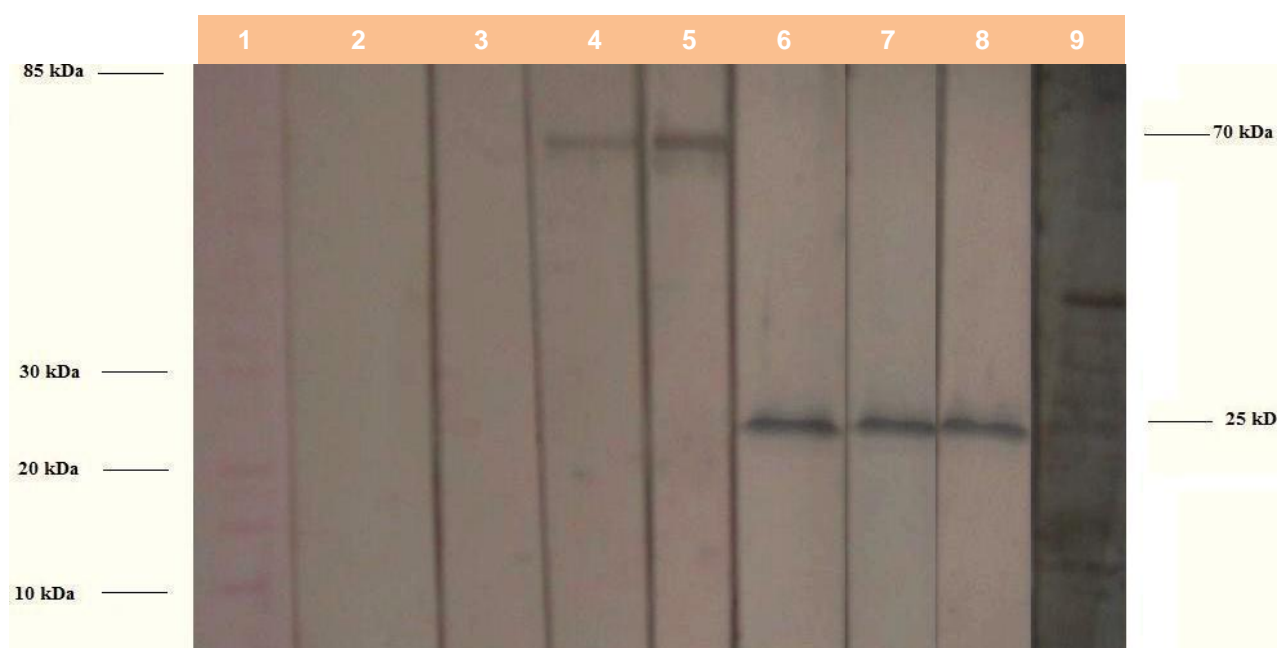


Figura 13- Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao *Neospora caninum*. Pesos moleculares (kDa) indicados à esquerda. 1-Marcador de peso molecular; 2- Controle

negativo: meio de cultivo RPMI 1640 completo; 3- Amostra de *Toxoplasma*, com sobrenadante dos clones; 4 a 8- Amostra de Nc1, com sobrenadante dos clones; 9- Controle positivo, soro policlonal de BALB/c positivo ao *Neospora caninum*.

A proteína de 70 kDa reconhecida pelos anticorpos monoclonais não foi detectada no soro policlonal utilizado como controle positivo. Porém, como foi visto no item 5.4, essa banda protéica esteve presente na canaleta que recebeu amostras do Nc1, o que confirma os dados apresentados por KELLER, et al. (2004).

Uma proteína de 70 kDa identificada nos taquizoítos do *N. caninum* pelos anticorpos monoclonais pode ser uma proteína de micronema que desempenha um papel importante na primeira fase da adesão do parasito à célula hospedeira, por ser uma proteína de mediação entre eles. Uma proteína de 70 kDa foi denominada de NcMIC4 (*N. caninum* microneme proteína 4) por KELLER et al.(2004), que confirmaram que esta é fortemente expressa na ponta apical do parasito. Assim, a NcMIC4 possui um papel fundamental na interação parasito-hospedeiro, sendo importante para que o taquizoíto invada a célula hospedeira, confirmando os dados de NISHIKAWA et al. (2000). A proteína de 70 kDa a qual foi identificada pelos monoclonais deste trabalho, não se pode afirmar que se trata da mesma proteína de 70 kDa detectada pelos autores citados acima, no entanto, pelo desenvolvimento do trabalho viu-se que essa e a de 25 kDa, possuem participação na interação parasita-hospedeiro.

Para o reconhecimento dos clones e anticorpos monoclonais em qualquer localização mundial é de suma importância representar os anticorpos monoclonais seguindo a nomenclatura universal como pode ser observado na tabela 06. A nomenclatura para os clones “mãe”, foi baseada no número da placa de fusão (1, 2, 3), colunas (números, de 1 ao 12) e linhas (letras de A até H), presentes nas placas de 96 poços.

Tabela 06-Nomenclatura Universal dos anticorpos monoclonais (PETERS, J.H. e BAUMGARTEN, H., 1992)

Clones	Nomenclatura
1E1 E12 A11	MAB<Nc1>1.2.84.11
1E1 E12 C9	MAB<Nc1>1.48.60.33
3H8 E11 C10	MAB<Nc1>1.92.73.34
2A2 12G 10G	MAB<Nc1>1.2.84.82

MAB (anticorpo monoclonal), Nc1 (*Neospora caninum*, cepa 1), 1º nº: a fusão realizada, 2º nº: posição na placa de 96 poços do hibridoma, 3º nº: posição na placa de 96 poços do clone, 4º nº: posição na placa de 96 poços do reclone. A contagem na placa é de forma contínua por linhas de 1 a 96.

Assim, neste trabalho foram produzidos quatro clones que sintetizam anticorpos monoclonais que reconhecem as proteínas de massa molecular de 25 e 70 kDa. Com a descoberta e a produção desses anticorpos é essencial afirmar que são ferramentas fundamentais para estudos posteriores de vacinas e métodos de diagnósticos como ELISA, dot-ELISA e imunistoquímica.

5.11. Inibição da infecção por *Neospora caninum* em células VERO

O procedimento para avaliação da inibição do Nc1 nas células VERO foi descrito no item 4.21. Essa etapa do trabalho foi um pré-experimento para a análise da inibição das células VERO com os taquizoítos do *N. caninum* em cultivo celular, com os anticorpos monoclonais presentes nos sobrenadantes dos clones.

Observam-se na figura 14, os resultados obtidos no pré-experimento, as fotos representam a cultura mantida com meio completo em (a), e com sobrenadantes do clones em (b) e (c).

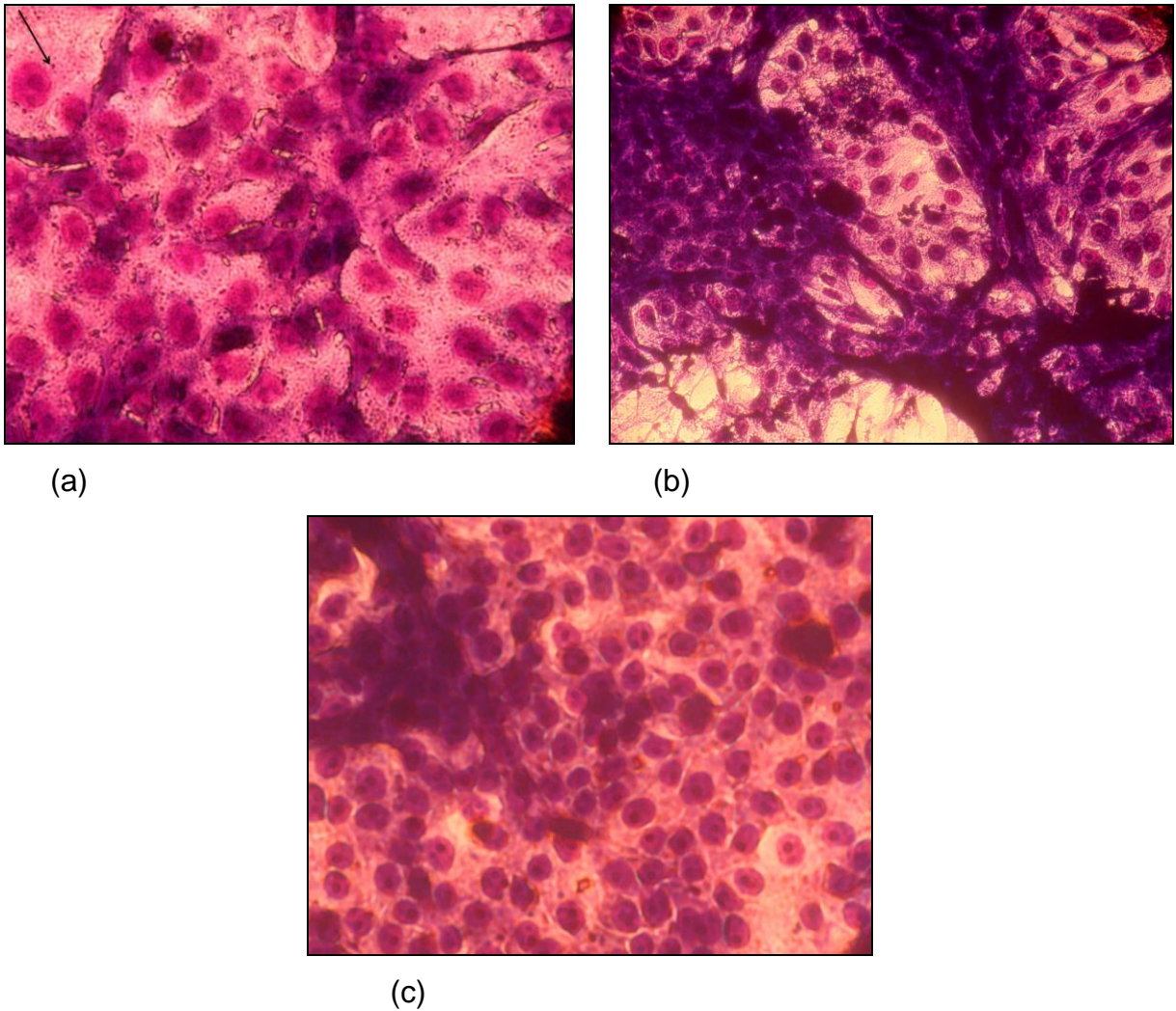


Figura 14. Coloração por GIEMSA de células VERO infectadas por *N. caninum*. (a)- células VERO inoculadas com Nc1 e mantidas com meio RPMI completo, observa-se pela seta a presença do Nc1, 400x. (b)- células VERO inoculadas com Nc1 e mantidas com sobrenadante dos clones de 25 kDa, 200x. (c)- células VERO inoculadas com Nc1 e mantidas com sobrenadante dos clones de 70 kDa, 400x.

As culturas celulares que receberam os sobrenadantes dos clones de 25 kDa e 70 kDa como pode ser visto na figura 14b e 14c impediram a multiplicação dos taquizoítos e seu efeito citopático nas células VERO, como é observado em (a) que foram mantidas somente com o meio RPMI completo. Portanto, os anticorpos produzidos pelos clones foram capazes de impedir que os taquizoítos multiplicassem e destruíssem as células VERO, sendo assim, é de suma importância afirmar que as proteínas de 70 kDa e 25 kDa do *N. caninum* são proteínas de interesse na relação parasita e hospedeiro. Essas proteínas ao serem inibidas pelos anticorpos impediram que os taquizoítos livres invadissem as células, não ocorrendo a invasão celular e a sua

multiplicação. Assim, pode-se sugerir que são proteínas de interesse para estudos posteriores de vacinas e terapêutica para o controle da neosporose.

5.12. Isotipos dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais produzidos pelos clones foram submetidos a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) como está descrito no item 4.22. Os anticorpos monoclonais que reconheceram as proteínas de massa molecular de 25 kDa e 70 kDa são do isotipo IgG2a. SCHREIBER et al (1991) demonstraram que os anticorpos IgG2a e IgG2b produzidos pelos linfócitos B promovem a aceleração da maturação dos macrófagos do hospedeiro.

Segundo ESTES e BROWN (2002), a produção de IgG2a ocorre pela indução de INF- γ , assim como pela IL-12 e IL-18 em resposta ao aumento da produção do INF- γ , portanto tem-se uma resposta polarizada do tipo Th1.

Os anticorpos monoclonais produzidos neste trabalho poderão ser usados no desenvolvimento de testes mais sensíveis, nos estudos epidemiológicos da neosporose ou poderão ser utilizados na identificação de proteínas relevantes para o desenvolvimento de vacinas. Sendo de grande importância a manutenção das culturas celulares dos clones, já que são de produção ilimitada.

Os clones que sintetizaram os anticorpos monoclonais para o reconhecimento das proteínas de 25 kDa e 70 kDa são importantes ferramentas de trabalho para a expansão e produção de anticorpos em maior escala para a sua utilização em diagnóstico da neosporose como as técnicas de imunistoquímica, ELISA e dot-ELISA.

De acordo com os objetivos propostos para esse trabalho, os anticorpos monoclonais foram produzidos contra o *N. caninum* purificado através da fusão de um *pool* de células esplênicas de um camundongo imunizado e o mieloma SP2/O resultando na obtenção de hibridomas, secretores de anticorpos que detectavam os antígenos por RIFI. Após a clonagem por diluição limitante das culturas positivas, foram obtidos clones secretores de anticorpos específicos para o Nc1.

Na caracterização dos AcMo realizada através da isotipagem, todos os

anticorpos puderam ser isotipados. A vantagem do kit utilizado é a facilidade de manuseio aliado à rapidez dos resultados. Neste ensaio, 4 dos clones apresentaram positivos para a secreção de anticorpos isotipo IgG2a.

Os anticorpos monoclonais produzidos por todos os clones obtidos nessa fusão apresentaram reatividade por “imunoblotting” com uma banda protéica de 25 kDa e 70 kDa na fração purificada do *N. caninum*.

Assim, anticorpos monoclonais altamente específicos para o parasita são importantes para o uso em diagnóstico, através de sistemas de captura de determinada proteína presente no soro dos pacientes, o que se pode sugerir para a proteína de 25 kDa.

Teve-se a intenção de empregar uma gama de metodologias modernas e outras já consagradas, de forma a produzir anticorpo monoclonal com características neutralizantes na identificação de epítomos e componentes do *N. caninum* que podem vir a ter utilidade biotecnológica no desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos ou de novas terapias e vacinas.

Demonstrou-se que a técnica dos anticorpos monoclonais pode ser desenvolvida contra o *N. caninum* e o estabelecimento das condições de clonagem e preservação dos hibridomas ao nível de Brasil, possibilitando ao LBCHV do DVT e do BIOAGRO, na UFV a utilização desses anticorpos para trabalhos posteriores.

6. CONCLUSÕES

A imunização dos camundongos com o *Neospora caninum* purificado e sonificado permitiu a obtenção de anticorpos policlonais capazes de detectar a proteína parasitária nos ensaios do tipo RIFI e Western Blotting.

Houve a produção de hibridomas secretores de anticorpos policlonais que reconheceram o *N. caninum* por RIFI.

Houve a produção de clones secretores de anticorpos monoclonais, os quais se identificaram positivos à RIFI.

Os anticorpos monoclonais foram caracterizados como IgG2a, e foram capazes de inibir a infecção e o efeito citopático do *N. caninum* nas células VERO.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Produção dos AcM em maior escala por meio da produção de líquido ascítico em camundongos.

Podem ser propostos os seguintes estudos empregando os AcM: imunistoquímica para diagnóstico *in situ* da infecção por *N. caninum*, estudo de amostras em surtos de doença quanto ao tropismo tecidual e, avaliação da situação atual do *N. caninum* no campo, comparando a ocorrência de episódios clínicos atuais com a doença e em anos anteriores.

Multiplicação dos clones para a produção dos anticorpos monoclonais, para que sejam purificados e em seguida utilizados em cromatografias.

Pela cromatografia de afinidade obter as proteínas de massa molecular de 70 kDa e 25 kDa para serem seqüenciadas e por longos trabalhos desenvolver uma proteína recombinante para a utilização em projetos com vacinas para o controle da neosporose.

Após a determinação da inibição da infecção pelo *N. caninum in vitro*, faz-se necessários estudos mais aprofundados para alcançar um método de controle da neosporose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K; LINCHTMAN, A.H; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier. Rio de Janeiro, 580p., 2005.
- ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABON, M.; CASTELLA, J.; MANAS, S. Red Foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.107, p.287-294, 2002.
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANAVIRO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.2, n.60/61, p.417-431, 2000.
- ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. M.; PACKHAM, A. E.; BARR, B.G.; CONRAD, P.A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.210, n.8, p.1169-1172, 1997.
- ANDERSON, M.L.; PALMER, C.V.; THURMOND, M.C.; PICANSO, J.; BLANCHARD, P.; BREITMEYER, R.; LAYTON, A.; MCALISTER, N.; DAFT, B.; KINDE, H.; READ, D.; DUBEY, J.P.; CONRAD, P.A.; BARR B.C. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. p.1206-1210, 1995.
- ANDREOTTI, R.; LOCATELLI-DITTRICH, R.L.; SOCCOL, V.T.; PAIVA, F. **Diagnóstico e controle da neosporose em bovinos**. Campo Grande: Embrapa, (Documentos 136), 51p., 2003.
- ASAI, T.; ASAI, D. K.; NAKAJIMA, K.; NOZAKI, T.; TAKEUCHI, T.; SIBLEY, L.D. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. **Experimental Parasitology**. v.90, n. 3, p. 277-285, 1998.
- AVENDAÑO, B. Plantas mágicas. Ciencia y Tecnología. Bohemia Digital, junho de 2006. <http://www.bohemia.cubasi.cu/2006/06/15/cienciatecnologia/plantas.html>. Acessado em: março 13 de 2007.
- BARBOSA, M. V. F. Freqüência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de Salvador-Bahia. Salvador, Bahia, 2002. 63p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical)** - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2002.
- BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; BREITMEYER, R.; SVERLOW, K.; ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J.; CHAUVET, A.E.; DUBEY, J.P.; ARDANS, A.A.

Congenital Neospora infection in calves born from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses: four cases (1990-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.1, p.113-117, 1993.

BARTA, J. R.; DUBEY, J.P. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. **Parasitology Research**, v. 78, n. 8, p. 689-694, 1992.

BASZLER, T.V.; KNOWLES, D.P.; DUBEY, J.P.; GAY, J.M.; BRUCE, A. M.; MCELWAIN, T.F. Serological Diagnosis of Bovine Neosporosis by *Neospora caninum* Monoclonal Antibody-Based Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.6, p. 423-1428, 1996.

BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, v.70, p.271-274, 1984.

BJÖRKMAN, C.; LUNDEN, A.; HOLMDAHL, J.; BARBEI, J.; TREES, A.J.; UGGLA, A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 12, p. 643-648, 1994.

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STELUND, S.; HOLMDAHL, O.J.M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.208, n.9, p.1441-1444, 1996.

BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1497-1507. 1999.

BLACKMAN, M.; BANNISTER, L. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular Biochemical Parasitology**. v. 117, n. 1, p. 11-25, 2001.

BOGER, A.L.; HATTEL, A.L., Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. **Veterinary Parasitology**. v.113, p.1-6, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyze Biochemical** v. 72, p. 248-254, 1976.

BUXTON, D.; McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis. **Trends Parasitology**. v.18, p.546-552, 2002.

CAETANO DA SILVA, A.C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Pasitologia Veterinária**. 13, p.29-33, 2004.

CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; CARVALHEIRA, J.; ROCHA, A.; SOUSA, S.; CORREIA DA COSTA, J.M. Determination of an optimized cut-off value for the *Neospora* agglutination test for serodiagnosis in cattle. **Veterinary Parasitology**. v.121, 225-231, 2004.

CORBELLINI, L.G; DRIEMEIER D.; CRUZ, C.F.E.; GONDIM, L.F.P.; WALD, V.; Neoporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Revista de Medicina Veterinária Parasitologia**, v.103, p.195-2002, 2002.

- CORBELLINI, L. G.; PESCADOR, C. A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.S.D.R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abort with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**. v.172, p. 114–120, 2006.
- COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZEDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; ARAÚJO, F.R.; MCALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*, **International Journal for Parasitology**. v38, p. 157–159, 2008.
- DUBEY, J.P.; CARPENTER J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER M.J.; UGGLA, A. New recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.192, p.1269 –1285, 1988.
- DUBEY, J.P., KOESTNER, A., PIPER, R. C. Repetead transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.197, n.7, p.857-860, 1990.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal American Veterinary Medical Association**. V.205, n.11, 1593-1598, 1994.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; ADAMS, D.S.; GAY, J.M.; BASZLER, T.V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.57, n.3, p.329-336, 1996.
- DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOW, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1293-1304, 1998.
- DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKAM, B.L.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, DE.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International for Journal Parasitology**. v.32, p. 929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**. v.41, 1–16, 2003.
- DUBEY, J.P. Neosporose em Bovinos. **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**, p. 01-26, 2004.
- DUBEY, J.P.; SCAHRES G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**. p.1-34, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA., L. M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum* **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323-367, n. 2, 2007.

DUIVENVOORDEN, J. *Neospora* abortion in eastern Ontario dairy herds. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.36, p.623, 1995.

ELLIS, J. T.; RYCE, C.; ATKINSON, R.; BALU, S.; JONES, P.; HARPER, P. A. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 120, n. 4, p.383-390, 2000.

ENTRICAN, G.; BUXTON, D.; LONGBOTTOM, D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.94, n. 6, p. 273-277, 2001.

ESTES, M.D.; BROWN, W.C. Type 1 and type 2 responses in regulation of ig isotype expression in cattle. **Veterinary immunology an immunopatology**. 90, p.1-10, 2002.

GARCÍA, G.A; PÉREZ I. L.; INNES, E.; FERNANDEZ, E. C.; GARCIA, A. F.; BAUTISTA, M. G.; MORA L.M.O. Use of an immunodominant p17 antigenic fraction of *Neospora caninum* in detection of antibody response in cattle. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 101 p. 529-534, 2005.

GARCÍA, A.F.; CASTILLO, V. R.; ZABALLOS, A.; GARCIA, G. A. I.; MORA, L.M.O. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. **Molecular e Biochemical Parasitology**. v.146 p.89–97, 2006.

GÓMEZ, S. Y. M. Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal. **Dissertação (mestrado)**. 68 p. Viçosa: UFV, 2007.

GONDIM, L.F.; SARTOR, I.F.; MONTEIRO JUNIOR, L.A.; HARITANI, M. *Neospora caninum* infection in na aborted bovine foetus in Brazil. **New Zealand Veterinary Journal**, v.47. p.35, 1999.

GONDIM, L.F.; MCALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis tatrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.34, n.02, p.159-161, 2004.

GONDIM, L. F. Novos desafios para o controle da neosporose. **XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul**. Curitiba, 2008.

GONZALEZ, L.; BUXTON, D.; ATXAERANDIO, R.; ADURIZ, G.; MALEY, S.; MARCO, J.C; CUERVO, L.A. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. **Veterinary Record**, 144, n.6, p. 145-150, 1999.

GORETTI, R. G; PATARROYO, J.H.; VARGAS, V. M. I.; SOCARRÁS, T. O. S.; SILVA, C. H. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros fetais bovinos provenientes do triângulo mineiro, estado de Minas Gerais, **XII Congresso brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, 2002.

HADDAD, J. A; DOHOO, I.R; VANLEEUEWEN, J.A; KEEFE G.; WEERSINK A. Perdas na produção e custos no tratamento em rebanhos leiteiros canadenses infectados com *Neospora caninum*, I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, **ANAIS**, p.31, 2005.

- HALDORSON, G. J.; MATHISONA, B.A.; WENBERGA K.; CONRAD P.A.; DUBEYC, J.P.; TREESD, A.J.; YAMANEE, I.; BASZLERA, T.V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. **International Journal for Parasitology**. v. 35 p.1407–1415, 2005.
- HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies, a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, USA, 726p.,1988.
- HEMPHIL, A.; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology Research**, Berlin, v.82, p.497-504, 1996.
- HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 371-380, 1997.
- HEMPHILL, A.; GAJENDRAN, N.; SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HENTRICH, B.; JENKINS, M. Identification and characterization of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 429-438, 1998.
- HEMPHILL, A. The host–parasite relationship in neosporosis. **Advances in Parasitology**. v. 43, p. 47–104, 1999.
- HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B. A European perspective of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 877-924, 2000.
- HERNANDEZ, J.; RISCO, C.; DONOVAN, A. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.219, n.5, p.632-635, 2001.
- HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.O.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; BONESI, G.L.; HOWE, D.K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**. v.136, p.155-159, 2006.
- HOWE, D.K.; CRAWFORD, A.C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L.D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, v. 65, n. 11, p. 5322- 5328, 1998.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1489-1496, 1999.
- HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**. v.35, p.283-290, 2004.
- INNES, E; ADRIANARIVO, A.G.; BJORKMAN, C.; WILLIAMS, D.J.L.; CONRAD, P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends in parasitology**, Oxford, v.18, n.11, p.497-504, 2002.
- INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; MALEY, S. W.; KATZER, F.; BUXTON D. Bovine neosporosis: pathogenesis and host immune responses. **XV**

Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul. Curitiba, 2008.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A; OKABAYSHI, S. *Doença de Gumboro: Revisão de literatura avanços em biotecnologia e novos conhecimentos.* ELANCO SaúdeAnimal, 76p. 2001.

JARDINE, J.E. The ultra structure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs, absence or distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. **Veterinary Parasitology**, v.62, 231-240, 1996.

JENKINS, M. Diagnose of *Neospora caninum*. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, **ANAIS**, p.11, 2005.

JUNQUEIRA, J. R.C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas, **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 289-298, 2006.

KANG S.W.; LEE E. H.; JEAN Y.H.; CHOE S.E.; QUYEN D. V.; LEE M.S. The differential protein expression profiles and immunogenicity of tachyzoites and bradyzoites of in vitro cultured *Neospora caninum*. **Parasitology Research** v.103, p. 905–913, 2008

KELLER, N.; NAGULESWARAN, A.; CANNAS, A.; VONLAUFEN, N.; BIENZ, M.; BJORKMAN, C.; BOHNE, W.; HEMPHILL, A. Identification of a neospora caninum microneme protein (NcMIC1) witch interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. **Infection and immunity**. v.70, n.6, p.3187-3198, 2002.

KELLER, N.; RIESEN, M.; NAGULESWARAN, A.; VONLAUFEN, N.; STETTLER, R.; LEEPIN, A.; WASTLING, JM.; HEMPHILL, A. Identification and characterization of a *Neospora caninum* microneme-associated protein (NcMIC4) that exhibits unique lactose-binding properties. **Infection and immunity**, v. 72, n. 8, p.4791–4800, 2004.

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

KUPPER, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: mechanisms and speculations. **Journal Clinical Investigation** 86, p.1783-1789. 1990.

LALLY, N. C.; JENKINS, M. C.; DUBEY, J. P. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 3, p. 275-279, 1996.

LASRI, S.; DE MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. **Veterinary Parasitology**. v.123, p.25–32, 2004.

LEE, C.Y.; SUAREZ, I.D.; GOUVEIA, T.; TEIXEIRA, V.R.; BARBOSA, S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; AUGUSTO, E.F.P., Melhoramento da produção de anticorpo monoclonal anti-TNP utilizando meio de cultura fortificado. **Anais do**

VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, v.1, p.79, 2002.

LEMBERGUER, K.Y.; GONDIM, L.F.P.; PESSIER, A.P.; McALLISTER, M.M.; KINSEI, M.J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging Raccoon (*Procyon Lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. **The journal parasitology**, v.91, p.960-991, 2005.

LEENAARS, M; HENDRIKSEN, F.M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **ILAR Journal**. v.46, n.3, p.269-279, 2005.

LIAO, M.; XUAN, X.; HUANG, X.; SHIRAFUGI, H.; FUKUMOTO, S.; HIRATA, H.; SUZUKI, H.; FUJISAKI, K. Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. v.130, p. 481–488, 2005.

LIDDELL, J. E.; CRYER, A. A practical guide to monoclonal antibodies. In: **John Wiley e Sons (Ed)**, 188 p. 1991.

LINDSAY, D. S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R. R., SEMRAD, S. D., KONKLE, D. M., MILLER, P. E., BLAGBURN, B. L. Central nervous system neosporosis in a foal. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.8, n.4, p.507-510, 1996.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**., v.82, p.327-333, 1999.

LIPMAN, N.S; JACKSON, L.R; TRUDEL, L.J; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information. **ILAR Journal**. v. 46, p.258-268, 2005.

LITTLE, M.; KIPRIYANOV, F.; LE GALL, F.; MOLDENHAUER, G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunology Today**. v.21 p.364-370, 2000.

LOUIE, K.; SVERLOW, K.W; BARR, B.C.; ANDERSON, M.L; CONRAD, P.A. Cloning and characterization of two recombinant *Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology** 4 p.692- 699,1997.

LOVETT, J.L.; HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. Molecular characterization of a thrombospondin-related anonymous protein homologue in *Neospora caninum*. **Molecular Biochemical of Parasitology**. v.107, n.1, p.33-43, 2000.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A. E., CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 983-991, 1998.

MASUDA, T.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA R., OMATA, Y.; Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p.130–133, 2007.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

- MELO C.B.; LEITE, R.C.; SOUZA, G.N.; LEITE, R.C; Freqüência de Infecção por *Neospora Caninum* em dois diferentes sistemas de Produção de Leite e Fatores Predisponentes à Infecção em bovinos em Minas Gerais. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.10, n 2, p. 67-74, 2001
- MICELI, M.C.; PARNES, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. **Adv Immunology**, v.53, p.59-122. 1993.
- MINERVINO, A.H.H.; RAGOZO, A M.A.; MONTEIRO, R. M; ORTOLANI, E.L.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle from Santare Para´, Brazil, **Research in Veterinary Science**, p.1-3, 2007.
- MORALES, J.C. Técnicas de diagnóstico en virologia. **Ediciones Díaz de Santos**, Madrid España, p.79–103, 1993.
- NISHIKAWA, Y.; XUANA, X; NAGASAWAA, H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; OTSUKAB, H.; MIKAMIA, T. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. **International Journal for Parasitology** 30 p.51- 58, 2000.
- NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 175–184, 2003.
- OGAWA, L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTO, O.; FREIRE, R.L.; GONDIM, L.F.P.; MARANA, E.R.M.; SILVA, E.H.; SEDEMAKA, T.M.; DAMAS, A.C.; MATTOS, M.R.; PRUDENCIO, L.B.; TSUTSUI, V.S.; SANTOS, A.P.M. Avaliação sorológica do *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos de leite da região do norte do Paraná. IN: **Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 11., Salvador. Colégio Brasileiro de parasitologia Veterinária, p.225, 1999.
- OMATA, Y.; KAMIYA, H.; KANO, R.; KOBAYASHI, Y.; MAEDA, R.; SAITO, A. Footpad reaction induced by *Neospora caninum* tachyzoite eextract in infected BALB/c mice. **Veterinary Parasitology**, v.139, p. 102-108, 2006.
- OTTER, A J. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. **Veterinary Research, Schaumburg**, v.141, n.19, p.487- 489, 1997.
- PALAVICINI, P.; ROMERO, J.J.; DOLZ, G.; JIMÉNEZ, A.E.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. **Veterinary Parasitology** 149, p.265–270, 2007.
- PEREIRA, S.R.F.G; TRAVASSOS, C.E.P.F.; HUGUENIM, A.; GUIMARÃES, A.C.C.; SILVA, A.G.; GUIMARÃES M.A.A.M. Western blot detection of infectious bursal disease virus infection. Short Communication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.31, p.671-674, 1998.
- PERL, S.; HARRUS, S.; SATUCHNE, C.; YAKOBSON, B.; HAINES, D. Cutaneous neosporosis in a dog in Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.79, n.3, p.257-261, 1998.
- PETERS, J.H; BAUMGARTEN, H.; Monoclonal Antibodies. **Springer-Verlag**, Berlin, 487 p., 1992.

PINHEIRO, A. M.; COSTA, S. L.; FREIRE, S. M.; MEYER, R.; ALMEIDA, M. A.; TARDY, M.; EL BACHA, R.; COSTA, M. F. *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. **Experimental Parasitology**, v.112, n. 3, p.193-197, 2006.

PONTECORVO, G. Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylene glycol (PEG) treatment. **Somatic Cell Genetic**, v.1 p.397-400, 1976.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478–482, 1997.

RAGOZO, A. M. A; DE PAULA VÂNIA S. O; DE SOUZA S. L. P.; GENNARI S.M. OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Neospora caninum* em soros de bovinos procedentes de seis estados brasileiros, **XII Congresso brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, 2002.

REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. Control options for *Neospora caninum* in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**. v.50, p.86-92, 2002.

ROCHA, F.T.R. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da Bronquite infecciosa das galinhas. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**. 31p., 2000.

ROMERO, J.J., PEREZ, E., FRANKENA, K., Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. **Veterinary Parasitology**. v.123, p.149–159, 2004.

ROSAS, L.V., Fitoquímica, quimiosistemática, e busca de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses: estudo de *Raputia praetermissa* (RUTACEAE). **Tese (Doutorado em Ciências Médicas)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos**, 312p., 2005.

RUEHLMANN, D.; PODDEL, M.; OGLESBEE, M.; DUBEY, J. P. Canine neosporosis: a case report and literature review. **Journal American Animal Hospital Association**, v.31, n.2, p.174-183, 1995.

RYAN J.A. Single Cell Cloning by Serial Dilution. **Protocol**. Corning Incorporated Life Sciences.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTINEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDLGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology** 135, p.197–203, 2006.

SCHARES, G.; DUBREMETZ, J. F.; DUBEY, J. P.; BARWALD, A.; LOYENS, A.; CONRATHS, F. J. *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 109-119, 1999.

SCHREIBER, S.; BLUM, J.S.; STENSON, W.F.; MACDERMOTT, R.I.P.; STAHL, P. D.; TEITELBAUM, S. L.; PERKINS, S. L., Monomeric IgG2a promotes maturation of bone-marrow macrophages and expression of the mannose receptor. **Immunology**. v. 88, p. 1616-1620, 1991

SHULMAN, M., WILDE, C. D., KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. *Nature*, v. 276, p.269-270, 1978.

- SCHUNK, M.K.; MACALLUM G.E. Applications and optimization of immunization procedures. **ILAR Journal**. v.46, n.3, p.241-257, 2005.
- SLAPETA, J.R.; MODRÝ, D.; KYSELOVÁ, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dogs shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**. v.109, p. 157-167, 2002.
- SILVA, D. A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.P.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*, **Veterinary Parasitology** 143, p.234–244, 2006.
- SONDA, S.; FUCHS, N.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. **Molecular Biochemical of Parasitology**. v. 108, n.1, p.39-51, 2000.
- SOUZA, C.M. *Produção de anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus de Bronquite Infecciosa*. 1999, 65f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SOUZA, V.F. Caracterização de amostras de herpesvírus tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.13-18, 2002.
- SOUZA E SILVA, C.H. Estudo da Transmissão Vertical do *Neospora caninum* em ovelhas deslanadas. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 50p., 2005.
- TAN, J.S. Human Zoonotic Infections Transmitted by Dogs and Cats. **Archive International Medicine**. v.157, p. 1933-1943, 1997.
- THILSTED, J.P.; DUBEY, J.P. Neosporosis – Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.205 – 209, 1989.
- TREES, A.J.; DAVISON, H.C.; INNES, E.A.; WASTLING, J.M. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. **International journal for Parasitology**, v. 29, p.1195 – 1200, 1999.
- VARDELEON, D.; MARSH, A.E.; THORNE, J.G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.2-4, p.273-282, 2001.
- YANIZ, M.G. DE; MOORE, D.P.; ODEO, A.C.; CANO, A.; CANO, D.B.; LEUNDA, M.R.; CAMPERO, C.M. Humoral immune response in pregnant heifers inoculated with *Neospora caninum* tachyzoites by conjunctival route. **Veterinary Parasitology**. 148 p. 213–218, 2007.
- ZOLA, H.; Introduction. In: ZOLA, H. **Monoclonal Antibodies: The Second Generation**. Oxford: BIOS Scientific Publ., p. 205, 1995.
- WAPENAAR, W.; BARKEMA H.W.; VANLEEUVEN J.A.; MCCLURE, J.T.; O'HANDLEY, R.M.; KWOK, O.C.H.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. **Veterinary Parasitology**. 8p., 2006.

WILLIAMS, D.D.L.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; TASKER, L; SMITH, R,F.; MACEACHERN,K.; CRIPPS, P.J.; TREES, A.J. Neospora caninum associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitoemia during gestation determines foetal survival. **Parasitology**. v.121, p. 346-358, 2000.

WRIGHT, P.F.; NILSSON, E.; VAN ROOIJ, E.M.A. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis **Revue Scientifique et Technique Office International Epizooties**. v.12, n.2, p.4435-4450, 1993

WOUDA, W.; DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. **Journal Parasitology**, v. 83, p. 545–547, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)