

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

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 Vilorio. 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 sonificado, 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.