

SANDRA YULIET MARÍN GÓMEZ

**PRODUÇÃO DE CLONES SECRETORES DE ANTICORPOS (IgG) CONTRA O
VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA BURSAL**

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

2007

A DIOS

A mi Familia,

A mi madre: Maria Doris.

A mi padre: José Joaquín.

A mi hermana: Maria Aydeé.

A mi sobrina: Juliana.

Quienes siempre están presentes en mi vida a pesar de la distancia.

GRACIAS por apoyarme, creer en mí
y por darme fuerzas siempre que quiero desistir.

Dedico este trabajo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

A minha família e amigos, que com amor, sacrifício e esperança sempre estiveram presentes.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

Ao Departamento de Veterinária da UFV por contribuir na formação científica.

A Professora Bernadete Miranda dos Santos, pela orientação na realização deste trabalho, por ter incentivado a idéia deste estudo e pela tão esmerada atenção em todas as dúvidas.

Ao Professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade, generosidade e atenção com que sempre me recebeu e por ter permitido o uso do laboratório de biologia e controle de hematozoários e vetores (LBCHV) e me deixar participar de sua equipe de trabalho.

À Professora Marlene Isabel Vargas Vilória, pela amizade, carinho e ajuda em todo momento.

Ao Professor Mauro Pires Moraes e a Professora Márcia Rogéria de Almeida por ter permitido o uso do laboratório de virologia sempre que preciso.

Ao Professor Murilo Zerbini Jr. pela disposição do laboratório e assessoria para purificação do vírus.

À FAPEMIG pela concessão de recursos para realização deste trabalho.

Ao Professor e amigo William Narvaez, pela ajuda e incentivo para vir ao Brasil e fazer este curso de pós-graduação.

A todos os professores do Departamento de Veterinária pelos conhecimentos transmitidos.

A bolsista de iniciação científica Ana Carolina Barbosa de Paula por todo o auxílio prestado no decorrer do experimento, pela paciência e amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Veterinária.

Ao funcionário Márcio Mendes pela disposição em ajudar nas técnicas laboratoriais, pela amizade e paciência.

Aos funcionários Francisco Edmar Martins de Souza e Deusdedet Evangelista dos Santos do laboratório de doenças de aves pela disposição, ajuda e carinho.

Ao Adão pela ajuda oportuna nos cortes histológicos.

À Rosinéia Aparecida da Cunha Andrade, secretária da pós-graduação do Departamento de Veterinária, por ser tão atenciosa e prestativa.

Ao Marcos Orlando de Oliveira por ter tornado meus dias em Viçosa mais felizes.

A minha querida amiga Yasmine Barbosa, que foi para mim como uma irmã durante minha estadia no Brasil.

Aos amigos Diana Yamin e Jose Augusto pela amizade e companheirismo.

Aos meus colegas de UESA, Lindomar, Ana Carolina, Cleiton, Michel o meu muito obrigada e carinho eterno.

Ao meu amigo Claiton, pelos conselhos, apoio e ajuda no experimento.

A Bruna Alves Devéns, pelo auxílio imprescindível na realização das culturas celulares e pela amizade.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Sidimar Sossai e Carlos Henrique pela ajuda, e ensinamentos na execução das técnicas de imunodiagnóstico.

Aos colegas e amigos do LBCHV – Hugo, Gabriel, Carla, Ana Paula Peconick, Anna Paula Ferreira, Fabrício, Javier, Flavia, Marina.

As minhas amigas do laboratório de virologia animal, Camila e Fernanda.

Às minhas colegas de república durante estes anos: Larissa, Yasmine, Márcia, Ana Paula e Natalia, pelos momentos vividos.

Aos meus amigos Colombianos em Viçosa, Luis, Diego, Juan Felipe, Gloria, Carolina, Alejandro por todos os momentos compartilhados.

E a todas as outras pessoas cujos nomes não estão aqui, mas que estiveram presentes e contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

SANDRA YULIET MARÍN GÓMEZ, filha de Jose Joaquín Marín e Maria Doris Gómez, nasceu em 25 de janeiro de 1979, em Manizales – Colômbia. Em Abril de 2004 graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia, pela Universidad de Caldas, Manizales – Colômbia.

Em Fevereiro de 2005 concluiu o Programa de Aprimoramento Profissional na área de Sanidade Avícola, no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Em Março do mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Abril de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE QUADROS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Histórico da doença infecciosa bursal (IBD).....	3
2.2. A IBD	5
2.3. Anticorpos Monoclonais.....	9
2.4. ELISA.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Local	17
3.2. Vírus	17
3.3. Multiplicação do vírus.....	17
3.4. Mensuração da patogenicidade viral em cultivo celular.	18
3.5. Purificação do vírus	18
3.6. Dosagem de proteína	19
3.7. Animais Experimentais.....	20
3.8. Sangria dos camundongos	20
3.9. Imunização dos camundongos.....	20
3.10. ELISA para avaliação do soro dos camundongos	20
3.11. Produção de Plasmocitomas	21
3.12. Preparo de macrófagos peritoneais.....	22
3.13. Contagem celular.....	22

3.14. Coleta de linfócitos para fusão	23
3.15. Fusão.....	23
3.16. Coleta do sobrenadante.....	24
3.17. ELISA para avaliação do sobrenadante.....	24
3.18. Clonagem dos hibridomas positivos.....	24
3.19. Congelamento das células produtoras de anticorpos monoclonais.	25
3.20. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	26
3.21. Caracterização dos clones.....	26
3.21.1. SDS-PAGE	26
3.21.2. Coloração pelo azul de Coomassie G-250.....	27
3.21.3. Western blotting	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Patogenicidade viral em cultivo celular.....	29
4.2 Purificação do vírus	29
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	30
4.4. Dosagem de proteínas.....	31
4.5. Imunização dos camundongos BALB/c	31
4.6. Fusão e clonagem	33
4.7. ELISA Indireto do sobrenadante.	33
4.8. Expansão dos hibridomas positivos em placas de 24 orifícios.....	34
4.9. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	35
4.10. Western blotting	37
5. CONCLUSÕES	40
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	42
8. APÊNDICE	51
8.1 Cultivo Celular	51
8.2 Purificação do Vírus	51
8.3 Dosagem de proteína viral.....	51
8.4 ELISA indireto	52
8.5. Produção de Plasmocitomas	52
8.6 Preparo de macrófagos peritoneais.....	53
8.7 Coleta de linfócitos.....	53
8.8 Imunofluorescência	53
8.9 Eletroforese.....	54
8.10. Western blotting	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM: Anticorpos Monoclonais
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
BSA: soro albumina bovina (bovine serum albumin)
DAB: diaminobenzidina
DMEM: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DICC_{50%}: dose infectante em cultura de células 50%
DMSO: dimetil sulfóxido
D.O.: densidade óptica
DVT: Departamento de Veterinária
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, teste imunoenzimático
FEG: fibroblastos de embrião de galinha.
FITC: isotiocianato de fluoresceína
g: grama
HGPRT: hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
HAT: hipoxantina aminopteridina tiamidina
HT: hipoxantina tiamidina
IBD: “infection bursal disease” doença infecciosa bursal
IBDV: “infection bursal disease virus” vírus da doença infecciosa bursal
Ig: imunoglobulina
I.V.: intravenoso
kDa: kilodalton
LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
MCA: membrana cório-alantóide
µg: microgramas
µL: microlitros
mL: mililitros
nm: nanômetros
°C= graus Celsius
OPD= o-phenylenediamine
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS: phosphate buffer solution
PEG: polietileno glicol.
RIFI: reação de imunofluorescência indireta
RNA: ácido ribonucléico

RPMI: Roswell Park Memorial Institute meio de cultura.
q.s.p.: quantidade suficiente para
SFB: soro fetal bovino
SPF: livre de patógenos específicos.
TK: “timidine kinase”
UESA: Unidade de Estudo em Sanidade Avícola.
UFV: Universidade Federal de Viçosa
v:v: volume: volume
VERO: “african green monkey kidney”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via da síntese de purinas, via de <i>novo</i> e via de recuperação.....	11
Figura 2. Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos (IgG).....	25
Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do vírus da IBD corado pelo Azul de Coomassie. Marcadores de peso molecular (PM) em kDa à esquerda.....	30
Figura 4. Teste de ELISA mostrando os três clones positivos que correspondem aos clones D8, F9, H8 - após clonagem, por diluição limitante D.O. D8 (0,617); F9 (0,823); H8 (0,923).	34
Figura 5. Reação de imunofluorescência indireta dos anticorpos monoclonais frente a cortes histológicos de bolsas de Fabrício positivas para o IBDV por infecção natural. A. Controle policlonal negativo, soro de camundongo sem imunizar. B. Controle policlonal positivo, soro de camundongo imunizado. C. sobrenadante de hibridomas clone H8. D. sobrenadante de hibridomas clone D8. E e F. sobrenadante de hibridomas clone F9. Diluição 1:40, 400X.....	36
Figura 6. Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao vírus da IBD. Pesos moleculares (kDa) indicados à esquerda. 1.Marcador de peso molecular, 2.Controle policlonal positivo: soro de camundongo anti-vírus da IBD, 3.Clone H8, 4.Clone F9, 5. Clone D8, 6. Controle policlonal negativo: soro de camundongo negativo para o vírus da IBD, 7. Controle policlonal positivo: soro de camundongo anti-vírus da IBD	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva padrão para dosagem de proteína, usando SAB.	31
Gráfico 2. Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto dos soros dos camundongos testados por ELISA antes de serem imunizados; 2 semanas após cada imunização, os camundongos foram inoculados com intervalos de 3 semanas. Foram feitas 4 inoculações nos camundongos e as setas no gráfico indicam o dia da imunização, a 5 e ultima imunização quatro dias antes da fusão.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais proteínas virais sua função e características.	6
Tabela 2. Relação µg de soroalbumina (SAB) bovina como padrão com densidade óptica determinada pelo método de ácido biciconinico.	31
Tabela 3. Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-IBDV em ELISA.	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto. Os números representam as médias de absorvância nas semanas indicadas, sendo que para cada soro foram feitas duas repetições. As inoculações foram feitas na semana 0, 3, 6, 9 e 4 dias antes da fusão.	32
--	----

RESUMO

MARIN, Sandra Yuliet Gómez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2007.
Produção de clones secretores de anticorpos (IgG) contra o vírus da doença infecciosa bursal. Orientadora: Bernadete Miranda dos Santos. Co-orientadores: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilorio.

O vírus da doença infecciosa bursal (IBDV) é o agente etiológico de uma das mais importantes doenças para a indústria avícola mundial, e se caracteriza por ser altamente contagioso e produzir um estado de imunodepressão nas aves, trazendo falhas na vacinação e susceptibilidade a outras doenças, o que resulta em perdas econômicas ao setor avícola. O Brasil é o maior exportador de frango de corte do mundo o que motiva ao setor de sanidade avícola a oferecer alternativas de diagnóstico confiáveis, e rápidas, com tecnologia nacional. Por este motivo, a proposta do presente trabalho foi a produção de anticorpos monoclonais (AcM) de alta afinidade contra o vírus da doença infecciosa bursal (IBD), para uma possível utilização futura em testes de imunodiagnóstico do tipo imunofluorescência, imunohistoquímica ou ELISA de captura. Para a produção dos AcM se usou vírus inteiro proveniente de uma vacina comercial, estirpe intermediária (Bur-706) o qual se multiplica em células VERO e foi purificado por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, foi utilizado para a imunização dos camundongos BALB/c, usando como adjuvante saponina, o que permitiu a obtenção de anticorpos policlonais capazes de revelar a enzima por ELISA. A fusão das células esplênicas dos camundongos imunizados e o mieloma SP2/0 resultou na obtenção de 2 famílias de hibridomas (2H11 e 5C7) secretores de anticorpos. Após clonagem por diluição limitante, foram obtidos 3 clones secretores de AcM da classe IgG. Os três AcM obtidos foram capazes de revelar as proteínas virais VPX e VP2 por "western blotting", reconhecendo a proteína de 47 kDa e 41 kDa. A definição dos isótipos reconhecidos pelos AcM obtidos devem ser objeto de investigações futuras, de modo a permitir a utilização dos anticorpos em ensaios imunoenzimáticos para estudos epidemiológicos da doença o para diferenciar vírus vacinal e de campo.

ABSTRACT

MARIN, Sandra Yuliet Gómez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April of 2007.
Production of clone secreting of antibodies (IgG) against infectious bursal disease virus. Adviser: Bernadete Miranda dos Santos. Co-advisers: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo and Marlene Isabel Vargas Vilorio.

The infectious bursal disease virus (IBDV) causes highly contagious and immunosuppressive disease for the world poultry, resulting in an impaired response to vaccination and susceptibility to other diseases, and severe economical losses to the poultry activity. Brazil is the world's largest exporter of chicken meat, condition which demands reliable and rapid procedures for diagnosis. The proposal of the present work is the production of monoclonal antibodies (MAbs) of high affinity against IBDV. The IBDV was strain S 706 (the intermediate vaccine) was replicated in VERO cell and purified by sucrose gradient, for ELISA and mice inoculation. For the immunization of the mice BALB/c using as a saponin adjuvant, that allowed an inflammation reaction which enhanced the antibody response, detectable by ELISA. The fusion of splenic cells of the immunized mice and the mieloma SP2/0 resulted in 2 hybridoma families (2H11 and 5C7). After cloning by limiting dilution, 3 clones secretors of MAbs from IgG class were obtained. The 3 obtained MAbs were capable to reveal the proteins VPX and VP2 by "western blotting", respectively of 47 kDa and 41 kDa. The definition of the isotypes recognized by obtained MAbs must be object of future characterization to allow the use of the antibodies in immunodiagnostic tests such as immunofluorescence, immunocitochemistry or capture ELISA, for epidemiologic of the disease researches or to differentiate vaccine's virus of the field virus.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura representa uma indústria de grande importância, na produção mundial e nacional de carne para a alimentação humana, por isso, devido à contínua pressão por resultados mais econômicos e à maior produção em menor espaço e tempo, na procura da máxima produtividade para atender a demanda, o nicho ecológico das aves tem sido alterado. Essa alteração tem propiciado o aparecimento de diversos problemas sanitários, antes não enfrentados com tanta frequência. Muitos agentes têm sido estudados e descritos como determinantes de importantes infecções em plantéis avícolas, que frequentemente geram perdas econômicas. Dentre essas infecções, a doença infecciosa bursal (IBD), atualmente, representa um dos principais problemas sanitários em virtude de sua alta contagiosidade e por seu caráter imunodepressor. Estes fatores influem negativamente no rendimento econômico dos plantéis de reprodutores, de postura comercial e de frangos de corte (KIBENGE *et al.*, 1988; SHARMA *et al.*, 2000; PAULILLO *et al.*, 2004a).

A IBD tem como agente etiológico um vírus membro da família *Birnaviridae* (DOBOS *et al.*, 1979), gênero *Avibirnavirus*, sendo um vírus de RNA fita dupla, não envelopado e apresenta dois tipos sorológicos distintos designados sorotipo 1 e sorotipo 2. Ambos infectam naturalmente galinhas e perus, mas a doença ocorre somente em galinhas e apenas o sorotipo 1 é patogênico (NAGARAJAN & KIBENGE, 1997; SAIF, 1999; JUNGMAN *et al.*, 2001; MONTASSIER, 2001; MULLER *et al.*, 2003).

Os métodos imunológicos para diagnóstico da IBD são atualmente mais utilizados do que o isolamento e identificação viral, por serem mais rápidos na obtenção dos resultados e pela simplicidade de sua execução, possibilitando análise de um maior número de amostras em menor tempo e com menores custos. A monitoria sorológica pressupõe avaliar a eficiência dos programas vacinais, como a vacina utilizada e o manejo de vacinação, além de auxiliar no diagnóstico e traçar um perfil imunológico dos plantéis (DI FABIO, 2001).

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 ELISA de captura com anticorpos monoclonais pode se converter em uma ferramenta muito útil para estimar a variabilidade do vírus de campo e para o estabelecimento de estratégias de controle (ITO *et al.*, 2001).

A biotecnologia é um ramo de 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 imunoquímica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos e na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas e animais, entre outros usos (LENAARS & HENDRIKSEN, 2005).

O objetivo deste estudo é a produção de anticorpos monoclonais de alta afinidade contra o vírus da IBD, para uma possível utilização futura em testes de imunodiagnósticos do tipo imunofluorescência, imunohistoquímica ou ELISA de captura, para estudo de amostras suspeitas, detecção e diferenciação do vírus vacinal e de campo para um melhor monitoramento dos plantéis com relação a essa doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da doença infecciosa bursal (IBD)

A IBD foi descrita pela primeira vez por Cosgrove, em 1962, e foi denominada de Doença de Gumboro (COSGROVE, 1962). Subsequentemente, Hitchner (1970) propôs o termo Doença Infecciosa Bursal, já que a infecção causava lesões específicas na bolsa cloacal. Allan *et al.* (1972), comparando a resistência de lotes de aves imunizadas e não imunizadas frente ao desafio com uma amostra virulenta, verificou que os anticorpos maternos protegiam as aves até três semanas de idade de desenvolverem a doença e que a progênie de aves não imunes também pode ser refratária à doença clínica durante os primeiros 21 dias.

Giambone *et al.* (1976) estudaram o efeito inicial da exposição natural ao vírus da IBD na resposta imune aos vírus da doença de Marek e ao vírus da doença de Newcastle. Encontraram que as aves tiveram a resposta imune deprimida quando vacinas contra essas doenças e colocadas em área contaminada com o IBDV.

Kaufer e Weiss (1980), trabalhando com aves de quatro semanas bursectomizadas cirurgicamente e inoculadas com vírus virulento imediatamente ou uma semana depois da retirada da bursa, observaram que não houve manifestação de sinais clínicos.

Na década de 70, foram detectadas nos Estados Unidos da América (E.U.A.), variantes do vírus IBD a partir de lotes vacinados com cepa clássica padrão (LEFFER, 2004). Em meados dos anos 80, foram observados problemas imunodepressivos na área avícola do estado no Sul dos E.U.A em Delaware. Saif *et al.* (1986) isolaram uma variante antigênica do vírus da IBD que era a causa aparente desses problemas no campo. Essas variantes antigênicas estavam vencendo a barreira de anticorpos maternos antes que as

vacinas intermediárias fossem administradas. Esses autores demonstraram que essas variantes tinham apenas de 10 a 20% de relação com as estirpes padrões do vírus da IBD.

Durante os primeiros anos da identificação do agente da IBD, vários trabalhos foram relatados sobre a caracterização bioquímica do vírus, demonstrando a sua resistência às condições extremas de pH e de temperatura e aos vários tipos de tratamentos químicos (LUKERT & DAVIS, 1974; DOBOS, *et al.*, 1979; KIBENGE, *et al.*, 1988). Estes achados explicam o papel importante da ração e fômites na transmissão da doença. Devido às características de sua natureza, somente em 1976 foi possível descrever melhor o vírus (NICK *et al.*, 1976). Assim, através dos conhecimentos físicos, químicos e morfológicos foi possível classificá-lo em uma nova categoria taxonômica pertencente à família *Birnaviridae* (DOBOS *et al.*, 1979). Antes do reconhecimento das características dessa família, o vírus foi classificado na família *Reoviridae* (LUKERT & DAVIS, 1974; HARKNESS *et al.*, 1975) ou *Picornaviridae* (LUNGER & MADDUX, 1972).

McFerran *et al.* (1980) foram os primeiros a relatar variação antigênica entre isolados do vírus da IBD de origem européia, ao apresentarem evidências da presença de dois sorotipos: 1 e 2. Estes resultados também foram encontrados nos Estados Unidos e os vírus foram designados sorotipo 1 e 2 (JACKWOOD *et al.*, 1982). Estudos posteriores indicaram forte relação entre os isolados da Europa e da América do Norte e então, foi proposta para todas as amostras a designação de sorotipo 1 e 2 (MCNULTY *et al.*, 1979). Os dois sorotipos são diferenciados nos testes de vírus-neutralização (VN), contudo não são distinguíveis por imunofluorescência ou ELISA (JACKWOOD & SAIF, 1987).

Em 1987 foram descritas estirpes altamente virulentas na Inglaterra, Holanda, Bélgica, Alemanha Ocidental, Norte da França, África do Sul e Israel. Essas estirpes podem causar elevada mortalidade e têm sido conhecidas como vírus muito virulentos da IBD (vvIBDV). Estes vírus são altamente patogênicos e, atualmente, estão disseminados em todo o mundo (CHETTLE *et al.*, 1989; LUKERT, 1993).

No Brasil, até meados da década de 90, a doença era predominantemente subclínica e as vacinas comerciais conferiam proteção satisfatória (LEFFER, 2004). Desde 1997, surtos da doença provocados por uma estirpe muito virulenta de alta patogenicidade similares às estirpes virulentas européias, vêm aparecendo em todos os estados produtores de frangos de corte e em algumas regiões de criação intensiva de poedeiras comerciais (SIMON & ISHIZUKA, 2000).

Para o desenvolvimento de vacinas, muitos esforços foram feitos por vários pesquisadores entre eles Moulthrop (1970), Edgar e Cho (1976) e Winterfiel (1978) em

trabalhos independentes para a produção de vacinas comerciais, que são utilizadas até hoje na avicultura (SIMONI, 2001). A seleção de uma vacina descrita como suave (“mild field”) foi um progresso na avicultura. Esta era propagada em embrião de galinha e deu origem às estirpes “Moulthrop”. Uma amostra derivada da amostra “Edgar” foi adaptada em diversos cultivos primários, primeiro em co-cultivo de células renais e da bursa, e finalmente foi relatada a primeira propagação do vírus em uma linhagem celular contínua após várias passagens em células VERO (LUKERT & DAVIS, 1974, KIBENGE *et al.*, 1988). Depois Lukert *et al.* (1975) adaptaram a mesma amostra em fibroblastos de embrião de galinhas (FEG). Esta vacina foi pouco utilizada e foi chamada de amostra “Lukert” e foram com seus derivados que se produziram as vacinas atuais.

A imunidade contra o vírus da IBD é mediada principalmente por anticorpos e pela imunidade passiva transferida aos pintos pelos anticorpos através do saco vitelino (LUKERT & SAIF, 1991). As aves reprodutoras são geralmente vacinadas com vacinas vivas e inativadas para garantir altos níveis de anticorpos passivos à progênie, de forma que a imunização ativa só seria necessária depois de quatro semanas de idade. Entretanto, a partir de 1986, começaram a ocorrer muitas perdas em frangos de corte e depois em aves de postura devido à presença de amostras muito virulentas, inicialmente reportadas na Bélgica e mais tarde por toda a Europa (VAN DEN BERG *et al.*, 1991). Com isso, passaram a vacinar os frangos de corte com duas semanas de idade, utilizando-se de vacinas vivas que tinham uma patogenicidade residual intermediária (MAZARIEGOS *et al.*, 1990).

2.2. A IBD

A Doença Infecciosa Bursal (IBD) é uma enfermidade altamente contagiosa que, dependendo de vários fatores, pode provocar imunodepressão nas aves, e favorecer o aparecimento de infecções secundárias responsáveis por inúmeros prejuízos à indústria avícola (ALLAN *et al.*, 1972; GIAMBRONE, 2000; PAULILLO *et al.*, 2004b; PEREIRA, 2004).

A IBD afeta galinhas e perus, sendo a infecção mais grave nas linhagens destinadas à produção de ovos do que àquelas destinadas à produção de carne. A doença constitui um dos mais sérios problemas avícolas em todo o mundo (SANTOS *et al.*, 2005).

O vírus da IBD é um membro da família *Birnaviridae*, do gênero *Avibirnavirus*. O genoma viral é constituído por dois segmentos de “RNA” de cadeia dupla. A estrutura do vírus é constituída de 5 proteínas: VP1, VP2, VP3, VP4, VP5 (MONTASSIER, 2001;

PAULILLO *et al.*, 2004a). As proteínas principais são as VP2 e VP3, representando respectivamente 51% e 40% do peso total, e as minoritárias são a VP1 e VP4 representando respectivamente 3% e 6% (SIMON & ISHIZUKA, 2000). Dobos (1979) designou de VPX a proteína viral precursora da VP2, com peso molecular de 47kDa, VP2 é produto da clivagem de VPX e respondem aos mesmos anticorpos monoclonais. O menor segmento de RNA genômico, denominado B, codifica VP1, enquanto que o maior segmento, denominado de A, codifica VP2, VP3, VP4 e VP5. VP2 e VP3 são proteínas principais do capsídeo viral e contém os principais epítomos neutralizantes desse vírus (tabela 1), sendo que VP2 expressa os epítomos sorotipo específico, enquanto VP3 apresenta epítomos grupo específico. As estirpes ou isolados de cada sorotipo são resultantes de mutação genética na região codificadora de VP2 que pode resultar em trocas de aminoácidos na região de VP2, responsável pela resposta imune protetora contra a IBD (MONTASSIER, 2001). Modificações genéticas e da regulação protéica e/ou as seqüências, podem ser determinantes da viabilidade do IBDV, enquanto outras são específicas para algumas estirpes e tipos, incluindo sorotipos e patotipos, além disso influencia no ciclo viral, em na especificidade para o hospedeiro e na virulência da cepa (VAN DEN BERG & ETERRADOSSI, 2001).

Proteína	Função e características
VP1	Proteína com atividade de polimerase, responsável pela replicação e transcrição do vírus.
VP2	Antigênicidade do vírus, resposta protetora do hospedeiro, diferença antigênica das estirpes, e virulência. Principal proteína estrutural do vírus possui os principais epítomos indutores de anticorpos neutralizantes.
VP3	Estrutura do vírus, antígeno grupo específico.
VP4	É uma protease viral.
VP5	Proteína responsável da liberação do vírus da célula infectada e induz apoptose.
VPX	Proteína precursora de VP2

Tabela 1. Principais proteínas virais sua função e características.

Existem dois sorotipos virais (1 e 2), sendo que somente o sorotipo 1 é patogênico para galinhas susceptíveis (MCFERRAN *et al.*, 1980; JACKWOOD *et al.*, 1982). Um grande número de variantes antigênicas do sorotipo 1 foi identificado e estas, via de regra, produzem um estado de imunodepressão mais precoce nos pintinhos e infecção subclínica, predispondo as aves afetadas a um conjunto significativo de infecções secundárias, deficientes respostas imunes às vacinações e, conseqüentemente, um mau desempenho produtivo (SAIF, 1984; PAULILLO *et al.*, 2004a; PEREIRA, 2004; ALVES, 2005).

Os vírus da IBD, pertencentes ao sorotipo 1, são divididos em seis subtipos antigênicos por meio de ensaios de soroneutralização (JACKWOOD & SAIF, 1987). Essa variação antigênica encontrada pode causar falha nos programas de vacinação, principalmente quando a estrutura antigênica da cepa de campo é muito distinta da cepa vacinal (VAN DEN BERG, 2000). Em concordância com essa afirmação, Lunge *et al.* (1997), relataram a existência de novos genótipos do vírus da IBD no Brasil, portanto distintos das estirpes vacinais. Na opinião desses autores, esse fato pode ser uma das explicações para a eventual ineficiência dos programas de vacinação. Eles salientam que este fato já foi descrito com o isolamento de amostras variantes nos E.U.A. e isolados patogênicos no Japão.

O vírus da IBD é replicado inicialmente pelos linfócitos e macrófagos do tecido linfóide associado ao intestino (KIBENGE *et al.*, 1988; VAN DEN BERG, 2000) e atinge a bursa, via corrente sanguínea, onde ocorre sua replicação. Após isso, atinge os órgãos linfóides pelos linfócitos T. A infecção pelo vírus da IBD tem efeitos dramáticos sobre a população dos linfócitos B e a gravidade desta lesão é inversamente proporcional à idade. A depleção linfóide no início da vida, durante a maturação do sistema imune, gera supressão de competências do sistema imune humoral (MARTINS *et al.*, 2005). Os monócitos e macrófagos podem ser infectados de forma persistente, tendo um papel crucial na disseminação do vírus e no aparecimento dos sinais da doença (MÜLLER *et al.*, 2003; KHATRI & SHARMA, 2006).

A disseminação do vírus para o ambiente dá-se pelas fezes de aves contaminadas, além de água, ar, ração, equipamentos e insetos. A transmissão é horizontal e a contaminação ocorre pelas vias aéreas, digestiva e ocular. O vírus da IBD é bastante resistente às condições do meio ambiente, podendo resistir por algumas horas à temperatura de 56°C e, também, a substâncias químicas, como derivados do fenol e compostos de amônia quaternária. O vírus permanece infectante por longos períodos nas

instalações avícolas, mesmo após a desinfecção (GARDIN, 2000; MONTASSIER, 2001; TREVISOLI, 2001).

Os sinais clínicos da doença e as lesões variam em intensidade, de acordo com a patogenicidade da amostra do vírus e com o grau de susceptibilidade do plantel, mas a IBD pode ser classificada de duas formas:

- Forma subclínica: é a forma mais freqüente e mais importante. Há, baixa mortalidade e severa depleção linfóide bursal. Devido à lesão no sistema imunológico provocada por este vírus, a resistência dos plantéis afetados a outros patógenos e também a resposta à vacinação são prejudicadas (IKUTA, 2001; PAULILLO, 2004a; PEREIRA, 2004). Nesta forma, as manifestações clínicas consistem em redução no consumo de alimentos, retardo no crescimento, sonolência discreta e palidez (RUOCCO, 2001).

- Forma aguda: ocorre em aves entre 3 a 6 semanas de idade, quando as aves são expostas ao vírus altamente virulento. O período de incubação é muito curto e os sinais clínicos são percebidos entre 2 e 3 dias após a exposição ao vírus. Dentre estes sinais, são encontrados: penas eriçadas, prostração/letargia, tremores, anorexia, desidratação, diarreia com fezes esbranquiçadas, cloaca suja e morte súbita. A mortalidade varia por um período de 3 a 7 dias e se encontra entre 20 e 60% (SHARMA *et al.*, 2000; RUOCCO, 2001).

As lesões de necropsia caracterizam-se por hemorragias no tecido subcutâneo, na musculatura do peito e coxa e na porção glandular do proventrículo; os músculos podem se apresentar escurecidos (sinal de desidratação); a bolsa de Fabrício mostra-se edemaciada, recoberta por um transudado gelatinoso e com as pregas espessadas; os rins estão pálidos e os ureteres se encontram dilatados e com presença de uratos; os intestinos mostram-se com a mucosa espessa e com excesso de muco; o baço está aumentado de volume; e o timo com tamanho reduzido (BERG *et al.*, 1991; GIAMBRONE, 2000; ITO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2005).

O controle da IBD é realizado por meio de medidas de biossegurança (educação em saúde, desinfecção dos galpões, controle do trânsito de animais, pessoas e veículos) e programas de vacinação (SIMON & ISHIZUKA, 2000; TREVIZOLI, 2001; SILVA, 2001).

O diagnóstico da IBD envolve histórico e desempenho de lotes anteriores recentemente fechados e análise do aparecimento ou não de sinais clínicos e lesões nos lotes em andamento (DI FÁBIO, 2001). O diagnóstico preciso é feito por combinação das observações clínicas, histórico epidemiológico e testes sorológicos (SNYDER, 1988; SAIF, 1998). O isolamento viral é feito inoculando-se o material suspeito em ovos

embrionados via membrana cório-alantoide (MCA), com 10 a 11 dias de incubação, obtidos de galinhas livre de patógenos específicos (SPF) ou em cultivo celular (SAIF, 1998). Geralmente, os isolados patogênicos de campo não são facilmente adaptados em cultivo celular e o processo de adaptação requer várias passagens (SAIF, 1998; MARINHO *et al.*, 2003) ou em MCA ou em saco da gema de ovos embrionados (HITCHNER, 1970). Já a detecção de anticorpos para o vírus da IBD pode ser feita por vírus neutralização, ELISA e testes de precipitação em gel de ágar (SIMON & ISHIZUKA, 2000).

Stewart-Brown (1997) fazem referência aos diferentes métodos utilizados para a caracterização e comparação do vírus da IBD encontrado no campo. A maioria desses métodos inclui neutralização cruzada, análise molecular e anticorpos monoclonais, sendo úteis para o seguimento epidemiológico da enfermidade e para diferenciar vírus vacinal e de campo.

2.3. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos produzidos pelas células híbridas (hibridomas) são chamados monoclonais, ou seja, anticorpos produzidos por um único clone de linfócito B contra um único determinante antigênico da molécula de antígeno (ABBAS *et al.*, 2005).

Köhler e Milstein (1975) foram os primeiros a demonstrar que linfócitos normais secretores de anticorpos podem ser fundidos a células de mieloma para formar uma nova célula, o hibridoma. Esta célula híbrida original, ao crescer, forma uma população de células idênticas, chamadas clones, que produzem um único tipo de anticorpo, os anticorpos monoclonais.

O processo de produção dos anticorpos monoclonais inicia-se com a escolha dos animais a serem utilizados na imunização. Na prática, a maioria dos roedores (ratos, camundongos) podem ser usados no processo, porém os camundongos BALB/c têm sido os animais de eleição para receberem as imunizações, por seu tamanho, fácil manejo, por serem compatíveis com as células de mieloma e por produzirem altos títulos de anticorpos (NRC, 1999; LITTLE *et al.*, 2000; HENDRIKSEN, 2005).

Os protocolos de imunização estão baseados nos conhecimentos da resposta humoral *in vivo*. Sabe-se que, após a primeira imunização, ocorre uma fase de crescimento logarítmico dos níveis de anticorpos e depois um platô, antes de se iniciar o declínio dos níveis de anticorpos. Essa resposta permanece aproximadamente por três semanas, e os anticorpos produzidos são predominantemente da classe IgM. Após um segundo desafio

com o mesmo imunógeno, a resposta imune humoral é rápida, maior, mais duradoura que a primeira, e os anticorpos predominantes são da classe IgG. Geralmente, esses anticorpos apresentam uma maior afinidade, principalmente se a dosagem de imunógeno dado for baixa. A dosagem de imunógeno varia de 10-50 µg de proteína por dose, emulsionadas em adjuvante, sendo os intervalos de inoculação de duas a quatro semanas (SCHUNK & MACALLUM, 2005). Normalmente, o animal imunizado recebe a quarta e última dose por via endovenosa, três a quatro dias antes da remoção do baço.

O baço do animal imunizado é removido e fusionado com células de mieloma. Várias células de mieloma foram adaptadas, sendo originárias principalmente de camundongos, mas também de ratos, coelhos e humanos. Atualmente, células sensíveis ao meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) e não produtoras de imunoglobulinas estão disponíveis, como a P3x63Ag8.653, Sp2/0-Ag14, NS-1, NS-0 (SHULMAN *et al.*, 1978; LITTLE *et al.*, 2000).

Após a fusão das células do baço de camundongo imunizado com as células de mieloma da linhagem SP₂O, através do agente polietilenoglicol (PEG), várias combinações de células fusionadas são formadas, como células mieloma – células mieloma, células esplênicas – células esplênicas e células mieloma – células esplênicas, sendo esta última a necessária para a continuidade do trabalho. Para esse híbrido (célula esplênicas – células de mieloma) ter um crescimento ótimo em meio de cultura, os outros híbridos precisam ser eliminados (PONTECORVO, 1976; HARLOW & LANE, 1988).

As linhagens de células de plasmocitoma têm sido selecionadas por cultivo na presença de drogas cuja base seja análoga a 8-azaguanina e 6-tioguanina. As células mutantes sobreviventes possuem um gene defeituoso para codificar e deficientes 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 recuperação para a síntese de ácidos nucleicos (ABBAS *et al.*, 2005; LITTLE *et al.*, 2000). A enzima HGPRTase transfere o fosforibosil (ácido fosfórico e ribose) 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 normais têm um ciclo de vida limitado em meio de cultura, portanto, morrem naturalmente nessas condições. Por outro lado, às células de mieloma têm um crescimento ilimitado em meio de cultura, e para a sua eliminação utiliza-se um meio de cultura seletivo (HAT – hipoxantina, aminopterina e timidina) desenvolvido por

Littlefield em 1964, que é baseado 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 várias etapas, em que está envolvida a transferência de grupos metil e formil de tetrahydrofolato ativado. Drogas como a aminopterina, que é um antagonista de ácido fólico, têm como característica promover o bloqueio da reativação do tetrahydrofolato, deste modo, inibindo a síntese de purina e timidilato (MILSTEIN, 1980; ABBAS *et al.*, 2005). Esses componentes são necessários para o DNA, e a aminopterina bloqueia a síntese de DNA na via “de novo” (Figura 1).

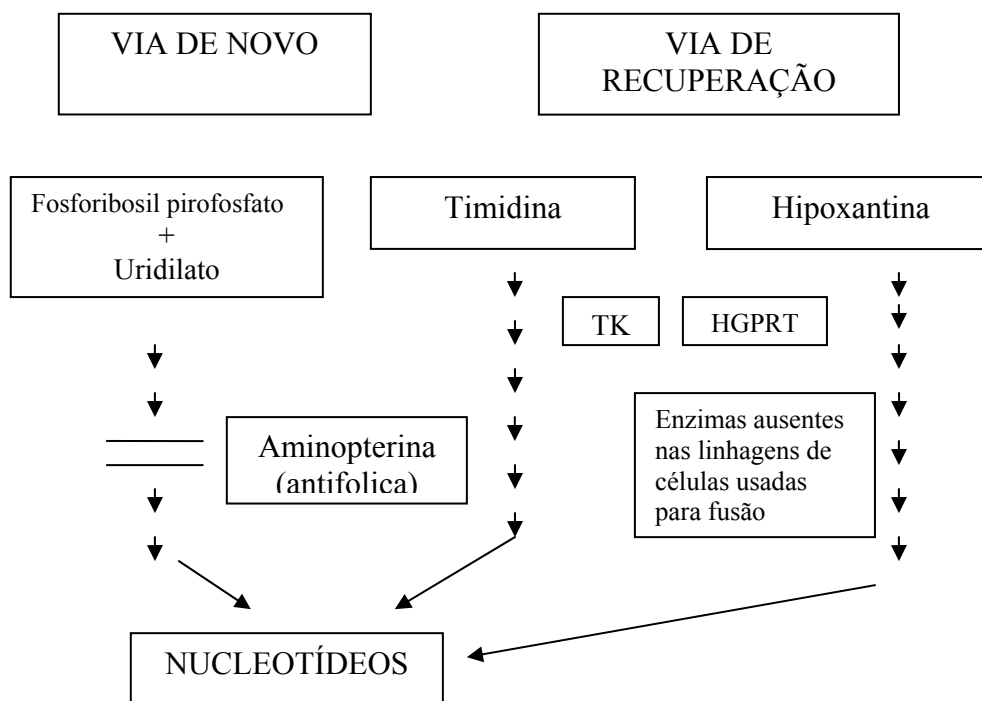


Figura 1. Via da síntese de purinas, via de *novo* e via de recuperação.

As células normais tratadas com 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 que selecionadas na presença de 8 azaguanina, ou seja, células deficientes em HGPRT'ase não podem usar a via 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. Esse é o princípio aplicado para a geração de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais (HARLOW & LANE, 1988; MORALES, 1993).

Após a fusão, células binucleadas podem ser formadas e cada híbrido possui um cromossomo de cada doador. Esses híbridos são colocados em meio seletivo (HAT) no qual as células produtoras de anticorpos são selecionadas através de testes diagnósticos e posteriormente clonadas e propagadas em meio de cultura ou mesmo em camundongos BALB/c, onde poderão crescer no líquido ascítico como um tumor sólido (MORALES, 1993; LEENAARS & HENDRIKSEN, 2005).

Os anticorpos monoclonais têm sido amplamente empregados na detecção e caracterização imunoquímica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos e como agentes carreadores de drogas terapêuticas, entre outros usos (LIPMAN *et al.*, 2005).

Dentro do campo de pesquisa da imunologia, o advento da tecnologia de hibridomas, permitiu o estudo das moléculas de superfície dos linfócitos. Com a ajuda desse tipo de reagente, foi possível caracterizar fenotipicamente as diferentes subpopulações de linfócitos T e as células acessórias do sistema imune, bem como detectar e quantificar os fatores biologicamente ativos (citocinas) (MICELI & PARNES, 1993). Técnicas baseadas em anticorpos monoclonais são amplamente utilizadas em medicina e biologia como, dosagens hormonais e na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas, veterinárias ou vegetais (LIPMAN *et al.*, 2005).

Uma forma empregada para produção de anticorpos monoclonais bastante utilizada em laboratórios de pesquisa, é através da produção de líquido ascítico em animais inoculados intraperitonealmente com os hibridomas, obtendo concentrações altas de anticorpos até 20mg por mL. Esse procedimento, a despeito de ser ainda bastante difundido, apresenta alguns inconvenientes de ordem operacional, além de causar desconforto e, a seguir, a morte do animal utilizado, sendo pelas últimas razões uma prática condenada em diversos países.

Hibridomas secretores de anticorpos de interesse podem ser cultivados em frascos apropriados de cultivo, de tamanhos variados, contendo os meios de cultura convencionais para células de mamífero, acrescidos de soro fetal bovino. Nesses meios, os hibridomas secretam os anticorpos monoclonais em quantidades que variam de 20 µg a 1,0 mg/mL de proteína de anticorpo (HARLOW & LANE, 1988).

O mais recente avanço na produção de anticorpos monoclonais para fins terapêuticos é através da engenharia genética, que utiliza o mecanismo biológico da planta para produção de fármacos recombinantes, ou seja, um gene é introduzido a um vegetal, fazendo com que este produza as proteínas de interesse necessárias para a formação de um determinado anticorpo. As vantagens deste meio de produção são facilidade para a produção industrial, disponibilidade e inocuidade do produto final (AVENDAÑO, 2006).

O uso potencial dos anticorpos monoclonais como reagentes biológicos, foi amplamente difundido e apreciado, levando a um rápido crescimento em diferentes áreas da ciência. Mas, sem dúvida, a sua utilização para detecção de produtos biológicos, através de ensaios imunoenzimáticos, resultou em enorme benefício para o avanço em diversas áreas do conhecimento (LIDDELL & CRYER, 1991; MORALES, 1993).

A etapa de seleção dos híbridos positivos é uma das mais importantes do processo, uma vez que é através dela que se pode observar a positividade e a especificidade dos híbridos, principalmente quando se usam antígenos brutos. E também uma das etapas mais problemáticas, por quanto o teste diagnóstico a ser utilizado para a seleção dos híbridos precisa ser sensível, devido à pequena quantidade de anticorpos presente no meio de cultura, e rápido de ser executado, razão baseada na grande velocidade de crescimento dos hibridomas. As células de mieloma crescem muito rapidamente e em pequeno espaço (placas de 96 orifícios), se o teste demorar mais de 24 horas para ser realizado, corre-se o risco de populações de células específicas morrerem (LIDDELL & CRYER, 1991).

Muitos testes diagnósticos (ELISA, dot-ELISA, imunofluorescência) podem ser usados na seleção dos híbridos, porém o tipo do teste a ser utilizado depende das características do antígeno usado, como, por exemplo, antígenos desnaturados (western blotting) que não revelam anticorpos específicos, isto porque muitos anticorpos reagem com estruturas conformacionais (LIDDELL & CRYER, 1991).

A etapa de clonagem tem por finalidade produzir um clone de células idênticas secretoras de anticorpos específicos, para que a linhagem de célula monoclonal possa ser estabelecida. O método de clonagem mais simples e mais popular é o método de diluição sucessiva. Este método baseia-se em diluições seriadas realizadas nas placas, de modo que o último orifício fique com apenas uma célula. Após a clonagem e a identificação das células secretoras de anticorpos monoclonais, algumas amostras são estocadas em nitrogênio líquido, enquanto outras são propagadas em meio de cultura ou *in vivo* para a obtenção de quantidades ilimitadas de anticorpos monoclonais (HARLOW & LANE, 1988; MORALES, 1993).

É importante salientar que as células propagadas em meio de cultura devem ser monitoradas regularmente com a finalidade de se observar a fidelidade de produção de anticorpos específicos ao antígeno predefinido. Segundo Liddell e Cryer (1991), algumas culturas continuam a produzir anticorpos específicos por meses após a clonagem, porém outras perdem a estabilidade em períodos muito curtos, cerca de semanas. Essa instabilidade varia de um clone para outro e não há uma explicação para tal fato.

A célula híbrida formada retém a propriedade de secretar o mesmo anticorpo que o linfócito B normal e retém a propriedade da célula de mieloma de multiplicar-se em cultura indefinidamente. Com as linhagens dos hibridomas resultantes das fusões clonadas e imortais, assegura-se a disponibilidade permanente de 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 & LANE, 1988; LIDDELL & CRYER, 1991; MORALES, 1993).

Os anticorpos monoclonais representam uma valiosa 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; CARDOZO, 1998).

Os anticorpos monoclonais, que reconhecem determinantes antigênicos únicos, podem ser selecionados para uma especificidade desejada, produzidos em grandes quantidades com boa qualidade e podem ser usados no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos, mais rápidos e fáceis (LEENAARS & HENDRIKSEN, 2005).

No cultivo de hibridoma, tanto a glicose quanto a glutamina atuam como substratos limitantes do crescimento, sendo o ácido láctico e o amônio os subprodutos do metabolismo que inibem o crescimento celular. O ácido láctico e o amônio são produzidos a partir da glicose e glutamina, respectivamente (LEE *et al.*, 2002).

Snyder *et al.* (1988) produziram e caracterizaram um painel de anticorpos monoclonais (AcM), contra o IBDV. Dois dos AcM, nomeados R63 e B69, mostraram-se capazes de neutralizar altos títulos do IBDV no teste de vírus-neutralização, o AcM R63 neutralizou seis estirpes do sorotipo 1 e uma cepa do sorotipo 2 indicando a existência de antígenos conservados em VP2.

Fahey *et al.* (1991), produziram seis AcM neutralizantes contra o IBDV, os quais reconheceram dois epítomos independentes topologicamente. Dois desses anticorpos neutralizaram uma cepa variante que não tinha sido neutralizada por outros AcM, o que sugere a existência de dois epítomos neutralizantes distintos.

Anticorpos monoclonais contra o IBDV podem definir os sítios antigênicos do virion. Epítomos encontrados em todos os subtipos e aqueles específicos para um dado subtipo têm sido reportados (SNYDER, 1990). Têm sido desenvolvido AcM específicos contra o vírus clássico, variante e para um novo grupo variante, GLS (SNYDER, 1988). Foram isolados seis novos subtipos do variante, tendo ao menos um epítomo neutralizante diferente dos outros subtipos e o GLS tem um epítomo não encontrado em outros vírus clássico e variante (SNYDER, 1990).

De modo geral, os estudos presentes na literatura, que envolvem o emprego de anticorpos monoclonais no diagnóstico e monitoramento da IBD e outras infecções, indicam serem estes, instrumentos específicos de identificação de antígenos, demonstrando o seu alto potencial, como reagentes biológicos no estudo das relações parasita-hospedeiro.

Pesquisas adicionais, que venham ampliar, ainda mais, o entendimento desses mecanismos imunológicos, serão, sem dúvida, importantes para o avanço científico nessa área de conhecimento.

2.4. ELISA

É uma técnica imunoenzimática descrita pela primeira vez por Engvall e Perlman, (1972). Desde então, é amplamente utilizada em rotinas de laboratórios de diagnóstico (LIMA, 1998; ROCHA, 2000). O teste de ELISA baseia-se na reação antígeno-anticorpo, sendo utilizados como suporte placas de poliestireno. Essa reação é detectada através da adição de imunoglobulina anti-espécie conjugada com enzima e, posteriormente o substrato respectivo a esta enzima. A quantidade de anticorpo ligada ao antígeno pode ser mensurada através do grau de degradação do substrato observado através de espectrofotômetro.

O princípio básico da técnica consiste na reação de soros-testes com o antígeno, que está aderido à superfície dos poços de microplacas previamente sensibilizados. O anticorpo ligado é demonstrado pela adição de anti-imunoglobulina, marcada com enzima, seguida por ensaio da reação da enzima (conjugado) com seu substrato, resultando em formação de cor (MORALES, 1993; LIMA, 1998). O produto cromogênico formado pode ser visualizado ou mensurado através de um fotolorímetro, provido de filtro de luz adequado, ou espectrofotômetro (OLIVEIRA, 2004).

O ELISA detecta basicamente todos os tipos de anticorpos, IgG, IgM, IgA, anticorpos neutralizantes e não neutralizantes (DI FABIO, 2001). O teste imunoenzimático é o teste sorológico comumente usado para a detecção de anticorpos

contra o vírus da IBD em lotes de aves. O teste de ELISA tem a vantagem de ser um teste rápido com os resultados facilmente analisados por programas de computador. Com estes programas se pode estabelecer um perfil de anticorpos de lotes reprodutores, que vai indicar os níveis de imunidade e dar a informação para o desenvolvimento de programas de imunização apropriados tanto para os reprodutores como para sua progênie (LUKERT, 1993; SANTOS & SILVA, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O estudo foi conduzido na Unidade de Estudos em Sanidade Avícola (UESA), Laboratório de Virologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária (DVT) e Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2. Vírus

Foi utilizada uma amostra atenuada do vírus da IBD cepa intermediária (Bur-706), proveniente de uma vacina comercial, apresentada na forma liofilizada para 1000 doses, diluída em 30 mL de solução salina estéril.

3.3. Multiplicação do vírus

Foi utilizado cultivo de células VERO (rim de macaco verde africano), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do BIOAGRO (UFV), de linhagem contínua, seguindo as técnicas descritas por Tham e Moon (1996) e Barros (2001).

Para o crescimento dos cultivos das VERO foi empregado o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Auto-mod[®], EUA), suplementado com glutamina, 10% de soro fetal bovino (CULTILAB), antibiótico (sulfato de gentamicina, CULTILAB) e antimicótico (anfotericina B, CULTILAB) pH 7,2.

Para o cultivo, foram utilizadas garrafas de poliestireno, com 75 cm² (Corning[®], EUA) de superfície, semeadas com um volume de 5 mL de suspensão celular, com aproximadamente 200.000 células/mL.

A infecção das células foi realizada utilizando-se uma estirpe vacinal do IBDV. O volume de 0,2 mL desta solução foi inoculado em garrafas de cultivo celular, contendo monocamada de células, com 70 a 80% de confluência (após 24 horas de incubação aproximadamente). Após a inoculação, as garrafas foram incubadas por 1 hora, a 37°C e levemente movimentadas a cada 15 minutos, para maior adsorção do vírus. Decorrido o tempo, o volume foi completado para 3 mL, com meio de manutenção (DMEM com 5% de soro fetal bovino, antibiótico e antimicótico). As garrafas foram colocadas sob incubação a 37°C e diariamente foram monitoradas (visualização em microscópio invertido, Olympus IMT2, Japão) para verificação de 70 a 80% de efeito citopático (ECP). Este efeito geralmente se dá entre 72 e 96 horas após a inoculação. O ECP causado pelo vírus consistiu em arredondamento e deslocamento celulares e acentuada granulação no citoplasma celular, em particular em volta do núcleo, com eventual destruição da monocamada (BARROS, 2001). Foi utilizada ainda uma garrafa controle não infectada, que continha somente o meio de manutenção. Após a completa destruição da monocamada celular (aproximadamente 24 horas) o conteúdo da garrafa de cultivo foi transferido para um tubo com rosca (Corning®, EUA), centrifugado (centrifuga, Jouan BR4, Francia) a 200g por 10 minutos para a sedimentação dos debris celulares e os sobrenadante foi conservado a -20°C.

3.4. Mensuração da patogenicidade viral em cultivo celular.

Para o estudo de comparação da patogenicidade viral em cultivo celular foi utilizada placa de 96 poços. Em todos os poços a serem testados, foram adicionados 50 µL do inóculo viral teste e a partir daí foram feitas diluições seriadas de cada uma das amostras virais, começando na diluição 1:2 e terminando com a diluição 1:2048. Em seguida foram adicionados 50 µL de suspensão de células.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Nuair Auto Flow Incubators, EUA), e o acompanhamento do desenvolvimento do efeito citopático foi realizado diariamente com o auxílio de um microscópio óptico invertido (Olympus IMT2, Japão).

3.5. Purificação do vírus

A purificação do antígeno foi realizada por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, de acordo com a técnica descrita por Collins e Gough (1988), Lima (1998) e Barros (2001).

A suspensão de células infectadas foi submetida a três etapas de congelamento e descongelamento, sendo depois centrifugada a 2.000g (centrifuga JOVAN) por 15 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 30.000g (ultracentrifuga, BECKMAN OPTIMA TM, Estados Unidos), durante uma hora, a 4°C. O sobrenadante resultante desta segunda centrifugação foi descartado e o sedimento ressuspendido em 2mL do tampão Tris – HCl (0,1 M; pH 7,4), que corresponde a 2% do volume inicial (100mL) da amostra. O sedimento ressuspendido foi colocado em tubos de ultracentrífuga, previamente preparados com 10 mL de um gradiente descontínuo de sacarose, compreendendo sacarose a 30% (8 mL) e sacarose a 55% (2 mL), e centrifugado a 53000 g, por 90 minutos, a 4°C. Decorrido o tempo, a fração translúcida que dividia as duas concentrações de sacarose foi coletada, colocada em tubos de centrifuga e ressuspendida em tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4). A suspensão foi novamente centrifugada, a 16000 g, por 60 minutos, a 4°C. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, correspondente ao concentrado viral, aliquotado em criotubos, após ressuspensão em 1 mL de tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4), sendo armazenados em nitrogênio líquido até o momento do uso.

3.6. Dosagem de proteína

Após a purificação do vírus, foi realizada a dosagem de proteínas, pelo método do ácido bicinonínico (SMITH *et al.*, 1985). Para esta dosagem foi empregado como padrão soro albumina bovina (SAB, Sigma, EUA) a 0,5% e utilizados os reagentes A e B (ver apêndice), combinados em uma solução de trabalho (1960 µL de reagente A; 40 µL de reagente B), preparada no momento do uso.

Em tubos de vidro de 15 mL foram adicionados 2 mL de solução de trabalho mais 100 µL das soluções a serem dosadas. Primeiramente, foi realizada a construção da curva-padrão para o teste, utilizando-se 100 µL de SAB em cada tubo, nas seguintes concentrações: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/mL. Utilizou-se um tubo como “branco”, contendo 2 mL de solução de trabalho mais 100 µL de água MilliQ. Os tubos foram agitados, vedados com parafilme e incubados a 60°C por 30 minutos. Decorrido o tempo, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 562nm (Smartspectm 3000, Bio-Rad, EUA). Depois da construção da curva foi realizada a dosagem da amostra (vírus purificado), procedendo-se da mesma forma que para determinação da curva-padrão.

3.7. Animais Experimentais

Foram utilizados 10 camundongos BALB/c, com cerca de 7 semanas de idade, sendo 8 fêmeas e 2 machos. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Machos e fêmeas foram mantidos em gaiolas separadas, forradas com maravalha, trocada 3 vezes por semana, após higienização das gaiolas. Além disso, foi fornecida água filtrada, trocada todos os dias após lavagem dos bebedouros, e ração comercial peletizada, padronizada para animais de laboratório, ambos *ad libitum*. As condições de temperatura, umidade, ventilação, luz e ruídos foram controlados, evitando estresse dos camundongos.

3.8. Sangria dos camundongos

Realizou-se a coleta através do plexo orbital, previamente anestesiados em câmara de éter, permanecendo na mesma por aproximadamente um minuto. Decorrido o tempo, eram imobilizados conforme descrito anteriormente. Com auxílio de um tubo capilar de ponta fina (a ponta era preparada colocando-se o tubo no fogo e puxando-se, formando uma ponta mais fina), que possibilitava a perfuração do plexo orbital, o tubo era preenchido com sangue, por capilaridade. O soro foi obtido centrifugando-se os capilares em centrífuga para microhematócrito e armazenado para testes de ELISA para o IBDV.

3.9. Imunização dos camundongos

Os animais receberam, por via intraperitoneal, cerca de quatro doses de um inóculo preparado com o IBDV purificado, com intervalo de 21 dias entre cada aplicação. O antígeno foi emulsionado em adjuvante saponina. Usando de 40 µg de vírus purificado + 50 µg de saponina (diluída em água MilliQ). O volume do inóculo foi completado para 0,2 mL, com tampão fosfato (PBS pH 7,6).

A última imunização foi realizada quatro dias antes da coleta dos baços, sem adjuvante, utilizando-se as vias venosa e intraperitoneal.

3.10. ELISA para avaliação do soro dos camundongos

Para avaliação dos níveis de anticorpos contra o IBDV no soro dos camundongos foram realizados testes ELISA indireto, seguindo as técnicas descritas por Santos (1995), Lima (1998) e Barros (2001). Além disso, os testes de ELISA foram previamente

padronizados, pela diluição do antígeno e titulação dos soros obtidos, resultando-se nas concentrações e diluições ótimas, para a experimentação futura.

Microplacas de polivinil contendo 96 poços (Hemobag, Brasil), com capacidade para 200 µL cada, foram sensibilizadas com 1 µg de antígeno purificado, diluído em 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6). A placa foi incubada a 4°C, por uma noite. Após o período de adsorção, a placa foi lavada três vezes, utilizando-se tampão de lavagem (pH 7,2). Em seguida foram adicionados, em cada pocinho, 100 µL de caseína hidrolisada a 2% em tampão fosfato (PBS, pH 7,6), para bloquear os sítios não utilizados pelo antígeno. A placa foi, então, incubada por 1 hora em temperatura ambiente e, decorrido o tempo, submetida a duas lavagens, com tampão de lavagem (pH 7,2). Após a lavagem, cada orifício da microplaca recebeu 100 µL de soros negativos e positivos, diluídos em tampão de incubação. A placa foi incubada por 2 horas e posteriormente lavada com tampão de lavagem (pH 7,2). Foram adicionados 100 µL do conjugado (IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, Sigma®, EUA) diluído em tampão de incubação (1:30000) nos orifícios da microplaca. A placa foi incubada por mais 2 horas e, em seguida, lavada. Após a lavagem, foram adicionados, em cada orifício, 100 µL de substrato (o-phenylenediamine - OPD Sigma®, EUA). A placa foi então incubada por 40 minutos em câmara escura, à temperatura ambiente. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de ácido sulfúrico 2N (1:20). Foram feitas quatro lavagens por ciclo.

Para a leitura das reações foi utilizado leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus, EUA) com filtro de comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO).

3.11. Produção de Plasmocitomas

Na produção dos plasmocitomas foram utilizadas células de mieloma da série plasmocitária não secretoras de imunoglobulinas (SP₂/O) (SHULMAN *et al.*, 1978), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do BIOAGRO da UFV, seguindo-se a metodologia descrita por Rocha (2000). 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 garrafa de 75 cm² contendo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Brasil), e incubadas em estufa de CO₂ (Nuair Auto Flow Incubators, EUA) por uma hora, após este tempo as células foram transferidas para tubos de centrifuga e seu volume foi

completado com meio RPMI sem SFB. O tubo foi centrifugado a 350 g por 5 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante do tubo foi desprezado e o pellet desprendido, acrescentando-se 1 mL de meio RPMI-10% de SFB. As células foram colocadas em garrafa de cultivo celular e mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e repicadas a cada 48 – 72 horas até se obter número suficiente de células para a realização do processo de fusão, que é 250.000 células/mL, em aproximadamente, duas semanas. A troca total do meio se fazia por centrifugação a 400 g por 5 minutos.

3.12. Preparo de macrófagos peritoneais

Células normais da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram assepticamente obtidas para o preparo do *feeder-layer* de macrófagos. Para a coleta das células peritoneais, os camundongos foram anestesiados com éter etílico e foram sacrificados por estiramento cervical e posteriormente mergulhados em uma solução de álcool a 70% (v:v) durante 3 minutos, para desinfecção. Os animais foram fixados em prancha de isopor, dentro de capela de fluxo, previamente descontaminada, e a pele do abdômen foi rebatida, com auxílio de pinça e tesoura estéreis. Depois de rebatida a pele, foi injetado, na cavidade peritoneal, 5 mL de dextrose 10% RPMI 1640 gelada. O abdômen do animal foi massageado com a ponta dos dedos por aproximadamente 4 minutos e, após esse tempo, o meio injetado foi coletado e transferido imediatamente para tubos de centrifuga, mantidos em gelo. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 400 g, por 5 minutos, a 4°C, desprezando-se o sobrenadante ao final do processo. O pellet formado, correspondente aos macrófagos, foi ressuscitado em RPMI 1640 (Sigma, EUA), 10% SFB (Cultilab, Brasil) e distribuído em placa de 96 orifícios. As placas foram incubadas em estufa, a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

3.13. Contagem celular

Para os procedimentos de fusão, clonagem, congelamento dos mielomas e hibridomas foi preciso fazer a contagem das células viáveis utilizando-se de Câmara de Neubauer. Centrifugou-se a suspensão celular a 400 g, por aproximadamente 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 1 mL de meio RPMI incompleto (meio RPMI-1640 sem SFB), e foram coletados 100 µL de suspensão celular e misturou-se com 100 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:

Média das células contadas (X) = número de células/ número de quadrados.

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

3.14. Coleta de linfócitos para fusão

Os camundongos foram anestesiados em câmara de éter, por aproximadamente 3 minutos. Decorrido o tempo foram sacrificados por distensão cervical e colocados em frasco contendo álcool 70%, por 3 minutos, para desinfecção dos mesmos. Os animais foram fixados em prancha de isopor, dentro de capela de fluxo previamente descontaminada, e a pele do abdômen foi rebatida, com auxílio de pinça e tesoura estéreis. O baço foi coletado e colocado em placa de petri estéril, com 4 mL de meio RPMI-1640 incompleto. Em seguida se macerou com auxílio de um êmbolo de seringa e uma malha de metal. O baço foi comprimido contra essa malha, obtendo-se, então, a massa de linfócitos, que foram suspensos em 5 mL de meio RPMI-1640 incompleto e passados novamente pela malha de metal, agora acoplada a um tubo de centrífuga. O volume do tubo foi completado com meio RPMI-1640 incompleto e o tubo foi centrifugado a 400 g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet, resultante da centrifugação, foi ressuspensionado em solução de lise de hemácias. Os linfócitos foram novamente centrifugados a 400 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 incompleto e novamente centrifugado a 400 g por 5 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 11 mL de RPMI-1640 incompleto, 10% de SFB e HAT (hipoxantina aminopteridina tiamidina, Sigma, EUA). Não foi necessário contar os linfócitos do baço, pois estima-se haver 10^8 linfócitos por baço de camundongo (SHULMAN *et al.*, 1978).

3.15. Fusão

As células de mieloma foram coletadas das garrafas de cultivo e centrifugadas a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 10mL meio RPMI incompleto. Procederam-se duas centrifugações, a 400 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante entre os dois processos. O pellet resultante foi ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI incompleto. Retirou-se uma alíquota de 100 μ L, para contagem das células, que foi misturada a 100 μ L de azul de trypan (Sigma, EUA). As células foram contadas em Câmara de Neubauer.

A mistura de células (linfócitos + mielomas) em uma proporção de 10^8 células de baço para 10^7 células de mieloma, foi colocada em tubo de centrifuga de 50 mL, sendo seu volume completado com meio RPMI-1640 incompleto e o tubo centrifugado a 400 g por 10 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi descartado e o excesso de meio retirado com auxílio de pipeta Pasteur. O pellet foi desprendido e o tubo colocado em um Becker com água a 37° C. Com uma pipeta foi adicionado à mistura 1mL de polietilenoglicol (PEG, Sigma, EUA) 50%, pré-aquecido, no intervalo de 1 minuto e fazendo-se movimentos circulares, para que ocorresse a mistura. O PEG foi diluído adicionando-se 1 mL de meio RPMI incompleto aquecido a 37°C, gota a gota, agitando-se lentamente o frasco, no tempo de 1 minuto. Acrescentou-se ainda mais 15 mL de meio RPMI-1640 incompleto, agitando-se o tubo por 5 minutos. Os híbridos recém formados foram centrifugados a 400 g e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI-1640 completo (meio com SFB, com sulfato de gentamicina, com anfotericina com glutamina e com HAT) com 10% SFB e HAT. Em seguida, foram acrescentados mais 50 mL de meio e distribuídos os híbridos em placas de 96 orifícios (100 µL por pocinho). As placas foram incubadas em estufa, a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após e cada 48 horas foram realimentados os clones com RPMI-1640 complementado com HAT e após 10 dias 50% do volume dos orifícios foi substituído por meio RPMI-1640 complementado com HT (Figura 2).

3.16. Coleta do sobrenadante

As placas foram deixadas na estufa de cultivo por pelo menos 15 dias, para que só então fosse coletado o sobrenadante. Foi retirada o 50% do sobrenadante dos orifícios com cuidado de não pegar os hibridomas e foi armazenado a -20°C até a realização dos testes ELISA para detecção dos anticorpos contra o vírus da IBD.

3.17. ELISA para avaliação do sobrenadante

O teste ELISA realizado para avaliação do sobrenadantes é o mesmo para avaliação dos camundongos (3.9) e este já foi descrito anteriormente.

3.18. Clonagem dos hibridomas positivos

Os híbridos positivos foram selecionados para a clonagem. As células dos orifícios a serem clonadas foram retiradas com auxílio de pipeta de Pasteur, ressuspensionadas em RPMI-1640 e contadas em Câmara de Neubauer.

Após a contagem, fez-se diluição limitante, de modo que durante a distribuição nas placas de cultura de 96 orifícios se colocasse apenas uma célula por orifício. O crescimento foi acompanhado diariamente, a partir do quinto dia, com troca de meio a cada três dias.

Os orifícios que apresentavam bom crescimento apenas de uma colônia e permaneceram positivas no ELISA foram expandidas em placas de 24 orifícios e garrafas de 75 cm² para obtenção de sobrenadante de cultura para congelamento a -70°C.

Todos os fracos ou placas utilizados foram 24 horas previamente revestidos com uma camada de macrófagos.

3.19. Congelamento das células produtoras de anticorpos monoclonais.

As células dos diferentes clones foram congeladas, quando apresentavam crescimento satisfatório e alta viabilidade. As células foram adicionadas à solução de congelamento contendo 20% de soro fetal bovino, 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) em RPMI-1640. A mistura foi imediatamente transferida para ampolas de congelamento de 1 mL e imersas em banho de gelo, mantidas a -20°C por trinta minutos e -70°C *overnight* e depois transferidos para o nitrogênio líquido.

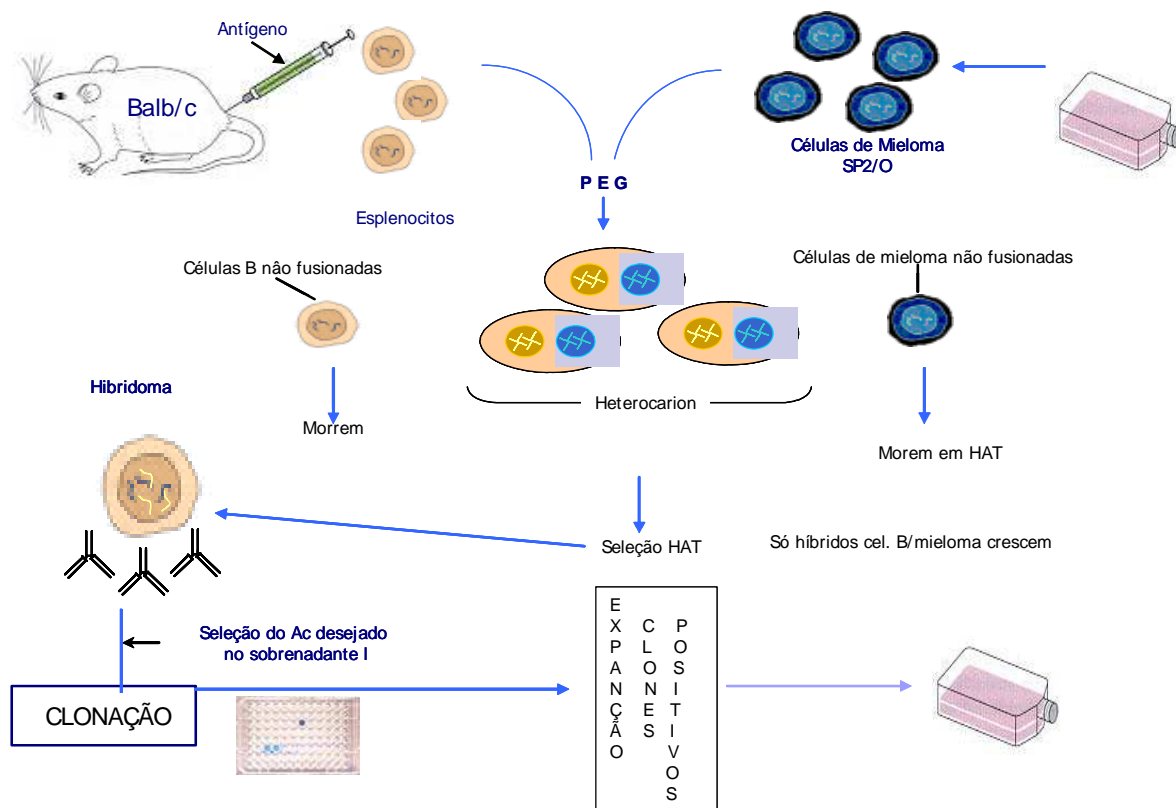


Figura 2. Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos (IgG).

3.20. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Fragmentos da bolsa de Fabrício fixados em formol de episódios naturais de IBD foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina e submetidos a reação de imunofluorescência utilizando a técnica descrita por Oviedo (2001). Foram obtidas secções histológicas de 4µm e aderidas à lâmina de vidro com cola comum e deixadas por 24 horas em estufa a 37°C e após este tempo foram desparafinizadas. Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, duas passagens de 30 minutos cada, sendo hidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) trocando-se de solução a cada 5 minutos. Após lavagem em PBS pH 7,4, foi feita a digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina 1mg/ml em PBS pH 7,4 durante 15 minutos a 37°C.

Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4. Em seguida, cobriram-se os cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubaram-se em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, enxugou-se o excesso de soro e sem deixar secar os cortes colocou-se anticorpo primário específico (IgG dos sobrenadante de hibridomas anti-IBDV, e como controle positivo e negativo soro de camundongo, sabidamente positivo e negativo respectivamente); os cortes foram incubados durante 18 horas em câmara úmida a 4°C.

Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e em seguida cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de camundongo, marcada com fluoresceína – Sigma, EUA), diluído 1:256 em PBS 7,4 de acordo com especificação do fabricante. Após incubação em câmara úmida e escura, durante 60 minutos a 37°C, os cortes foram lavados três vezes, 5 minutos cada, com PBS pH 7,4, após lavagem as laminas foram seladas com lamínula e solução glicerina (1 parte de PBS pH 8,0 e 9 partes de glicerina) e analisadas ao microscópio de fluorescência de luz verde (Nikon Eclipse E-600).

3.21. Caracterização dos clones

3.21.1. SDS-PAGE

O vírus purificado foi submetido à eletroforese de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações.

Os géis foram montados entre placas de vidro separadas por espaçadores. Os géis de corrida e de concentração (*Stack*) foram utilizados na concentração de 12% e 3%, respectivamente. O antígeno foi misturado com igual volume de tampão de amostra completo e fervido por três minutos. A amostra aplicada por canaleta múltipla foi de 30µL de antígeno para géis corados pela azul de Coomassie G-250. Nos géis para eletrotransferência, amostra aplicada foi de 200 µL de antígeno em canaleta única.

Em todas as eletroforeses, foram incluídos marcadores padrões com os respectivos pesos moleculares (Sigma, EUA): albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (36 Kda), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio bovino (24 kDa), a lactoalbumina bovina (14,2 kDa).

3.21.2. Coloração pelo azul de Coomassie G-250.

Após eletroforese e rápida lavagem em água destilada, o gel foi transferido para uma solução corante, contendo 0,25% de azul Comassie G-250 durante 30 minutos. Logo após, foi feita a descoloração, utilizando-se uma solução contendo metanol, ácido acético e água destilada até se obter a diferenciação das bandas coradas.

3.21.3. Western blotting

A eletrotransferência das proteínas virais dos géis de poliacrilamida para as membranas de nitrocelulose foi realizada de acordo com metodologia descrita por Pereira *et al.* (1998) com modificações.

Ao terminar a eletroforese, o gel foi lavado em água destilada e mergulhado por 30 minutos em tampão de transferência. A membrana de nitrocelulose foi imersa em água deionizada durante cinco minutos e, posteriormente, incubada por 30 minutos em tampão de transferência, juntamente com seis pedaços de papel de filtro *Whatman* 3 mm, cortados do tamanho do gel e espumas.

Realizou-se montagem seqüencial sobre um suporte de acrílico na seguinte ordem: uma espuma, três pedaços de papel filtro, o gel, a membrana, os outros três pedaços de filtro e espuma. Na montagem evitou-se a formação de bolhas de ar entre as varias camadas e sempre utilizando-se 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 controle da transferência, a tira de nitrocelulose, que continha o padrão de peso molecular foi corada com solução de Ponceau-S durante um

minuto. Após a transferência, as membranas foram utilizadas na identificação das proteínas dos antígenos, reconhecidas pelos anticorpos monoclonais antivírus da IBD.

A membrana foi lavada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 0,5 cm de largura. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com tampão de bloqueio durante 30 minutos. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas três vezes em PBS-Tween 80 a 0,05%, durante 15 minutos, e incubadas por duas horas com as imunoglobulinas dos sobrenadantes de culturas, contendo os anticorpos monoclonais.

Como controles positivos foram utilizados soros policlonais de camundongo imunizados e, como controles negativos, utilizaram-se soro de camundongo não imunizado, além de sobrenadante de cultura de híbridos não produtores de anticorpos monoclonais.

As tiras de nitrocelulose foram lavadas três vezes em PBS-Tween 80 (Sigma, EUA) e incubadas por duas horas com anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:2000 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. A revelação foi interrompida com água destilada. Toda a reação foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Patogenicidade viral em cultivo celular.

O vírus da IBD é capaz de multiplicar em células de linhagem, tais como RK13 e células VERO (ITO *et al.*, 2001). Com a finalidade de multiplicar o vírus IBD obtido de uma vacina viva atenuada, a suspensão vacinal foi inoculada em células VERO. Após a terceira passagem observou-se o efeito citopático. O efeito citopático consiste em destruição da monocamada celular, onde podem ser observadas células com morfologia arredondada com grande espaço entre elas, além de presença de grande quantidade de células mortas no sobrenadante do cultivo. Após completa destruição do tapete celular as amostras foram estocadas a -20°C. Quando se obteve quantidade suficiente do vírus para purificação (500 mL de sobrenadante), retirou-se uma amostra para ser analisada no ensaio de patogenicidade em cultivo celular. Para esse ensaio foi utilizada uma placa de 96 poços, em cada linha da placa foram avaliadas diluições seriadas da amostra viral e na última linhas se adicionaram células sem vírus como controle negativo. O título obtido, segundo o método de Reed e Muench (1938), foi de $1,4 \times 10^5$ ou TCDI⁵⁰ de 10^5 .

4.2 Purificação do vírus

Após a multiplicação do vírus coletou-se 500 mL de sobrenadante de células VERO infectadas com o IBDV. Na purificação por gradiente de sacarose, obteve-se 3 mL de concentrado viral, os quais foram alíquotados em criotubos e armazenados a -70°C, retirando 100µL da amostra para dosagem de proteína viral. É importante o uso de antígenos puros para evitar que anticorpos contra possíveis impurezas, presentes no material empregado na imunização, sejam revelados nos testes de seleção de hibridomas e dos clones.

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

O perfil eletroforético do antígeno do IBDV, amostra vacinal em SDS-PAGE esta apresentado na figura 4. Através dessa técnica, podem-se observar a banda do vírus correspondente ao peso molecular de 47 kDa correspondente à proteína VPX precursora de VP2, observe-se ausência de proteínas celulares, outras bandas fracas se observam que correspondem a VP2 (41kDa), VP3 (35kDa) e VP4 (28kDa).

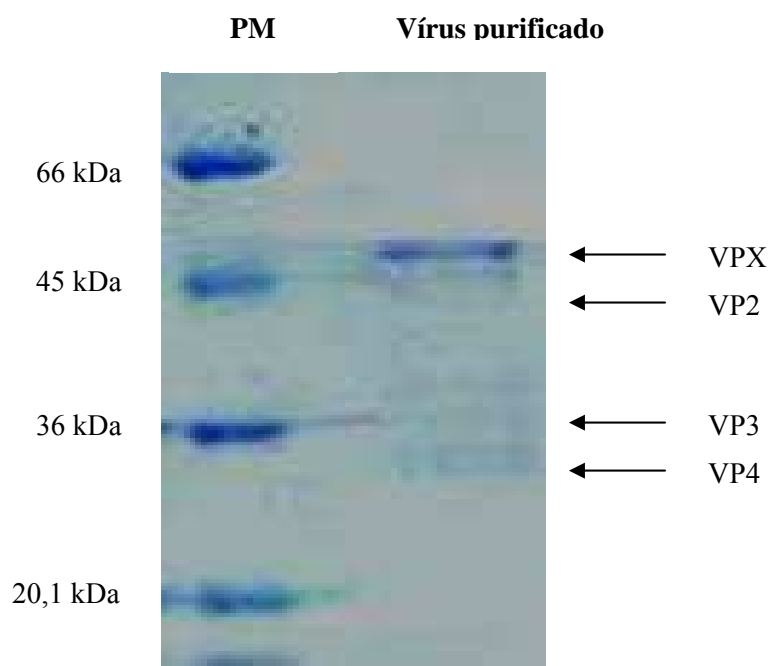


Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do vírus da IBD corado pelo Azul de Coomassie. Marcadores de peso molecular (PM) em kDa à esquerda.

4.4. Dosagem de proteínas

Primeiramente foi determinada a curva-padrão, utilizando-se a soroalbumina bovina (SAB) a 0,5%:

Concentração (µg/mL)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Absorvância	0,289	0,768	0,956	1,366	1,414	1,672	1,745	1,927	2,172	1,906

Tabela 2. Relação µg de Soro Albumina Bovina (BSA) bovina como padrão com densidade óptica determinada pelo método de ácido biciconinico.

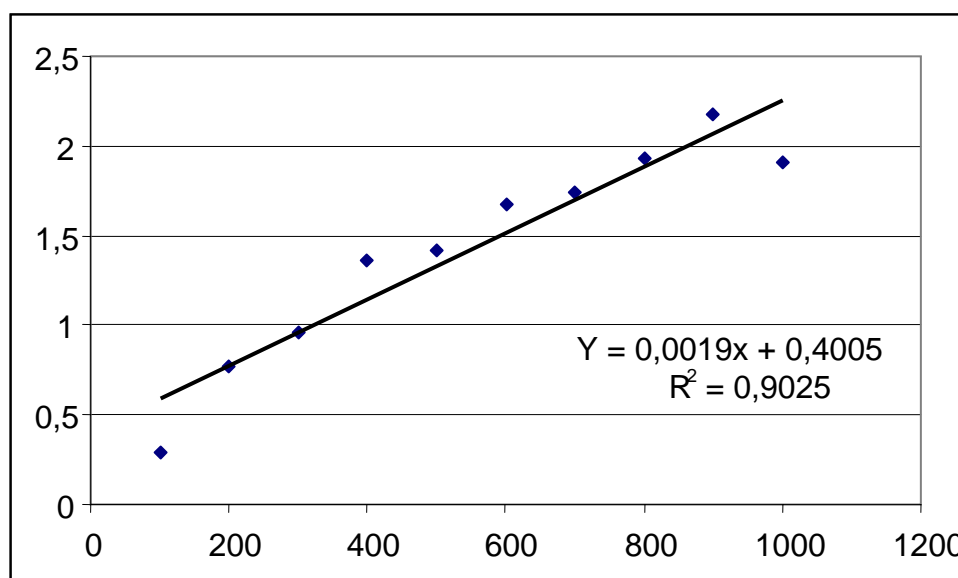


Gráfico 1. Curva padrão para dosagem de proteína, usando Soro Albumina Bovina (BSA).

Em seguida, foi realizada a dosagem de proteína do vírus purificado, através de leitura em espectrofotômetro (Smartspectm 3000, BIO-RAD, EUA) a 562 nm, obtendo-se 1623,22 µg/mL que corresponde a absorvância de 0,708. A quantidade de proteína viral obtida foi suficiente para o desenvolvimento de todo o experimento.

4.5. Imunização dos camundongos BALB/c

A partir dos soros obtidos com as sangrias que eram realizadas a cada duas semanas após imunização, foram realizados testes ELISA indireto, para mensuração dos níveis de anticorpos (Quadro 1).

Semanas	Camundongo Número							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0,097	0,1	0,135	0,159	0,102	0,22	0,103	0,103
2	0,367	0,407	0,406	0,37	0,309	0,38	0,407	0,365
5	0,346	0,336	0,384	0,353	0,344	0,384	0,362	0,347
8	0,634	0,637	0,634	0,644	0,615	0,643	0,621	0,634
11	0,355	0,368	0,435	0,385	0,361	0,354	0,415	0,363
12	0,593	0,57	0,587	0,614	0,582	0,593	0,613	0,563

Quadro 1. Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto. Os números representam as médias de absorvância nas semanas indicadas, sendo que para cada soro foram feitas duas repetições. As inoculações foram feitas na semana 0, 3, 6, 9 e 4 dias antes da fusão.

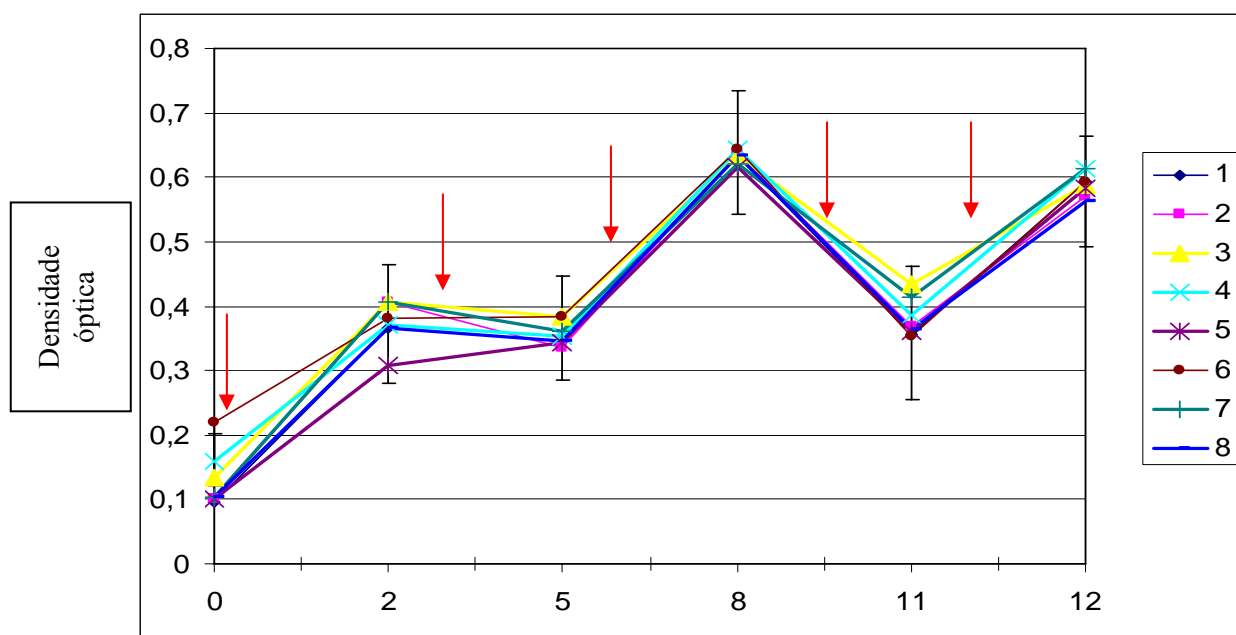


Gráfico 2. Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto dos soros dos camundongos testados por ELISA antes de serem imunizados; 2 semanas após cada imunização, os camundongos foram inoculados com intervalos de 3 semanas. Foram feitas 4 inoculações nos camundongos e as setas no gráfico indicam o dia da imunização, a 5 e ultima imunização quatro dias antes da fusão.

Dos oito camundongos imunizados, todos desenvolveram resposta imune humoral, sendo observado o maior título a partir da terceira inoculação (Gráfico 2). O uso de

saponina como adjuvante mostrou uma boa resposta humoral em termos de produção de IgG, garantindo sua eficácia e coincidindo com os resultados relatados por Sales-Junior *et al.* (2005), que usou como modelo experimental camundongos. Os autores verificaram que o adjuvante saponina tem a habilidade de estimular a resposta mediada por células, assim como de aumentar a produção de anticorpos. Quanto ao seu modo de ação, Bar *et al.* (1998) citam que a saponina estimula a apresentação antigênica, a imunomodulação e a indução de resposta T citotóxica. Além disso, segundo Scott *et al.* (1985) a saponina aumenta a retenção do antígeno no local da inoculação (SALES – JUNIOR *et al.*, 2005).

4.6. Fusão e clonagem

Quinze dias após a fusão dos linfócitos com as células de mieloma Sp2/O, os sobrenadantes das culturas foram retirados (100 μ L) e a produção de anticorpos pelos hibridomas foi acompanhada através de ELISA. Nessa etapa, detectaram-se orifícios contendo híbridos positivos, porém foram selecionados apenas dois (2H11 e 5C7), por apresentarem maior densidade óptica.

Após a clonagem, foram selecionados três clones (D8, F9 e H8) por serem positivos frente ao ELISA e por mostrarem bom crescimento. Portanto, foram expandidos em placas de 24 orifícios, previamente revestidas por uma monocamada de macrófagos.

A utilização de macrófagos alimentadores durante o processo de cultivo dos híbridos mostrou ser útil e benéfico para a multiplicação dos hibridomas, e o crescimento dos clones se observo perceptivelmente superior quando comparados aos clones em cultivo sem macrófagos fatos também relatados por Souza (1999).

4.7. ELISA Indireto do sobrenadante.

A partir do sobrenadante obtido dos orifícios (100 μ L), foram realizados testes ELISA indireto, para avaliação dos níveis de anticorpos (Figura 4). Em relação à reatividade dos anticorpos monoclonais pelo teste ELISA, foram observados diferentes intensidades de absorvância de 0,617 a 0,923, permitindo distinguir claramente os clones positivos dos negativos (considerando-se um *cut off* de 4 vezes a D.O. do soro normal 0,187) (Tabela 3).

Clone	Absorvância (D.O.)
D8	0,617
F9	0,823
H8	0,923

Tabela 3. Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-IBDV em ELISA.

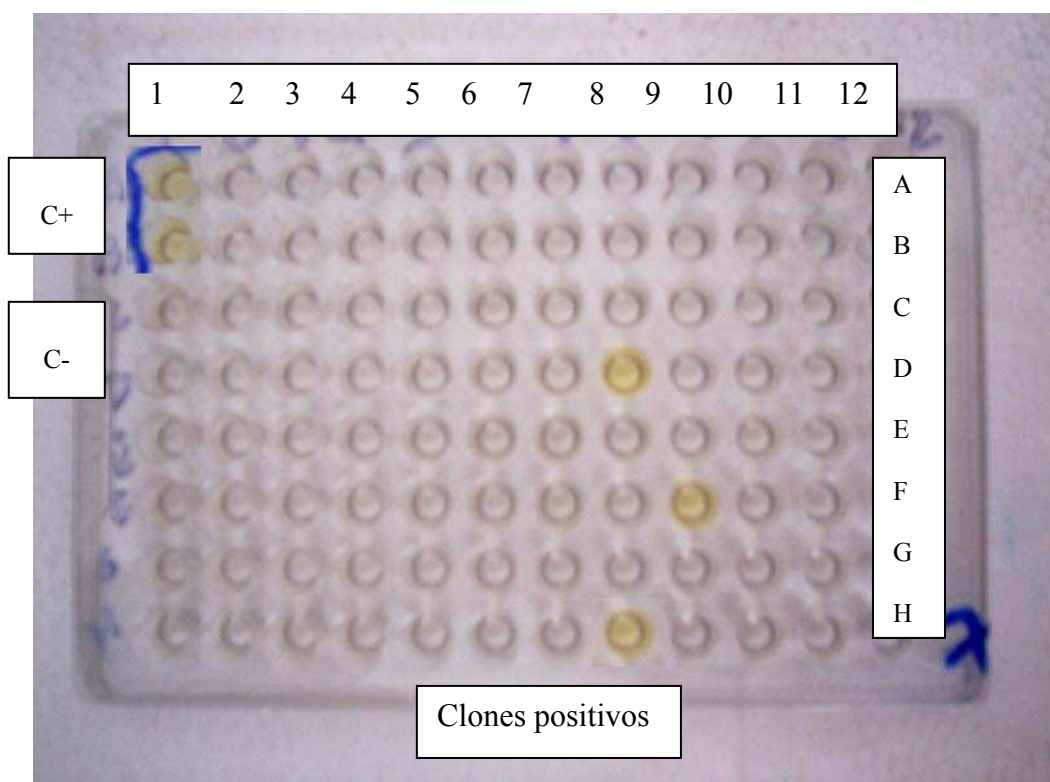


Figura 4. Teste de ELISA mostrando os três clones positivos que correspondem aos clones D8, F9, H8 - após clonagem, por diluição limitante D.O. D8 (0,617); F9 (0,823); H8 (0,923).

4.8. Expansão dos hibridomas positivos em placas de 24 orifícios

Os hibridomas positivos, que mostraram bom crescimento, foram transferidos para placas de 24 orifícios para estimular seu crescimento e a produção dos anticorpos. Foram testados em ELISA e RIFI para verificar sua produção.

As principais dificuldades neste trabalho foram o crescimento e manutenção dos híbridos, bem como a obtenção de grande quantidade de anticorpos. Neste contexto, Lee *et al.* (2002) são de opinião que a literatura busca soluções para os seguintes problemas: limitação nutricional; redução dos efeitos inibitórios ocasionados pelos subprodutos do metabolismo, principalmente amônia e ácido láctico, e/ou síntese de produtos; transferência de oxigênio em sistemas *in vitro*.

4.9. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os anticorpos monoclonais oriundos dos clones D8, F9, H8, ao serem submetidos à RIFI frente a cortes histológicos de bolsas de Fabrício diagnosticadas como positivas para o IBDV apresentaram fluorescência, apresentaram diferenças com respeito à diluição usada para identificação do vírus na RIFI. Em geral, o sobrenadante dos cultivos apresentou reação positiva na diluição de 1:160 para F9; 1:160 para D8 e de 1:320 H8 (Figura 5). Todos os clones positivos em ELISA se mostraram positivos em RIFI O título de reação de cada anticorpo monoclonal foi determinado testando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultivo como anticorpo primário nas técnicas de RIFI, apresentando reação positiva na diluição de 1:160 para os clones denominados F9 e D8 e de 1:320 para H8.

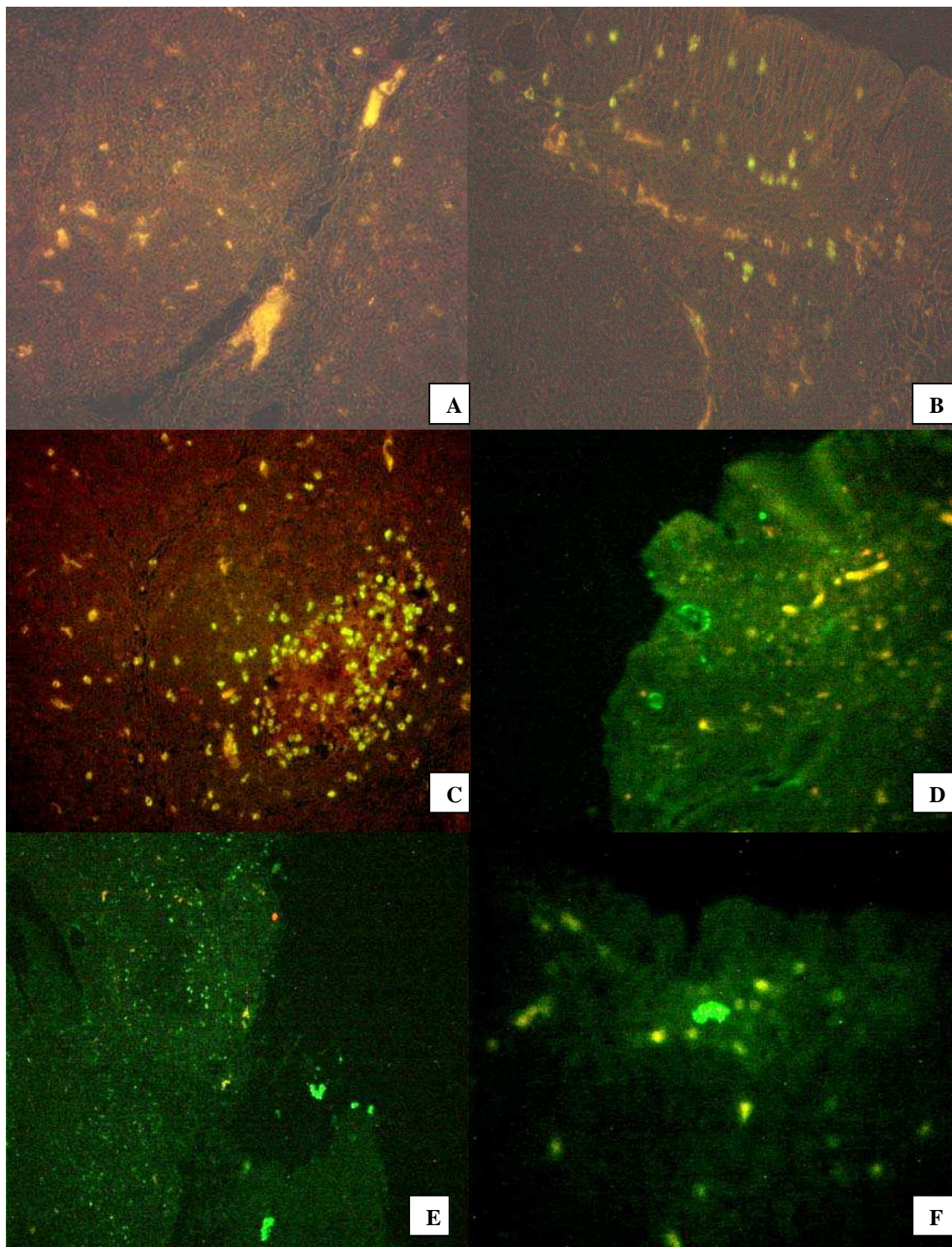


Figura 5. Reação de imunofluorescência indireta dos anticorpos monoclonais frente a cortes histológicos de bolsas de Fabrício positivas para o IBDV por infecção natural. A. Controle policlonal negativo, soro de camundongo sem imunizar. B. Controle policlonal positivo, soro de camundongo imunizado. C. sobrenadante de hibridomas clone H8. D. sobrenadante de hibridomas clone D8. E e F. sobrenadante de hibridomas clone F9. Diluição 1:40, 400X.

4.10. Western blotting

As bandas protéicas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais apresentavam pesos moleculares entre 66 e 41 kDa, sendo que todos os anticorpos monoclonais reconheceu mais de uma banda nessa faixa de peso molecular (Figura 6).

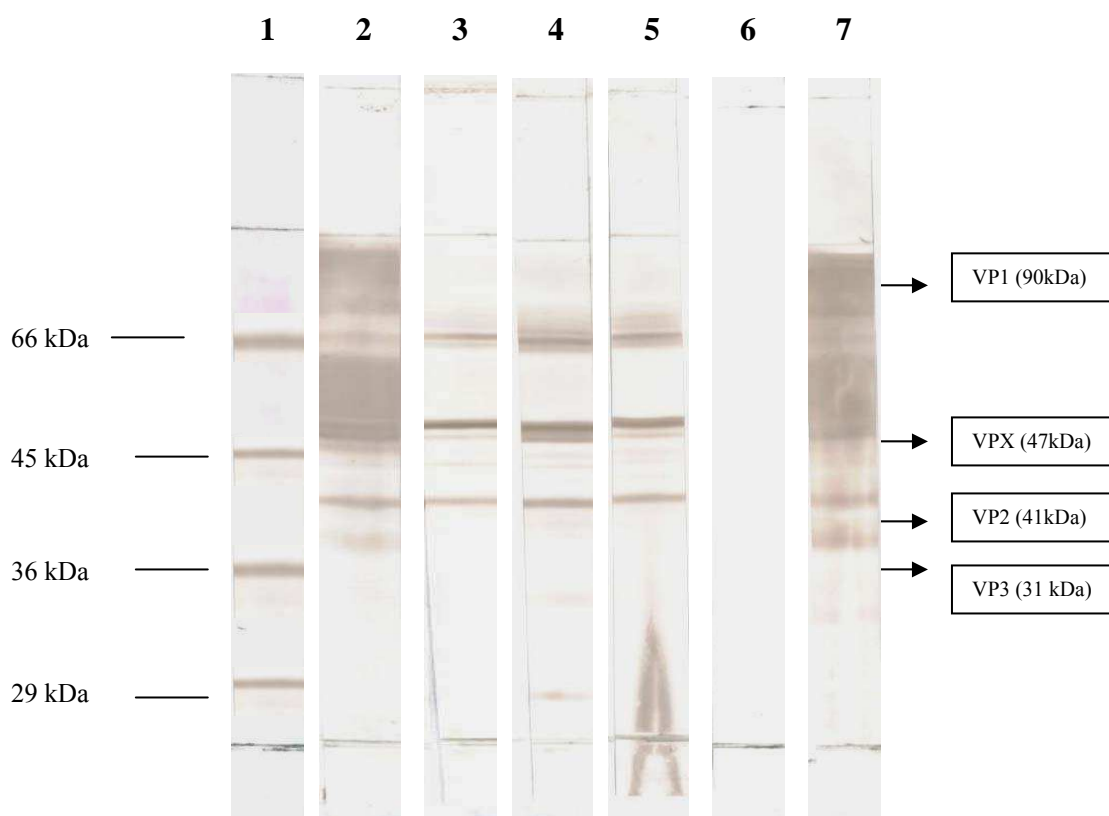


Figura 6. Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao vírus da IBD. Pesos moleculares (kDa) indicados à esquerda. 1.Marcador de peso molecular, 2.Controle policlonal positivo: soro de camundongo anti-vírus da IBD, 3.Clone H8, 4.Clone F9, 5. Clone D8, 6. Controle policlonal negativo: soro de camundongo negativo para o vírus da IBD, 7. Controle policlonal positivo: soro de camundongo anti-vírus da IBD

Dobos (1979), trabalhando com amostras purificadas do vírus da IBD encontraram as seguintes proteínas virais com seus respectivos pesos moleculares: VP1 (90kDa), VP2 (41kDa), VP3 (35kDa), VP4 (28kDa) e VPX (47kDa). Este mesmo autor designou de VPX a proteína viral precursora da VP2, com peso molecular de 47kDa. A proteína

denominada de VP2, principal indutora de proteção ao hospedeiro conforme Azad *et al.* (1987), é descrita por vários autores com pesos moleculares entre 37 e 42kDa. A VP2, localizada no capsídeo externo do vírus, está relacionada com a antigenicidade, ou seja, expressão de epítomos que induzem uma resposta de anticorpos. Por essa razão, essa proteína é conhecida como epítomo de neutralização, ou seja, anticorpos gerados por ela permitem efetuar a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais. A VP3 está no capsídeo interno e é a principal responsável pela conformação estrutural do vírus tendo relação com antígenos grupos específicos. Induz resposta de anticorpos, porém são fracamente neutralizantes. A VP4 é uma protease viral que não é incorporada na partícula madura do vírus. A VP5 tem sido demonstrada na célula infectada, não está presente no vírus maduro e suspeita-se que tenha papel na regulação do ciclo viral ou na liberação do vírus da célula infectada (ITO *et al.*, 2001).

Di Fabio (2001) relatou que VP2 contém epítomos que induzem a produção de anticorpos que neutralizam o vírus, existindo assim uma correlação direta entre o título de anticorpos neutralizantes específico, para a fração VP2 do vírus e a proteção conferida as aves. A região protéica VP2 foi identificada como antígeno protetor, pois contém uma região antigênica responsável pela indução de anticorpos neutralizantes. Becht *et al.* (1988) demonstraram que os epítomos neutralizantes encontravam-se na região protéica VP2 do vírus da IBD, esta região está relacionada com a antigenicidade do vírus, ou seja, contém expressões de epítomos que induzem uma resposta imunológica. Por esta razão esta proteína é conhecida como epítomo de neutralização (ITO *et al.*, 2001).

As diferenças nos pesos moleculares encontrados nesta pesquisa podem ser devidas à metodologia empregada. Outra possível razão para estas variações pode ser a variação na clivagem dos sítios das proteínas precursoras, quando diferentes sistemas são empregados na replicação viral. Assim, Rodriguez-Chavez *et al.* (2002), e Müller e Becht (1982), relataram mudanças nos epítomos associadas ao método usado para propagação do vírus. Além disso, os determinantes antigênicos podem ter sofrido modificação de configuração ou de aspecto tridimensional da molécula protéica estrutural durante a execução do *western blotting*, na qual pode ocorrer desnaturação de proteínas, com modificação de determinantes antigênicos de conformação e alteração de sensibilidade frente a testes que dependam da forma de apresentação molecular (CARDOZO *et al.*, 1998).

Segundo Fahey *et al.* (1985) VPX e VP2 reagem com o mesmo anticorpo monoclonal em *wetern blotting*, esta observação pode ser explicada porque VP2 é um produto da clivagem de VPX.

Outras possíveis explicações para os anticorpos reagirem com mais de uma proteína é a necessidade de novas clonagens. A clonagem por diluição limitante, que aponta a obtenção de clone puro originado de uma única célula, foi promovida e facilitada pela alta diluição das células pós-fusão cultivadas em grande número de microplacas após a fusão. Esses foram incluídos no *western blotting*, evidenciando a necessidade de trabalho adicional de individualização das células produtoras de anticorpos monoclonais.

Os controles policlonais positivo (CPP) reconheceu todas as bandas protéicas estruturais e mostrou reação inespecífica o que confirma uma possível desnaturação da proteína durante a execução da técnica de *western blotting*.

A técnica empregada neste estudo não difere das descritas por outros autores, entretanto, certos aspectos devem ser ressaltados, como a imunização dos camundongos, a seleção dos híbridos e a clonagem.

Pelo exposto, pode-se concluir que alguns componentes antigênicos do vírus da IBD, foram identificados neste estudo usando-se anticorpos monoclonais. Estes anticorpos monoclonais poderão ser usados no desenvolvimento de testes mais sensíveis nos estudos epidemiológicos do vírus da IBD ou podem ser usados na identificação de proteínas relevantes.

Deve-se ter em conta que a especificidade dos AcM é dada por sua capacidade de reconhecer determinados epítomos dentro da proteína, é se esperar que nos casos de reação cruzada não mantêm a mesma intensidade e depende da quantidade ou expressão destes. Estes AcM serão muito úteis no diagnóstico, como é observado na imunofluorescência.

5. CONCLUSÕES

- A imunização dos camundongos com o vírus purificado permitiu a obtenção de anticorpos policlonais capazes de detectar a proteína viral nos ensaios do tipo ELISA.
- O uso de saponina como adjuvante na imunização dos camundongos contra o vírus da IBD estimulou a produção de altos títulos de anticorpos policlonais no soro.
- Na fusão de células de mieloma SP2/0 com células esplênicas de camundongos imunizados, obteve-se dois poços contendo hibridomas secretores de anticorpos policlonais que reconhecem o IBDV por ELISA.
- Nas clonagens por diluição limitante foram obtidos três clones secretores de anticorpos monoclonais, os quais se identificaram positivos em RIFI na diluição de 1:160 até 1:320, além disso os clones reagiram no *western blotting* contra as proteínas virais de pesos moleculares 47 kDa (VPX) e 41 kDa (VP2).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Este trabalho demonstrou que a técnica dos anticorpos monoclonais pode ser desenvolvida contra o vírus da IBD e estabelecidas as condições de clonagem e preservação dos hibridomas ao nível de Brasil, nos laboratórios do DVT e do BIOAGRO, na UFV.
- A definição dos isótipos e atividade neutralizante dos AcM obtidos pode ser objeto de investigações futuras, de modo a permitir a utilização dos anticorpos em ensaios imunoenzimáticos de detecção ou/captura de antígenos presentes, em amostras do vírus da IBD isoladas de casos clínicos.
- Podem ser propostos os seguintes estudos empregando os AcM; imunohistoquímica para diagnóstico “in situ” da infecção por vírus IBD; estudo de amostras em surtos de doença quanto ao tropismo tecidual e persistência viral; e avaliação da situação atual do IBDV no campo, comparando a ocorrência de episódios clínicos atuais com a doença e em anos anteriores.
- Os AcM reconheceram sítios de infecção bursal por RIFI.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALVES, F.M.X. *Celulite associada às lesões na bolsa de Fabrício de frango de corte sob inspeção sanitária*. 2005. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.
- ABBAS A.K, LINCHTMAN A.H, POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005. 580p.
- ALLAN, W.H.; FARAGHER, J.T.; CULLEN, G.A. Immunossuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Veterinary Records*, v. 90 p.511-512, 1972.
- AVENDAÑO, B. Plantas mágicas. *Ciencia y Tecnología*. Bohemia Digital, junio de 2006. <http://www.bohemia.cubasi.cu/2006/06/15/cienciatecnologia/plantas.html>. Acessado em: março 13 de 2007.
- AZAD, A.A.; JAGADISH M.N.; BROWN M.A.; HUDSON P.J. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*. v.161, p.145–152, 1987.
- BARROS, D. M. *ELISA e dot-ELISA, para detecção de anticorpos para o vírus da doença infecciosa bursal*. 2001. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BECHT, H., MÜLLER, H.; MÜLLER, H.K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, v. 69, p.631-640, 1988.
- BERG, T.P.; GONZE, M.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, v.20, p.133-143, 1991.
- CARDOZO, R.M. *Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas*. 1998, 69f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CHEITTLE, N., STUART, J.C., WYETH, P.J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.*, v.125, p.271-272, 1989.
- COLLINS M.S.; GOUGH R.E. Characterization of a virus associated with Turkey Rinotracheitis. *J. Gen. Virol*, 69, p.909-916, 1988.

- COSGROVE, A. S. An apparently new disease of chickens: Avian nephrosis. *Avian Dis.*, v.6, n.3, p.385-389, 1962.
- DI FABIO, J. Diagnóstico sorológico da doença de Gumboro, In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, Facta 2001. Campinas. Anais... São Paulo: 2001. p.79-91.
- DOBOS, P. Peptide map comparison of the proteins of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.*, v.32, n.3, p.1046-1050, 1979.
- DOBOS, P., HILL, B.J., HALLETT, R., KELLS, D.T., BECHT, H., TENINGES, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented dsRNA genomes. *J. Virol.* 32, p.593–605, 1979.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay –ELISA. III quantification of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, v.109, p.129-135, 1972.
- FAHEY, K.J., I. J. O'DONNELL, A. A. AZAD. Characterization by western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, v.66 p.1479-1488, 1985.
- FAHEY K.J.; MCWATERS P.; BROWN A.; ENRY K.; MURPHY, V.J.; HEWISH D.R.. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. *Avian Dis.*, v.35, p.365-373, 1991.
- GARDIN, Y. Gumboro estirpes muito virulentas – patogenia e controle. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, Campinas. **Anais...** São Paulo: 2000. p.59 -78.
- GIAMBRONE J.J. Gumboro remains of economic importance. *World Poultry.* ELSEVIER, v.16, n.4, 2000.
- GIAMBRONE, J.J.; EIDON, C.S.; PAGE, R.K.; FLETCHER, O.J.; BARGER, B.O. AND LEVEN, S.H. Effect of infectious bursal agent on the response of chickens to Newcastle disease and Marek's disease vaccination. *Avian Dis.* v 20, p.534-544, 1976.
- HARKNESS, J. W., ALEXANDER, D. J., PATTISON, M., SCOTT, A. C. Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy. *Archives of Virology*, v.48, p.63-73, 1975.
- HARLOW, E., LANE, D. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 726p, 1988.

- HENDRIKSEN, C. F. M. Laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities. *ILAR Journal*, v.46, n.3, p. 227-229, 2005.
- HITCHNER, S.B. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonated eggs. *Poultry Science*, v. 49, p511-516, 1970.
- IKUTA N. Diagnóstico Molecular do Vírus da Doença de Gumboro. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, Facta 2001. Campinas, anais... São Paulo. p.93-101. 2001.
- 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 Saúde Animal, 76p. 2001.
- JACKWOOD, D.J.; SAIF, Y.M. Antigenic diversity of infectious bursal disease. *Avian Dis.*, v. 31, p.766-770, 1987.
- JACKWOOD, D.J.; SAIF, Y.M., HUGHES, J.H. Characteristics and serologic studies of two serotypes of IBDV in Turkeys. *Avian Dis.*, v.26 p.871-881, 1982.
- JUNGMANN, A.; NIEPER H.; MÜLLER H.A. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. In: *J. Gen. Virol.*, n.82, p.1107-1115, 2001.
- KAUFER, I.; WEISS, E. Significance of bursa of fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infection and Immunity*, n 27, p.364-367, 1980.
- KHATRI M.; SHARMA J.M.. Infection bursal disease virus infection induces macrophage activation via P38 MAPK and NF-Kb pathways. *Virus Research* 118 p.70-77, 2006.
- KIBENGE F.S.B.; DHILLON A.S., RUSSELL, R.G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. In: *J. Gen. Virol.*, n.69, p.1757-1775, 1988.
- KÖHLER, G. MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256, p.495-497, 1975.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, C.Y.; SUAREZ, I.D.; GOUVEIA, T.; TEIXEIRA, V.R.; BARBOSA, S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; AUGUSTO, E.F.P., Melhoria 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.
- 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.

- LEFFER, E.V.B. Considerações sobre o controle da doença de Gumboro. *Ave world*. Animal World, abr-mai. 2004.
- LIDDELL, J. E.; CRYER, A. *A practical guide to monoclonal antibodies*. In: John Wiley e Sons (Ed). 1991, 188 p.
- LIMA A.M.C. *Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos ELISA e dot-ELISA para detecção de anticorpos antipneumovirus aviário*. 1998, 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- LIPMAN NS, JACKSON LR, TRUDEL LJ, 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.
- LUKERT, P.D. A situação da doença de Gumboro nos Estados Unidos. In: Simpósio da Doença de Gumboro, Facta, 1993. Campinas, anais... Sao Paulo, 1993. p.36-39.
- LUKERT, P.D.; DAVIS, R.B. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Diseases*, v.18, p.243-250, 1974.
- LUKERT, P.D.; LEONARD J.; DAVIS, R.B. Infectious bursal disease virus: antigen production and immunity. *Am. J. Vet. Res.* v.36, p.539-540. 1975.
- LUKERT, P. D.; SAIF, Y.M. Infectious bursal disease. In: Calnek, B. W.; Barnes, H.J.; Beard, C. W. *et al. Diseases of poultry*. 9 ed., Iowa: State University Press, p.648-663, 1991.
- LUNGE, V.R.; FONCECA, A.S.K; VERDI FILHO, R. Caracterização de genótipos de campo do vírus da doença de Gumboro no Brasil. Conferencia APINCO 1997 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Premio José Maria Lamas da Silva. FACTA, São Paulo, p.46, 1997.
- LUNGER, P.D.; MADDUX, T.C. Fine-structure studies of avian infectious bursal agent. In vivo viral morphogenesis. *Avian Dis.* v.16 p.874-893, 1972.
- MAZARIEGOS, L.A.; LUKERT, P.D.; BROWN, J. Pathogenesis and immunosuppressive properties of infectious bursal disease “intermediate” strains. *Avian Dis.* v.34, p.203-208, 1990.
- MARINHO, C.E., FERNANDES M.J.B., SIMONI I.C. Estudo do ciclo de replicação do vírus da doença infecciosa da bursa na linhagem celular RK-13. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, n.1, p.5-9, 2003

- MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S.; JORGE, M. A. Principais causas de imunossupressão em galinhas. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia 2005, Santos, São Paulo. Anais... 2005, v.2, p.85, 2005.
- MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S.; MCKILLOP, E.R.; CONNOR, T.J.; MCCRACKEN, R.M.; COLLINS, D.S.; ALLAN, G.M. Isolation and serological studies with IBDV from fowl, turkeys and ducks. Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.*, v.9, p.395-404, 1980.
- MCNULTY, M.S., ALLAN, G.M., MCFERRAN, J.B. Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys. *Avian Pathol.*, v. 8, 205-212, 1979.
- MICELI M.C.; PARNES J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv. Immunol.* v.53, p.59-122, 1993.
- MILSTEIN, C. Monoclonal antibodies. *Sci Am.*, n.243, p.56-64, 1980.
- MONTASSIER, H. J. Doença de Gumboro: Imunologia. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, Facta 2001, p.37-45.
- MORALES, J.C. *Técnicas de diagnóstico en virología*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid España, 1993, p.79–103.
- MÜLLER, H; BEHT, H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *Journal of Virology*, n.44, p.384-392, 1982.
- MÜLLER H., ISLAM, R., RAUE R. Research on infectious bursal disease –The past, the present and the future. In: *Veterinary Microbiology*, n. 97, p.153-16, 2003.
- NAGARAJAN, M.M.; KIBENGE, F.S.B. Infectious bursal disease virus: A review of molecular basis for variation in antigenicity and virulence. *Can. J. Vet. Res.*, v.61, n.1, p.81-88, 1997.
- NICK, H., CURSIEFEN, D.; BECHT, H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology* n.18, p.227-234, 1976.
- NRC [National Research Council]. Monoclonal Antibody Production. Washington DC: National Academy Press, 1999.
- OLIVEIRA D.D. *ELISA indireto para detecção de Ig antivírus da doença de Newcastle em soro de codorna*. 2004, 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OVIDO, T.J.S. Infecção experimental de ovelhas deslanadas com *Neospora caninum*. 2001, 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- PAULILLO, A.C.; NISHIZAWA, M.; GAMA, N.M.Q.; BERNARDINO, A.; DORETTO J.R.L.; LIMA, F.S. Avaliação do efeito imunodepressor de diferentes amostras vacinais contra a doença de Gumboro em frangos de corte. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia, 2004a, p.174.
- PAULILLO, A.C.; NISHIZAWA, M.; SAYD, S.M.; OBA, A.; BERNARDINO, A.; PEREIRA, G.T. Avaliação da resposta imune total em frangos de corte vacinados e desafiados com vírus da doença de Gumboro (vvIBDV). In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia, 2004b, p.175.
- PEREIRA, V.L.A. *Qualidade de frango de corte ao abate pela relação entre peso doença de Gumboro e algumas enfermidades associadas*. 2004, 73f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária), Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. Higiene Veterinária.
- 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.
- PONTECORVO G. Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylene glycol (PEG) treatment. *Somatic Cell Genet*. v.1 p.397-400, 1976.
- REED, J.H.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* v. 27, p.493-496, 1938.
- ROCHA, F.T.R. *Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra a glicoproteína S1 do vírus da Bronquite infecciosa das galinhas*. 2000, 31f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RODRIGUEZ, 2004. *Produção de anticorpos monoclonais para uma proteinase ácida extracelular (aspartil proteinase) de Candida spp.* 2004, 71f. Tese (Doutorado em Odontologia). Piracicaba, São Paulo.
- RODRIGUEZ-CHAVEZ, I.R.; ROSENBERGER J.K.; CLOUD, S.S. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture). II. Antigenicity at the epitope level. *Avian Pathol.* v.31, p.473-483, 2002.
- RUOCCO, T. C. Manifestação Clínica. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, FACTA 2001, p. 48-49.

- SAIF, Y. M. Infectious bursal disease virus types. In: National meeting of poultry health condemnations, 19, Maryland, 1984. Proceedings... Maryland: University of Maryland, 1984, p.105-107.
- SAIF Y.M. Infectious bursal disease and hemorrhagic enteritis. *Poultry Sci.*, v.77, p.1186-1189, 1998.
- SAIF, Y. M. Control y Prevención de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura, Peru 1999. Memórias... p.37-38, 1999.
- SAIF, Y.M.; JACKWOOD D.H., JACKWOOD M.W, JACKWOOD, D.J. Antigenic characteristic of infectious bursal disease virus. Abst. 58th Northeastern Conf. on Avian Dis. Newark, Del. 1986.
- SALES-JUNIOR P.A; GUZMAN, F.; VARGAS M.I.; SOSSAI S.; PATARROYO V.A.M.; GONZALES C.Z.L.; PATARROYO J.H. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.107, p.281-290, 2005.
- SANTOS B.M. *Paramixovírus aviário, estudos sorológicos e histopatológicos das amostras la Sota e VG/GA*. 1995, 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SANTOS, B.M.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, V. Doenças virais de importância nas aves. CD, Editora UFV, 2^a ed., 71p. 2005.
- SANTOS, C.H.C.; SILVA, E.N. Método de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.171-182. 2000.
- SHARMA, J. M.; KIM, I. J.; RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H.Y. Infectious bursal disease vírus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immuno*, v.24, n.2-3, p.223-235, 2000.
- SCHUNK, M.K.; MACALLUM G.E. Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR Journal*, v.46, n.3, p.241-257, 2005.
- SHULMAN, M., WILDE, C. D., KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting antibodies. *Nature*, v. 276, p.269-270, 1978.
- SILVA, B.G.M. Controle da doença de Gumboro: Proposta Intervet, II Simpósio da Doença de Gumboro, FACTA 2001. p.187-202.

- SIMONI, I.C. Utilização de diferentes linhagens celulares para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa. 2001, 94f. Tese (Doutorado em Biologia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- SIMON, V.; ISHIZUKA, M. Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício (IBD). In: BERCHIERI J.R.; MACARI, M. *Doença das aves*, FACTA: Campinas, 2000, cap. 5 p. 301-314, 2000.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUGIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, n.150, p.76-85, 1985.
- SNYDER, D.B.; LANA, D.P.; CHO, B.R., MARQUARDT, W.W. Group- and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis.* v.32, p. 527-534, 1988.
- SNYDER, D.B. Changes in the field status of infectious bursal disease. *Avian Pathol.* v.19, p. 419-423, 1990.
- 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.
- STEWART-BROWN, B. Análisis molecular de la infección de la bolsa de Fabricio. Interpretación practica. Congreso Latinoamericano de Avicultura, XV, Cancún, México. Anis. p.33-34, 1997.
- THAM, K.M., MOON, C.D. Apoptosis in cell cultures induced by infectious bursal disease virus following in vitro infection. *Avian Dis.* v.40, n.1, p.109-113, 1996.
- TREVISOLI, J.F. Medidas profiláticas gerais contra a doença de Gumboro. II Simpósio da doença de Gumboro, FACTA 2001. Trabalhos do temário técnico. p.135-140. 2001.
- VAN DEN BERG, T.; ETERRADOSSI, N. Doença infecciosa bursal aguda em aves. In: II Simpósio da doença de Gumboro, 2001, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, p.103-131, 2001.
- VAN DEN BERG, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry. A review. *Avian Pathol.* v.29, p.175-193, 2000.
- VAN DEN BERG, T.P., GONZE, M., MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* v.20, p.133-143, 1991.

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.

8. APÊNDICE

8.1 Cultivo Celular

Meio DMEM Sigma®

DMEM	1 frasco
Glicose	4 g
Ácido Fólico	0,006 g
L-Arginina	0,116 g
L-asparagina	0,036 g
HEPES	2,383 g
NaHCO ₃	2 g
Água MilliQ q.s.p	1000mL

pH 7,2, conservar a 4°C até por 6 meses, conservando as características físicas do meio como a cor, vedar com parafilme aliquidar em garrafas de vidro estéril 90 mL.

8.2 Purificação do Vírus

Tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,4)

Tris HCl	3,152 g
Água MilliQ q.s.p	100 mL

Tampão NET

NaCl	5,85 g
EDTA	0,292 g
Tris HCl	0,261 g
Tris Base	1,010 g
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

Sacarose 30%

Sacarose	30 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Todos os reagentes a 4°C, em frasco estéril.

8.3 Dosagem de proteína viral

Ácido Bicinconínico

Reagente A (pH 11,25):

Ácido bicinconínico Sigma®	1 g
Na ₂ CO ₃ x H ₂ O	2 g
Tartarato de sódio x 2 H ₂ O	0,16 g
NaOH	0,4 g
NaHCO ₃	0,95 g
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

Reagente B:

Cu SO ₄ x 5 H ₂ O	4 g
Água MilliQ	100 mL

Reagente A e B a temperatura ambiente.

8.4 ELISA indireto**Tampão Carbonato-Bicarbonato (pH 9,6):**

Na ₂ CO ₃	0,159 g
NaHCO ₃	0,293 g
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

Tampão Fosfato (PBS- pH 7,6):

NaCl.	8,5 g
KH ₂ PO ₄ .	0,48 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	10,74 g
Água MilliQ q.s.p	1000 mL

Tampão de Lavagem pH 7,2:

NaCl	9g
Tween 20	0,5 mL
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

Tampão de Incubação:

PBS pH 7,6	200 mL
Caseína 2% em PBS	0,5 g
Tween 20	50 µL

Substrato:**Solução A:**

NaHPO ₄	7,19 g
Ácido Cítrico	5,19 g
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

Solução B:

OPD Sigma, EUA	4mg
Solução A	20 mL
H ₂ O ₂ 30V	2,5 µL

Preparar na hora de utilizar, OPD sensível a luz.

8.5. Produção de Plasmocitomas**Meio RPMI-1640 incompleto**

Hepes	2,4 g
Piruvato de Sódio	0,11 g
D-glucose	4,5 g
Bicarbonato de Sódio	1,5 g
RPMI 1640 com	
L-glutamina	10,43 g (frasco)

Água MilliQ q.s.p. 1000 mL

Meio RPMI completo

Meio RPMI incompleto 90mL
Soro fetal bovino 10mL
Gentamicina 1mL
Anfotericina 1mL

SFB, Gentamicina e Anfotericina aliquotar e conservar -20°C, quando completado o meio a 4°C.

Meio RPMI completo com HAT

Meio RPMI completo 100 mL
Meio suplemento HAT
(Sigma, EUA) 2 mL

HAT aliquotar e conservar a -20oC, e em frasco âmbar, a aminopteridina é sensível à luz. Quando misturado ao meio conservar a 4°C em frasco âmbar.

Meio RPMI completo com HT

Meio RPMI completo 100 mL
Meio suplemento HT
(Sigma, EUA) 2 mL

HT aliquotar e conservar a -20oC. Quando misturado ao meio conservar a 4°C.

8.6 Preparo de macrófagos peritoneais

Solução de Dextrose 10%:

Dextrose 5 g
DMEM 50 mL

8.7 Coleta de linfócitos

Solução de Lise de Hemáceas:

NH₄Cl 8,29 g
KHCO₃ 1 g
EDTA 0,0372 g
Água MilliQ q.s.p. 1000 mL

8.8 Imunofluorescência

Tampão PBS pH 7,4

NaCl 7,2 g
Na₂HPO₄ 1,48 g
NaH₂PO₄ 0,43 g
Água MilliQ q.s.p. 1000 mL

8.9 Eletroforese

Tampão de corrida

Tris	6,06 g
Glicina	28,8 g
SDS	2 g
Água MilliQ q.s.p.	2000 mL

Tampão de amostra

SDS	0,23 g
Tampão do gel de concentração	1,25 mL
Glicerol	2 mL
2 mercaptoetanol	0,5 mL
Azul de bromofenol	400 µL
Água MilliQ q.s.p.	10 mL

Tampão do gel de concentração pH 6,8

Tris	12,10 g
SDS	0,80 g
Água MilliQ q.s.p.	100 mL
Acertar o pH para 6,8 com HCl 5N	

Tampão do gel de resolução pH 8,8

Tris	36,33 g
SDS	0,80 g
Água MilliQ q.s.p.	100 mL
Acertar o pH para 8,8 com HCl 5N	

Solução estoque de acrilamida

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

Gel de acrilamida 12%

Sol. estoque de acrilamida	12 mL
Tampão do gel de resolução	3,75 mL
SDS 10%	300 µL
Água MilliQ q.s.p.	13,28 mL
Persulfato de amônio 10%	150 µL
TEMED	15 µL

Gel de concentração

Sol. estoque de acrilamida	1,6 mL
T. do gel de concentração	1,25 mL
SDS 10%	100 µL
Água MilliQ q.s.p.	7,34 mL
Persulfato de amônio 10%	300 µL
TEMED	10 µL

Solução corante azul de Coomassie

Coomassie blue G-250	1 g
Ácido perclórico 70%	99 mL

Solução fixadora e descorante

Metanol	100 mL
Ácido acético	70 mL
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

8.10. Western blotting**Tris glicina, buffer metanol**

25 mM tris	3,0275 g
192mM glicina	14,42 g
20% metanol	200 ml
H ₂ O dd qsp.	1000 ml

PBS pH 7,6 10X

KH ₂ PO ₄	4,8 g
NaCl	85 g
Na ₂ HPO ₄	85,7 g
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

Substrato para peroxidase

DAB (diaminobenzidina)	10 mg
TRIS 50mM pH=7,6	10 mL
Cloreto de níquel 0,3%	1 mL
H ₂ O ₂ 30%	10 mL