

Joely Ferreira Figueiredo

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PAINEL DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS E IDENTIFICAÇÃO DE
ANTÍGENOS DE *Babesia bovis***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária.
Área: Medicina Veterinária
Preventiva
Orientadora: Profa. Lygia Maria
Friche Passos

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1997



MV-00008272-1

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

18/09/97

1892997-04

F475p Figueiredo, Joely Ferreira, 1971-

Produção e caracterização de painel de anticorpos monoclonais e identificação de antígenos de *Babesia bovis* / Joely Ferreira Figueiredo. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1997.

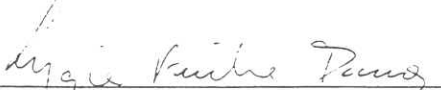
p. 106: il.

Dissertação (mestrado)

1. Babesiose em bovinos - Teses. 2. Anticorpos monoclonais - Teses. 3. Imunofluorescência - Teses. 4. Ensaio imunoenzimático - Teses. I. Título.

CDD - 636.208 963 6

Dissertação defendida e aprovada em 13 de junho de 1997 pela
Comissão Examinadora constituída por



Prof. Lygia Maria Friche Passos



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro



Prof. Maria Sônia Martins



Prof. Ricardo Wagner de Almeida Vitor



*“ Não basta saber,
é preciso aplicar.
Não basta querer,
é preciso agir.”*

(Goethe)

DEDICO

Aos meus pais que revestem minha existência de amor, carinho e dedicação, que abriram a porta do meu caminho, oferecendo-me a luz mais brilhante deste universo: o estudo; que não são apenas pais, mas companheiros e amigos.

Às minhas irmãs Jonisy e Josely, que dividem comigo todas as alegrias, dificuldades e tristezas, que me deixam mais feliz pelo simples fato de existirem.

Ao Eustáquio, por fazer parte da minha vida, por estar sempre presente com um sorriso, gestos de carinho e amor, palavras de incentivo, estímulo e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me proporcionar muito mais do que mereço.

À professora Lygia Maria Friche Passos, pela confiança, orientação e ensinamentos.

“O que caminha à sombra do tempo rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura. Se ele for verdadeiramente sábio, não nos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas nos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente.”
Khalil Gibran

Aos professores Múcio Flávio Barbosa Ribeiro e Maria Sônia Martins, pela orientação e inestimável colaboração.

Aos professores José Divino Lima, Dagmar Diniz Cabral, Júlia Maria Costa-Cruz, Antônio Pinho Marques Júnior, Ricardo Wagner de Almeida Vítor e Cláudio Roberto Madruga pela compreensão, colaboração e amizade.

À professora Sueli Cristina de Almeida Ribeiro que me apoiou e incentivou a seguir esse caminho, meu muito obrigada.

Aos demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Aos professores da Universidade Federal de Uberlândia que me ensinaram a amar cada vez mais a Veterinária, pelo apoio e amizade.

Às amigas Rita e Maria José, pelos excelentes momentos de convivência, e amizade.

À amiga Valeska que me apoiou nos momentos mais difíceis desta jornada, com alegria e carinho.

Aos funcionários Ricardo, Nilda, Cláudia, Heloísa, D. Sônia e Nádia pelo apoio e convivência agradável.

Aos amigos Maria das Mercês e André pela inestimável ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos de pós-graduação: Magda, Brasilina, Éricka, Anna Christina, Márcia, Márcio, Santa Rosa, pela amizade e agradável convívio.

Ao amigo Rodrigo pela amizade nos momentos mais difíceis.

À amiga Wanny que sempre esteve presente com palavras amigas e carinho.

À minha amiga Ana Sacco pelos valiosos ensinamentos e amizade.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ministério da Educação e do Desporto - CAPES - MEC, pela bolsa de estudos concedida.

A todos os amigos cuja presença e convívio fortaleceram a concretização do meu ideal, tornando mais agradável o trabalho realizado.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Composição antigênica da <i>Babesia bovis</i>	22
2.2 Anticorpos monoclonais	25
2.3 Métodos de diagnóstico	31
2.3.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	32
2.3.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Local	39
3.2 Animais experimentais	39
3.3 Inóculo de <i>Babesia bovis</i>	39
3.4 Imunização dos camundongos	40
3.5 Produção de anticorpos monoclonais	40
3.5.1 Células de mieloma	40
3.5.2 Fusão celular	41
3.5.3 Seleção dos híbridos após fusão	42
3.5.4 Obtenção de macrófagos para monocamadas	42
3.5.5 Clonagem dos híbridos	43
3.5.6 Obtenção de sobrenadantes de cultura contendo anticorpos monoclonais	44
3.5.7 Produção de líquidos ascíticos dos anticorpos monoclonais	44
3.5.8 Congelamento das células produtoras de anticorpos monoclonais	44
3.5.9 Concentração dos sobrenadantes	45
3.6 Caracterização dos anticorpos monoclonais	45

3.6.1	Caracterização isotípica	45
3.6.2	Caracterização através do teste de ELISA	46
→ 3.6.3	Caracterização através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	47
3.6.4	Caracterização através de eletroforese em gel	48
3.6.4.1	SDS-PAGE.....	48
3.6.4.2	Coloração pela prata.....	49
3.6.4.3	Coloração pelo azul de comassie.....	50
3.6.4.4	Western blotting.....	50
4	RESULTADOS	53
4.1	Imunização dos camundongos BALB/c	53
4.2	Produção de anticorpos monoclonais	53
4.3	Produção de líquidos ascíticos dos anticorpos monoclonais.....	59
4.4	Caracterização dos anticorpos monoclonais	59
4.4.1	Caracterização isotípica	59
→ 4.4.2	Caracterização através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	59
→ 4.4.3	Caracterização através do teste de ELISA	61
→ 4.4.4	Caracterização através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	63
4.4.5	Caracterização através de Western blotting.....	64
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES	75
	SUMMARY	77
	APÊNDICE I	79
	APÊNDICE II	81
	APÊNDICE III	83
	APÊNDICE IV	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	pág.
TABELA 1 Denominação dos principais clones produtores de anticorpos monoclonais anti- <i>Babesia bovis</i>	55
TABELA 2 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti- <i>Babesia bovis</i> pela reação de imunofluorescência indireta.....	60
TABELA 3 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti- <i>Babesia bovis</i> em ELISA.....	62
TABELA 4 Pesos moleculares aproximados dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais anti- <i>Babesia bovis</i> em Western blotting	64
TABELA 5 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti- <i>Babesia bovis</i> em RIFI, ELISA e Western blotting	67
FIGURA 1 Via da síntese de purinas	28
FIGURA 2 Cultura de células de clone produtor de anticorpos monoclonais anti- <i>Babesia bovis</i> em microscópio invertido. (500x).....	54
FIGURA 3 Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos monoclonais.	57
FIGURA 4 Reação de imunofluorescência indireta dos anticorpos monoclonais frente ao antígeno de <i>Babesia bovis</i> (amostra brasileira). (400x).....	61
FIGURA 5 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do antígeno de <i>Babesia bovis</i> corado pela prata.....	63

FIGURA 6a	Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao antígeno de <i>Babesia bovis</i>	65
FIGURA 6b	Western Blotting com os anticorpos monoclonais frente ao antígeno de <i>Babesia bovis</i>	66



RESUMO

A babesiose bovina, causada pelas espécies *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, constitui fator limitante para o desenvolvimento da pecuária brasileira. As variedades climática e topográfica deste país implicam diversas situações epidemiológicas, que podem ser mensuradas através de testes imunodiagnósticos. Com o intuito de identificar antígenos de *Babesia bovis*, para uso potencial em testes imunodiagnósticos, um painel de anticorpos monoclonais foi produzido e caracterizado através de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e Western blotting. Após a fusão celular, os híbridos resultantes foram selecionados por RIFI, clonados, mantidos em cultivo celular e criopreservados em nitrogênio líquido. Doze clones produtores de anticorpos monoclonais reagiram com merozoíto todo de *B. bovis*, cinco reagiram com superfície de merozoíto e somente um clone reagiu com região polar de merozoíto. Em ELISA, todos os anticorpos monoclonais apresentaram-se positivos, sendo observada variação de densidade óptica de 0,365 a 0,502 (cut-off = 0,022). As bandas protéicas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais apresentaram pesos moleculares aproximados entre 162 a 19 kDa. Quatro clones reconheceram apenas um polipeptídeo (73 kDa), e outros quatro não se ligaram em nenhum polipeptídeo em Western blotting. Esses antígenos identificados possibilitarão o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos para estudos epidemiológicos, bem como a sua utilização como imunógenos na imunoprofilaxia da babesiose bovina no Brasil.

Palavras-Chave: Anticorpos monoclonais, reação de imunofluorescência indireta, ELISA e Western blotting.

1 INTRODUÇÃO

A babesiose bovina, também conhecida como piroplasmose, febre dos carrapatos, febre do Texas, tristeza parasitária, entre outras, é causada por várias espécies do protozoário intraeritrocitário do gênero *Babesia*. No Brasil, é causada principalmente por duas espécies, a *Babesia bovis* (Babes, 1888) e a *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), que, em condições naturais, são transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).

A classificação dessas espécies tem sido objeto de estudos durante vários anos, porém de acordo com Levine et al. (1988), a classificação da *Babesia* é a seguinte:

Filo: Apicomplexa
Classe: Aconoidasida
Ordem: Piroplasmosida
Família: Babesiidae
Gênero: *Babesia*

Esses hemoparasitas desenvolvem dentro dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado. A infecção inicia-se quando os esporozoítos de *Babesia* são inoculados durante a alimentação de carrapatos infectados. Esses invadem os eritrócitos e transformam-se em formas arredondadas denominadas trofozoítos. Posteriormente, sofrem divisões assexuadas (merogonia) originando estruturas piriformes denominadas merozoítos. Os merozoítos após multiplicação por divisão binária rompem a célula e invadem novos eritrócitos. Após a penetração no eritrócito ocorre novamente a transformação em trofozoíto reiniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado. Fêmeas de carrapatos ao alimentarem em

bovinos infectados ingerem eritrócitos contendo as formas parasitárias de *Babesia*. No intestino dos ixodídeos inicia-se o ciclo sexual. Após a fusão dos gametas há formação do zigoto que transforma-se em oocinetos invadindo as células epiteliais basofílicas do intestino, onde crescem e desenvolvem originando os esporocinetos. Esses esporocinetos rompem as células intestinais, caem na hemolinfa e invadem novas células do vetor iniciando ciclos de esporogonia. No ovário os oocinetos infectam os oócitos ocorrendo a transmissão transovariana da *Babesia*. Após a eclosão das larvas os esporocinetos ficam em estado de dormência até o início da fase parasitária que desencadeia a invasão de células das glândulas salivares, onde por esporogonia, originam os esporozoítos que são infectantes para o hospedeiro vertebrado (Friedhoff, 1988).

Esses parasitas são capazes de induzir doença clínica severa caracterizada por febre, anemia hemolítica, choque hipovolêmico e, freqüentemente, morte. A severidade dessa enfermidade está relacionada com a espécie e a amostra envolvida, sendo a *B. bovis* mais patogênica que a *B. bigemina*. A diferença de patogenicidade entre as duas espécies, provavelmente, deve-se ao fato da *B. bovis* ter histiotropismo visceral, causando distúrbios circulatórios generalizados com ativação do sistema de coagulação, liberação de peptídeos vasoativos, consumo de complemento, hipotensão, vasodilatação e hemólise terminal (Wright, 1979).

Nos países de clima tropical e subtropical, a babesiose constitui fator limitante para o desenvolvimento da pecuária. Na década de 60, essa enfermidade passou a ter maior importância devido à importação de animais. Os animais provenientes de áreas livres de carrapatos, ao serem introduzidos em áreas endêmicas, são infestados por ixodídeo e adquirem o hemoparasito, o que resulta em sérios problemas traduzidos pelas altas taxas de mortalidade (Kuttler, 1988), perdas na produção de carne e leite, elevados custos de medidas profiláticas e de controle da doença, além da dificuldade de expansão das bacias leiteiras de alta produtividade

devido à restrição ao fluxo de animais geneticamente superiores (McCosker, 1981).

Atualmente, as novas práticas de manejo, como o sistema "free stall", o aleitamento artificial de bezerros, o uso indevido de carrapaticidas, têm propiciado o aparecimento de áreas de instabilidade enzoótica, devido ao restrito contato dos animais com os vetores.

O Brasil apresenta grande variedade climática e topográfica, o que resulta variadas situações epidemiológicas. Portanto, a distribuição geográfica, a importância econômica das babesioses bovinas e a avaliação de diferentes medidas de controle só podem ser avaliadas através de estudos epidemiológicos que determinem a incidência e a prevalência dessa enfermidade.

Métodos de diagnósticos precisos, sensíveis e específicos, são essenciais para a execução desses estudos e estabelecimento de medidas adequadas de controle. Vários testes sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico das hemoparasitoses, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Ross & Löhr, 1968; Leeflang & Perié, 1972), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Bidwell et al., 1978; Waltisbuhl et al., 1987), entre outros.

Os antígenos de *Babesia* são produzidos a partir de sangue de animais experimentalmente infectados ou de suspensões de hemácias parasitadas mantidas em cultivo celular. Devido à contaminação dos antígenos por componentes celulares do hospedeiro, ocorrem reações inespecíficas já que, as babesias se desenvolvem dentro dos eritrócitos (Wright et al., 1983). Esse fato revela a necessidade de obter antígenos purificados em substituição à antígenos brutos, no intuito de melhorar a qualidade dos testes diagnósticos, diminuir as reações cruzadas e melhor entender a situação epidemiológica das babesioses.

A discriminação entre essas duas espécies de *Babesia* é importante nos estudos sobre a ocorrência das espécies em uma determinada área e nos programas de imunização. Hoje, as pesquisas para a obtenção de vacinas eficientes são cada vez mais frequentes e, sabendo-se qual espécie de *Babesia* ocorre em determinada área, tornar-se-á possível a produção de vacinas espécie-específicas, diminuindo, dessa forma, o custo dos processos de imunização.

Com o advento da tecnologia dos anticorpos monoclonais, tornou-se possível utilizá-los para a análise dos complexos componentes antigênicos da *B. bovis* (Wright et al., 1983, Goff et al., 1988). Essa técnica foi descrita por Kohler & Milstein (1975). Linfócitos B de camundongos imunizados com hemácias de carneiro foram fusionados com células de mieloma de camundongo, obtendo-se um produto (hibridoma), que mantinha as propriedades de secretar anticorpos contra as hemácias de carneiro e o crescimento indefinido das células de mieloma. Os clones derivados desses hibridomas eram homogêneos e secretavam anticorpos com afinidade por um epítipo específico do antígeno.

Através dessa técnica, anticorpos monoclonais têm sido produzidos contra as várias amostras de *B. bovis*, com o objetivo de identificar e isolar proteínas específicas e relevantes para estudos de imunoproteção e imunodiagnósticos (Wright et al., 1983, Goff et al., 1988).

Vários antígenos de pesos moleculares, variando de 16 a 250 kDa (Goff et al., 1988, Hines et al., 1989, Reduker et al., 1989, Wright et al., 1983), foram identificados e podem-se perceber variações antigênicas entre amostras de *B. bovis* de diferentes localidades geográficas (Palmer et al., 1991, Suarez et al., 1991). Esses anticorpos estão sendo utilizados para isolar antígenos desse hemoparasito (Cowman et al., 1984, Suarez et al., 1991, Hines et al., 1992, Jasmer et al., 1992, Dalrymple, 1993) com a finalidade de

sequenciá-los e desenvolver vacinas recombinantes através de técnicas de engenharia genética (Dalrymple, 1993).

Sabendo-se da importância econômica dessa enfermidade, vários pesquisadores estão utilizando testes diagnósticos como ELISA e RIFI para determinar a prevalência da babesiose em diferentes estados (Madruga et al., 1983; 1986, Patarroyo et al., 1987, Martins et al., 1994), avaliar respostas imunes após medidas de imunização, bem como caracterizar áreas de estabilidade e instabilidade enzoótica (Patarroyo et al., 1987).

Entretanto, o valor epidemiológico desses estudos é limitado, visto que não há avaliação dos fatores inerentes ao animal, como, por exemplo, raça, idade, queda de imunidade devido à redução do número de carrapatos e dos fatores ambientais como manejo, controle dos carrapatos, variações climáticas, tipo de pastagens, etc (Alonso et al., 1992), além da reação cruzada existente entre *B. bovis* e *B. bigemina*. Portanto, estudos epidemiológicos utilizando testes diagnósticos mais precisos são necessários para determinar a real situação dessa enfermidade, os seus efeitos sobre a produção bovina e as medidas de controle específicas à nossa situação.

Pelo acima exposto, torna-se imprescindível a produção de um painel de anticorpos monoclonais contra amostras de *B. bovis*, o que permitirá o isolamento e a purificação de antígenos específicos desse hemoparasito (Kohler & Milstein, 1975).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir um painel de anticorpos monoclonais para identificar e caracterizar antígenos específicos de *B. bovis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Composição antigênica da *Babesia bovis*

A composição e a variedade antigênica da *B. bovis* têm sido objeto de estudo de muitos pesquisadores. Através desses estudos, torna-se possível definir antígenos específicos responsáveis pela indução de imunidade protetora e o desenvolvimento de métodos de imunização contra *B. bovis*, bem como observar as variedades antigênicas desse hematozoário.

Os primeiros trabalhos mostrando a variedade antigênica desse hemoparasito foi realizado por Curnow (1968, 1973), quando trabalhava com o teste de aglutinação utilizando hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos de *B. bovis*.

No intuito de demonstrar a composição protéica de diferentes populações de parasitos Kahl et al. (1982, 1983), utilizaram a técnica de eletroforese em gel bi-dimensional para separar as proteínas dos eritrócitos infectados marcados biosinteticamente. Após esse estudo, puderam concluir que alguns antígenos de diferentes populações diferenciavam entre si devido à composição de aminoácidos, e essas diferenças protéicas propiciavam uma maior ou menor virulência do parasito. A análise genética da *B. bovis* através de sondas de DNA permitiu distinguir características de vários isolados e indicar sua composição como sendo uma mistura heterogênea de sub-populações (Cowman et al., 1984).

McElwain et al. (1988) realizaram um trabalho na tentativa de identificar antígenos de superfície de merozoítos de *B. bovis* para

posterior utilização em programas imunoproliféricos. Através do teste de imunoprecipitação, utilizando antígenos mantidos em cultivo celular radiomarcados com ^{35}S -metionina e soro policlonal, identificaram oito proteínas com pesos moleculares, variando de 14,5 a 200 kDa, sendo que a proteína de 42 kDa mostrou ser específica de *B. bovis*.

Goff et al. (1988), utilizando a técnica de imunofluorescência indireta de merozoítos livres e imunoprecipitação de proteínas de superfície de merozoíto, marcadas com ^{125}I através de anticorpos policlonais e monoclonais, identificaram quatro proteínas com pesos moleculares de 37, 42, 60 e 85 kDa. As proteínas de 37 e 42 kDa mostraram ser de superfície de merozoíto, enquanto a de 60 kDa parecia ser de região polar e só ocorria em 5% dos merozoítos viáveis. A exata localização da proteína de 85 kDa não foi determinada.

Outras proteínas foram identificadas através de anticorpos monoclonais produzidos contra *B. bovis* com pesos moleculares de 16, 42, 44, 60 e 225 kDa. Esses anticorpos monoclonais foram utilizados por Reduker et al. (1989), para seqüenciar o DNA desse protozoário, o que resultou na identificação de dois clones recombinantes, que codificavam a proteína de 44 kDa.

A proteína de peso molecular de 44 kDa também foi identificada por imunoabsorção através do anticorpo monoclonal 15B1 e mostrou induzir imunidade homóloga protetora em animais esplenectomizados (Wright et al., 1983). Goodger & Wright (1983) analisaram eluatos de eritrócitos infectados com *B. bovis* através de Western blotting e identificaram quatro antígenos com pesos moleculares de 120, 190, 280 e 380 kDa. Ao analisar esse material em imunofluorescência, podem-se perceber proteínas de membranas de eritrócitos não infectados e proteínas, que se localizavam nos parasitos e na matriz interna dos eritrócitos infectados.

Goodger et al. (1984), trabalhando com duas frações de *B. bovis* em imunizações de bovinos susceptíveis, obtidas de lisados de eritrócitos

infectados, filtrados em gel (Sephadex 200), observou diferenças entre as duas, ao analisá-las em Western blotting. A primeira fração apresentava seis bandas reativas com pesos moleculares variando de 27 a 300 kDa enquanto que a segunda apresentava quatro bandas com pesos moleculares de 70, 60, 44 e 27 kDa. Goodger et al. (1986) trabalhando com a segunda fração em programas de imunização, observaram um baixo desenvolvimento de resposta imune em bovinos susceptíveis.

Wright et al. (1985) purificaram um antígeno de lisado de eritrócitos infectados com *B. bovis* de 29 kDa através de gel de acrilamida e usaram-no em imunização de bovinos susceptíveis. Proteção parcial foi observada, ao desafiar esses animais com amostras homólogas de *B. bovis*.

Commins et al. (1985) também isolaram duas proteínas de 22 e 70 kDa de lisado de eritrócitos infectados por *B. bovis* e as usaram em programas de imunização de bovinos. Essas proteínas mostraram ser protetoras, quando os animais eram desafiados com amostras virulentas do hemoparasito.

Goodger et al. (1987) obtiveram lisado de eritrócitos infectados por *B. bovis* através de ultracentrifugação e usaram-no na imunização de bovinos esplenectomizados. Após desafio com amostras homólogas, pode-se perceber que estas proteínas conferiram imunidade protetora a esses animais. A análise em Western blotting revelou proteínas de 180, 140 e 135 kDa.

Com o surgimento de novas técnicas, como a técnica de DNA recombinante, outras proteínas de *B. bovis* passaram a ser reconhecidas (5-10 kDa, 220 kDa). Essas proteínas foram utilizadas em imunizações, porém sem sucesso, visto que os animais, quando desafiados com amostras heterólogas virulentas, não se apresentavam protegidos. A proteína de 220 kDa localiza-se na região apical do merozoíto (Timms & Barry, 1988).

Em um estudo realizado por Goodger et al. (1990), utilizando eritrócitos marcados com ^{14}C , sugeriram que a resposta imune era formada contra lipídeos de *Babesia* e estes estavam compreendidos entre as bandas de 12 a 18 kDa. Animais susceptíveis, inoculados com esse material, apresentaram redução da parasitemia, quando comparados com animais sem imunização, desafiados com amostras heterólogas virulentas.

Outra fração de *B. bovis*, rica em lipídeos, isolada de eritrócitos infectados, mostrou atividade antigênica em ELISA. O teste de imunofluorescência indireta revelou que essa fração era associada ao parasito e a eritrócitos infectados e não estava presente em eritrócitos não infectados, reações cruzadas foram observadas entre *B. bovis* e *B. bigemina*, sugerindo ser devido aos lipídeos ou a associações de lipídeos aos antígenos (Orinda et al., 1992).

2.2 Anticorpos monoclonais

A era dos anticorpos monoclonais começou com dois pesquisadores Kohler & Milstein (1975), que publicaram um trabalho sobre fusão de células de mieloma com células esplênicas (linfócitos B) de animais imunizados (hibridização), sendo esses híbridos capazes de produzir anticorpos específicos direcionados ao imunógeno pre-definido. Essa descoberta de produção de quantidades ilimitadas de anticorpos específicos para um particular determinante antigênico tem revolucionado os campos de pesquisa.

A hibridização celular permite dissecar o complexo da resposta humoral em seus componentes individuais. A técnica baseia-se na fusão celular, em que, as células fusionadas passam a exibir características de ambas as células parentais, ou seja, cada híbrido pode secretar anticorpos de especificidade determinada pelo doador imune e também ser imortal, característica cedida pelas células de mieloma (Antczak, 1982).

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) pode ser usado no processo, porém os camundongos BALB/c têm sido os animais de eleição para receberem as imunizações (Liddell & Cryer, 1991).

Os protocolos de imunizações 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 completo ou incompleto de Freund, sendo os intervalos de inoculação de duas a quatro semanas (Liddell & Cryer, 1991, Goding, 1980, Campbell, 1991). 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 estabelecidas, 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 SP₂O (Shulman et al., 1978), X63/Ag 8.653 e a NSO/U (Kearney et al., 1979).

A linhagem SP₂O é a mais utilizada para a produção de hibridomas, visto que pode ser fusionada com o polietilenoglicol por ser este

processo tecnicamente mais fácil que o Sendai vírus ou mesmo o SV 40.

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 (células esplênicas - células de mieloma) ter um crescimento ótimo em meio de cultura, os outros híbridos precisam ser eliminados.

As linhagens de células de plasmocitoma têm sido selecionadas na presença de drogas cuja base seja análoga à 8-azaguanina e 6-tioguanina. As células mutantes sobreviventes possuem um gene defeituoso para codificar 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 selvagem para a síntese de ácidos nucleicos (Abbas et al., 1994, Kelley & Lewin, 1986).

Pelo exposto, pode-se concluir que as células esplênicas normais têm um ciclo de vida limitado em meio de cultura, portanto, morrem naturalmente nessas condições (Antczak, 1982, Goding, 1980, Kelley & Lewin, 1986). Por outro lado, as 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 (1964), que é baseado na deficiência da enzima HGPRT'ase na célula de mieloma necessária para a síntese de ácidos nucleicos.

Uma célula animal normal sintetiza nucleotídeos de purina e timidilato 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 tetrahidrofolato ativado.

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.

Após a fusão, células multinucleadas são 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 serão selecionadas através de testes diagnósticos e posteriormente clonadas e propagadas em meio de cultura ou mesmo em camundongos BALB/c, onde poderão crescer como ascite ou tumor sólido (Blann, 1979; Yoshida et al., 1980).

A etapa de seleção dos híbridos positivos é uma das etapas 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, porquanto, 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, 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 relevantes, isto porque muitos anticorpos reagem com estruturas conformacionais (Liddell & Cryer, 1991). Maiores detalhes sobre testes diagnósticos estão descritos na seção 2.3.

A etapa de clonagem tem por finalidade isolar apenas uma célula secretora de anticorpo das milhares de outras células presentes no meio

de cultura, para que a linhagem de célula de 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, amostras são estocadas em nitrogênio líquido, enquanto outras amostras são propagadas em meio de cultura ou *in vivo* (BALB/c) para a obtenção de quantidades ilimitadas de anticorpos monoclonais (Campbell, 1991, Goding, 1980, Kelley & Lewin, 1986, Liddell & Cryer, 1991). Segundo Campbell (1991), todas as etapas realizadas *in vitro* têm melhor desenvolvimento, se são acrescentadas monocamadas de macrófagos para promover a limpeza das culturas.

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 & 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.

Essa técnica de hibridização é uma importante ferramenta para a produção de anticorpos monoclonais contra parasitos como a *B. bovis*. Wright et al. (1983) isolaram antígenos protetores, utilizando anticorpos monoclonais, Goff et al. (1988) identificaram antígenos de superfície de merozoítos, usando anticorpos monoclonais e Madruga et al. (1996) observaram a conservação de epítomos comuns entre amostras do Mato Grosso do Sul de *B. bovis* e *B. bigemina* utilizando anticorpos monoclonais desenvolvidos contra amostra México.

2.3 Métodos de diagnóstico

Os métodos diagnósticos para a babesiose têm sido objeto de estudo de muitos pesquisadores.

O primeiro teste utilizado como diagnóstico foi o esfregaço sanguíneo, corado pelo Giemsa ou outros corantes, cujo objetivo era a identificação direta do parasito com auxílio de microscópio óptico. Esse método ainda hoje é utilizado para o diagnóstico das babesioses bovinas agudas, sendo que o esfregaço é feito a partir sangue de capilares periféricos (animal vivo), ou, quando o animal está morto, opta-se por órgãos como os rins, cérebro, baço e fígado (Ristic, 1988). Porém as dificuldades desse teste referem-se ao intensivo trabalho, ao tempo consumido e aos resultados falso negativos (Mahoney & Saal, 1961, Ristic, 1988). Outro fator refere-se também à dificuldade de detecção de parasitos em portadores crônicos (Reiter & Weiland, 1989).

Uma alternativa encontrada para esse problema foi a detecção indireta desse parasito, através da demonstração de anticorpos contra *Babesia*, presentes no soro do animal, utilizando teste sorológicos.

Vários testes sorológicos têm sido empregados na demonstração de anticorpos como o teste de fixação de complemento, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, aglutinação em látex, precipitação em gel, entre outros. Segundo Todorovic & Carson (1981), os testes mais utilizados são: imunofluorescência indireta e ELISA. Cada teste tem suas vantagens e desvantagens, dependendo do nível de sensibilidade, especificidade, simplicidade e custo efetivo (Ristic, 1988).

Os testes diagnósticos indiretos são muito utilizados em estudos epidemiológicos da babesiose bovina, visto que detectam anticorpos específicos em animais portadores. Esses testes sorológicos também são utilizados no monitoramento da eficiência terapêutica das drogas babesicidas, dos níveis de resposta humoral em animais premunidos e a

eficiência dos imunógenos empregados nos programas de vacinação (Ristic, 1988).

2.3.1 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A reação de imunofluorescência indireta tem sido amplamente utilizada no diagnóstico sorológico de inúmeras protozooses humanas e animais (Leeflang & Perié, 1972), tendo seu princípio baseado na detecção do complexo antígeno-anticorpo através de anti-imunoglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína.

Esse teste apresenta vantagens por ser rápido, de fácil execução, alta sensibilidade e relativa especificidade, mas apresenta limitações no que se refere à subjetividade de interpretação dos resultados, número limitado de amostras examinadas e um "background" fluorescente, devido à ligações não específicas das imunoglobulinas marcadas com contaminantes (debris celulares), o que leva a leituras erradas (falsos positivos), (Callow et al., 1974).

A sensibilidade e especificidade desse teste varia de acordo com a natureza da preparação antigênica empregada. Normalmente, os antígenos são produzidos a partir de sangue de animais experimentalmente infectados ou suspensões de hemácias parasitadas mantidas em cultivo celular. A reação cruzada entre *B. bovis* e *B. bigemina* também é observada, principalmente com antígenos de *B. bigemina* (Bessenger & Schoeman, 1983), mas a presença dessas reações cruzadas não afeta o valor dessa técnica para a diferenciação das espécies (Leeflang & Perié, 1972).

Essa técnica foi descrita como ferramenta de diagnóstico para detectar anticorpos contra *B. caballi* em cavalos com infecção latente, o que possibilitou estudar os vários estágios de crescimento e desenvolvimento das babesias dentro dos eritrócitos, bem como a estrutura morfológica desse parasito (Ristic et al., 1964; Ristic & Sabinovic, 1964).

Garnham & Voller (1965) utilizaram a imunofluorescência para estudar a resposta imune de macacos esplenectomizados e infectados com *B. divergens*. Madden & Holbrook (1968) detectaram anticorpos em cavalos experimentalmente infectados com *B. caballi*, e não observaram a ocorrência de reação cruzada, quando o teste era realizado com soro de animais infectados com *B. equi*. A partir de então, os anticorpos fluorescentes passaram a ser extensivamente aplicados no diagnóstico de babesioses bovinas, equinas e caninas.

Ross & Löhr (1968) utilizaram a RIFI para a detecção de anticorpos anti-*B. bigemina* em soro bovino. O teste foi considerado específico, com alta acurácia e sensível para a detecção de animais previamente infectados (2 anos). Nesse trabalho, foi possível observar reação na diluição 1:1280 em animais após o 21º dia de infecção, a queda gradual do título a partir dos seis meses, e, entre os 18 e 24 meses, ainda era possível detectar alguns baixos títulos nos animais infectados experimentalmente.

Ross & Löhr (1970) utilizaram a RIFI para estudar a persistência dos anticorpos colostrais de *B. bigemina* em bezerros e observaram que os títulos eram mais elevados nos animais com um mês de idade do que nos animais adultos (vacas leiteiras). Esses anticorpos colostrais persistiram durante 17 semanas após o nascimento.

Brocklesby et al. (1971) utilizaram a RIFI para diferenciar a *Babesia* spp (Inglaterra) da *B. major*. Amostras de soros colhidas de animais infectados com *Babesia* spp e submetidas a RIFI, empregando antígenos de *B. major*, apresentaram forte reação com títulos variando de 320 a 2560. Os soros apresentaram maior reação frente aos antígenos de *B. bigemina*, com títulos variando de 40 a 160. Este trabalho teve por finalidade identificar a *Babesia* larga do gado Britânico como sendo amostra da *Babesia major*.

Os trabalhos utilizando RIFI para a observação da relação antigênica entre as babesias passaram a ser freqüentes e importantes. Ludford et al. (1972) observaram a relação antigênica, através de reações cruzadas, entre a *B. argentina*, *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*. Leeftang & Perié (1972) descreveram sobre a relação antigênica de quatro babesias (*B. bigemina*, *B. major*, *B. argentina* e *B. divergens*), utilizando antígenos homólogos e heterólogos, sendo que os títulos obtidos nos antígenos heterólogos mostraram-se sempre menores que nos antígenos homólogos.

Até o ano de 1972, o teste era realizado utilizando soros obtidos de animais através de punção na veia jugular. Burr ridge et al. (1973) propuseram o uso do papel de filtro para a colheita do sangue dos animais, sendo que este serviria como fonte para a detecção de anticorpos anti-*B. bigemina* através de RIFI. Observaram uma alta correlação entre os títulos de anticorpos no soro e no sangue em papel de filtro e sugeriram o seu uso em estudos epidemiológicos por serem mais fáceis de manusear, transportar e armazenar (Burr ridge et al., 1973; Todorovic & Garcia, 1978).

Kuttler et al. (1977) compararam a RIFI com o teste de fixação de complemento para a detecção das babesioses bovinas (*B. bigemina*). Concluíram que ambos os testes eram eficientes para detectar anticorpos durante os primeiros 84 dias de infecção, porém, após 90 dias de infecção, os níveis dos títulos de anticorpos em RIFI continuaram persistindo, enquanto que na fixação de complemento observaram uma queda no título. Todorovic & Long (1976) também concluíram que a RIFI é mais sensível que a fixação de complemento para o diagnóstico da *B. bovis*, pois a detecção de anticorpos ocorre duas semanas mais cedo.

Com o surgimento do teste de ELISA, os pesquisadores Bidwell et al. (1978) realizaram um trabalho comparando o teste de fixação de complemento, RIFI e ELISA, para o diagnóstico de *B. major* e *B. divergens*. Observaram que os três testes poderiam detectar anticorpos



contra as babesias, sendo que o teste de fixação de complemento detectava anticorpos mais cedo, mas com títulos de anticorpos menores em relação àqueles obtidos nos outros testes (ELISA e RIFI). Os resultados encontrados entre a RIFI e ELISA foram semelhantes, o que permitiu inferir que os dois testes são adequados para demonstrar a presença de infecção com *B. divergens* e *B. major*, porém o teste ELISA deve ser o de escolha já que a leitura não é subjetiva e um maior número de amostras são analisadas.

Após a realização desses trabalhos, a RIFI passou a ser empregada em trabalhos relacionados com a área de biotecnologia. Wright et al. (1983) utilizaram essa técnica para selecionar clones secretores de anticorpos monoclonais específicos contra *B. bovis*. Goff et al. (1988) utilizaram-na para demonstrar o local de ligação dos anticorpos monoclonais nos antígenos de *B. bovis*, o que permitiu concluir, por exemplo, que as proteínas de 42 e 37 kDa estão presentes em todos os merozoítos viáveis e por toda a superfície do organismo e que somente 5% dos merozoítos apresentaram reação na sua região polar no que se refere a proteína de 60 kDa.

No intuito de identificar antígenos de superfície de *B. bigemina* utilizando anticorpos monoclonais, Figueroa et al. (1990) utilizaram a RIFI para observar a especificidade da reação e concluíram que a RIFI definiu o local de ligação antígeno-anticorpo monoclonal, tão bem quanto a microscopia imunoeletrônica.

2.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O teste de ELISA baseia-se na reação antígeno-anticorpo, sendo utilizados como suporte placas de poliestireno (Voller et al., 1976). 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.

Essa técnica foi utilizada primeiramente por Engvall & Perlmann (1972), no intuito de detectar anticorpos. Esses autores consideraram-na muito sensível e econômica.

Purnell et al. (1976) mostraram ser esse teste adequado para a detecção de anticorpos anti-*Babesia*. A detecção indireta de anticorpos anti-*B. bovis* passou a ser empregada com frequência (Barry et al., 1982, Waltisbuhl et al., 1987, Böse et al., 1990).

A maior dificuldade desse teste refere-se à padronização dos estágios envolvidos na técnica, ou seja, diluição de antígeno e conjugado, bem como a discriminação (cut-off) entre soros positivos e negativos (Voller et al., 1979). Apesar desses entraves, o teste ELISA tem sido empregado pelo fato de ocorrer menor erro de leitura (leitura espectrofotômetro) comparado com o teste de imunofluorescência (leitura subjetiva), além de um maior número de amostras poder ser examinado (Bidwell et al., 1978).

A determinação dos níveis de discriminação entre os soros positivos e negativos (cut-off) pode ser calculada de diferentes modos, ou seja, através da média das absorvâncias dos soros negativos multiplicada duas ou três vezes; média das absorvâncias dos soros negativos acrescida de dois ou três desvios padrões, ou pode ser determinada arbitrariamente utilizando um nível de absorvância entre 0,15 a 0,20 (Tijssen, 1985).

Barry et al. (1982) desenvolveram o teste de ELISA para detectar anticorpos anti-*B. bovis*, utilizando como antígeno sangue infectado com 20% de parasitemia, concentrados por lise das hemácias com cloreto de potássio 0,425% e, como conjugado, utilizaram a fosfatase alcalina. Quando comparado o teste de ELISA com a RIFI, pode-se observar 95% de concordância entre os dois testes, porém, o ELISA mostrou ser mais específico em relação às reações cruzadas entre *B. bovis*, *B. bigemina*, *Anaplasma centrale* e *Theileria*, e mais sensível.

Em relação à produção dos antígenos para o teste ELISA, Melrose & Brown (1979) promoveram a concentração dos eritrócitos infectados com *B. bovis* através de lise hipotônica com cloreto de potássio, pois as hemácias infectadas são osmoticamente mais resistentes que as hemácias não infectadas. Após a centrifugação e a retirada dos debris celulares dos eritrócitos lisados, o material foi submetido à sonicação no intuito de destruir as hemácias infectadas, resultando, desta forma, um extrato solúvel usado como antígeno. Através desse trabalho, puderam concluir que as reações cruzadas com *B. bovis* eram menores apesar de serem detectáveis e não interferiam na interpretação dos resultados dos testes.

Como todo teste diagnóstico existente para babesiose, o maior empecilho refere-se ao antígeno utilizado. Na tentativa de melhorar a performance do teste de ELISA, um grupo de pesquisadores obtiveram uma fração purificada de lisado de eritrócitos infectados com *B. bovis* (fração dois), utilizando a filtração em gel (Sephadex G200). Essa amostra mostrou-se sensível e específica na detecção de anticorpos (IgM e IgG) anti-*B. bovis*, porém apresentava reações cruzadas com soros positivos para *Anaplasma marginale* (Waltisbuhl et al., 1987). Outro objetivo desse trabalho foi o de determinar o conjugado e o respectivo substrato mais adequado para a detecção de anticorpos anti-*B. bovis*. Após testar quatro enzimas, pôde-se concluir que o método mais adequado era com a peroxidase.

Com o mesmo intuito, Spencer (1988) observou que o uso de substâncias bloqueadoras como detergentes e proteínas, em uma fase anterior à adição dos soros testes, reduziam o *background* de absorvância, visto que essas substâncias ligavam-se em sítios reativos não específicos.

Atualmente, com a engenharia genética, antígenos recombinantes (11C5) têm sido utilizados no teste de ELISA, objetivando a redução de reações não específicas, pois não há presença de restos celulares do hospedeiro, porém observam baixa sensibilidade com alguns soros

positivos que, possivelmente, pode ser corrigida através da utilização de dois ou mais antígenos recombinantes (Böse et al., 1990).

Outra maneira de melhorar a especificidade do teste é através do uso de anticorpos monoclonais (IgG) como conjugados em substituição aos conjugados convencionais. Essa etapa foi analisada por Böse et al. (1990) os quais concluíram que as reações não específicas foram abolidas, quando utilizavam anticorpos monoclonais como conjugado.

Kung'u & Goodger (1990) desenvolveram uma variação da técnica de ELISA denominada "Slide enzyme-linked immunosorbent assay (SELISA) para a detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, tornando-a mais econômica e simples. Essa técnica tem o mesmo princípio da técnica convencional, o que muda é o suporte da reação, ou seja, neste caso, utiliza-se uma lâmina onde o esfregaço é fixado com acetona e estocado a -70°C . Anticorpos monoclonais foram testados com a finalidade de demonstrar a especificidade do teste e concluiu-se que o SELISA é muito sensível, detecta anticorpos anti-*B. bovis* por até 36 meses e é um teste adequado para a seleção de hibridomas, em que os anticorpos podem ser selecionados tanto pela avidéz quanto pela sua especificidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Híbridomas e Imunologia de Parasitoses do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2 Animais experimentais

Foram utilizadas 50 fêmeas de camundongos BALB/c, de 30-40 dias de idade com peso aproximado de 20 gramas, fornecidas pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para a produção dos anticorpos monoclonais.

3.3 Inóculo de *Babesia bovis*

O antígeno de *B. bovis* utilizado foi produzido no Centre for Tropical Veterinary Medicine em Edinburgh - Escócia.

Hemácias parasitadas com *B. bovis* (amostra México), mantidas em cultivo celular, foram concentradas por lise diferencial com KCl e lisadas com NH₄Cl (Passos, 1993). O lisado final foi sonicado e o sobrenadante obtido após a centrifugação foi liofilizado e utilizado como antígeno (Passos et al., 1996).

3.4 Imunização dos camundongos

Foi feita conforme método descrito por Liddell & Cryer (1991). Foram imunizados cinco camundongos BALB/c com quatro doses do antígeno liofilizado (575 µg) reconstituído em 500 µl de água destilada. Na primeira inoculação, os animais receberam 10 µg de antígeno emulsionados com adjuvante completo de Freund por via subcutânea. As duas doses seguintes foram de 10 µg do antígeno em adjuvante incompleto de Freund, ministradas 15 e 30 dias após a primeira inoculação pela mesma via. Sete dias após, os camundongos foram sangrados, através do plexo retro orbital, com auxílio de pipeta de Pasteur, e o sangue, centrifugado para obtenção de soros. Os soros foram testados através de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os camundongos cujos soros estavam positivos à RIFI receberam a quarta inoculação de 10 µg do antígeno sem adjuvante por via endovenosa, quatro dias antes da fusão.

3.5 Produção de anticorpos monoclonais

A produção dos anticorpos monoclonais foi realizada conforme método utilizado por Kohler & Milstein (1975) e Berne (1994), com modificações.

3.5.1 Células de mieloma

Foram utilizadas células de mieloma da linhagem SP2/0, não secretoras de imunoglobulinas (Shulman et al., 1978).

Duas semanas antes da fusão, células de mieloma, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Após o descongelamento, as células foram colocadas em tubos contendo Dulbecco's Modified EAGLES Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 200 mM L-

glutamina, 100 UI penicilina e 100 µg/ml estreptomicina (DMEM-10) e centrifugadas a 4000 g por dez minutos. O sedimento foi ressuspensionado em DMEM-10 e as células contadas em câmara de Neubauer, sendo a viabilidade determinada com azul de tripan.

As células de mieloma foram mantidas em estufa a 37°C, a uma atmosfera de 5% de CO₂ e repicadas a cada 48-72 horas até que apresentassem crescimento exponencial. No dia anterior ao da fusão, as células foram repicadas a uma concentração de 5 x 10⁵ células por ml para frascos de 75 cm².

3.5.2 Fusão celular

Um camundongo BALB/c, previamente imunizado e selecionado por RIFI, foi sacrificado, o baço removido assepticamente e transferido para uma placa de Petri estéril contendo 5 ml de DMEM. Com auxílio de pinça e tesoura, o baço foi cortado em pequenos fragmentos e macerado com êmbolo de seringa sobre uma tela fina de aço inoxidável. As células esplênicas foram lavadas duas vezes por centrifugação a 4000 g, por dez minutos, com DMEM.

As células de mieloma, repicadas 24 horas antes, foram removidas dos frascos de cultura e lavadas três vezes em DMEM por centrifugação a 4000 g por dez minutos.

As células esplênicas foram misturadas com 10⁷ células de mieloma da linhagem SP2/0 (Shulman et al., 1978). A mistura de células foi centrifugada a 4000 g por dez minutos e, ao sedimento, adicionou-se lentamente 1 ml de solução de PEG 1500 (polietilenoglicol) a 50% (p/v) em DMEM, pré-aquecida a 37°C mantendo-se as células sob agitação suave e constante por um minuto.

Após um minuto de repouso, adicionaram-se 20 ml de DMEM, sendo 1 ml no intervalo de um minuto, sob agitação suave e os

outros 19 ml no intervalo de quatro a cinco minutos. A mistura foi centrifugada a 3200 g por dez minutos e, ao sedimento, adicionaram-se 100 ml de meio seletivo DMEM-HAT-20 (hipoxantina, aminopterina, timidina e 20% soro fetal bovino) e células totais do baço de camundongo não imunizado. A suspensão final foi distribuída em cinco placas de 96 orifícios (200 µl por orifício), seguindo-se incubação em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, com realimentação dos híbridos a cada três dias, por 10 a 13 dias com o meio seletivo DMEM-HAT-10.

A presença da aminopterina no meio teve como objetivo eliminar células não fusionadas ou resultantes de fusões homólogas. As células totais de baço de camundongo não imunizado foram utilizadas para promover a limpeza da cultura.

Após esse período, a realimentação foi feita com DMEM-HT-10 (10% de soro fetal bovino), por duas vezes e, após 20 dias, o meio DMEM-10 passou a ser utilizado para estimular o crescimento dos hibridomas.

3.5.3 Seleção dos híbridos após fusão

Os primeiros híbridos foram testados 13 dias após a fusão celular, quando os clones apresentavam crescimento relativo à 2/3 da superfície do orifício da placa. A observação foi feita através do microscópio invertido IMT-2 (Olympus).

A presença dos anticorpos contra o antígeno *B. bovis* no sobrenadante das culturas foi detectada por RIFI.

3.5.4 Obtenção de macrófagos para monocamadas

Camundongos BALB/c foram anestesiados com éter sulfúrico e desinfetados com etanol a 70%. Dentro de uma capela, previamente

descontaminada, com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas, procedeu-se à remoção da pele da região abdominal dos camundongos, com a finalidade de inocular na cavidade peritoneal 5 ml de DMEM, contendo 1 UI/ml de heparina. A região abdominal foi massageada, e o líquido peritoneal aspirado (agulha 40 x 12 mm) e centrifugado a 4000 g por dez minutos a 4°C.

As células obtidas na aspiração do líquido peritoneal foram ressuspensas em DMEM-10 e distribuídas em frascos ou placas de 96 orifícios e incubadas a 37°C e 5% de CO₂, 24 horas antes de serem utilizadas.

Os macrófagos obtidos foram adicionados às placas e aos frascos de culturas previamente à clonagem, com o objetivo de estimular o crescimento dos híbridos e promover a limpeza das culturas

3.5.5 Clonagem dos híbridos

Os híbridos positivos foram selecionados para a clonagem. As células dos orifícios a serem clonadas foram retiradas com auxílio de pipeta de Pasteur, ressuspensas em DMEM-10 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 de uma só colônia, e as colônias que em RIFI permaneceram positivas, foram expandidas em placas de 24 orifícios e frascos de cultura de 75 cm² para obtenção de sobrenadante de cultura e células para inoculação em camundongos para produção de líquido ascítico ou congelamento em nitrogênio líquido.

Todos os frascos ou placas utilizados foram previamente revestidos com uma camada de macrófagos.

3.5.6 Obtenção de sobrenadante de cultura contendo anticorpos monoclonais

Os sobrenadantes obtidos das culturas, contendo anticorpos monoclonais produzidos *in vitro*, através da manutenção dos híbridos em frascos de cultura, foram armazenados em frascos de 50 ml e estocados a -70°C .

3.5.7 Produção de líquidos ascíticos dos anticorpos monoclonais

Trinta camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 0,5 ml de óleo mineral (Nujol). Sete dias após, cada animal foi inoculado pela mesma via, com 10^6 células produtoras de anticorpos monoclonais. Aproximadamente 15 dias após a inoculação das células, quando os camundongos apresentavam o abdome aumentado de volume, o líquido ascítico foi colhido através de punção abdominal, utilizando agulha 40 x 12 mm. Colheitas subsequentes foram realizadas enquanto houve presença de ascite.

Os líquidos ascíticos colhidos foram centrifugados a 4000 g por dez minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos Eppendorf e conservados a -70°C .

3.5.8 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 Sulfóxido (DMSO) em DMEM.



A mistura foi imediatamente transferida para ampolas de congelamento de 1 ml (Nunc), que foram mantidas a -70°C por 24 horas e posteriormente transferidas para nitrogênio líquido a -196°C .

3.5.9 Concentração dos sobrenadantes

Os sobrenadantes obtidos dos clones selecionados foram submetidos à diálise em açúcar refinado comercial até redução de cinco vezes o volume inicial, seguindo-se diálise à 4°C em PBS durante dois dias e conseqüente armazenamento a -70°C .

3.6 Caracterização dos anticorpos monoclonais

3.6.1 Caracterização isotípica

O método de imunodifusão dupla segundo Ouchterlony (1968) foi utilizado para determinar os isotipos dos anticorpos monoclonais nos sobrenadantes das culturas.

Uma solução de agarose a 1% em água destilada, contendo 0,1% de azida sódica, foi solubilizada em banho-maria fervente e espalhada em lâminas de vidro $7,5 \times 2,5$ cm, previamente cobertas por uma fina película dessa mesma solução. Após a solidificação, foram feitos os orifícios com o auxílio de um cortador circular de ágar. Os sobrenadantes foram distribuídos radialmente nos orifícios, e os soros anti-IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (SIGMA) foram colocados na cavidade central. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e a leitura foi realizada através de observação de linhas de precipitação 24 horas após a colocação dos sobrenadantes e dos soros.

3.6.2 Caracterização através do teste de ELISA

A caracterização dos anticorpos monoclonais anti-*B. bovis* em ELISA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Waltisbuhl et al., (1987). As soluções utilizadas no teste de ELISA estão descritas no Apêndice I

A reação foi executada em microplacas de poliestireno (COSTAR), sendo o antígeno (5,75 µg) diluído em solução tampão carbonato - bicarbonato de sódio pH 9.6 adsorvido a placa. Cada orifício da placa recebeu 100 µl dessa mistura, seguindo-se incubação durante 18 horas a 4°C.

Após a incubação, o excesso da solução antigênica foi removido dos orifícios por uma série de três lavagens com solução de PBS contendo Tween 80 a 0,05%. Em seguida, a placa foi incubada com soros positivos e negativos diluídos em PBS-Tween 80 na diluição 1:200 e sobrenadantes de culturas durante uma hora à 37°C.

Os soros controles positivos foram obtidos de camundongos BALB/c imunizados experimentalmente com *B. bovis* e comprovadamente positivos em RIFI, e os soros negativos foram obtidos de camundongos BALB/c não inoculados, com cerca de dois meses de idade. Os animais foram sangrados por punção cardíaca ou através do plexo retro orbital, e o sangue coletado foi mantido por duas horas em estufa a 37°C. Decorrido esse período, os soros foram obtidos por centrifugação a 4000 g por 10 minutos.

Após lavagem, adicionaram-se a cada orifício 100 µl de conjugado anti-IgG de camundongo (1:2000) marcado com peroxidase (SIGMA). Após uma hora de incubação a 37°C, a placa foi lavada e adicionaram-se 100 µl do substrato (OPD). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4N (32 µl por orifício) após dez minutos.

A leitura foi feita em leitor de micro placa com filtro de comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como positivos (valores de absorvância acima da absorvância discriminante) ou negativos (valores abaixo da absorvância discriminante). A determinação da absorvância discriminante foi feita através da média dos valores de soros de 50 camundongos negativos, acrescida de dois desvios padrões (Richardson et al., 1983).

3.6.3 Caracterização através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A caracterização dos anticorpos monoclonais anti-*B. bovis* em RIFI foi realizada conforme a técnica recomendada pelo Instituto Internacional de Cooperacion para la Agricultura (IICA, 1987), com modificações.

O antígeno foi produzido a partir de sangue de bezerro esplenectomizado com parasitemia de 5,5% de *B. bovis* (amostra brasileira). O sangue foi colhido em citrato de sódio, seguindo-se centrifugação a 2000 g por dez minutos. O plasma e a papa de leucócitos foram removidos e as hemácias lavadas três vezes em PBS por centrifugação e ressuspensas em dois volumes de PBS. Esfregaços foram feitos, fixados com acetona por 15 minutos e armazenados à temperatura de -20°C.

No momento da reação, as lâminas foram descongeladas e a confecção dos círculos para a delimitação dos antígenos foi realizada com esmalte. Os sobrenadantes das culturas foram distribuídos nas lâminas contendo o antígeno. Estas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e, após a lavagem com PBS por cinco minutos, e água destilada por cinco minutos. Posteriormente a secagem adicionou-se o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (produzido no

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva) na diluição 1:10 em PBS-Tween 80 a 0,02%.

Soros de camundongos infectados e não infectados com *B. bovis* foram utilizados como controles positivos e negativos respectivamente, na diluição 1:40 em PBS-Tween 80 a 0,05%.

A especificidade de cada anticorpo monoclonal foi determinada através da fluorescência emitida a partir do local de ligação do anticorpo ao antígeno, ou seja, superfície da hemácia, superfície ou citoplasma do merozoíto, região polar do merozoíto etc.

3.6.4 Caracterização através de eletroforese em gel

As soluções utilizadas na eletroforese estão descritas no Apêndice II.

3.6.4.1 SDS-PAGE

O antígeno de *B. bovis* (amostra brasileira) foi produzido a partir de sangue de bezerro experimentalmente inoculado de acordo com Passos (1993), com modificações (Sacco, 1994 - comunicação pessoal). Ao antígeno adicionou-se tampão de amostra (pH 8,8), obtendo-se, assim, as proteínas totais dos antígenos solubilizados em detergente (SDS).

As preparações do antígeno foram submetidas à eletroforese de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações.

Os géis foram montados entre placas de vidro (160 x 180 mm), separadas por espaçadores de 1,5 mm de espessura. Os géis de separação e vedação foram utilizados na concentração de 10% e o de concentração a 3%.

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 10 µl e 30 µl de antígeno, para géis corados pela prata e azul de Comassie, respectivamente. Nos géis para eletrotransferência, a amostra aplicada foi de 400 µl de antígeno em canaleta única.

Em todas as eletroforeses, foram incluídos marcadores padrões com os respectivos pesos moleculares (SIGMA): β galactosidase (116 kDa), fosforilase b-musculo de coelho (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), fumarase coração suíno (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa).

3.6.4.2 Coloração pela prata

Foi utilizada a metodologia descrita por Tunon & Johanson (1984), com modificações.

Concluída a eletroforese, o gel foi lavado em água destilada e colocado em solução pré - fixadora I durante a noite. Em seguida, o gel foi transferido para a solução pré - fixadora II durante uma hora. Após lavagem em água destilada durante 30 minutos, o gel foi fixado em solução de glutaraldeído 25%, diluído 1:2 em água destilada, durante uma hora. Novamente foram realizadas várias lavagens em água destilada durante 30 minutos, em seguida, adicionou-se etanol aquoso a 20% por uma hora.

Procedeu-se, então, à coloração em solução de prata amoniacal, ao abrigo da luz durante uma hora. O gel foi transferido para etanol aquoso por 15 minutos e, posteriormente adicionou-se ao gel a solução reveladora. Após visualização das bandas, adicionou-se ao gel solução inativadora. Todas as etapas da coloração foram realizadas sob agitação.

3.6.4.3 Coloração pelo azul de Comassie

Após eletroforese e rápida lavagem em água destilada, o gel foi transferido para uma solução corante, contendo 0,25% de azul Comassie R-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.

3.6.4.4 Western blotting

A eletrotransferência das proteínas para as membranas de nitrocelulose foi realizada de acordo com metodologia descrita por Towbin et al. (1979), com modificações.

Ao terminar a eletroforese, o gel foi lavado em água destilada e mergulhado por 30 minutos em tampão de transferência. Todas as soluções utilizadas em Western blotting estão descritas no Apêndice III.

A membrana de nitrocelulose (SCHLEICHER/SCHUEL) foi imersa em água deionizada durante cinco minutos e, posteriormente, incubada por 30 minutos em tampão de transferência, juntamente com quatro pedaços de papel de filtro Whatman 3 mm, cortados do tamanho do gel e espumas "Scotch Brite".

Realizou-se a montagem seqüencial sobre um suporte de acrílico na seguinte ordem: uma espuma, dois pedaços de papel de filtro, o gel, a membrana, os outros dois pedaços de filtro e espuma. Na montagem evitou-se a formação de bolhas de ar entre as várias 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 (polo positivo). A transferência foi realizada à temperatura ambiente por 24 horas a 24 volts, seguida de duas horas a 48 volts.

Ao final desse período, para controle da transferência, a tira de nitrocelulose, que continha o padrão de peso molecular, e uma fração da amostra foram coradas com solução de Ponceau-S durante um minuto. O gel foi corado pelo Azul de Coomassie, para comprovar a total transferência das proteínas. Após transferência, as membranas foram utilizadas na identificação das proteínas dos antígenos, reconhecidas pelos anticorpos monoclonais anti-*B. bovis*.

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 quatro horas. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas sete vezes em PBS-Tween 80 a 0,05%, durante duas horas, e incubadas por 24 horas com as imunoglobulinas dos sobrenadantes de culturas, contendo os anticorpos monoclonais concentrados cinco vezes.

Como controle positivo foram utilizados soros policlonais bovinos anti-*B. bovis* produzidos na EMBRAPA (CNPQC-Campo Grande) e, como controles negativos, utilizou-se soro de camundongo não imunizado, além de sobrenadante de cultura de híbridos não produtores de anticorpos monoclonais e soros policlonais de bovinos.

As tiras de nitrocelulose foram lavadas três vezes em PBS-Tween 80 e incubadas por uma hora com anti-IgG de camundongos conjugado à peroxidase na diluição de 1:2000 em PBS-Tween 80 a 0,05%, e os controles positivos e negativos bovinos foram incubados com conjugado anti-IgG bovina na diluição de 1:10000. Após a incubação com o conjugado, as tiras de nitrocelulose foram lavadas três vezes com PBS-Tween 80 a 0,05% 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.

Os pesos moleculares aproximados das bandas protéicas foram calculados através de análise de regressão.

4 RESULTADOS

4.1 Imunização dos camundongos BALB/c

Dos cinco camundongos imunizados, dois desenvolveram resposta imune humoral a partir da terceira inoculação. Esses animais apresentaram o desenvolvimento de anticorpos apenas contra o merozoíto da *Babesia* e receberam a imunização final quatro dias antes da fusão. Os soros dos outros três camundongos reagiram com todo o antígeno, ou seja, hemácias infectadas e não infectadas e merozoítos de *B. bovis*.

4.2 Produção de anticorpos monoclonais

Treze dias após a fusão dos linfócitos com as células de mieloma SP2/0, os sobrenadantes das culturas foram retirados (200 µl) e a produção de anticorpos pelos hibridomas foi acompanhada através de RIFI. Nessa etapa, detectaram-se 64 orifícios contendo híbridos positivos (13,3%), sendo selecionados apenas 16 orifícios, por estarem fortemente positivos, para a realização da clonagem por diluição limitante (uma ou duas células por orifício).

Após a clonagem, vários orifícios apresentavam-se positivos, o que possibilitou a seleção de 36 clones que mais se destacavam em RIFI. A seleção foi baseada no local de emissão de fluorescência (superfície e/ou citoplasma do merozoíto, região polar do merozoíto, entre outros).

Desses 36 clones, foram selecionados 18, que foram expandidos em placas de 24 orifícios e, posteriormente, em frascos de cultura para obtenção de sobrenadantes, congelamento e obtenção de líquido ascítico (Fig. 2). Todas as placas e frascos de cultura utilizados para a expansão dos híbridos foram previamente revestidos com uma camada de macrófagos, objetivando limpar as culturas e estimular o seu crescimento.

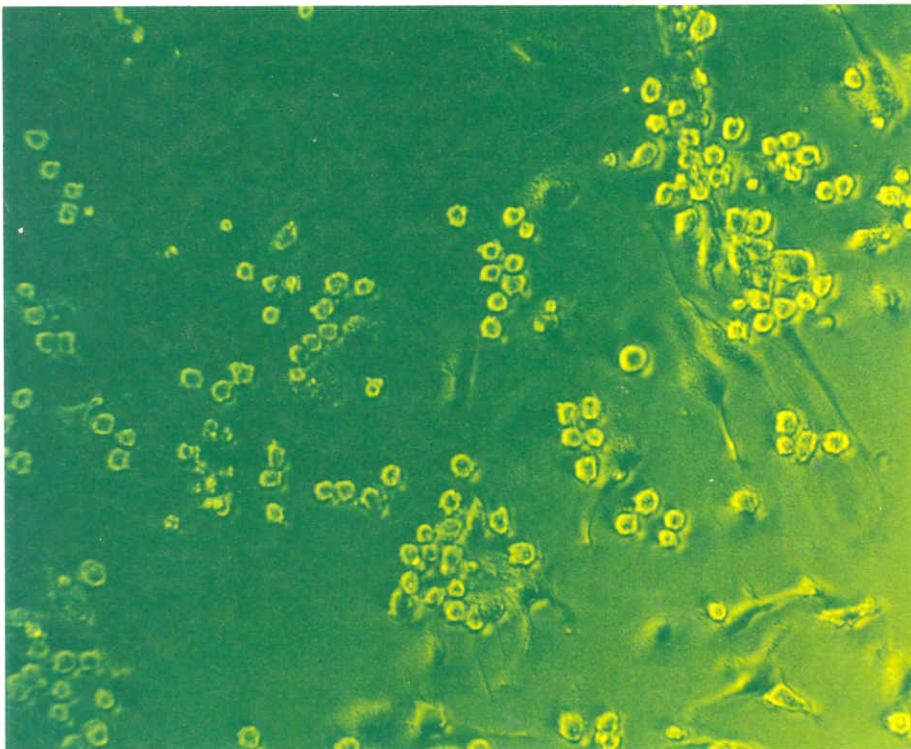


Figura 2 Cultura de células de clone produtor de anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis* em microscópio invertido. (500x).



Os demais clones foram congelados e estocados em nitrogênio líquido a -196°C , visto que, provavelmente, eram réplicas dos outros clones (Fig. 3). Os clones foram nomeados conforme Tabela 1.

Tabela 1: Denominação dos principais clones produtores de anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis*.

Clone	Denominação
2A5C6	C1
2A5H6	C2*
2A9G8	C3
2A9H11	C4*
2B12A5	C5*
2B12G4	C6
2G2A8	C7*
2G2E7	C8
2B4A3	C9*
2B4H4	C10
3D9C12	C11
3D9D9	C12*
3A9B6	C13*
3A9D6	C14
3H12A12	C15*
3H12C8	C16
4A9B6	C17*
4A9H2	C18
4E10A10	C19
4E10G7	C20*
4C2C1	C21
4C2H4	C22*
4C10B10	C23*
4C10G7	C24
4F3B1	C25*
4F3F4	C26
4F10C9	C27
4F10F12	C28*
4G2C6	C29*
4G2F4	C30
4G11B7	C31*
4G11H9	C32
4D5D5	C33
4D5F5	C34*
4E12B7	C35
4E12F11	C36*

* Clones selecionados para expansão

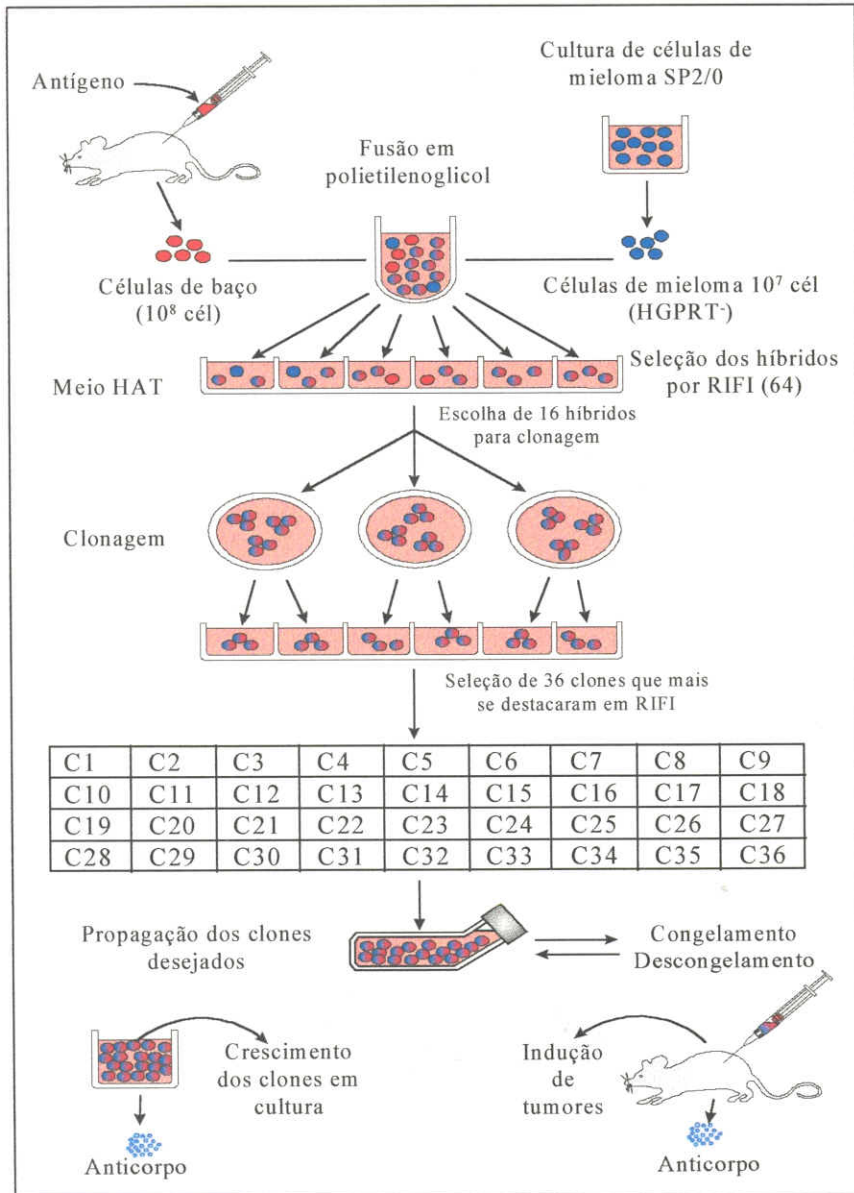


Figura 3 Desenho esquemático da técnica para a produção de hibridomas e clones secretores de anticorpos monoclonais.

4.3 Produção de líquidos ascíticos dos anticorpos monoclonais

Dentre os 18 clones eleitos, apenas seis foram selecionados para a produção dos líquidos ascíticos por apresentarem bom crescimento em meio de cultura, forte reação em ELISA e RIFI.

Decorridos 15 dias da implantação das células produtoras de anticorpos monoclonais na cavidade abdominal dos camundongos, o abdome apresentava-se dilatado, sendo realizadas, então, a punção abdominal e a colheita dos líquidos ascíticos em tubos Eppendorf. Após a colheita, esses líquidos foram centrifugados e armazenados a -70°C . A quantidade de líquido ascítico obtida de cada animal, por punção, foi de aproximadamente 5 ml.

4.4 Caracterização dos anticorpos monoclonais

4.4.1 Caracterização isotípica

Decorridos 24 horas do início da reação, pôde-se observar a formação de linhas de precipitação no soro padrão e em dois clones (13 e 20). O clone 13 reagiu com a imunoglobulina da sub-classe IgG2a, e o clone 20 reagiu com a sub-classe IgG3.

4.4.2 Caracterização através da reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

Os anticorpos monoclonais oriundos dos clones C4, C5, C7, C9, C12, C13, C15, C17, C20, C22, C23, e C28, ao serem submetidos à RIFI com antígenos de *B. bovis*, apresentaram fluorescência com todo o merozoíto. Os demais apresentaram algumas diferenças em relação ao local de emissão da fluorescência (merozoíto todo, contorno de merozoíto e região polar), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-*Babesia bovis* pela reação de imunofluorescência indireta.

Clones	Local de emissão de fluorescência
C2	contorno de merozoíto
C4	merozoíto todo
C5	merozoíto todo
C7	merozoíto todo
C9	merozoíto todo
C12	merozoíto todo
C13	merozoíto todo
C15	merozoíto todo
C17	merozoíto todo
C20	merozoíto todo
C22	merozoíto todo
C23	merozoíto todo
C25	superfície polar de merozoíto
C28	merozoíto todo
C29	contorno de merozoíto
C31	região polar de merozoíto
C34	contorno de merozoíto
C36	contorno de merozoíto

Os clones que mais se destacaram foram os de números 17, que apresentavam maior intensidade de fluorescência emitida a partir de todo merozoíto (Fig. 4), o clone 29, com fluorescência emitida a partir do contorno do merozoíto, e o clone 31, cuja fluorescência ocorreu na região polar de merozoíto.