

Guilherme Guerra Alves

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE TOXINAS E ANTITOXINAS  
CLOSTRIDIAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Coorientadores: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine  
Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silva Silveira

Belo Horizonte - MG  
Escola de Veterinária - UFMG  
2017

A474p

Alves, Guilherme Guerras, 1987-

Produção e purificação de toxinas e antitoxinas clostridiais / Guilherme Guerras Alves. – 2017.

110 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Coorientadores: Luiz Guilherme Dias Heneine, Rodrigo Otávio Silva Silveira  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Clostridium botulinum – Teses. 2. Clostridium perfringens – Teses. 3. Imunoglobulinas – Teses. 4. Toxinas – Teses. 5. Antitoxinas – Teses. 6. Vacina veterinária – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias. III. Silveira, Rodrigo Otávio Silva. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 616.931

## FOLHA DE APROVAÇÃO

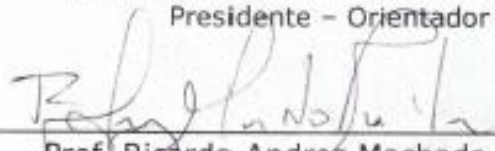
**GUILHERME GUERRA ALVES**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

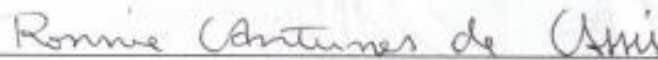
Aprovada em 26 de Abril de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato  
Presidente - Orientador



Prof. Ricardo Andrez Machado de Ávila  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC



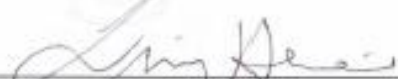
Dr. Ronnie Antunes de Assis  
Doutorado - UFMG



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis  
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Daniel Menezes Souza  
Colégio Técnico da UFMG - COLTEC



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine  
Fundação Ezequiel Dias- FUNED





Aos meus pais, Osmar de Andrade Alves e  
Hermelinda Geralda Guerra Alves, pelo exemplo e  
por todos os seus esforços que me permitiram  
chegar até aqui e concluir mais esta etapa;

Aos meus irmãos, Juliano Guerra Alves e Rafael  
Guerra Alves, pela amizade e amor incondicionais  
e por serem muito importantes em minha vida.

*“Compadre meu Quelémem sempre diz que eu posso aquietar meu temer de consciência, que sendo bem-assistido, terríveis bons espíritos me protegem. Ipe! Com gosto... Como é de são efeito, ajudo com meu querer acreditar. Mas nem sempre posso. O senhor saiba: eu toda a minha vida pensei por mim, forro, sou nascido diferente. Eu sou eu mesmo. Divêrjo de todo mundo... Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa. O senhor concedendo, eu digo: para pensar longe, sou cão mestre - o senhor solte em minha frente uma idéia ligeira, e eu rastreio essa por fundo de todos os matos, amém!”*

*“O senhor... Mire veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior.”*

*“Riobaldo, se lembra certo da senhora sua mãe? Me conta o jeito de bondade que era a dela...” (...) Na ação de ouvir, digo ao senhor, tive um menos gosto, na ação da pergunta. Só faço, que refugo, sempre quando outro quer direto saber o que é próprio o meu no meu, ah. Mas desci disso, o minuto, vendo que só mesmo Diadorim era que podia acertar esse tento, em sua amizade delicadeza. Ao que entendi. Assim devia de ser. Toda mãe vive de boa, mas cada uma cumpre sua paga prenda singular, que é a dela e dela, diversa bondade. E eu nunca tinha pensado nessa ordem. Para mim, minha mãe era a minha mãe, essas coisas. Agora, eu achava. A bondade especial de minha mãe tinha sido a de amor constando com a justiça, que eu menino precisava. E a de, mesmo no punir meus demaseios, querer-bem às minhas alegrias. A lembrança dela me fantasiou, fraseou – só face dum momento – feito grandeza cantável, feito entre madrugara e amanhecer.”*

*“Por que era que eu estava procedendo à-toa-assim? Senhor, sei? O senhor vai pondo seu perceber. A gente vive repetido, o repetido, e, escorregável, num mim minuto, já está empurrado noutra galho. Acertasse eu com o que depois sabendo fiquei, para de lá de tantos assombros... Um está sempre no escuro, só no último derradeiro é que clareiam a sala. Digo: o real não está na saída nem na chagada: ele se dispões para a gente é no meio da travessia.”*

*“A lembrança da vida da gente se guarda em trechos diversos, cada um com seu signo e sentimento, uns com os outros acho que nem não misturam. De cada vivimento que eu real tive, de alegria forte ou pesar, cada vez daquela hoje vejo que eu era como se fosse diferente pessoa. Sucedido desgovernado. Tem horas antigas que ficaram muito mais perto da gente do que outras, de recente data.”*

*“Ah, não; amigo, para mim, é diferente. Não é um ajuste de um dar serviço ao outro, e receber, e saírem por este mundo, barganhando ajudas, ainda que sendo com o fazer a injustiça aos demais. Amigo, para mim, é só isto: é a pessoa com quem a gente gosta de conversar, do igual o igual, desarmado. O de que um tira prazer de estar próximo. Só isto, quase; e os todos sacrifícios. Ou – amigo – é que a gente seja, mas sem precisar de saber o por quê é que é.”*

Trechos retirados do livro “Grande Sertão: Veredas”, de João Guimarães Rosa.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, Osmar, Hermelinda, Juliano, Rafael, Raissa, Juliana, Carol e Davi, por todo amor, esforços, incentivos e paciência ao longo desses quatro anos de doutorado.

Ao comitê de orientação, Chico, Luiz e Rodrigo, pela oportunidade, confiança, compreensão, empenho e pelos exemplos profissionais.

A todos que estiveram juntos comigo no Laboratório de Anaeróbios da UFMG: Felipe, Pri, Rodrigo, Carlos, Ronnie, Marina, Lu, Ricardo, Roseane, Amanda, Nayara, Carol, Isadora, Marcos, Diogo, Larissa.

A todos que estiveram juntos comigo no Laboratório de Imunologia e Bioprodutos da FUNED: Lu, Thaís, Érika, Valéria, Gian, Lenice, Marcos, Thiago, Rafaela, Girlaine, Mariana, Vitória.

A todos que estiveram juntos comigo no LANAGRO: Maurício, Rogério, Jair, Penna, George e o pessoal da Jardinagem.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa e ao ensino: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).



---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	12
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	12
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	14
<b>RESUMO</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>2.1 Geral</b> .....	22
<b>2.2 Específicos</b> .....	22
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
<b>3.1. <i>Clostridium</i> spp.</b> .....	23
3.1.1. Introdução.....	23
3.1.2. <i>Clostridium botulinum</i> .....	23
3.1.3. <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	25
3.1.4. <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	27
3.1.5. Diagnóstico das clostridioses.....	29
3.1.6. Controle das clostridioses.....	30
<b>3.2. Métodos Cromatográficos</b> .....	31
3.2.1. Introdução.....	31
3.2.2. Filtração em gel.....	33
3.2.3. Cromatografia de afinidade.....	35
3.2.4. Cromatografia de imunoafinidade.....	36
3.2.5. Cromatografia de afinidade por íons metálicos.....	37
3.2.6. Cromatografia de troca iônica.....	38
3.2.7. Focagem isoelétrica.....	40
3.2.8. Cromatografia de interação hidrofóbica.....	41
3.2.9. Cromatografia de fase reversa.....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
<b>4.1. Locais de Realização dos Experimentos</b> .....	46
<b>4.2. Animais Utilizados</b> .....	46
<b>4.3. Amostras Utilizadas – Estirpes Bacterianas</b> .....	46
<b>4.4. Amostras Utilizadas – Toxinas e Antitoxinas Padrões</b> .....	46
<b>4.5. Reconstituição e Teste de Pureza das Amostras Bacterianas</b> .....	46
<b>4.6. Extração de DNA</b> .....	47

---

---

<b>4.7. Tipificação e Confirmação da Identidade das Estirpes.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8. Produção das Toxinas.....</b>	<b>47</b>
<b>4.9. Purificação das Toxinas.....</b>	<b>48</b>
4.9.1. Concentração e diafiltração das toxinas.....	49
4.9.2. Purificação das neurotoxinas C e D de <i>Clostridium botulinum</i> .....	50
4.9.3. Purificação da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> .....	51
4.9.4. Purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> .....	52
<b>4.10. Produção dos Imunógenos.....</b>	<b>53</b>
4.10.1. Inativação das Toxinas.....	53
4.10.2. Teste de Esterilidade.....	53
4.10.3. Teste de Inocuidade.....	53
4.10.4. Adição de Adjuvantes.....	54
<b>4.11. Produção das Antitoxinas Clostridiais.....</b>	<b>54</b>
4.11.1. Produção das antitoxinas clostridiais em ovinos.....	54
4.11.2. Produção das antitoxinas clostridiais em galinhas.....	54
<b>4.12. Purificação das Imunoglobulinas G.....</b>	<b>55</b>
<b>4.13. Purificação das Imunoglobulinas Y.....</b>	<b>55</b>
<b>4.14. Caracterização e Avaliação dos Insumos.....</b>	<b>56</b>
4.14.1. Quantificações proteicas.....	56
4.14.2. Titulação das toxinas por bioensaios em camundongos.....	56
4.14.3. Titulação das antitoxinas C e D de <i>Clostridium botulinum</i> .....	56
4.14.4. Titulação das antitoxinas beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> .....	57
4.14.5. Análises das toxinas e antitoxinas em gel de SDS-PAGE.....	57
4.14.6. Confirmação da identidade biológica das toxinas.....	58
4.14.7. Testes de avidéz das antitoxinas clostridiais.....	58
<b>4.15. Comparação dos Imunoreagentes Produzidos com os Padrões Existentes.....</b>	<b>59</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1. Caracterização das Estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2. Caracterização das Estirpes de <i>Clostridium perfringens</i> tipos C e D.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3. Produção das Toxinas.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4. Purificação das Toxinas.....</b>	<b>63</b>
5.4.1. Purificação das toxinas botulínicas C e D de <i>Clostridium botulinum</i> .....	63
5.4.2. Purificação da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> .....	67
5.4.3. Purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> .....	72
<b>5.5. Produção e Purificação das Imunoglobulinas G.....</b>	<b>79</b>
5.5.1. Produção dos imunógenos.....	79

---

---

5.5.2. Produção das Imunoglobulinas G.....	80
5.5.3. Purificação das Imunoglobulinas G.....	80
<b>5.6. Produção e Purificação das Imunoglobulinas Y.....</b>	<b>83</b>
5.6.1. Produção dos imunógenos.....	83
5.6.2. Produção das Imunoglobulinas Y.....	83
5.6.3. Purificação das Imunoglobulinas Y.....	84
<b>5.7. Comparação dos Imunoreagentes Produzidos com os Padrões Existentes.....</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>91</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>103</b>
<b>9.1. Apêndice I - Projetos e Trabalhos Concluídos ou em Andamento Utilizando Insumos Produzidos Nesta Tese.....</b>	<b>103</b>
<b>9.2. Apêndice II – Protocolos de Purificação dos Insumos.....</b>	<b>105</b>
9.2.1. Purificação das neurotoxinas C e D de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	105
9.2.2. Purificação da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	105
9.2.3. Purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	106
9.2.4. Purificação das imunoglobulinas G clostridiais.....	107
9.2.5. Purificação das imunoglobulinas Y clostridiais.....	108

---

---

## LISTA DE QUADROS

---

<b>Quadro 1.1</b>	Principais características das toxinas C e D de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D, beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipos C e D.	19
<b>Quadro 3.1.1</b>	Toxinotipos de <i>Clostridium perfringens</i> e suas principais toxinas produzidas....	26
<b>Quadro 3.2.1</b>	Principais métodos cromatográficos, propriedades das proteínas utilizadas e parâmetros de adequabilidade para a utilização desses métodos.....	32
<b>Quadro 4.1</b>	Tampões utilizados nas corridas cromatográficas de purificação das toxinas clostridiais C, D, beta e épsilon.....	49
<b>Quadro 4.2</b>	Protocolo de Imunização dos ovinos com as toxinas clostridiais C, D, beta e épsilon purificadas.....	54
<b>Quadro 4.3</b>	Protocolo de Imunização das galinhas com as toxinas clostridiais C, D, beta e épsilon purificadas.....	55
<b>Quadro 5.1</b>	Títulos das imunoglobulinas G brutas de ovinos contra os antígenos clostridiais C, D e épsilon em UI/mL. ....	81
<b>Quadro 5.2</b>	Títulos das imunoglobulinas G purificadas de ovinos contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon em UI/mL e UI/mg.....	82
<b>Quadro 5.3</b>	Índices de avidéz das imunoglobulinas G purificadas de ovinos contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon.....	82
<b>Quadro 5.4</b>	Títulos das imunoglobulinas Y purificadas de galinhas contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon em UI/mL e UI/mg.....	85
<b>Quadro 5.5</b>	Índices de avidéz das imunoglobulinas Y purificadas de galinhas contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon.....	86
<b>Quadro 5.6</b>	Comparação dos índices de avidéz das imunoglobulinas G e Y purificadas produzidas por este trabalho e dos soros padrões oficiais.....	89

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 3.2.1</b>	Esquema de filtração em gel.....	33
<b>Figura 3.2.2</b>	Cromatograma de filtração em gel.....	34
<b>Figura 3.2.3</b>	Esquema de cromatografia de afinidade.....	35
<b>Figura 3.2.4</b>	Cromatograma de cromatografia de afinidade.....	36
<b>Figura 3.2.5</b>	Cromatograma de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados...	38
<b>Figura 3.2.6</b>	Esquema de cromatografia de troca iônica.....	39
<b>Figura 3.2.7</b>	Cromatograma de cromatografia de troca iônica.....	40
<b>Figura 3.2.8</b>	Cromatograma de focagem isoeletrica.....	41

---

<b>Figura 3.2.9</b>	Esquema de cromatografia de interação hidrofóbica.....	42
<b>Figura 3.2.10</b>	Cromatograma de cromatografia de interação hidrofóbica.....	43
<b>Figura 3.2.11</b>	Esquema de cromatografia de fase reversa.....	44
<b>Figura 3.2.12</b>	Cromatograma de cromatografia de fase reversa.....	45
<b>Figura 4.1</b>	Foto do biorreator BioFlo 110 utilizado nos cultivos de <i>Clostridium spp.</i> .....	48
<b>Figura 4.2</b>	Foto do sistema de ultrafiltração tangencial utilizado para a concentração e diafiltração dos sobrenadantes de cultivo bacteriano.....	49
<b>Figura 4.3</b>	Fotos dos cromatógrafos utilizados nas purificações.....	50
<b>Figura 4.4</b>	Coluna XK 26/20 utilizada nas purificações das toxinas beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> . ....	51
<b>Figura 5.1</b>	Caracterização das estirpes de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	60
<b>Figura 5.2</b>	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR Monoplex para detecção de DNA de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D.....	61
<b>Figura 5.3</b>	Caracterização das estirpes de <i>Clostridium perfringens</i> tipos C e D.....	61
<b>Figura 5.4</b>	Eletroforese em gel de agarose a 2% da PCR Multiplex para detecção de DNA de <i>Clostridium perfringens</i> .....	62
<b>Figura 5.5</b>	SDS-PAGE a e 10% apresentando os resultados da precipitação das toxinas botulínicas C e D por PEG 6000.....	63
<b>Figura 5.6</b>	Perfil cromatográfico obtido nas purificações das toxinas botulínicas C e D.....	65
<b>Figura 5.7</b>	SDS-PAGE das frações de 5 a 13 coletadas nas cromatografias das toxinas botulínicas C e D.....	65
<b>Figura 5.8</b>	<i>Western Blot</i> dos complexos de neurotoxinas botulínicas C e D purificadas.....	66
<b>Figura 5.9</b>	SDS-PAGE do complexo de toxinas botulínicas B purificadas obtidas por Zhao et al. (2012) .....	67
<b>Figura 5.10</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando o sobrenadante concentrado e diafiltrado de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	68
<b>Figura 5.11</b>	Cromatograma obtido na purificação da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C por IMAC.....	69
<b>Figura 5.12</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando os resultados da purificação da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	70
<b>Figura 5.13</b>	<i>Western Blot</i> da toxina beta purificada de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	70
<b>Figura 5.14</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando o sobrenadante concentrado e diafiltrado de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	73

<b>Figura 5.15</b>	Cromatograma obtido na purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D por IEX.....	74
<b>Figura 5.16</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando os resultados da purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	75
<b>Figura 5.17</b>	Western Blot da toxina épsilon purificada de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D....	75
<b>Figura 5.18</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando os resultados da purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo B.....	77
<b>Figura 5.19</b>	Cromatograma obtido na purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D por GF.....	78
<b>Figura 5.20</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando os resultados da cromatografia de GF da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	79
<b>Figura 5.21</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando todas as fases de purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	79
<b>Figura 5.22</b>	SDS-PAGE a 10% apresentando os resultados da purificação das imunoglobulinas G dos ovinos. ....	81
<b>Figura 5.23</b>	Curva de produção de IgY anti-C e anti-D de <i>Clostridium botulinum</i> tipos C e D, e anti-Beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	84
<b>Figura 5.24</b>	SDS-PAGE a 10% apresentando os resultados da purificação das imunoglobulinas Y das galinhas. ....	84
<b>Figura 5.25</b>	SDS-PAGE a 15% apresentando os resultados de corrida de eletroforese das toxinas padrões oficiais beta e épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipos C e D.....	88

---

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

<b>AC</b>	Cromatografia de afinidade
<b>AU</b>	Unidade de absorvância
<b>BHI</b>	Infusão cérebro e coração
<b>BoNT</b>	Neurotoxina botulínica
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>CF</b>	Focagem isoelétrica
<b>CPA</b>	Toxina alfa de <i>Clostridium perfringens</i>
<b>CPB</b>	Toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i>
<b>CV</b>	Volume de coluna
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina

---

---

<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal em 50% dos camundongos
<b>DMM</b>	Dose mínima mortal
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>ETX</b>	Toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i>
<b>EV-UFMG</b>	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
<b>FUNED</b>	Fundação Ezequiel Dias
<b>GF</b>	Filtração em gel
<b>HIC</b>	Cromatografia de interação hidrofóbica
<b>IEX</b>	Cromatografia de troca iônica
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgY</b>	Imunoglobulina Y
<b>IMAC</b>	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
<b>ITX</b>	Toxina iota de <i>Clostridium perfringens</i>
<b>LANAGRO-</b>	Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo - Minas Gerais
<b>MG</b>	
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>mS/cm</b>	Milisiemens por centímetro
<b>MTP</b>	Meio de produção de toxina
<b>OPD</b>	Ortofenilenodiamina
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>RPC</b>	Cromatografia de fase reversa
<b>SPS</b>	Sulfito polimixina sulfadiazina

---

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir, purificar e avaliar as toxinas e antitoxinas C e D de *Clostridium botulinum*, beta e épsilon de *Clostridium perfringens*, bem como compará-las aos padrões existentes utilizados pelos órgãos oficiais, visando suas utilizações em pesquisas para a produção de novas vacinas, desenvolvimento e implementação de métodos alternativos para diagnóstico e controle de vacinas clostridiais. A produção das toxinas foi realizada por meio do cultivo das estirpes em meios específicos para cada espécie em biorreator de bancada. As toxinas C e D de *C. botulinum* foram purificadas por filtração em gel. A toxina beta de *C. perfringens* tipo C foi purificada por meio de cromatografia por afinidade metálica, utilizando o zinco como agente quelante. A toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D foi purificada por cromatografia de troca aniônica. As imunoglobulinas G e Y foram produzidas pela múltipla imunização de ovinos e galinhas, respectivamente, com as toxinas purificadas inativadas e conjugadas ao adjuvante de Freund. Posteriormente, as IgG foram purificadas por meio das precipitações por ácido caprílico e sulfato de amônio; e as IgY foram purificadas pela precipitação por sulfato de amônio. As toxinas C e D de *C. botulinum* foram purificadas ao nível de várias bandas em gel de SDS-PAGE, as quais representam as toxinas, suas subunidades e proteínas auxiliares associadas. A toxina beta de *C. perfringens* tipo C foi purificada ao nível de uma banda de alta intensidade em gel, e poucas bandas com alto peso molecular e de fraca intensidade que podem se tratar de formas oligomerizadas da toxina. A toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D foi purificada ao nível de uma banda de altíssima intensidade em gel de SDS-PAGE, e poucas bandas de alto peso molecular e de baixíssimas intensidades. As toxinas padrões produzidas por este estudo apresentaram rendimentos proteicos e purezas superiores aos padrões oficiais. As IgG e IgY produzidas e purificadas obtiveram altos títulos, evidenciando a qualidade dos imunógenos e da purificação das imunoglobulinas. Além disso, apresentaram altos índices de avides, maiores que os índices dos padrões oficiais, evidenciando a qualidade superior dos insumos produzidos por este estudo. O presente trabalho produziu insumos, toxinas e antitoxinas clostridiais, com altos graus de pureza e de qualidade superior aos insumos oficiais nacionais, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, vacinas e metodologias de controle da qualidade das vacinas.

**Palavras-Chave:** *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, tipo C, tipo D, anticorpo, imunoglobulina, IgG, IgY, ovino, galinha.



## ABSTRACT

The objective of this work was to produce, purify and analyze the toxins and antitoxins C and D from *Clostridium botulinum*, beta and epsilon from *Clostridium perfringens*, as well as to compare them to the existing standards used by the official organs, aiming their uses in research for the production of new vaccines, development of alternative diagnostic methods and quality control of vaccines. The production of the toxins was carried out by fermentation of the strains in specific media for each species in a bench bioreactor. *C. botulinum* C and D toxins were purified by gel filtration. *C. perfringens* type C beta toxin was purified by immobilized-metal affinity chromatography using zinc as a chelating agent. *C. perfringens* type D epsilon toxin was purified by anion exchange chromatography. Immunoglobulins G and Y were produced by multiple immunization of sheep and chickens, respectively, with inactivated purified toxins in Freund's adjuvant. Subsequently, IgG were purified by precipitation by caprylic acid and ammonium sulfate, and the IgY were purified by ammonium sulfate precipitation. *C. botulinum* C and D toxins were purified to the level of several SDS-PAGE gel bands, which represent the toxins, their subunits and accessory proteins associated. *C. perfringens* type C beta toxin was purified to the level of a high intensity gel band, and few bands of high molecular weight and low intensity which may be oligomerized forms of the toxin. *C. perfringens* type D epsilon toxin was purified to the level of a very high intensity gel band, and few bands of high molecular weight and very low intensities. The standard toxins produced by this study showed higher yields of protein and higher purity when compared to the official standards. The produced and purified IgG and IgY obtained high titers, revealing the quality of the immunogens and purification methods. In addition, they presented high avidity indexes, higher than the indexes of the official standards, indicating the superior quality of the products generated by this study. The present work produced clostridial toxins and antitoxins with high purity levels and superior quality when compared to the official national ones, and they can be applied for the development of new diagnostic methods, vaccines and methodologies for quality control of vaccines.

**Keywords:** *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, type C, type D, antibody, immunoglobulin, IgG, IgY, ovine, chicken.

## 1. INTRODUÇÃO

*Clostridium* spp. são bactérias com forma de bastonetes Gram-positivos, esporulados e anaeróbios estritos. O gênero foi primeiramente descrito por Prazmowski em 1880 e desde então foram identificadas mais de 225 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas, contando com cerca de 17 espécies patogênicas para animais e/ou seres humanos (Poxton, 2006).

Devido à alta capacidade de esporulação, forma de resistência desses anaeróbios no ambiente, os clostrídios são capazes de se manter potencialmente infectantes, mesmo em condições de aerobiose, por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana. Os processos infecciosos e intoxicações que afetam os animais domésticos causados por bactérias do gênero *Clostridium* são genericamente chamados de clostridioses, sendo considerados doenças com altas taxas de letalidade e mortalidade, acarretando grandes prejuízos econômicos ao setor produtivo primário (Lobato et al. 2013).

As bactérias patogênicas que compõem este gênero causam doenças basicamente por dois mecanismos: produção de toxinas e invasão de tecidos. A maior parte das infecções clostridiais acontece após a entrada dos clostrídios no organismo na forma esporulada, por meio de alimentos ou água contaminados, feridas ou por inalação. Sob condições favoráveis, esses clostrídios germinam, passando da forma esporulada para vegetativa e produzindo grandes quantidades de toxinas no organismo do hospedeiro. Existe ainda a possibilidade de causarem intoxicação, quando as toxinas pré-formadas no ambiente ou alimento são ingeridas. Independentemente da espécie, as exotoxinas clostridiais são potentes e responsáveis pelo quadro patológico específico de cada uma das clostridioses (Popoff & Bouvet, 2009).

Dentre as toxinas clostridiais, as neurotoxinas botulínicas C e D (BoNT), produzidas por *C. botulinum* tipos C e D respectivamente, são as principais causadoras da grande maioria dos casos de botulismo nos animais (Lobato et al. 2013). Reconhecidas como as toxinas de origem microbiana mais potentes existentes, são atualmente consideradas como potenciais agentes de bioterrorismo e guerra biológica. O mecanismo de ação das BoNT é dotado de três etapas. Na primeira etapa, as cadeias pesadas das BoNT se ligam às membranas de neurônios, principalmente colinérgicos; na segunda etapa, as BoNT são translocadas para o citoplasma neuronal via endocitose; finalmente, na terceira etapa, as cadeias leves das BoNT clivam uma ou mais proteínas SNARE, responsáveis pela ancoragem e fusão de vesículas contendo neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos. Como resultado, ocorre redução da liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares, o que leva à incapacidade para contração muscular ou paralisia flácida dos músculos esqueléticos (Aoki et al 2010).

A toxina beta produzida por *C. perfringens* tipos B e C é responsável por grande parte dos quadros enterotoxêmicos nos ruminantes domésticos, principalmente em animais recém-nascidos. Causadora de enterites necróticas e hemorrágicas e, frequentemente, sinais neurológicos e mortes-súbitas, essa toxina exerce seus efeitos por meio da formação de poros nas células-alvo, despolarização celular e alteração da permeabilidade vascular (Uzal et al., 2010).

A toxina épsilon produzida por *C. perfringens* tipos B e D é causadora de enterotoxemia por superalimentação nos ruminantes domésticos, principalmente ovinos. Reconhecida como o terceiro fator de origem microbiana mais potente conhecido, essa toxina também é considerada um potencial agente de bioterrorismo e guerra biológica. Após um desequilíbrio na microbiota intestinal, *C. perfringens* se replica de forma exacerbada no intestino e produz grande quantidade da protoxina épsilon. Esta é ativada por proteases específicas, age localmente e é absorvida, causando lesões em outros órgãos, tais como os rins, pulmões e cérebro. Nos órgãos-alvo, as toxinas se ligam a receptores ainda desconhecidos, se oligomerizam, formam poros ativos na membrana celular, e causam alterações e danos celulares (Alves et al., 2014). O quadro 1.1 apresenta as principais características das toxinas discutidas acima.

**Quadro 1.1** - Principais características das toxinas C e D de *Clostridium botulinum* tipos C e D, beta e épsilon de *Clostridium perfringens* tipos C e D.

	<b>Botulínicas C e D (BotC e BotD)</b>	<b>Beta (CPB)</b>	<b>Épsilon (ETX)</b>
<b>Principal Agente</b>	<i>Clostridium botulinum</i> C e D	<i>Clostridium perfringens</i> C	<i>Clostridium perfringens</i> D
<b>Doença</b>	Botulismo	Enterotoxemias por <i>C. perfringens</i> tipo C	Enterotoxemias por <i>C. perfringens</i> tipo D
<b>Peso Molecular (kDa)</b>	150	35	34
<b>Atividade Biológica</b>	Inibição da liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, inibição da contração muscular	Formação de poros, despolarização celular, alteração da permeabilidade vascular	Formação de poros, alteração da permeabilidade celular, destruição celular
<b>DL 50 (/kg camundongo)</b>	0,5-5 ng	0,4-50 µg	100 ng

As toxinas clostridiais chamam a atenção pela sua grande potência e consideráveis impactos que causam nos sistemas de produção, sendo responsáveis por elevados índices de perda nos rebanhos (Popoff & Bouvet, 2009). Apesar do significativo número de casos, a maior parte dos diagnósticos é baseada apenas em sinais clínicos pouco conclusivos e/ou lesões de necropsia, existindo poucos relatos de confirmação laboratorial. Muitas vezes, o diagnóstico laboratorial, importante para determinar o agente etiológico e guiar as medidas preventivas e de controle para o problema, não é realizado por falta de imunoreagentes e/ou falta de pessoal capacitado para a realização dos testes (Lobato et al., 2013). Tais testes, via de regra, envolvem a utilização de anticorpos frente as toxinas clostridiais, os quais não são produzidos em quantidades satisfatórias para atender a demanda nacional.

Tendo em vista que os clostrídios passam por uma forma de resistência às condições ambientais adversas denominada endósporo, bem como sua ampla distribuição ambiental e no trato gastrointestinal de animais e humanos, estes agentes são de erradicação praticamente impossível. Dessa forma, o controle e a profilaxia das clostridioses são baseados principalmente na vacinação sistemática do rebanho com bacterinas e toxóides específicos, além de práticas adequadas de manejo (Lobato et al., 2013). Atualmente, estima-se que no Brasil sejam produzidas em torno de 250 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano (Informação Pessoal, George Caldeira, LANAGRO/MG) e um total de 30 produtos veterinários com diferentes formulações variando desde vacinas monovalentes a polivalentes com até 11 antígenos clostridiais.

O teste oficial de potência de vacinas contra o botulismo foi implementado no Brasil em 2002 pela Instrução Normativa 23 (Brasil, 2002), baseada na técnica descrita e utilizada na África do Sul (Lobato et al., 1998). A partir de 2008, foi introduzido o controle oficial para os toxóides beta e épsilon produzidos por *C. perfringens* tipos C e D. Até então apenas os componentes contra *C. chauvoei* e *C. botulinum* eram oficialmente testados. Esse incremento na fiscalização foi um significativo avanço para certificação de garantida desses produtos veterinários, mas infelizmente, nem todos os antígenos clostridiais são fiscalizados. O próximo componente a ser testado

oficialmente deverá ser o toxóide alfa de *C. septicum* (Informação Pessoal, George Caldeira, LANAGRO/MG).

A técnica “padrão ouro” utilizada na realização dos testes de potência dos toxóides clostridiais e diagnóstico de grande parte das clostridioses é a soroneutralização em camundongos. Apesar da reconhecida sensibilidade, repetibilidade e confiança, este método é demorado (2-4 dias), pode apresentar resultados extremos e é relativamente caro, por requerer grande número de animais (Wood, 1991).

Com o início dos questionamentos bioéticos em relação ao uso de animais para esses fins, iniciou-se uma corrida com o propósito de desenvolver métodos alternativos *in vitro* que apresentassem resultados rápidos, confiáveis, sensíveis e específicos, aliados a um baixo custo (Souza Júnior et al., 2010). Um exemplo brasileiro foi o desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para mensurar a resposta de anticorpos contra o toxóide épsilon de *C. perfringens* tipo D, produto este que está atualmente em fase de validação para emprego no teste de potência (Parreiras, 2001).

Além dos ELISA, outras metodologias também utilizadas para essa finalidade têm ganhado destaque no cenário científico mundial. Nesse contexto, o uso de linhagens celulares, baseado na citotoxicidade *in vitro*, tem se mostrado uma alternativa viável e eficaz à soroneutralização em camundongos. O modelo celular permite, ainda, observar e estudar a atividade biológica da toxina, o que não é possível em outras técnicas, tais como os ELISA. A soroneutralização celular foi recentemente padronizada, no Brasil, para avaliação dos toxóides alfa de *C. septicum*, épsilon de *C. perfringens* tipo D e alfa de *C. novyi* tipo B (Salvarani et al., 2010; Souza-Junior et al., 2010; Lima et al., 2011).

Independentemente da metodologia *in vitro* ou *in vivo* a ser implementada, um grande gargalo enfrentado por grupos de pesquisas em diagnóstico e vacinas, laboratórios para diagnóstico, indústrias produtoras de vacinas e o órgão oficial (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) é a dependência da produção e/ou importação de insumos padrões, como toxinas e antitoxinas, representando assim um empecilho para o bom andamento das pesquisas, testes e implementação de métodos alternativos. Tais dificuldades comumente inviabilizam o cumprimento de metas e prazos devido as dificuldades para a produção nacional de insumos de qualidade, bem como ao tempo requerido e custos para a chegada dos mesmos no Brasil, quando importados.

Além disso, as toxinas e antitoxinas padrões nacionais e importadas utilizadas no país não apresentam nenhum grau de pureza. Insumos purificados são essenciais para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico, novas vacinas, novos métodos de controle da qualidade das vacinas, bem como aumentam expressivamente a sensibilidade, especificidade e confiabilidade dos testes empregados para o diagnóstico e controle das vacinas clostridiais.

A tecnologia e conhecimento para produção desses insumos avançou de forma significativa, conferindo ao país condições necessárias para suas produções. Sendo assim, há a necessidade de, além de produzir insumos de qualidade, padronizar os insumos e garantir suas purezas para que os mesmos possam ser utilizados pelas indústrias, órgãos oficiais e instituições de pesquisa.

A produção e purificação desses insumos traria vantagens e independência científica ao país. Permitiria o desenvolvimento de novas técnicas *in vitro*, como alternativas às técnicas *in vivo* para diagnóstico e controle das vacinas clostridiais; permitindo estabelecer ainda a real situação destas enfermidades no país, e possibilitando a implementação de um programa de controle mais efetivo. A produção e purificação das toxinas e antitoxinas clostridiais traria ainda outros benefícios e oportunidades, tais como: a futura certificação dos mesmos, a validação de métodos, controle da qualidade de métodos de ensaio, estabelecimento de valores de referência, avaliação da competência das equipes técnicas, monitoramento de laboratórios e uso em controles

interlaboratoriais. A ainda restrita oferta desses imunoreagentes no Brasil, como também as dificuldades alfandegárias, de tempo e custos envolvidos para a sua obtenção no exterior, justificam por si projetos que resultem na sua produção nacional.

Tendo em vista a importância e urgência da obtenção destes insumos clostridiais a nível nacional, o projeto que precedeu o presente trabalho está vinculado ao projeto aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), com o número de processo 455717/2014-1. Este projeto e o presente trabalho foram desenvolvidos por meio da parceria entre as instituições: Escola de Veterinária da UFMG, Fundação Ezequiel Dias de MG e Laboratório Nacional de Agropecuária de Pedro Leopoldo em MG.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Produzir, purificar e avaliar as toxinas e antitoxinas C e D de *Clostridium botulinum* tipos C e D respectivamente, beta e épsilon de *Clostridium perfringens*, bem como compará-las aos padrões existentes utilizados pelo órgão oficial nacional.

### **2.2. Específicos**

- Produzir as toxinas C e D de *Clostridium botulinum*, beta e épsilon de *Clostridium perfringens*;
- Purificar as toxinas C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens*;
- Produzir as antitoxinas C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens*, em ovinos e galinhas;
- Purificar as antitoxinas C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens*;
- Testar a avidéz das antitoxinas produzidas e purificadas C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens*;
- Comparar as características dos padrões produzidos com aqueles existentes e utilizados pelo órgão oficial nacional.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Clostridium spp.*

##### 3.1.1. Introdução

*Clostridium spp.* são bactérias com forma de bastonetes Gram-positivos, esporulados e anaeróbios estritos. O gênero foi primeiramente descrito por Prazmowski em 1880 e desde então foram identificadas mais de 225 espécies distribuídas em áreas geográficas distintas, contando com cerca de 17 espécies patogênicas para animais e/ou seres humanos (Poxton, 2006).

Devido à alta capacidade de esporulação, forma de resistência desses anaeróbios no ambiente, os clostrídios são capazes de se manter potencialmente infectantes, mesmo em condições de aerobiose, por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana. Os processos infecciosos e intoxicações que afetam os animais domésticos causados por bactérias do gênero *Clostridium* são genericamente chamados de clostridioses, sendo considerados doenças com altas taxas de letalidade e mortalidade, acarretando grandes prejuízos econômicos ao setor produtivo primário (Lobato, et al. 2013).

As bactérias patogênicas que compõem este gênero causam doenças basicamente por dois mecanismos: produção de toxinas e invasão de tecidos. A maior parte das infecções clostridiais acontece após a entrada dos clostrídios no organismo na forma esporulada, por meio de alimentos ou água contaminados, feridas ou por inalação. Sob condições favoráveis, esses clostrídios germinam, passando da forma esporulada para vegetativa e produzindo grandes quantidades de toxinas no organismo do hospedeiro. Existe ainda a possibilidade de causarem intoxicação, quando as toxinas pré-formadas no ambiente ou alimento são ingeridas. Independentemente da espécie, as exotoxinas clostridias são potentes e responsáveis pelo quadro patológico específico de cada uma das clostridioses. Em suma, as toxinas clostridiais chamam a atenção pela sua grande potência e consideráveis impactos que causam nos sistemas de produção, sendo responsáveis por elevados índices de perda nos rebanhos (Popoff & Bouvet, 2009).

##### 3.1.2. *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum*, por meio da produção de neurotoxinas, é o causador de quadros de botulismo em humanos, animais domésticos e selvagens. Atualmente, existem descritos oito tipos ou sorotipos deste micro-organismo, de A a H, sendo o último reportado recentemente, bem como mais de 30 subtipos diferentes (Hill e Smith, 2013; Barash e Arnon, 2014).

Os animais possuem diferentes susceptibilidades aos sorotipos de *C. botulinum*. Os bovinos são susceptíveis aos tipos C e D, e raramente acometidos pelos tipos A e B. Os equinos são sensíveis a todos os sorotipos. Os cães são menos sensíveis, sendo o botulismo causado pelos sorotipos A, B e C, mas de forma rara. As aves são acometidas pelos tipos C e, mais raramente, A e E, embora elas possam eliminar todos os sorotipos em seus dejetos (Rodloff e Krüger, 2012). Todas as espécies de aves são susceptíveis ao botulismo, havendo, porém, diferenças significativas com relação à sensibilidade às toxinas botulínicas. Em geral, aves herbívoras são mais sensíveis que carnívoras, sendo os abutres considerados extremamente resistentes (Alves et al., 2013). Humanos são acometidos principalmente pelos tipos A, B e E, e de forma menos comum pelos tipos F e H (Barash e Arnon, 2014; Rosow e Strober, 2015).

As neurotoxinas botulínicas são a substância de ocorrência natural de maior potência já conhecida, com uma dose letal em 50% dos camundongos (DL<sub>50</sub>) de 0,5-5 ng/kg. Essas neurotoxinas são proteínas de 150 kDa compostas por uma cadeia pesada de 100 kDa, e uma

cadeia leve de 50 kDa. As cadeias pesadas possuem dois domínios funcionais: um domínio C-terminal envolvido na ligação da toxina à célula nervosa; e um N-terminal envolvido na movimentação da cadeia leve para o citoplasma da célula nervosa. As cadeias leves são endopeptidases dependentes de zinco que agem dentro da célula nervosa clivando proteínas importantes para o complexo de acoplamento e fusão das vesículas contendo neurotransmissores. Como consequência, não há liberação desses neurotransmissores levando à paralisia flácida (Carter e Peck, 2015).

As toxinas botulínicas formam complexos com proteínas acessório, como as hemaglutininas (HA) e não hemaglutininas não tóxicas (NTNH) de vários tamanhos (300 até 900 kDa). Essas proteínas protegem as neurotoxinas e parecem facilitar sua absorção no corpo. O complexo de hemaglutininas da neurotoxina tipo A, por exemplo, se liga às proteínas de adesão celular, comprometendo as junções celulares entre as células epiteliais do intestino, e facilitando a absorção da toxina (Lee et al., 2014). Os genes que codificam as toxinas e suas proteínas acessório estão situados juntos em aglomerados conservados das neurotoxinas. A origem dos genes responsáveis pela expressão das neurotoxinas varia entre os tipos de *C. botulinum*: tipos A, B, E e F, os quais causam o botulismo humano, são de origem cromossomal; tipos C e D, responsáveis pela grande maioria dos casos da doença nos animais, possuem origem em bacteriófagos; já para o tipo G a origem é plasmidial (Brüggemann, 2005; Swaminathan, 2011).

Após ultrapassarem a barreira epitelial do intestino, as neurotoxinas botulínicas entram no sistema linfático e circulatório, podendo permanecer por muitos dias na circulação. Em seguida, se ligam especificamente a nervos terminais periféricos, particularmente aqueles nervos autonômicos colinérgicos e da musculatura esquelética. Para se ligar à membrana pré-sináptica dos nervos terminais, as toxinas utilizam dois tipos de receptores: um polysialogangliosídeo (PSG) e um receptor proteico no lume das vesículas sinápticas. O mecanismo pelo qual a toxina botulínica é internalizada na célula ainda é desconhecido. No entanto, é possível que ela utilize as vesículas sinápticas como um “cavalo de Tróia” para entrar nos neurônios terminais; outras vesículas e rotas de tráfego parecem também contribuir para a internalização (Rosseto et al., 2014).

Para atingirem as proteínas SNARE, responsáveis pela ancoragem e fusão de vesículas contendo neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos, no citosol das células nervosas, a cadeia leve deve ser translocada da vesícula para o citoplasma. Para tal, as neurotoxinas exploram dois eventos fisiológicos que ocorrem nos nervos terminais: a endocitose de vesículas sinápticas (para entrar nos nervos); e a recarga de neurotransmissores das vesículas sinápticas (para a entrada da cadeia leve no citosol). As neurotoxinas utilizam canais para íons para a translocação da cadeia leve para o citoplasma. O baixo pH dentro das vesículas sinápticas induz uma mudança conformacional no domínio N-terminal da cadeia pesada, a qual se insere na membrana e forma canais para a translocação da cadeia leve para o lado citosólico da vesícula (Rosseto et al., 2014).

As cadeias leves das neurotoxinas botulínicas quebram proteínas SNARE específicas: VAMP (proteína de membrana associada a vesícula), SNAP25 (proteína associada ao sinaptossoma) ou syntaxina. O tipo C cliva a SNAP25 e a syntaxina; os tipos B, D, F e G clivam a VAMP; e os tipos A e E clivam a SNAP25. A clivagem e inativação de qualquer uma dessas três proteínas levam a inibição da liberação de neurotransmissores. Caso não leve o animal ou humano acometido a óbito, a ação das toxinas botulínicas pode ser reversível, visto que elas não atingem o corpo celular neuronal e não matam os neurônios (Rosseto et al., 2014).

Nos animais, destacam-se o botulismo nos ruminantes e nas aves. O botulismo nos ruminantes pode ocorrer de forma epizootica ou esporádica. Na forma epizootica, animais com alta exigência nutricional, como fêmeas gestantes ou em lactação, criados em solos e pastagens pobres em minerais, principalmente fósforo, sem suplementação mineral adequada, desenvolvem o hábito de osteofagia (ingestão de ossos) ou sarcófagia (ingestão de cadáveres), buscando suprir



suas deficiências minerais. Concomitantemente, ingerem as neurotoxinas pré-formadas durante a decomposição das carcaças, o que pode levar à grandes epidemias da doença com morte de muitos animais. Na forma esporádica, as neurotoxinas ingeridas pelos animais têm origem em alimentos contaminados com matéria orgânica em decomposição, tais como cama de frango, feno, grãos, rações e silagens de má qualidade ou mal armazenados. Além destes, cochos de água com carcaças de pequenos animais ou outros tipos de matéria orgânica em decomposição, bem como poços e lagoas com água estagnada também podem servir como fonte das toxinas (Lobato et al., 2013).

Nos ruminantes, o curso da doença pode ser de horas a poucas semanas e a letalidade é próxima dos 100%. Os sinais clínicos iniciais são dificuldade de locomoção, incoordenação dos membros posteriores, com progressão cranial da paralisia flácida. O animal entra em estado pré-agônico, sendo que a morte, precedida por coma, ocorre devido à parada cardiorrespiratória; o psiquismo dos animais permanece inalterado. Lesões à necropsia são raras e limitadas à petéquias no miocárdio como consequência da agonia respiratória, que precede o óbito (Lobato et al., 2007).

Nas aves, destacam-se como fontes de toxinas as poças e lagoas com água estagnada, especialmente para aves aquáticas e em período de estiagem. Outra importante fonte de toxina para a espécie são as larvas de mosca e outros invertebrados que se desenvolvem em matéria orgânica e, por serem resistentes à ação da toxina botulínica, concentram-na em seu organismo. Menos comumente, quadros de botulismo podem ocorrer de forma endógena, com produção de toxina botulínica no intestino das aves ou em feridas contaminadas pelos esporos (Alves et al., 2013).

O botulismo em aves é caracterizado clinicamente por uma paralisia flácida simétrica ascendente, acometendo inicialmente as patas, e prosseguindo para as asas, pescoço e pálpebras. O psiquismo permanece inalterado durante o curso da doença e, em casos fatais, a morte ocorre devido à parada cardiorrespiratória. A ausência de alterações macroscópicas marcantes durante o exame *post-mortem* é comumente relatada nos casos de botulismo em aves (Trampel et al., 2005).

### **3.1.3. *Clostridium perfringens* tipo C**

*C. perfringens* está amplamente distribuído no ambiente, como no solo, água, vegetação, instalações, equipamentos e matéria orgânica em decomposição, além de fazer parte da microbiota intestinal normal de animais e humanos (Lobato et al., 2007). Porém, sob certas circunstâncias, *C. perfringens* pode tornar-se patogênica, causando quadros de gangrena gasosa, intoxicação alimentar e enterite necrótica em humanos; e gangrena gasosa, doenças gastrointestinais e enterotoxemias nos animais (Petit et al., 1999).

*C. perfringens* não invade células normais, mas produz várias toxinas e enzimas responsáveis por causar lesões e sinais clínicos. As toxinas produzidas dependerão da cepa envolvida, e gerarão síndromes específicas. Esta espécie de clostrídio é dividida em cinco tipos (A, B, C, D e E) com base na produção de quatro toxinas principais, alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX) e iota (ITX) (Petit et al., 1999; Quadro 3.1.1).

**Quadro 3.1.1** - Toxinotipos de *Clostridium perfringens* e suas principais toxinas produzidas

Principais Toxinas				
Toxinotipo	Alfa (CPA)	Beta (CPB)	Épsilon (ETX)	Iota (ITX)
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

As infecções por *C. perfringens* tipo C já foram relatadas em suínos, ruminantes domésticos, equinos, frangos, cães e humanos. Animais neonatos são os mais susceptíveis à colonização pelo micro-organismo pela ausência de uma microbiota intestinal bem estabelecida (Songer, 1996). Além disso, a baixa produção de tripsina endógena e a ingestão de inibidores da tripsina presentes no colostro fazem com que a atividade intestinal desta enzima esteja muito baixa nos primeiros dias de vida, permitindo que a toxina beta (CPB) permaneça ativa no intestino, e leve ao desenvolvimento da doença (Lobato et al., 2013).

A CPB possui homologia de sua sequência e estrutural com a toxina formadora de poros alfa de *Staphylococcus aureus*, uma das toxinas com estrutura, funções e métodos de purificação mais bem conhecidas e estudadas (Hunter et al., 1993). Principal fator tóxico produzido por *C. perfringens* tipo C (Quadro 1), a CPB possui uma dose letal em 50% dos camundongos (DL<sub>50</sub>) de 0,4-50 µg/kg (Uzal et al. 2010). É responsável pelas enfermidades causadas pelo agente. Estas incluem a enterite necrótica ou hemorrágica em suínos, cordeiros, bezerros, caprinos e potros, enterite necrótica em frangos, enterite hemorrágica em cães, enterotoxemia (“struck”) em ovinos adultos e enterite *necroticans* em humanos (Songer, 1996; Uzal et al., 2010; Uzal et al., 2012; Garcia et al., 2013; Lobato et al., 2013).

Animais doentes ou portadores de *C. perfringens* tipo C liberam esporos juntamente com suas fezes e contaminam o ambiente. Esses esporos são ingeridos por animais recém-nascidos, entram em contato com a mucosa intestinal sem microbiota estabelecida e a colonizam (Lobato et al., 2013). Inicialmente, *C. perfringens* tipo C adere a mucosa intestinal do ápice das vilosidades, onde esporos e bactérias em estado vegetativo estão presentes e produzem a CPB ativa com cerca de 35 kDa. Com a progressão da doença, ocorre maior colonização da mucosa intestinal, invasão bacteriana das paredes intestinais, multiplicação e maior produção de toxina. Animais doentes podem chegar a apresentar contagens de unidades formadoras de colônias tão altas quanto 10<sup>9</sup> UFC/g de fezes de *C. perfringens* tipo C. Por sua ação no intestino dos seus hospedeiros, a CPB causa aumento da permeabilidade vascular deste órgão, facilitando sua entrada na circulação sanguínea e promovendo seus efeitos sistêmicos e letais subsequentes (Songer, 1996; Uzal et al., 2010).

Há pouca informação sobre os mecanismos de patogenicidade da CPB nas doenças causadas por *C. perfringens* tipo C, e estes estão sob investigação. No entanto, sabe-se que a CPB age nos enterócitos e células endoteliais do intestino dos seus hospedeiros, causando necrose e destacamento das células intestinais, necrose da lâmina própria do intestino, degeneração endotelial e necrose vascular (Steinthorsdottir et al., 2000; Miclard et al., 2009; Uzal et al., 2010). Estes danos às células-alvo dos hospedeiros são causados pela formação de poros em suas membranas celulares (Uzal et al., 2010). A CPB forma canais seletivos principalmente para cátions nas bicamadas lipídicas de membranas, com cerca de 11,1 a 12,7 Å de raio (Shatursky et al., 2000). Esses canais parecem ser formados por hexâmeros de 191 kDa ou heptâmeros de 228

kDa, localizados em regiões de jangadas lipídicas (*lipid rafts*) das células. Os oligômeros, uma vez inseridos na membrana celular, induzem o efluxo de  $K^+$  e influxo de  $Ca^+$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$ , o que leva à despolarização da membrana, edema celular e lise (Nagahama et al., 2003).

Os sinais clínicos e lesões das infecções por *C. perfringens* tipo C são similares na maioria das espécies de animais acometidas. O curso da doença pode ser superagudo ou agudo principalmente, e crônico. Nas infecções superagudas e agudas, os sinais predominantes são dor abdominal, depressão e diarreia sanguinolenta. Já a doença crônica, em animais mais velhos, é caracterizada por diarreia crônica sem sangue e desidratação. Os achados de necropsia são mais frequentes no intestino delgado, porém o intestino grosso pode ser acometido. As lesões consistem em hiperemia do mesentério, enterite fibronecrótica extensa com enfisema e conteúdo intestinal sanguinolento, fluidos pleural e peritoneal sanguinolentos, estrias de fibrina na serosa intestinal e aderência de alças intestinais (Uzal et al., 2010).

### 3.1.4. *Clostridium perfringens* tipo D

As infecções por *C. perfringens* tipo D são causadoras de quadros de enterotoxemia nos animais. A doença já foi relatada em ovinos, caprinos, bovinos, veados, camelos e equinos, e pode acometer, de uma forma geral, animais de todas as idades, exceto neonatos. A enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D é considerada de importância para os ovinos, caprinos e bezerras (Songer, 1996).

Juntamente com a alfa de *C. septicum*, a toxina épsilon (ETX) faz parte do grupo de toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina, e é considerada a terceira toxina clostridial mais potente, com uma dose letal em 50% dos camundongos ( $DL_{50}$ ) de 100 ng/kg (Uzal et al., 2010). Por sua elevada potência, a ETX é considerada um potencial agente de bioterrorismo ou para guerra biológica (Bokori-Brown et al., 2011; Popoff, 2011), estando classificada como agente biológico da categoria B pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (Centers for Disease Control, 2000).

A ETX é produzida por *C. perfringens* tipos B e D, sendo a principal responsável pelo desenvolvimento da enterotoxemia dos ruminantes domésticos causada pelo tipo D. *C. perfringens* tipo D pode ser um habitante normal dos intestinos dos ruminantes, mas sob certas circunstâncias pode haver desequilíbrio da microbiota intestinal, multiplicação exacerbada da bactéria, e consequente aumento nos níveis de produção de toxinas (Lobato et al., 2013). Os fatores predisponentes para que isto ocorra são frequentemente: mudanças repentinas de dieta, principalmente para aquelas ricas em carboidratos fermentáveis, tais como pastos luxuriantes, grãos e rações concentradas; superalimentação; infestação por vermes intestinais; infestação por coccídeos; administração de drogas, como a fenotiazina e netobimina; frio ou calor excessivos; outros fatores que levem ao estresse; e baixa imunidade contra a ETX (Uzal, 2004).

A ETX é secretada na forma de protoxina, com aproximadamente 33 kDa, a qual é convertida em toxina ativa, cerca de 1000 vezes mais tóxica que sua progenitora. Essa ativação é catalisada por proteases, como a tripsina, quimiotripsina, toxina  $\lambda$  (uma metaloprotease sintetizada por *C. perfringens*), uma protease intracelular ainda não identificada e proteases presentes na superfície apical das células do hospedeiro (Worthington e Mülders, 1977; Chassin et al., 2007; Uzal et al., 2010; Harkness et al., 2012). Para que a ativação ocorra é necessária a remoção de ambos os peptídeos amino-terminal e carboxi-terminal da protoxina. A proteína resultante difere em sua sequência primária de acordo com a protease que catalisa a clivagem. Também há diferenças em relação à sua potência tóxica, sendo que máxima potência ocorre quando a toxina é ativada pelas proteases tripsina e quimiotripsina conjuntamente (Minami et al., 1997).

Após sua ativação, a ETX se liga a receptores presentes na superfície externa da membrana celular das células do hospedeiro. Esses receptores são dependentes de colesterol e esfingomielina, e estão presentes em regiões específicas da membrana celular chamadas jangadas lipídicas (*lipid rafts*), com áreas médias entre 0,35 a 0,45  $\mu\text{m}^2$ . A natureza confinada desses receptores propicia uma grande concentração dos monômeros da toxina, o que facilita a oligomerização dos mesmos, e explica em parte sua alta toxicidade (Türkcan et al., 2012).

Diferentemente de outras toxinas da mesma família, a ETX não se liga aos receptores GPI. Recentemente, Ivie et al. (2011) demonstraram que a ETX se liga *in vitro* aos receptores celulares 1 do vírus da hepatite A (HAVCR1), e confirmaram que esses receptores contribuem para a citotoxicidade da proteína. Segundo os autores, o HAVCR1 pode ser de fato um receptor para a toxina ou atuar como uma espécie de co-receptor da mesma.

Em seguida, ocorre oligomerização e formação de grandes complexos proteicos com cerca de 155 kDa ou 220 kDa de massa molecular (Petit et al., 1997; Chassin et al., 2007). Esses complexos são monômeros da ETX oligomerizados em um estado de pré-poro não inserido na membrana celular (Robertson et al., 2011). Subsequentemente, heptâmeros da toxina são inseridos nas mesmas regiões da membrana onde foram formados; e formam os poros ativos que permitem o trânsito de íons e moléculas de até cerca de 0,5 kDa, o que gera alterações e danos celulares (Miyata et al., 2002; Nestorovich et al., 2010). Há indícios de que esses heptâmeros também sejam internalizados e causem danos intracelulares (Chassin et al., 2007; Nagahama et al., 2011; Fennessey et al., 2012).

Vários órgãos são alvos para a ETX, destacando-se o intestino, a partir de onde ela é absorvida, os rins, pulmões e cérebro. Outros locais onde a toxina pode ser encontrada são a medula espinhal, olhos, baço, fígado e cornetos nasais (Buxton, 1978; Tamai et al., 2003). A atuação da toxina nestes locais determinará os sinais clínicos e lesões observados, assim como o curso da enterotoxemia dos ruminantes.

Nos intestinos, sialidases produzidas por *C. perfringens* tipo D contribuem para a sua adesão nas células entéricas, além de gerar e expor receptores adicionais da ETX nas superfícies celulares do hospedeiro (Li et al., 2011). Neste local, a toxina aumenta a permeabilidade intestinal por meio da abertura das junções oclusivas da mucosa, dilatação dos espaços intercelulares e alterações degenerativas da lâmina própria, afetando a homeostase dos fluidos, possivelmente pela via paracelular. Como resultado, há acúmulo de fluidos, hemorragia da mucosa e presença de conteúdo hemorrágico (Goldstein et al., 2009; Morris et al., 2012). Além disto, a ETX parece inibir o trânsito gastrointestinal, o que poderia contribuir para a multiplicação de *C. perfringens* tipo D, maior produção da toxina e aumento da sua própria absorção (Losada-Eaton e Fernandez-Miyakawa, 2010).

Após ganhar a circulação sanguínea, a ETX é distribuída em seus órgãos alvo, mas se acumula predominantemente nos rins. No sistema cardiorrespiratório e nas pleuras, a ação da toxina no endotélio dos vasos sanguíneos leva à formação de poros e causa aumento da permeabilidade vascular. Como consequência, há extravasamento de líquidos, e formação de hidropericárdio, hidrotórax e edema pulmonar (Uzal e Songer, 2008; Popoff, 2011).

Quando altas doses da ETX chegam ao cérebro, as lesões são predominantemente microscópicas e constituem-se em edema vasogênico severo e generalizado. Quando doses menores chegam ao órgão, ou o animal acometido possui imunidade parcial à toxina, as lesões são frequentemente macroscópicas, e constituem-se em encefalomalácia focal simétrica (EFS). A superfície luminal das células endoteliais do cérebro é provavelmente o local de ligação da ETX, e o endotélio microvascular é onde acontecem as principais alterações. Como consequência das lesões vasculares, ocorre a perda da barreira hematoencefálica (BHE), aumento da permeabilidade vascular, edema cerebral generalizado, aumento da pressão intracraniana, falha da perfusão sanguínea e isquemia ou hipóxia focais (Finnie, 2004). Após romper a BHE, a ETX age

diretamente em neurônios e outros elementos neurais, induzindo a liberação de glutamato, um neurotransmissor excitatório, contribuindo para os sinais neurológicos frequentemente observados (Miyamoto et al., 2000; Lonchamp et al., 2010).

O curso da enfermidade nos ruminantes, principalmente nos ovinos, pode ser agudo, subagudo ou crônico, e a ocorrência de mortes súbitas é frequente. Os sinais clínicos mais frequentes são neurológicos e respiratórios: ataxia, cegueira, opistótono, convulsões, balido, dispneia, espuma saindo pela boca e decúbito lateral com pedalagem previamente à morte. Alterações intestinais, tais como hiperemia da mucosa do intestino delgado, presença de fluidos intestinais avermelhados, colite e diarreia podem estar presentes, principalmente na doença em caprinos. Hidropericárdio, hidroperitônio, hidrotórax, edema pulmonar e presença de petéquias na serosa deste órgão são frequentes. No encéfalo, herniação do cerebelo pode ocorrer nos cursos agudo e subagudo; e a EFS pode estar presente nos casos crônicos (Uzal e Songer, 2008; Uzal et al., 2010).

### 3.1.5. Diagnóstico das clostridioses

O diagnóstico das doenças causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium* é complexo e deve ser baseado no maior número de informações possíveis. Essas informações devem ser reunidas a partir dos históricos do rebanho e dos animais acometidos, sinais clínicos e lesões observados, achados de necropsia, histopatologia, bacteriologia, e da detecção de toxinas no trato digestivo dos animais, fontes de alimento e água (Lobato et al., 2007).

O diagnóstico do botulismo causado por *C. botulinum* tipos C e D é baseado na epidemiologia, sinais clínicos dos animais e na detecção das toxinas C e D em espécimes clínicos ou fontes de intoxicação. As toxinas podem ser encontradas nos conteúdos rumenal, gástrico e intestinal, fígado, soro, além de em alimentos e água ingeridos pelos animais. O teste padrão para a pesquisa das neurotoxinas é o bioensaio em camundongos, o qual baseia-se na injeção intraperitoneal ou endovenosa das amostras em camundongos. Caso haja toxina, os camundongos desenvolvem sinais típicos, como pêlos arrepiados, fraqueza muscular e dispneia, que se manifesta por estreitamento da cintura, conhecido como “cintura de vespa”. O tipo da toxina envolvida é determinado pela sua neutralização com uma antitoxina específica. Embora o bioensaio em camundongos seja altamente específico e sensível, outros testes “*in vitro*” encontram-se disponíveis ou em desenvolvimento para o diagnóstico das clostridioses e/ou detecção das toxinas clostridiais. Destacam-se os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, quimioluminescência, eletroquimioluminescência, radioensaio, ensaio de fluxo lateral, ensaio da endopeptidase e a microfixação do complemento (Lindström e Korkeala, 2006; Chaudhry, 2011).

Os componentes importantes no diagnóstico das enterites causadas por *C. perfringens* tipo C são a avaliação dos sinais clínicos, das lesões macro e microscópicas, a cultura bacteriológica, mas principalmente a detecção de toxinas nos espécimes patológicos. A contagem de bactérias no intestino, bem como a detecção do gene produtor da toxina beta pela PCR podem ser indicadores da doença (Songer, 1996).

O histórico, sinais clínicos, lesões, quantificação da glicose urinária, isolamento da bactéria (em níveis de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  UFC/g em ovinos) e detecção por PCR são úteis para o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo da enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D. Já a detecção da toxina no conteúdo intestinal fornece diagnóstico definitivo. Ademais, a evidência de edema perivascular proteináceo no tecido cerebral pela histopatologia é de extrema relevância, já que tal lesão é patognômica da doença (Uzal e Songer, 2008).

O teste padrão para a detecção das toxinas beta e épsilon é a soroneutralização em camundongos. A espécime clínica utilizada é o conteúdo intestinal de animais suspeitos,

aconicionados em recipientes limpos e refrigerados ou congelados (Layana et al., 2006). Embora a soroneutralização em camundongos seja altamente sensível, ela possui alto custo, é dispendiosa, requer técnicos especializados e um grande número de animais. Estes fatores, em conjunto com as atuais discussões em bioética, culminaram com a necessidade do desenvolvimento de metodologias que possam substituir total ou parcialmente o teste *in vivo*, com destaque para os ELISA e a soroneutralização celular (Uzal et al., 2003; Carvalho, 2004; Lobato et al., 2007; Uzal e Songer, 2008; Sobrinho et al., 2010; Souza Júnior et al., 2010).

### 3.1.6. Controle das clostridioses

Considerando as características dos clostrídios, sua resistência, distribuição ambiental e presença no trato gastrointestinal dos animais, a erradicação desses agentes é inviável. Somado ao custo e ineficácia do tratamento, a profilaxia e o controle das clostridioses tornam-se prioridades nas criações dos animais domésticos. Ambos se apoiam em dois fundamentos: vacinação e algumas medidas visando reduzir os fatores predisponentes (Lobato e Assis, 2000).

As principais medidas a serem tomadas são: destinação adequada de carcaças de mamíferos e aves das pastagens e beiras de cursos de água; redução da quantidade de matéria orgânica e consequentemente da carga de esporos no ambiente; retirada de objetos perfurocortantes das instalações; assepsia adequada durante os procedimentos cirúrgicos; troca das agulhas durante vacinações e medicações; produção, armazenamento e fornecimento adequados de alimentos de alta qualidade; não fornecimento de cama de frango aos ruminantes domésticos; implementação de períodos de adaptação para mudanças de dieta, principalmente quando para pastos luxuriantes, grãos e rações concentradas; evitar a superalimentação; fornecimento de água de boa qualidade; impedir que os animais tenham acesso a locais com água de má qualidade; controle de parasitas, principalmente coccídeos; controle do frio ou calor excessivos, assim como de outros fatores que levem ao estresse (Uzal, 2004; Lobato et al., 2013).

A utilização das vacinas resulta em marcante redução da incidência das clostridioses de uma forma geral. Os animais jovens, entre 3 e 4 meses, devem ser vacinados duas vezes com intervalos de 4 a 6 semanas. Bovinos devem ser revacinados anualmente, e pequenos ruminantes semestralmente, para que mantenham títulos de anticorpos protetores durante estes períodos. Para o controle da enterotoxemia por *C. perfringens* tipo C, é indicada ainda a vacinação das fêmeas gestantes entre os 60 e 30 dias que precedem o parto, já que os mais acometidos são os neonatos. Os anticorpos transferidos de forma passiva aumentam a proteção destes animais até que atinjam a idade para a primo-vacinação (Lobato et al., 2013).

As vacinas mais modernas disponíveis comercialmente são constituídas basicamente de toxóides. Embora imunógenos monovalentes possam ser utilizados em condições específicas, há uma crescente tendência em todo o mundo para a produção e utilização de vacinas polivalentes, contendo antígenos de outros agentes, principalmente clostridiais. As vacinas de toxóides contra os clostrídios têm sido mundialmente utilizadas de forma extensiva nas últimas décadas. Somente no Brasil, mais de 250 milhões de doses de vacinas são produzidas por ano (Informação Pessoal, George Caldeira, LANAGRO/MG), refletindo o impacto causado por essas doenças nos atuais sistemas de criação, e a crescente necessidade de se proteger um grande número de animais frente às clostridioses (Gonçalves et al., 2009).

Embora essas vacinas possam ser efetivas na prevenção e controle das clostridioses, a qualidade das mesmas oscila enormemente entre os países e os fabricantes, ocorrendo grande variação das respostas imunes dos animais vacinados (Uzal e Songer, 2008; Titball, 2009). A produção de toxinas *in vitro* é o principal entrave para a fabricação de bons imunógenos. Ela requer a utilização de amostras toxigênicas, bem como meios de cultura específicos, pH, tempo, atmosfera de incubação adequados para o cultivo dos clostrídios e otimização da produção de

toxinas (Gonçalves et al., 2009). Além disto, repiques sucessivos *in vitro* das amostras bacterianas podem levar à perda dos seus elementos extracromossomais que carregam os genes das toxinas, levando as amostras a produzirem baixos títulos de toxinas, ou mesmo à perda total da toxigenicidade (Popoff e Titball, 2006)

## **3.2. Métodos Cromatográficos**

### **3.2.1. Introdução**

O estudo das proteínas e suas funções é algo central para o entendimento de todo e qualquer processo biológico fundamental. O termo purificação de proteínas se refere a uma série de procedimentos delineados para isolar preferencialmente uma única proteína ou um conjunto de proteínas a partir de uma fonte biológica complexa, tal como culturas microbianas ou tecidos biológicos. Para isolar uma proteína específica de uma mistura bruta, suas características físicas e químicas devem ser utilizadas, já que não há uma forma única de purificar todos os tipos de proteínas. Além disso, a pureza requerida da proteína alvo irá variar com a finalidade da mesma e influenciará na metodologia escolhida. O objetivo da purificação não é a penas a remoção dos contaminantes, mas também a concentração da proteína alvo e sua transferência para um macro ambiente onde ela permaneça estável e, dependendo de sua utilidade final, biologicamente funcional. Antigamente, a única forma de separar diferentes tipos de proteínas era pela precipitação, utilizando suas solubilidades relativas, pela adição de sais, solventes orgânicos, polímeros, variação do pH e temperatura. Atualmente, a capacidade das proteínas de adsorverem a uma variedade de superfícies é utilizada para separá-las de impurezas por meio de diferentes técnicas cromatográficas (Hedhammar, 2006; Janson e Jonsson, 2011).

Cromatografia se refere a um grupo de técnicas de separação que envolvem o retardamento da progressão de moléculas em um solvente (fase móvel) ao longo de um certo material (fase estacionária). Moléculas com alta tendência de permanecer na fase estacionária movem-se pelo sistema mais lentamente que as outras (Janson e Jonsson, 2011).

O termo cromatografia era anteriormente utilizado para descrever a separação de pigmentos naturais em filtros de papel, mas atualmente é utilizado para as técnicas de separação em colunas, nas quais as fases estacionárias são empacotadas e por onde a fase móvel e as amostras são bombeadas. A separação cromatográfica de misturas de proteínas se tornou a maneira mais eficaz e mais utilizada para a purificação de proteínas individuais (Hedhammar, 2006).

As propriedades gerais das proteínas, tais como tamanho, carga, hidrofobicidade, ponto isoelétrico, interações e afinidades bioespecíficas, são usadas pelos métodos cromatográficos para isolá-las de outras moléculas (Walls et al., 2011). O quadro 3.2.1 apresenta os principais métodos cromatográficos e algumas características de adequabilidade.

**Quadro 3.2.1** - Principais métodos cromatográficos, propriedades das proteínas utilizadas e parâmetros de adequabilidade para a utilização desses métodos (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

Método	Fundamento Do Método	Características Típicas		Fase de Purificação		
		Resolução	Capacidade	Captura	Intermediária	Polimento
AC	Reconhecimento específico	+++ ou ++	+++ ou ++	+++	++	+
IMAC	Ligação a íon metálico	+++	++	+++	++	+
GF	Tamanho	++	++	+		+++
IEX	Carga	+++	+++	+++	+++	+++
HIC	Hidrofobicidade	+++	++	++	+++	+++
CF	Ponto isoelétrico	+++	+			++
RPC	Hidrofobicidade	+++	++		+	++

AC: Cromatografia de afinidade;

IMAC: Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados;

GF: Filtração em gel;

IEX: Cromatografia de troca iônica;

HIC: Cromatografia de interação hidrofóbica;

CF: Focagem isoelétrica;

RPC: Cromatografia de fase reversa.

O tipo de interação das proteínas alvo com as fases estacionárias e seus ligantes varia com o método cromatográfico utilizado. Na filtração em gel (GF), ou exclusão por tamanho, em teoria, não há ligações entre os componentes, e as moléculas são separadas exclusivamente pela diferença em seus tamanhos. Nas demais técnicas, podem estar presentes uma ou mais das seguintes interações: ligações íon-íon ou íon-dipolo; ligações de hidrogênio; forças de van der Waals ou dispersão; interações dissulfeto ou aromáticas; e interações hidrofóbicas (Janson e Jonsson, 2011).

Até por volta dos anos 1950, os pioneiros na purificação de proteínas eram limitados à técnicas e métodos de baixa resolução, tais como a precipitação pelo sal e a adsorção em lote. Para a adsorção em lotes eles utilizavam fases sólidas de hidratos de alumínio, silicatos de magnésio, sílicas, carbonatos de cálcio e magnésio, fosfato de cálcio, óxidos de ferro e silicatos de alumínio e magnésio (Turba, 1954). As cromatografias realizadas não resultavam em produtos cristalinos de alta pureza, mas em conjunto com procedimentos de precipitação, eram uma ferramenta de relativa importância.

Com o decorrer dos anos, o desenvolvimento de novas fases sólidas ou matrizes para cromatografias, especialmente aquelas baseadas em dextrano, poliácridamida e agarose, alavancou o desenvolvimento de novos métodos cromatográficos e melhoria daqueles já existentes. Desde então, uma variedade de matrizes foi e ainda é utilizada nas cromatografias de

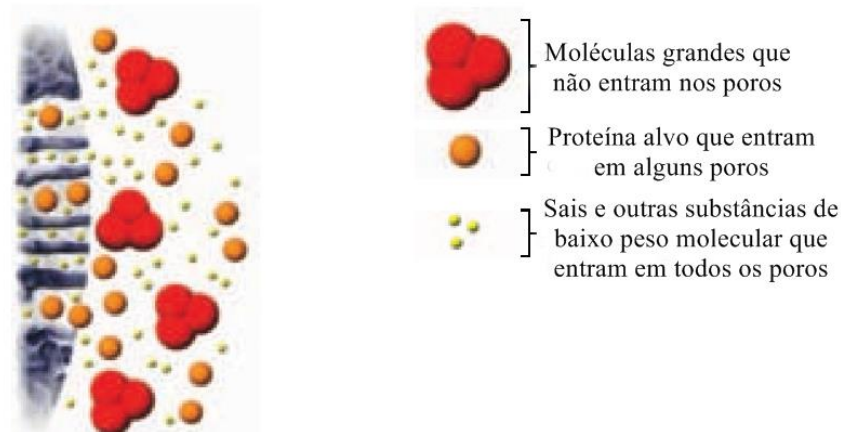


proteínas. Os materiais que as compõem podem ser classificados como materiais inorgânicos (sílica porosa, vidro poroso e hidroxiapatita), polímeros orgânicos sintéticos (poliacrilamida, polimetacrilato e poliestireno) e polissacarídeos (celulose, dextrano e agarose) (Janson e Jonsson, 2011).

### 3.2.2. Filtração em gel

A filtração em gel (GF) é um método que não envolve ligação entre seus componentes, e permite a separação de substâncias com diferenças em seus tamanhos moleculares. A GF pode ser utilizada para a purificação de proteínas ou separação de amostras em dois grupos principais, o que é feito para a dessalinização e troca de tampões, por exemplo (Hedhammar, 2006). A GF é uma das técnicas cromatográficas mais antigas existentes. O primeiro cromatograma descrito na literatura foi registrado por Lathe e Ruthven em 1956, que separaram hidrocarbonetos em uma coluna contendo amido de batata.

A separação pela GF é baseada na exclusão parcial de moléculas de polímeros dos poros da fase estacionária. Moléculas pequenas conseguem entrar na maioria dos poros e eluem no final do cromatograma, próximo ao solvente. Moléculas maiores não conseguem entrar em alguns poros, e se movem pela coluna mais rapidamente, eluindo antes do solvente. Macromoléculas que são muito grandes para entrar em qualquer poro eluem no limite de exclusão da coluna (Uliyanchenko, 2014). Além do tamanho, a forma molecular, ou mais precisamente seu volume esférico ou volume hidrodinâmico, também interfere na separação pela GF. Dessa forma, moléculas assimétricas parecem eluir em padrões como se fossem de maior peso molecular quando comparadas a moléculas simétricas de mesmo peso. Em outras palavras, proteínas assimétricas eluem mais rápido que proteínas globulares de peso molecular semelhante (O'Fágáin et al, 2011). A figura 3.2.1 mostra um esquema da cromatografia por exclusão de tamanho.



**Figura 3.2.1** - Esquema de filtração em gel (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

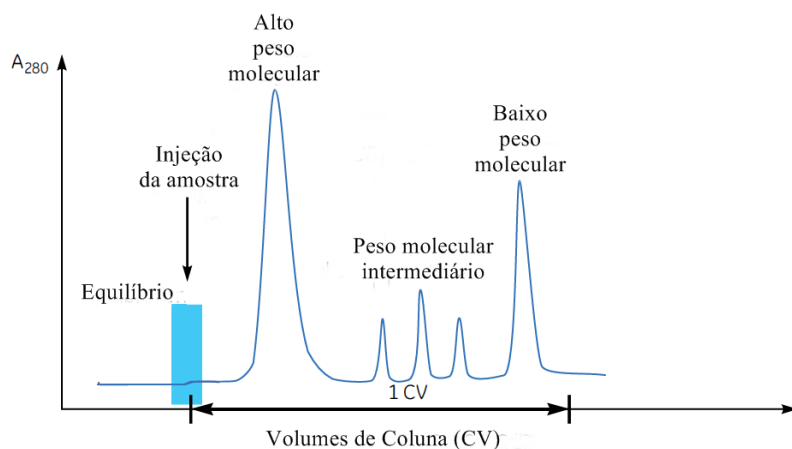
Vários fatores devem ser considerados durante o desenvolvimento de um sistema de GF, tais como a escolha da matriz, o tamanho e concentração da amostra, os parâmetros da coluna, escolha do eluente, a taxa de fluxo e a limpeza e armazenamento da coluna. Matrizes comumente usadas na GF são compostas de poliacrilamida, agarose, dextrano, ou uma combinação destes. Elas devem ser inertes e não interagir com as moléculas sendo separadas para evitar a adsorção parcial, retardamento da progressão e formação de picos com “cauda”. A maioria das matrizes pode ser limpa com NaOH 0,2M, ou detergentes não-iônicos. Quando não estiverem em

utilização, elas devem ser mantidas a 4 °C, na presença de agentes antimicrobianos, como azida sódica a 0,02-0,05% ou etanol a 20% (O'Fágáin et al, 2011).

Para garantir uma resolução suficiente da GF, as análises são comumente feitas em colunas de grandes dimensões ou várias colunas em série, taxas de fluxo (resolução máxima a 2 mL/cm<sup>2</sup>/h) relativamente baixas e utilizando baixos volumes relativos de amostra, de no máximo 5% do volume da coluna (CV) (Uliyanchenko, 2014). Para aumentar a baixa capacidade inerente das cromatografias, as amostras a serem purificadas podem ser concentradas anteriormente. No entanto, altas viscosidades devem ser evitadas, já que levam à migração irregular da amostra e perda de resolução. A cromatografia líquida de duas dimensões também beneficia a qualidade das separações pela GF. Neste caso, a amostra é primeiramente separada com base em alguma propriedade específica em uma primeira coluna cromatográfica (primeira dimensão). O efluente é fracionado e suas frações são subsequentemente separados pela exclusão de tamanho em uma segunda coluna cromatográfica (segunda dimensão). A GF é a técnica de separação mais comumente usada na segunda dimensão pela sua simplicidade e boa compatibilidade com os outros tipos de separação (van der Horst e Schoenmakers, 2003).

A GF independe do tipo de eluente utilizado, no entanto, as condições do eluente (pH, íons, cofatores, inibidores de protease, etc) devem ser selecionados para complementar os requisitos da molécula de interesse. Desta maneira, uma das principais vantagens da GF é que a separação pode ser realizada sob condições ótimas para a manutenção da estabilidade e atividade da molécula de interesse. Além disso, a força iônica deve ser suficiente para minimizar as interações eletrostáticas e de van der Waals entre as proteínas e entre estas e a matriz. A adição de 0,1 M de NaCl ou KCl é bastante comum. A ausência dessas interações e de uma etapa de ligação entre as substâncias alvo e a matriz previnem a danos desnecessários às moléculas, com consequentes altas recuperações de atividade (O'Fágáin et al, 2011).

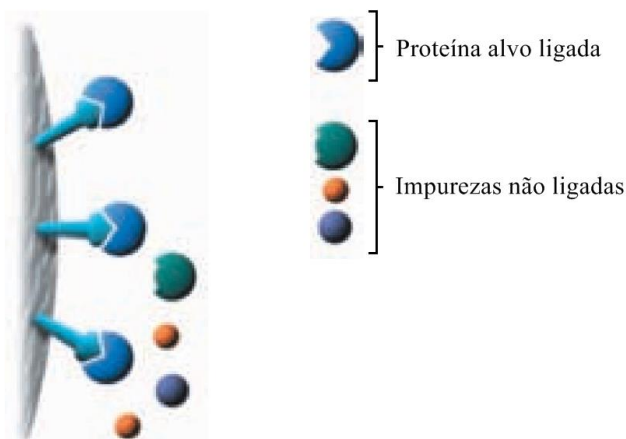
Entre as possíveis desvantagens da GF, destacam-se a diluição das amostras, baixas capacidade e taxas de fluxo e longa duração relativas. Como consequência do longo tempo das corridas, as proteínas separadas podem tornar-se alvo de proteases possivelmente presentes na amostra. Ademais, devido ao grande tamanho das colunas, os grandes volumes de soluções utilizados frequentemente aumentam os custos das corridas. Finalmente, quando comparada à outras técnicas, a GF possui baixa resolução inerente, pelo fato de nenhuma das moléculas ficarem retidas na coluna. Todavia, este método continua sendo bastante utilizado devido à sua versatilidade, à disponibilidade comercial de várias matrizes e às condições operacionais brandas (O'Fágáin et al, 2011). A figura 3.2.2 mostra um cromatograma típico de uma GF.



**Figura 3.2.2** - Cromatograma de filtração em gel (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

### 3.2.3. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade (AC) separa proteínas com base em uma interação específica e reversível entre a proteína alvo (ou um grupo de proteínas) e um ligante específico ligado à matriz de cromatografia (Figura 3.2.3). A interação pode ser bioespecífica, por exemplo, anticorpos se ligando a proteína A ou um receptor se ligando a um hormônio; ou não bioespecífica, por exemplo, uma proteína se ligando a um corante ou uma proteína contendo histidina se ligando a íons metálicos. A AC apresenta alta seletividade, alta resolução e capacidade intermediária a alta.



**Figura 3.2.3** - Esquema de cromatografia de afinidade (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

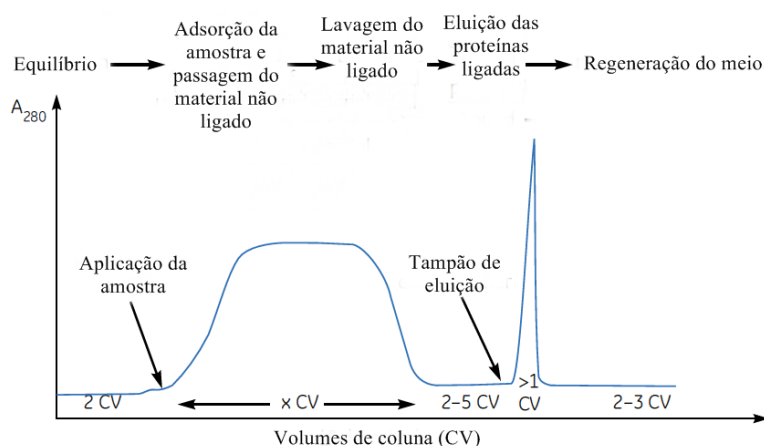
Em 1968, Cuatrecasas e colaboradores utilizaram a técnica de ativação de matriz com brometo de cianogênio para o acoplamento covalente de ligantes contendo grupamentos amina à matriz de agarose Sepharose 4B. Neste trabalho, pela primeira vez, o conceito de cromatografia de afinidade foi introduzido, sendo a base para o desenvolvimento da técnica para separação e purificação de proteínas. Subsequentemente, o desenvolvimento da AC foi facilitado pela introdução no mercado de uma série de matrizes pré-ativadas. Entre elas, a de maior sucesso comercial foi a Sepharose CL-4B ligada a proteína A para a separação específica de IgG em uma etapa a partir de plasma ou soro (Janson e Jonsson, 2011).

Os ligantes da AC podem ser uma variedade de agentes de ligação, desde uma proteína ou enzima até um anticorpo, antígeno, uma sequência de DNA ou RNA, um corante biomimético, um substrato ou inibidor de uma enzima, ou um composto de baixa massa (uma droga ou hormônio). O ligante é imobilizado dentro da coluna e utilizado para ligar seletivamente um alvo ou grupo de alvos da amostra. Pela natureza altamente seletiva de muitos ligantes, as colunas de AC podem ser usadas para isolar, medir ou estudar alvos específicos que se encontram em amostras biológicas complexas (Hermanson et al., 1992).

Um fator crítico no delineamento e uso de colunas de afinidade é o tipo de suporte ao qual o ligante é imobilizado. Muitos métodos de pré-tratamento da amostra ou isolamento de um alvo utilizam suportes de carboidratos, como a agarose ou celulose. Este tipo de material pode ser facilmente modificado para o acoplamento de ligantes, pode ser utilizado em uma grande variedade de condições de eluição, e apresenta baixa ligação inespecífica. Entretanto, pela estabilidade mecânica limitada e baixa eficiência de muitos materiais baseados em carboidratos, estes tendem a ser empregados em colunas que irão operar com baixas taxas de fluxo e pressão. Uma alternativa aos suportes tradicionais de carboidratos é a utilização de meios contendo

partículas de sílica ou materiais monolíticos, nas chamadas cromatografias líquidas de afinidade de alta performance (HPLAC) (Hermanson et al., 1992).

Em uma AC, primeiro a amostra é injetada na coluna sob condições que permitem forte ligação da proteína alvo com o ligante imobilizado. Essas condições comumente envolvem o uso de um tampão aquoso com pH e força iônica que mimetizam as condições nativas do ligante e do alvo. Compostos com pouca ou nenhuma interação com o ligante irão eluir da coluna neste momento, originando um pico de impurezas. No próximo passo, um tampão de eluição dissocia o alvo do ligante. Esta etapa de eluição requer alterações na composição da fase móvel, como mudança no pH, força iônica, polaridade, ou adição de um agente competitivo. Após a eluição do alvo, a coluna pode ser regenerada pela passagem de tampão original de aplicação (Hage et al., 2012). A figura 3.2.4 mostra um cromatograma típico de uma AC.



**Figura 3.2.4** - Cromatograma de cromatografia de afinidade (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

### 3.2.4. Cromatografia de imunoafinidade

A cromatografia de imunoafinidade (IAC) é uma categoria especial da AC, na qual os ligantes imobilizados da fase estacionária consistem em anticorpos (ou agentes relacionados a estes), ou em alvos de anticorpos, no caso da purificação de imunoglobulinas. A alta seletividade, estabilidade e forte ligação dos anticorpos aos seus alvos fizeram com que eles fossem largamente utilizados por muitos anos como ligantes imobilizados na AC. O primeiro uso de um tipo de IAC e métodos relacionados data de 1935, para a purificação de componentes de amostras biológicas. Compostos alvo imobilizados em caulim e carvão foram utilizados para isolar anticorpos associados com a sífilis e tuberculose (Moser e Hage, 2010).

Suportes para IAC devem ter boa eficiência, estabilidade mecânica e baixa ligação inespecífica. IAC tradicionais utilizam suportes de baixa performance, como meios de carboidratos (agarose e celulose) e polímeros sintéticos (acrilamida, polimetacrilato e polietersulfona). Nas HPLAC, agora chamadas de cromatografias de imunoafinidade de alta performance (HPIAC), materiais que suportam maiores taxas de fluxo e pressão são utilizados, tais como a sílica, vidro, azalactona, metacrilato e poliestireno (Moser e Hage, 2010). O formato de eluição mais utilizado na IAC é a eluição por degrau pela alteração do pH, embora agentes caotrópicos e modificadores orgânicos possam ser empregados. Além destes, agentes competitivos conhecidos também podem ser utilizados para deslocar os alvos nos sistemas de IAC, principalmente naqueles delineados como ensaios imunológicos (Hage et al., 2012).

Um dos sistemas de IAC mais utilizados para a purificação de anticorpos é o uso de proteínas de superfície bacterianas que interagem com a porção Fc das imunoglobulinas (Proteínas A ou G) ou com as cadeias leves das imunoglobulinas (Protein L). A proteína A, da parede celular de *Staphylococcus aureus*, se liga seletivamente a região Fc das IgG. A proteína de superfície G, de *Streptococci*, também possui afinidade específica pela região Fc da IgG. No entanto, também se associa com a cadeia pesada do fragmento Fab. Já a proteína L, de *Peptostreptococcus magnus*, se liga às cadeias leves de anticorpos (Fitzgerald et al., 2011; Ayyar et al., 2012).

### 3.2.5. Cromatografia de afinidade por íons metálicos

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) é baseada na interação de proteínas contendo resíduos de histidina (principalmente) ou triptofano ou cisteína em suas superfícies com íons metálicos divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  por exemplo) imobilizados via um agente quelante, como o ácido iminodiacético, ácido nitrilotriacético, ácido aspártico carboximetilado, e ácido L-glutâmico (Hage et al., 2012). Proteínas com caudas de histidina apresentam afinidade extra na IMAC por causa da presença de múltiplos resíduos de histina (de 6 a 10).

A IMAC foi introduzida por Porath e colaboradores em 1975 e representou um importante avanço para a separação e purificação de proteínas. Para fracionar e purificar proteínas em solução, esses autores imobilizaram íons metálicos em agarose utilizando ácido iminodiacético. Posteriormente, o método foi mais desenvolvido pela introdução do conceito de adição de caudas de histidina em combinação com novos grupos quelantes para separações e purificações altamente seletivas de proteínas expressas em *Escherichia coli*.

Muitas proteínas podem formar complexos com íons metálicos. IMAC pode ser delineada para a purificação de muitos destes complexos quelados. A força desses complexos formados diferem entre si, justificando a alta especificidade da IMAC. Após a adição dos íons metálicos ao meio cromatográfico, eles formam complexos com os ligantes quelantes. Alguns sítios dos metais permanecem livres para se ligarem ao solvente ou proteínas (Kagedal, 2011).

A eluição da proteína alvo pode ser efetuada pelo o uso de tampões com baixo pH, com um agente competitivo de deslocamento ou um agente quelante. Tampões com baixo valor de pH (pH 4, por exemplo) são comumente utilizados. Deslocamento por competição com imidazol em pH próximo da neutralidade é mais apropriado para proteínas sensíveis a baixo pH. Introdução de uma agente quelante forte, como o EDTA, extrai os íons metálicos e desfaz a interação entre as proteínas e os ligantes. Neste caso, a coluna deve ser recarregada com novos íons metálicos antes da próxima purificação (Chaga, 2001).

Uma variedade de suportes para IMAC têm sido desenvolvida. Suportes tradicionais são baseados em matrizes de agarose, e polissacarídeos, como a celulose, os quais possuem compatibilidade biológica. No entanto, eles possuem baixa força mecânica e não suportam sistemas de alta pressão. Em contrapartida, suportes inorgânicos, como a sílica, possuem ótimas propriedades mecânicas, mas apresentam adsorção inespecífica irreversível com proteínas (Cheung et al., 2012).

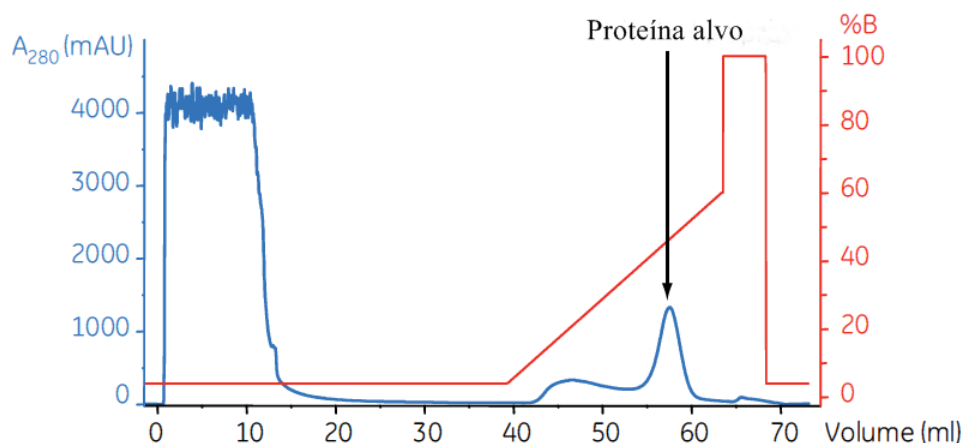
Ligantes quelantes tetradentados possuem maiores afinidades por íons metálicos que os tridentados, mas demonstram menos capacidade de ligação às proteínas pela perda de um sítio de coordenação. Isto é mais evidente nos ligantes pentadentados, já que eles ocupam cinco dos seis sítios de coordenação do  $\text{Ni}^{2+}$ , deixando apenas um para ligar proteínas (Cheung et al., 2012).

A afinidade de uma proteína por uma resina de IMAC depende do íon metálico presente. A afinidade dos íons metálicos com os ligantes varia de acordo com o último. Já a escolha do íon metálico imobilizado na matriz depende da sua aplicação. Como exemplo, íons trivalentes ( $\text{Al}^{3+}$ ,

$\text{Ga}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) são preferencialmente utilizados para a purificação de fosfoproteínas; íons divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ ) são utilizados na purificação de proteínas com caudas de histidina. Além disso, os íons metálicos podem ser facilmente retirados das resinas, e outros podem ser testados na mesma resina visando o aperfeiçoamento da purificação da proteína alvo (Cheung et al., 2012).

A compatibilidade das matrizes de IMAC com uma diversidade de químicos, como caotrópicos, sais, solventes orgânicos, detergentes e agentes redutores facilita a adaptação às necessidades específicas das purificações de proteínas. A introdução de  $\text{NaCl}$  0,3-1,0M nos tampões é comum visando minimizar interações iônicas entre as proteínas e a resina. Glicerol, em até 50%, ou etanol, em até 20%, podem ser adicionados aos tampões para prevenir interações hidrofóbicas entre as proteínas. Por outro lado, tampões de aplicação com pH ligeiramente alcalino são os mais usados para facilitar a ligação das proteínas. Tampões fosfato e acetato são os mais comuns já que não se ligam aos sítios de coordenação dos íons metálicos. Além disso, adição de detergentes em qualquer tampão melhora a seletividade, performance e rendimento (Cheung et al., 2012).

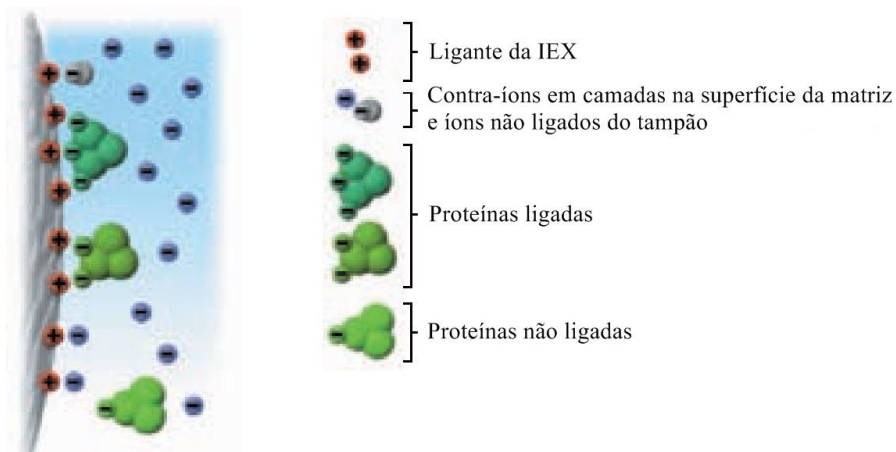
O maior entrave na utilização da IMAC deve ser o potencial escape dos íons metálicos da coluna cromatográfica. A presença destes íons nas frações coletadas pode interferir na pureza, vida útil e atividade das proteínas isoladas. Isto é particularmente indesejável quando a proteína alvo é utilizada como produto terapêutico (Hage et al., 2012). Além disso, se a proteína alvo possuir afinidade suficiente para remover os íons metálicos dos seus ligantes, ela passará pela coluna sem ser retida, o que levará à perda significativa de proteína. A figura 3.2.5 mostra um cromatograma típico de uma IMAC com eluição por gradiente.



**Figura 3.2.5** - Cromatograma de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

### 3.2.6. Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica (IEX) separa proteínas com diferenças em suas cargas de superfície, fornecendo separações com alta resolução e alta capacidade de carregamento de amostras. A separação é baseada na interação reversível entre uma proteína carregada e o meio cromatográfico com carga oposta. As proteínas alvo são concentradas durante sua ligação e coletadas de forma purificada e concentrada. A figura 3.2.6 mostra um esquema da IEX.



**Figura 3.2.6** - Esquema de cromatografia de troca iônica (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

Polímeros orgânicos porosos trocadores de íons baseados em monômeros, como o estireno, ácido metacrílico e divinilbenzeno, se tornaram disponíveis comercialmente durante os anos 1940. No entanto, o maior avanço foi feito nos anos 1950, com a introdução das matrizes DEAE- e CM-Celulose, fosfato de cálcio (hidroxiapatita) e quaternário de amônio. Já no início dos anos 1960, trocadores iônicos baseados em géis de dextrano com ligações cruzadas (Sephadex) foram introduzidos e rapidamente assumiram várias aplicações. As principais desvantagens desta resina, o encolhimento e inchamento sob forças iônicas altas e baixas, respectivamente, foram superadas nos anos 1970 pelo desenvolvimento de trocadores iônicos baseados em agarose com ligações cruzadas, como a DEAE-Sephacrose CL-6B e a SP-Sephacrose CL-6B. Dez anos mais tarde, foi lançada a segunda geração de trocadores iônicos baseados em agarose com ligações cruzadas, a série Sepharose Fast Flow. Finalmente, em 2001, novas melhorias nos processos de produção de agarose com ligações cruzadas aumentaram consideravelmente a rigidez do gel, dando origem à terceira geração de trocadores iônicos (Capto Q, Capto DEAE, Capto S, Capto adhere e Capto MMC) (Janson e Jonsson, 2011).

Atualmente, a IEX tem sido utilizada para a purificação de proteínas, enzimas, anticorpos, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos e compostos orgânicos. Suas grandes capacidade e aplicabilidade, alta performance, custo moderado e facilidades de escalonamento e automatização fizeram com que a IEX se tornasse um dos métodos mais versáteis e mais utilizados de cromatografia líquida (Cummins et al., 2011).

A IEX compreende uma fase móvel, tipicamente um sistema de tampão aquoso onde a amostra é introduzida para sua purificação; e uma fase estacionária, frequentemente uma matriz orgânica inerte com grupos funcionais ionizáveis que carregam contra-íons deslocáveis de carga oposta. Esses contra-íons existem em equilíbrio entre as duas fases, permitindo dois possíveis formatos de IEX, chamadas de troca aniônica e troca catiônica. Contra-íons podem incluir prótons, grupos hidroxila, íons monoatômicos com carga simples ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), íons inorgânicos poliatômicos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), bases orgânicas ( $\text{NR}_2\text{H}^+$ ) e ácidos ( $\text{COO}^-$ ) (Cummins et al., 2011).

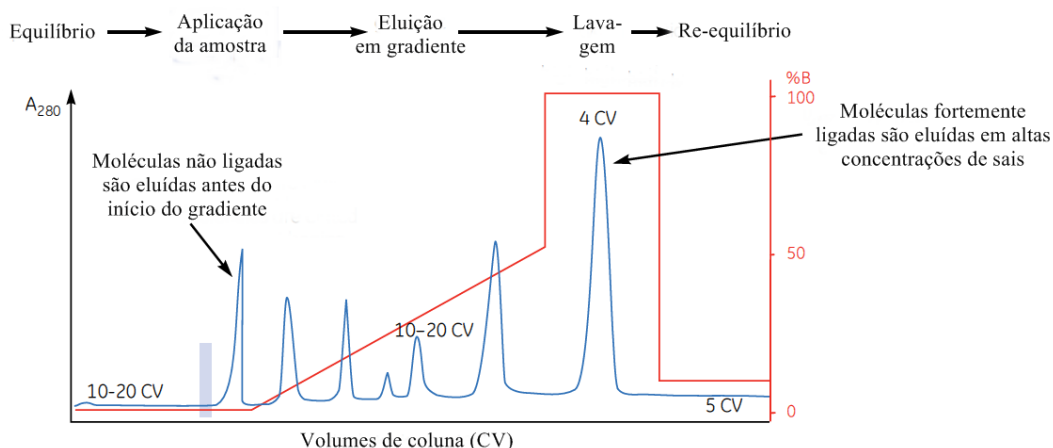
Durante a IEX, o pH da fase móvel determina a carga dos grupos funcionais da matriz e a carga individual das proteínas da amostra. Tipicamente, quando o pH do entorno está acima do ponto isoelétrico (pI) de uma proteína, esta adquire carga negativa e se liga a trocadores aniônicos carregados positivamente. Ao contrário, quando o pH está abaixo do pI de uma proteína, esta adquire carga positiva e se liga a trocadores catiônicos carregados negativamente. Naturalmente, diferentes proteínas podem possuir diferentes pI e possuir diferentes cargas em determinado pH. Sendo assim, o pH da fase móvel pode ser selecionado para garantir que uma proteína de interesse

tenha carga oposta à da matriz utilizada, e se ligue a esta. Inversamente, contaminantes de carga oposta não se ligarão. Alternativamente, o pH da fase móvel pode ser selecionado para garantir que as moléculas contaminantes se liguem à matriz, e a proteína de interesse não se ligue e seja prontamente eluída (Fekete et al, 2015).

Além de variarem em relação a suas cargas, as matrizes de IEX podem ser classificadas em trocadoras iônicas fortes ou fracas. Trocadoras fortes se encontram totalmente ionizadas em uma grande faixa de pH, e não variam sua carga com a mudança de pH; trocadoras fracas se encontram fracamente ionizadas em uma faixa estreita de pH, e suas cargas variam significativamente com o pH. Os tampões utilizados na IEX variam de acordo com as matrizes empregadas, sendo que os íons dos tampões não devem interagir com os grupos funcionais daquelas. De forma geral, tampões Tris são frequentemente utilizados com trocadores DEAE; enquanto tampões fosfato e acetato são frequentemente utilizados com trocadores CM (Cummins et al., 2011).

Proteínas ligadas podem ser eluídas de duas formas, pela alteração do pH ou da força iônica. Alterando o pH da fase móvel, a carga das proteínas ligadas também é alterada, podendo reduzir sua capacidade de ligação à matriz. Alternativamente, o aumento da concentração de sais (NaCl, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>) na fase móvel faz com que a afinidade de interação entre os íons de sais e os grupos funcionais da matriz eventualmente excedam a afinidade entre as cargas das proteínas e os mesmos grupos funcionais, resultando no deslocamento e eluição das proteínas (Cummins et al., 2011).

A figura 3.2.7 mostra um cromatograma típico de uma IEX com eluição por gradiente.



**Figura 3.2.7** - Cromatograma de cromatografia de troca iônica (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

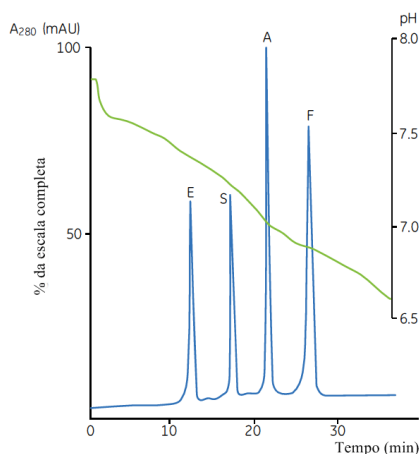
### 3.2.7. Focagem isoelétrica

Em 1978, um novo conceito dentro da IEX foi introduzido e chamado de focagem isoelétrica (CF). Após as publicações dos primeiros trabalhos, estes foram seguidos da introdução no mercado de trocadores iônicos e tampões específicos para a técnica. A CF separa as proteínas com base nos seus pontos isoelétricos (pI). Os cromatogramas são compostos de vários picos estreitos, possibilitando a resolução de proteínas muito similares com diferenças em seus pI de até 0,02 unidades de pH (Janson e Jonsson, 2011).

Um gradiente de pH é gerado na coluna enquanto tampão e o meio cromatográfico, um trocador aniônico fraco, interagem. Proteínas com diferentes valores de pI migram pela coluna



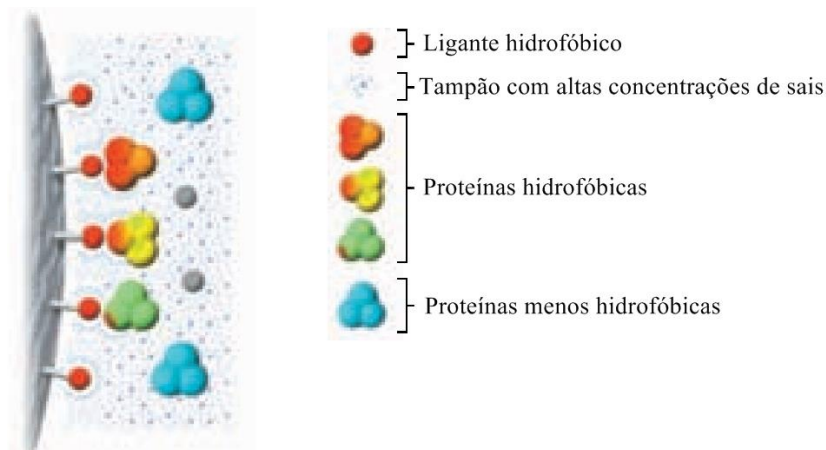
com diferentes velocidades enquanto o gradiente de pH progride, se ligando e dissociando até que finalmente eluem em picos estreitos (Figura 3.2.8). O limite superior do gradiente de pH é dado pelo tampão inicial, com o pH um pouco acima do máximo necessário e com baixa força iônica. O limite inferior do gradiente é definido pelo tampão de eluição com o pH ligeiramente abaixo do requerido. Proteínas das amostras com o pH acima do seu pI estão negativamente carregadas e se ligam ao topo da coluna. Proteínas com o pH abaixo do seu pI migram pela coluna com o tampão e não se ligam. Enquanto o pH continua a diminuir, proteínas que atingem pH abaixo do seu pI se tornam positivas, são repelidas pelos grupos amina positivos da matriz, e começam a migrar pela coluna e ser eluídas. Portanto, a proteína com o maior pI elui primeiro, e aquela com o menor pI elui por último.



**Figura 3.2.8** - Cromatograma de focagem isoelétrica (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

### 3.2.8. Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) separa as proteínas com base em diferenças nas suas hidrofobicidades, como resultado da quantidade de aminoácidos hidrofóbicos expostos. A separação é baseada na interação reversível entre a proteína e a superfície hidrofóbica de um meio cromatográfico. Essa interação é favorecida pela alta força iônica do tampão dada pela alta concentração de sais (Figura 3.2.9). As proteínas alvo são concentradas durante a ligação à coluna, e são coletadas de forma purificada e concentrada.



**Figura 3.2.9** - Esquema de cromatografia de interação hidrofóbica (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

Relatos de comportamentos anômalos de ligantes começaram a aparecer na literatura nos anos 1970, e as ligações observadas foram atribuídas como hidrofóbicas. Posteriormente, as interações hidrofóbicas foram rapidamente reconhecidas como potentes ferramentas para a separação de proteínas. O primeiro trabalho demonstrando o efeito promotor dos sais na adsorção das proteínas a um suporte hidrofílico substituído por ligantes hidrofóbicos data de 1973 (Porath et al., 1973).

É essencial para a técnica que a matriz (agarose ou sepharose desulfatadas) não carregue nenhuma carga iônica para evitar interações iônicas entre ela e as proteínas. Para técnicas de altas taxas de fluxo e pressão, como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), resinas de sílica e polímeros orgânicos também são utilizados. Estas matrizes possuem braços espaçadores (cadeias de hidrocarbonetos com 4 a 10 carbonos, frequentemente), onde grupos hidrofóbicos (octil, butil ou fenil) são introduzidos. Quanto maior for a cadeia de carbonos, maior a hidrofobicidade e maior a força de interação entre as proteínas e os ligantes hidrofóbicos (Hahn et al., 2003; Cummins e O'Connor, 2011).

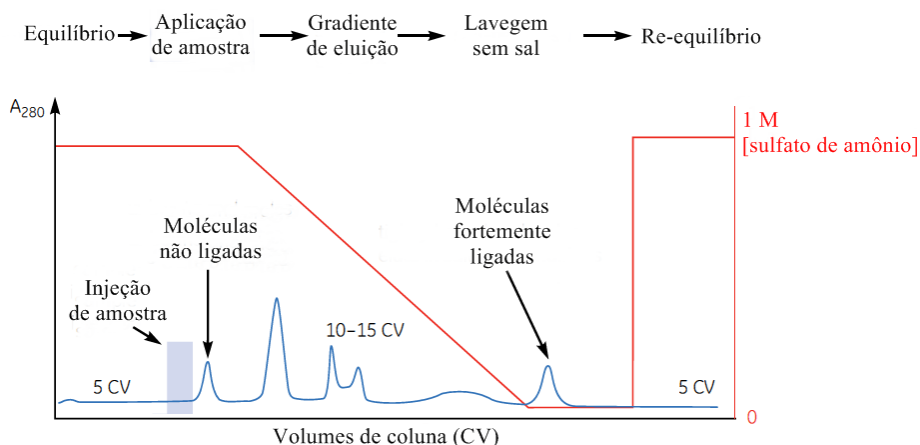
A etapa de adsorção requer a presença de íons de precipitação, tais como NaCl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Esses sais de íons reduzem a disponibilidade de moléculas de água em solução, aumentando a tensão superficial e as interações hidrofóbicas (Cummins e O'Connor, 2011). Altas concentrações de sais também podem causar desnaturação e desdobramento parciais das proteínas com exposição das suas regiões hidrofóbicas, com consequente aumento das interações hidrofóbicas e ligações (Cummins e O'Connor, 2011). Como a HIC é conduzida sob altas forças iônicas, há risco de precipitação das proteínas dentro da coluna cromatográfica. Sendo assim, a concentração de sais utilizada na adsorção deve ser mantida abaixo daquela que precipita qualquer proteína presente na amostra (Hedhammar et al., 2006). Tipicamente,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 a 2 M ou NaCl 3M são empregados. Como consequência do acima descrito, as HIC são ideais para etapas de purificação após precipitação por sais, como o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e após purificações por IEX, quando a amostra apresenta altas concentrações de sais utilizadas na eluição. A HIC também pode preceder a IEX, já que a amostras eluída na primeira contém baixo teor de sais, o que se adequa às condições de entrada de amostra necessárias para a última.

O pH dos tampões usados na HIC influenciam diretamente na adsorção das proteínas à matriz. Frequentemente, aumento nos valores de pH até 9-10 reduz as interações hidrofóbicas entre as proteínas e os ligantes hidrofóbicos devido ao aumento da hidrofiliicidade pela mudança da carga das proteínas. No entanto, proteínas com altos pI se ligam fortemente às matrizes sob valores de pH igualmente altos (Mahn e Asenjo, 2005). De forma geral, quando o pH do tampão

for igual ao pI de uma proteína, esta terá carga líquida final neutra, fazendo com que suas propriedades hidrofóbicas sejam máximas e favorecendo sua ligação ao meio cromatográfico da HIC.

A eluição das proteínas é frequentemente realizada pela diminuição das concentrações de sais por gradiente ou por degraus. Em alguns casos, redução na polaridade do solvente também é necessária. A adição de compostos redutores de polaridade, como o etilenoglicol, pode ser feita após ou concomitantemente com a retirada de sais do sistema. Se as interações hidrofóbicas forem muito fortes, praticamente irreversíveis, solventes orgânicos, detergentes ou agentes caotrópicos são necessários para a eluição, mas podem desnaturar as proteínas (Queiroz et al., 2001).

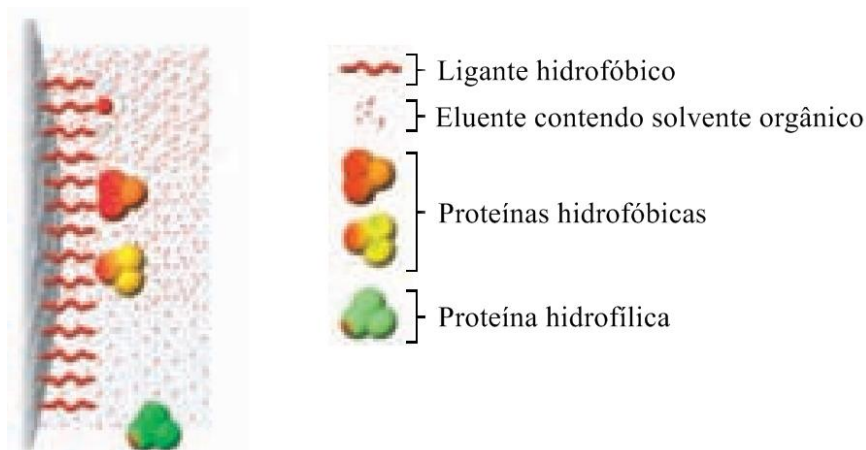
A figura 3.2.10 mostra um cromatograma típico de uma HIC com eluição por gradiente.



**Figura 3.2.10** - Cromatograma de cromatografia de interação hidrofóbica (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

### 3.2.9. Cromatografia de fase reversa

Assim como a HIC, a cromatografia de fase reversa (RPC) separa proteínas e peptídeos com base em suas hidrofobicidades. A RPC é um método de alta resolução que requer a utilização de solventes orgânicos (Figura 3.2.11). Por muitas proteínas serem desnaturadas por solventes orgânicos, a RPC é largamente utilizada em análises de pureza e controle de qualidade, quando a manutenção da estrutura terciária e atividade não é essencial. Em proteínas pequenas (abaixo de 30 kDa) e polipeptídeos curtos, os efeitos desnaturantes são comumente mínimos ou rapidamente reversíveis; sendo assim, a RPC pode ser utilizada para o isolamento e purificação destas moléculas.



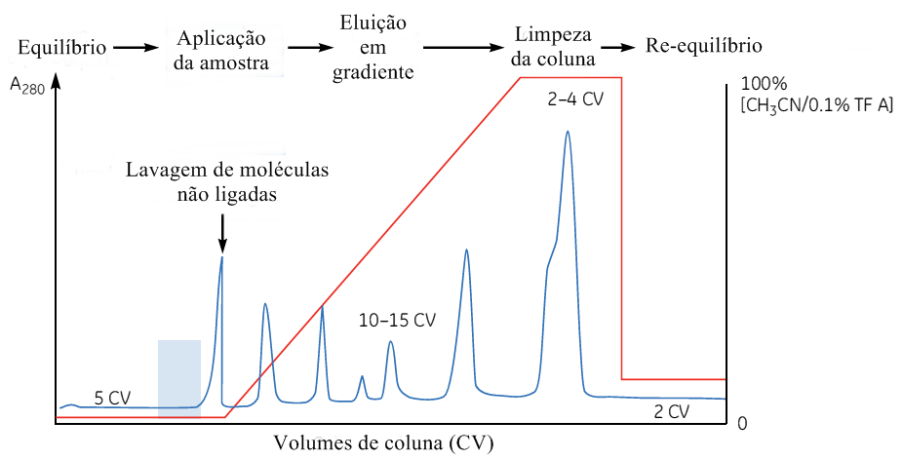
**Figura 3.2.11** - Esquema de cromatografia de fase reversa (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification)

Os primeiros trabalhos utilizando a RPC para a purificação de proteínas foram publicados a partir do final dos anos 1970, e se tornaram cada vez mais comuns com o desenvolvimento e melhora dos sistemas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Janson e Jonsson, 2011).

Assim como a HIC, a RPC se baseia nas interações entre ligantes hidrofóbicos covalentemente ligados à matriz e as regiões hidrofóbicas de moléculas aplicadas na fase móvel. Porém, no caso da RPC, as matrizes utilizadas possuem uma maior quantidade de ligantes hidrofóbicos. Consequentemente, as interações hidrofóbicas que ocorrem na RPC são mais fortes; fortes o bastante para permitir que as proteínas sejam adsorvidas em água pura, sem a presença de sais (Hedhammar et al., 2006).

As matrizes mais comuns utilizadas na RPC são baseadas em géis de esferas de sílica porosa com grupos Si-OH modificados para anexar os ligantes. Esferas de sílica são mecanicamente fortes e quimicamente estáveis em solventes orgânicos. As partículas de sílica são quase totalmente ligadas quimicamente a cadeias de hidrocarbonetos (2 a 8 carbonos para separação de proteínas; 8 a 18 para peptídeos), permitindo as fortes interações hidrofóbicas observadas na RPC. Polímeros orgânicos sintéticos, como o poliestireno, também estão disponíveis como géis de RPC; no entanto, esses materiais são menos estáveis mecanicamente, e tendem a encolher ou inchar na presença de diferentes solventes (Hedhammar et al., 2006).

A fase móvel de ligação inicial da RPC é primordialmente aquosa. As moléculas de água se organizam no entorno da matriz cromatográfica, permitindo a forte ligação das proteínas. Posteriormente, os solventes orgânicos reduzem a polaridade da fase móvel, aumentando a sua força eluente. A eluição é realizada pelo aumento em gradiente da concentração dos solventes orgânicos, comumente a acetonitrila, metanol, etanol ou propanol (Hedhammar et al., 2006). A figura 3.2.12 mostra um cromatograma típico de uma RPC com eluição por gradiente.



**Figura 3.2.12** - Cromatograma de cromatografia de fase reversa (Adaptado de GE Healthcare, Strategies for Protein Purification).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Locais de Realização dos Experimentos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo (LANAGRO-MG) e no Laboratório de Imunologia e Bioprodutos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). As etapas de bacteriologia e produção das toxinas foram realizadas no Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG. As ultrafiltrações das toxinas e titulações das antitoxinas foram feitas no LANAGRO-MG. As purificações das toxinas e antitoxinas foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Bioprodutos da FUNED. Já as imunizações dos ovinos se passaram no LANAGRO-MG, e as das galinhas na EV-UFMG.

### **4.2. Animais Utilizados**

Os animais utilizados neste projeto foram tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Foram utilizados camundongos de ambos os sexos da raça *Swiss*, linhagem *Webster*, com peso variando entre 16 a 22 g, adquiridos junto ao setor de Experimentação Animal do LANAGRO-MG. Oito carneiros entre 4 e 8 meses de idade foram adquiridos junto a fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFMG, e mantidos soltos em piquete no LANAGRO-MG durante o experimento. Oito galinhas poedeiras em pico de produção foram adquiridas junto a fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFMG, e mantidas em gaiolas individuais no biotério da EV-UFMG. Foram também utilizados cobaios da linhagem *English Short Ear*, de ambos os sexos, pesando entre 350 e 500 g, cedidos pelo LANAGRO-MG (Reed e Muench, 1938; Brasil, 1997; British Pharmacopeia, 1998; Lobato et al., 2000; Brasil, 2002; Araújo, 2007; Souza et al., 2010; Langroudi, 2014; Zayerzadeh et al., 2014). O presente trabalho obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) para a utilização destes animais, com o número de protocolo 214/2016.

### **4.3. Amostras Utilizadas – Estirpes Bacterianas**

Foram empregadas, neste trabalho, as estirpes: *Clostridium botulinum* tipos C e D, cedidas pelo LANAGRO/MG; *C. perfringens* tipo C (ATCC-3628) adquirida junto ao American Type Culture Collection (EUA); e *C. perfringens* tipo D (Uzal et al., 1997), pertencente à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG. Todas as estirpes foram mantidas liofilizadas e congeladas até momento do uso.

### **4.4. Amostras Utilizadas – Toxinas e Antitoxinas Padrões**

Durante o trabalho, para a realização das comparações dos insumos produzidos com aqueles oficiais, e para as titulações das antitoxinas, foram utilizados as toxinas e antitoxinas padrões C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens* cedidos pelo LANAGRO-MG

### **4.5. Reconstituição e Teste de Pureza das Amostras Bacterianas.**

Para confirmação da viabilidade das amostras bacterianas, as mesmas foram avaliadas quanto a pureza e capacidade de crescimento em anaerobiose. Cada amostra liofilizada foi

reconstituída com 1 mL de meio de cultura líquido BHI (Brain and Heat Infusion Broth, Difco, EUA) e transferida para um tubo de ensaio com tampa rosca contendo 9 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C, em câmara de anaerobiose (Thermo Scientific, EUA) contendo mistura gasosa (80% N<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; e 10% H<sub>2</sub>), por 24 horas. Após esse período, as amostras foram semeadas em tubos de ensaio com tampa rosca contendo caldo BHI e em duas placas com ágar sangue (AS) de carneiro a 5% e uma placa de ágar gema de ovo (para *C. botulinum* tipos C e D) ou uma placa de ágar SPS (para *C. perfringens* tipos C e D). Os tubos, uma das placas de ágar sangue e a placa de ágar gema de ovo ou SPS foram incubados a 37°C, em câmara de anaerobiose contendo mistura gasosa (80% N<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; e 10% H<sub>2</sub>), por 24 horas. A outra placa de ágar sangue foi deixada em aerobiose para avaliação da pureza das amostras. As unidades formadoras de colônias foram avaliadas por morfologia de colônia, aspecto da hemólise, método de Gram e visualização dos esporos no corpo celular. Foram avaliadas também as reações de lipase e lecitinase nas amostras de *C. botulinum* semeadas em ágar gema de ovo.

#### 4.6. Extração de DNA

Das placas incubadas em anaerobiose, foram coletadas três a cinco colônias de cada estirpe bacteriana e adicionadas em 400 µL de água Mili-Q estéril. As amostras foram aquecidas a 98 °C por 20 minutos e centrifugadas a 6000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a 4 a 8 °C até o momento do uso e utilizado como molde na PCR.

#### 4.7. Tipificação e Confirmação da Identidade das Estirpes.

A tipificação das amostras foi realizada por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) previamente padronizadas. Para tipificação das estirpes de *C. botulinum*, foi empregada a PCR multiplex que permite a tipificação simultânea dos genes da toxina botulínica C (BOT-C) e D (BOT-D), conforme descrito por Prévot et al. (2007).

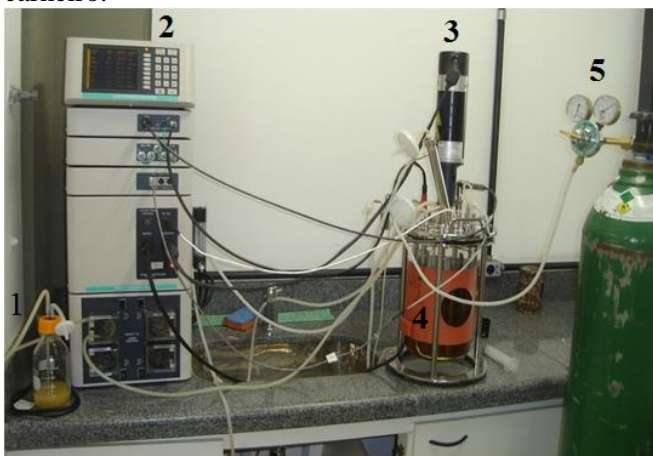
Às amostras de *C. perfringens*, foi empregada a PCR multiplex para detecção dos genes da toxina beta 2 (*cpb-2*), enterotoxina (*cpe*) e das toxinas principais de *C. perfringens* alfa (*cpa*), beta (*cpb*), épsilon (*etx*) e iota (*itx*) (Vieira, et al. 2008). Os amplicons da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5-2% p/v. A corrente elétrica, de até 200mA, foi conduzida em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X a 120 volts, por 120 minutos. Foi utilizado um marcador de peso molecular 100bp. (KASVI, Brasil) com faixas de peso molecular variando de 100 a 3500 bp, servindo como referência para a determinação do peso molecular dos amplicons.

#### 4.8. Produção das Toxinas

A produção das toxinas foi realizada por meio do cultivo das estirpes após correta identificação e tipificação fenotípica e genotípica. Os cultivos foram realizados em meios específicos para cada *Clostridium sp.*

Para a produção de cada uma das toxinas, foi utilizado um biorreator de bancada (BioFlo 110) (New Brunswick Scientific C.O., Reino Unido) com volume da dorna de 7,5 L (Figura 4.1). O biorreator é provido de uma turbina do tipo *pitched-blade*, dispendo de controle de velocidade de agitação e fornecimento de gás nitrogênio, o qual permite manter uma atmosfera anaeróbia durante o ensaio. O aparelho possui um sistema automático de controle de temperatura e pH, além de permitir a coleta de alíquotas para a dosagem da concentração celular, quantificada por meio da medida de densidade ótica (DO), em espectrofotômetro, lida a 600 nm, a cada hora. As alíquotas foram também utilizadas para avaliar a pureza do cultivo pela coloração de Gram e teste

respiratório em placas de agar Müller-Hinton (Difco, EUA) suplementado com 5% de sangue de carneiro.



**Figura 4.1** – Foto do biorreator BioFlo 110 utilizado nos cultivos de *Clostridium spp.* **1.** Inóculo; **2.** Painel de Controle **3.** Turbina *pitched-blade*; **4.** Dorna de Cultivo; **5.** Bala de Nitrogênio.

Fonte: arquivo do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG.

Para a produção das neurotoxinas botulínicas, foi utilizado o meio TPOM descrito por Zhao et al. (2012), que contém 1% extrato de levedura, 2% hidrolisado de caseína, 2% tioglicolato de sódio ácido e 0,05% de L-cisteína e 0,5% de glicose, pH 7.2). O pré-inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) do volume total de meio de cultura para o cultivo. O cultivo foi mantido por no máximo 24 horas no biorreator e o fim do processo determinado pela medida da DO.

Para a produção das toxinas beta e épsilon de *C. perfringens* tipos C e D, respectivamente, foi utilizado o meio de produção de toxina (MTP), suplementado com 0,05% de cisteína, com controle de pH para manutenção entre 6,5 e 6,9. O pré-inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) do volume da dorna. O cultivo foi mantido por aproximadamente nove horas (Carvalho et al., 2006; Brandi et al., 2014).

#### **4.9. Purificação das Toxinas**

O quadro 4.1 apresenta os principais tampões utilizados nas cromatografias realizadas para a purificação das toxinas clostridiais objetos deste trabalho.



**Quadro 4.1** – Métodos cromatográficos e respectivos tampões utilizados nas corridas cromatográficas de purificação das toxinas clostridiais C, D, beta e épsilon.

Cromatografia	Tampões Utilizados		
	Equilíbrio	Lavagem	Eluição
GF das toxinas C e D de <i>C. botulinum</i>	NaCl 150 mM Tris 50 mM pH 8,2	NaCl 150 mM Tris 50 mM pH 8,2	NaCl 150 mM Tris 50 mM pH 8,2
IMAC da toxina Beta de <i>C. perfringens</i>	Fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M pH 7,7	Fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M pH 7,7	Fosfato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,7-6,6
IEX da toxina Épsilon de <i>C. perfringens</i>	PBS 0,01 M, pH 7,2	PBS 0,01 M, pH 7,2	NaCl 1M
GF da toxina Épsilon de <i>C. perfringens</i>	PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2	PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2	PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2

#### 4.9.1. Concentração e diafiltração das toxinas

Após os cultivos das estirpes, as suspensões foram centrifugadas a 4500 x g, por 40 minutos a 4°C em ultracentrífuga da marca Hettich, modelo 420R. O sobrenadante removido foi concentrado no Laboratório de Produção de Materiais de Referência do LANAGRO/MG a 1/10 do volume inicial, pelo sistema de ultrafiltração tangencial (Figura 4.2); utilizando membrana de retenção de 30 kDa Prepscale® (Millipore, EUA) para os sobrenadantes de cultivo de *C. botulinum* tipos C e D; e membrana de retenção de 10 kDa Prepscale® (Millipore, EUA) para os demais sobrenadantes de cultivo, com auxílio de bomba peristáltica tipo *easy load*® (Millipore, EUA).



**Figura 4.2** – Foto do sistema de ultrafiltração tangencial utilizado para a concentração e diafiltração dos sobrenadantes de cultivo bacteriano. Laboratório de Produção de Materiais de Referência do LANAGRO-MG.

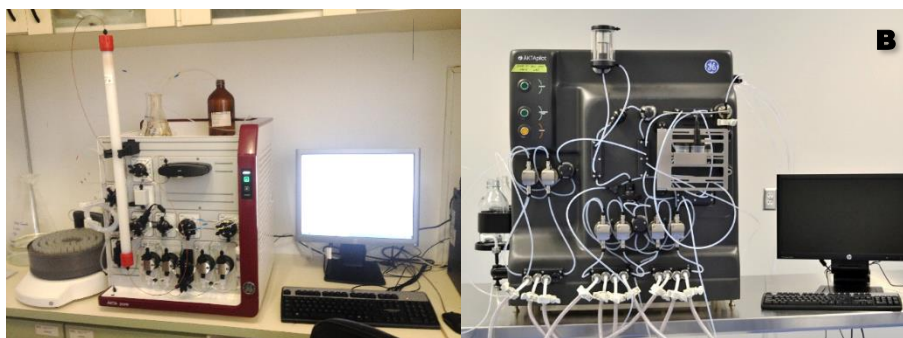
Após a concentração a 1/10 do volume inicial, o sobrenadante tinha seu volume dobrado com tampão para cromatografia e era novamente concentrado a 1/10 do volume inicial. Este processo, denominado diafiltração, foi realizado um total de cinco vezes. O tampão utilizado

variou de acordo com a toxina envolvida e o método cromatográfico utilizado em sua purificação, correspondendo aquele utilizado durante as etapas de equilíbrio das corridas cromatográficas. O processo de purificação das toxinas se deu por métodos cromatográficos específicos, cada um com suas particularidades descritas abaixo.

#### 4.9.2. Purificação das neurotoxinas C e D de *Clostridium botulinum*

O sobrenadante concentrado foi submetido à precipitação proteica adicionando-se solução de polietilenoglicol – PEG 6000 a 50% (v/v) em água ultrapura, sob agitação lenta durante 30 minutos, para a concentração final de 25% de PEG - 1:2 (Zhao et al., 2012). O precipitado contendo PEG foi então armazenado sob refrigeração a 4°C por 12 horas. Após esse período, o precipitado foi centrifugado em ultracentrífuga Beckman J2-21M, a 4°C, 10.000 x g durante 30 minutos para a retirada de debris celulares. O sobrenadante foi armazenado em outro recipiente sob refrigeração, e o sedimento contendo as proteínas, ressuspensionado para 1/3 do volume inicial utilizando solução tampão NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 8,2 (Zhao et al., 2012). A proteína ressuspensionada em tampão foi fracionada em tubos tipo Falcon de 15 mL, contendo 10 mL por tubo, e congeladas a -20°C até o momento da cromatografia.

A toxinas botulínicas tipo C e D precipitadas e congeladas, foram submetidas a cromatografia por filtração em gel (GF), baseando-se no protocolo proposto por Zhao et al (2012), com modificações. Foram realizadas por campanha, utilizando-se o equipamento AKTA Pure® do Laboratório de pesquisa do Serviço de Imunologia Aplicada da FUNED (Figura 4.3 A). Todos os passos da cromatografia foram executados a temperatura ambiente, em coluna Hi-Prep Sphacryl™ S-200®17, submetida aos procedimentos de operação, equilíbrio e sanitização, descritos pelo fabricante. O tampão de corrida para essa coluna foi o mesmo utilizado para ressuspender a toxina botulínica tipos C e D, após a precipitação por PEG, ou seja, NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 8,2.



**Figura 4.3** – Fotos dos cromatógrafos utilizados nas purificações. A) AKTA Pure® do Serviço de Imunologia Aplicada da Fundação Ezequiel Dias. B) AKTA Pilot® do Serviço de Imunologia Aplicada da Fundação Ezequiel Dias.

Para a purificação utilizou-se as amostras de 10 mL de toxina botulínica precipitada por PEG, e ressuspensionada em tampão NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 8,2, previamente descongeladas. O tampão de equilíbrio foi o mesmo acima citado e o pH da coluna equilibrada era de 8,2. O fluxo na coluna (fase móvel) foi de 2,3 mL por minuto e foram coletadas frações de 5 mL, durante a corrida total de 1,5 volume de coluna (CV). Foram medidas a densidade óptica a 280 nm e 254 nm, a condutividade e o pH. Após os procedimentos de purificação das toxinas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, e depois da realização dos testes que se sucederam, as amostras foram liofilizadas no liofilizador ModulyoD (Thermo, EUA).

### 4.9.3. Purificação da toxina beta de *Clostridium perfringens*

A purificação da toxina beta de *C. perfringens* se deu por meio de cromatografia por afinidade metálica (IMAC), utilizando-se o zinco como agente quelante (Sakurai e Fujii, 1987). O equipamento AKTA Pilot® (GE Healthcare, Suécia) (Figura 4.3 B) foi utilizado para as corridas cromatográficas visando a purificação desta toxina. A resina IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Suécia), empacotada em coluna XK 26/20 (GE Healthcare, Suécia) (Figura 4.4), foi utilizada durante os procedimentos.



**Figura 4.4** – Coluna XK 26/20 (GE Healthcare, Suécia) utilizada nas purificações das toxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens*.

Após seu empacotamento, a resina foi carregada com o íon zinco por meio da passagem de no mínimo 1 volume de coluna (CV) de solução de cloreto de zinco ou sulfato de zinco 0,2 M, com pH de no máximo 5,5, seguida de lavagem com 5 CV de água ultrapura. Antes de cada corrida, a coluna cromatográfica foi equilibrada com 5 CV de tampão de equilíbrio (fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M pH 7,7), a 6,6 mL/min, adquirindo pH 7,7. A amostra contendo a toxina beta em tampão de equilíbrio era centrifugada a 10000xg por 30 minutos a 4 °C e ajuste do pH para o mesmo do tampão de equilíbrio (pH 7,7). Após a etapa de equilíbrio, 50 a 100 mL de amostra era injetada na coluna a um fluxo de 4,5 mL/min. Em seguida, 2,5 CV de tampão de equilíbrio eram passados pela coluna a 4,5 mL/min para a retirada de toda e qualquer substância não ligada à coluna, em uma etapa de lavagem. A próxima etapa era a de eluição por gradiente, quando a concentração do tampão de eluição (fosfato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 5,7-6,6) aumentava de 0 a 100% no decorrer de 5 CV injetados na coluna a 4,5 mL/min, seguido de 1 CV do mesmo tampão a 100% a 4,5 mL/min. Finalmente, água ultrapura era passada pela coluna a 4,5 mL/min até que as leituras de UV e condutividade fossem zeradas. A partir da entrada da amostra até a passagem de água ultrapura, tudo era fracionado em 5 mL e coletado. As frações correspondentes às leituras de UV a 280nm eram identificadas, refrigeradas e analisadas posteriormente.

Outro tipo de cromatografia foi testado para a purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C, a troca iônica (IEX). Para tal, também se utilizou o equipamento AKTA Pilot® (GE Healthcare, Suécia) (Figura 4.3 B), e a resina DEAE Sepharose CL-6B (GE Healthcare, EUA), empacotada em coluna XK 26/20 (GE Healthcare, Suécia) (Figura Y). A coluna cromatográfica foi equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) de tampão de equilíbrio (Fosfato 0,01 M, pH 7,7), a 13,3 mL/min. A amostra contendo a toxina beta em tampão de equilíbrio era preparada

anteriormente por centrifugação a 10000xg por 30 minutos a 4 °C e ajuste do pH para o mesmo do tampão de equilíbrio (pH 7,7). Após a etapa de equilíbrio, 50 a 100 mL de amostra era injetada na coluna a um fluxo de 4,5 mL/min. Em seguida, 2,5-5 CV de tampão de equilíbrio eram passados pela coluna a 4,5 mL/min para a retirada de toda e qualquer substância não ligada à coluna, em uma etapa de lavagem. A próxima etapa era a de eluição por gradiente, quando a concentração do tampão de eluição (NaCl 1M) aumentava de 0 a 100% no decorrer de 5-10 CV injetados na coluna a 4,5 mL/min, seguido de 1 CV do mesmo tampão a 100% a 4,5 mL/min. Finalmente, água ultrapura era passada pela coluna a 4,5 mL/min até que as leituras de UV a 280nm e condutividade fossem zeradas. A partir da entrada da amostra até a passagem de água ultrapura, tudo era fracionado em 5 mL e coletado. As frações correspondentes às leituras de UV eram identificadas, refrigeradas e analisadas posteriormente.

Após os procedimentos de purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C, e depois da realização dos testes que se sucederam, as amostras foram liofilizadas no liofilizador ModulyoD (Thermo, EUA).

#### **4.9.4. Purificação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens***

A toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D foi purificada por cromatografia de troca iônica (IEX), conforme Uzal et al. (1997). O equipamento AKTA Pilot® (GE Healthcare, Suécia) (Figura 4.3 B) foi utilizado para as corridas cromatográficas visando a purificação desta toxina. A resina DEAE Sepharose CL-6B (GE Healthcare, EUA), empacotada em coluna XK 26/20 (GE Healthcare, Suécia) (Figura 4.4), foi utilizada durante os procedimentos.

Após seu empacotamento e antes de cada corrida, a coluna cromatográfica foi equilibrada com 5 volumes de coluna (CV) de tampão de equilíbrio (PBS 0,01 M, pH 7,2), a 10-13,3 mL/min, adquirindo pH 7,2. A amostra contendo a toxina épsilon em tampão de equilíbrio era preparada anteriormente por centrifugação a 10000xg por 30 minutos a 4 °C e ajuste do pH para o mesmo do tampão de equilíbrio (pH 7,2). Foram testadas amostras contendo a toxina épsilon tripsinizada e não tripsinizada. Após a etapa de equilíbrio, 50 a 100 mL de amostra era injetada na coluna a um fluxo de 4,5 mL/min. Em seguida, 2,5-5 CV de tampão de equilíbrio eram passados pela coluna a 4,5 mL/min para a retirada de toda e qualquer substância não ligada à coluna, em uma etapa de lavagem. A próxima etapa era a de eluição das substâncias ligadas à coluna, realizada de forma isocrática com NaCl 1M, a 4,5 mL/min, até que as leituras de UV a 280nm ficassem próximas de zero. Finalmente, água ultrapura era passada pela coluna a 4,5 mL/min até que as leituras de UV a 280nm e condutividade fossem zeradas. A partir da entrada da amostra até a passagem de água ultrapura, tudo era fracionado em 5 mL e coletado em tubos. As frações correspondentes às leituras de UV a 280nm eram identificadas, refrigeradas e analisadas posteriormente. A purificação por troca aniônica em resina DEAE-Sepharose CL-6B também foi testada em amostras de sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* tipo B tripsinizadas contendo a toxina épsilon ativada. Os procedimentos foram idênticos aos acima descritos.

Como segunda fase da cromatografia da toxina épsilon, três estratégias foram instituídas. Na primeira, todas as frações do pico de cromatografia IEX contendo a toxina épsilon, cerca de 70 a 100mL, eram repassadas na coluna em uma nova corrida cromatográfica com todos os parâmetros idênticos aos da anterior e acima descrita. Na segunda, 30 mL das frações do pico de cromatografia IEX contendo a toxina épsilon eram repassadas na coluna em uma nova corrida cromatográfica com alteração no pH dos tampões e da própria amostra de 7,2 para 8,5 ou 9,1. Na terceira estratégia, amostras de toxina épsilon pré-purificada por cromatografia IEX foram submetidas à filtração em gel (GF) ou cromatografia por exclusão de tamanho, descrita abaixo.

Para a GF da toxina épsilon foi utilizada a coluna cromatográfica pré-empacotada Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Suécia) para fracionamento de moléculas com 3 a 70

kDa. A coluna cromatográfica era equilibrada com 2 CV de tampão de equilíbrio (PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2) a 0,5 mL/min. A amostra contendo a toxina épsilon pré-purificada em tampão de equilíbrio era liofilizada, ressuspensa, centrifugada a 10000 g por 30 minutos a 4 °C e tinha seu pH ajustado para o mesmo do tampão de equilíbrio (pH 7,2). Após a etapa de equilíbrio, 500 µl (2% do CV) de amostra era injetada na coluna a um fluxo de 0,5 mL/min. Em seguida, a eluição era realizada pela passagem de 1,5 CV do mesmo tampão de equilíbrio (PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2). Após a saída de 0,2 CV de tampão durante a eluição, frações de amostra de 1 mL começavam a ser coletadas. As frações correspondentes às leituras de UV a 280nm eram identificadas, refrigeradas e analisadas posteriormente.

Após os procedimentos de purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D, e depois da realização dos testes que se sucederam, as amostras foram liofilizadas no liofilizador ModulyoD (Thermo, EUA).

#### **4.10. Produção dos Imunógenos**

No total, foram produzidos oito imunógenos monovalentes, para cada toxina produzida, purificada e inativada, quatro para serem inoculados em ovinos, e outros quatro em galinhas.

##### **4.10.1. Inativação das toxinas**

Após as purificações, as toxinas purificadas foram inativadas para, posteriormente, serem inoculadas nos animais para a produção das antitoxinas. A inativação foi feita por meio da adição de formol a 40% para concentração final de 0,5% (v/v), sob agitação, em temperatura ambiente. Alíquotas da mistura foram coletadas e inoculadas em dois camundongos em intervalos de 24 horas, até total inativação (Lobato et al., 2010). Os toxóides foram submetidos ao teste de esterilidade e inocuidade.

##### **4.10.2. Teste de esterilidade**

A esterilidade foi verificada pela inoculação de 0,5 mL de cada toxóide em quatro tubos contendo 20 mL de caldo tioglicolato e em quatro tubos contendo 20 mL de caldo sabouraud. Metade dos tubos de cada um dos inóculos em caldo tioglicolato foi incubada em anaerobiose; os demais tubos com meio sabouraud e com caldo tioglicolato foram incubados em aerobiose. Todos os tubos inoculados foram mantidos a 37°C, por 21 dias, com observações diárias (Brasil, 2002).

##### **4.10.3. Teste de inocuidade**

Dois cobaios foram inoculados com volume de 5,0 mL dos toxóides botulínicos tipos C e D a serem examinados, com o dobro da massa da dose teste, por via subcutânea, em dois locais de aplicação diferentes. Os animais foram então observados por um período de sete dias para evidenciação de reações locais e/ou sistêmicas significativas (Brasil, 2002).

Para o controle de inocuidade dos demais toxóides (beta e épsilon), foram inoculados por via subcutânea 2 mL do produto em dois cobaios, e estes puderam apresentar somente uma pequena e ligeira reação local durante os sete primeiros dias de observação (Brasil, 1997).

#### 4.10.4. Adição de adjuvantes

Os toxóides foram separadamente emulsionados (Sorvall Omni-mixer; Sorvall, EUA) na proporção 1:1 com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, EUA) para a primeira inoculação, e com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, EUA) para as demais inoculações (Pires et al., 2012).

### 4.11. Produção das Antitoxinas Clostridiais

#### 4.11.1. Produção das antitoxinas clostridiais em ovinos

Foram utilizados dois ovinos para cada um dos quatro toxóides envolvidos. O volume inoculado por animal/dia foi de 2,0 mL, contendo uma dose fixa de 200 µg/mL dos respectivos antígenos (Souza et al. 2010). As aplicações dos toxóides C e D de *C. botulinum* e épsilon de *C. perfringens* foram feitas nos dias 0, 21, 42, 63 e 84. A aplicação do toxóide beta de *C. perfringens* foi realizada nos dias 0, 21, 42, 63, 84 e 105. Após 14 dias da última dose, foram coletados sangue dos carneiros por punção da veia jugular. O sangue coletado foi mantido sob refrigeração a 4°C por 12 horas e centrifugado a 2000 x g por 30 minutos para obtenção dos soros. Os soros foram alíquotados em tubos tipo falcon de 15 mL devidamente identificados, e mantidos congelados a -20°C até o momento do uso.

**Quadro 4.2** – Protocolo de Imunização dos ovinos com as toxinas clostridiais C, D, beta e épsilon purificadas.

Imunização	Dia	Dose (massa / volume)	Antígenos
1 <sup>a</sup>	0	200 µg / 2 mL	C, D, beta e epsilon
2 <sup>a</sup>	21	200 µg / 2 mL	C, D, beta e epsilon
3 <sup>a</sup>	42	200 µg / 2 mL	C, D, beta e epsilon
4 <sup>a</sup>	63	200 µg / 2 mL	C, D, beta e epsilon
5 <sup>a</sup>	84	200 µg / 2 mL	C, D, beta e epsilon
6 <sup>a</sup>	105	200 µg / 2 mL	beta

#### 4.11.2. Produção das antitoxinas clostridiais em galinhas

Foram utilizadas duas galinhas para cada um dos quatro toxóides envolvidos. O volume inoculado por animal/dia foi de 1,0 mL, contendo uma dose de 30 µg/mL dos respectivos antígenos nas duas primeiras inoculações, 10 µg/mL na terceira inoculação e 50 µg/mL na quarta e última; baseado no trabalho de Araújo (2007), mas com modificações. As aplicações dos toxóides foram feitas nos dias 0, 14, 21 e 43. Após a primeira inoculação vacinal, os ovos dos animais foram coletados, identificados, armazenados entre 4 a 8 °C e processados conforme descrito a seguir.

**Quadro 4.3** – Protocolo de Imunização das galinhas com as toxinas clostridiais C, D, beta e épsilon purificadas.

Imunização	Dia	Dose (massa / volume)	Antígenos
1 <sup>a</sup>	0	30 µg / 1 mL	C, D, beta e epsilon
2 <sup>a</sup>	14	30 µg / 1 mL	C, D, beta e epsilon
3 <sup>a</sup>	21	10 µg / 1 mL	C, D, beta e epsilon
4 <sup>a</sup>	43	50 µg / 1 mL	C, D, beta e epsilon

#### 4.12. Purificação das Imunoglobulinas G

As purificações dos soros dos ovinos contendo as imunoglobulinas G contra os antígenos clostridiais foram realizadas por precipitação pelo ácido caprílico, seguido por precipitação pelo sulfato de amônio (Page e Thorpe, 2002a; Page e Thorpe, 2002b). O volume de soro a ser purificado era dobrado com tampão acetato de sódio 0,06 M, pH 4,6. Para cada 25 mL de soro, 2 mL de ácido caprílico era adicionado gota a gota sob agitação em temperatura ambiente, seguido por 30 minutos em agitação. Posteriormente, a amostra era centrifugada a 4000xg por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante era filtrado em papel filtro (0,45 µm) e o pélete descartado. Logo em seguida, a amostra era novamente colocada em agitação para a etapa de precipitação por sulfato de amônio. Este era adicionado lentamente em seu formato sólido para uma saturação final de 45%, e posteriormente a amostra ficava em agitação por mais duas horas. Após este período, era centrifugado a 4000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante era descartado e o pélete ressuspenso para o volume original do soro com PBS 0,01 M, pH 7,2. Finalmente, o soro contendo os anticorpos purificados era dialisado contra este mesmo tampão a 4 °C e congelado a -20 °C. Após os procedimentos de purificação das imunoglobulinas G, e depois da realização dos testes que se sucederam, as amostras foram liofilizadas no liofilizador Liotop L101 (Liotop, Brasil).

#### 4.13. Purificação das Imunoglobulinas Y

As purificações das imunoglobulinas Y presentes nos ovos das galinhas imunizadas com antígenos clostridiais foram precedidas de etapas de processamento dos ovos e delipidação das gemas. Para o processamento, os ovos eram quebrados e com auxílio de água destilada a clara era totalmente eliminada, bem como a membrana da gema. A delipidação da gema, ou extração dos seus lipídeos, foi realizada por meio da sua diluição em água destilada seguida da alteração do pH e temperatura. As gemas eram diluídas em 1:10, o pH ajustado para 5,0 e a amostra congelada a -20 °C por 12 horas. Posteriormente, a amostra era descongelada em temperatura ambiente e centrifugada a 800 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante, ou extrato aquoso, era retirado e filtrado em papel filtro (0,45 µm) (Araújo, 2007).

Para a purificação propriamente dita, o extrato aquoso tinha seu pH ajustado para 7,4. Em seguida, sulfato de amônio sólido era adicionado lentamente e sob agitação para uma concentração final de 20%. Após atingir tal concentração, a amostra permanecia sob agitação por mais 30 minutos, quando era centrifugada a 2000xg por 20 minutos a 4 °C, e o precipitado era ressuspenso em água destilada para um volume de 40 mL para cada quatro ovos processados. Finalmente, a amostra purificada era dialisada contra PBS 0,01 M pH 7,2 a 4 °C e congelada a -20 °C (Araújo, 2007). Após os procedimentos de purificação das imunoglobulinas Y, e depois da realização dos testes que se sucederam, as amostras foram liofilizadas no liofilizador Liotop L101 (Liotop, Brasil).

## **4.14. Caracterização e Avaliação dos Insumos**

### **4.14.1. Quantificações proteicas**

O método de Bradford (1976) foi utilizado com o reagente de Bradford comercial Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate®, diluído conforme as recomendações do fabricante. Em uma placa de polietileno de 96 poços foi adicionado 200 µL de reagente mais 10 µL da amostra a ser testada ou das amostras de BSA – Soro Albumina Bovina fração V, diluída para elaboração da curva padrão, em duplicata. A solução de albumina bovina contendo 1 mg/mL foi diluída em água ultrapura para conter 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg e 31,25 µg perfazendo os pontos da curva padrão. A placa foi incubada no escuro por 15 minutos e em seguida realizada a leitura a 620 nm, em leitor de placas Multiskan FC.

### **4.14.2. Titulação das toxinas por bioensaios em camundongos**

A titulação das toxinas purificadas foi realizada pela determinação da DL<sub>50</sub> (menor quantidade de toxina que mata 50% dos animais inoculados em até 72 horas após a inoculação), para as toxinas C e D de *C. botulinum*, e pela determinação da dose mínima mortal (DMM), menor quantidade de toxina que mata 100% dos animais inoculados em até 72 horas após a inoculação, para as toxinas beta e épsilon de *C. perfringens*. Para a determinação das DL<sub>50</sub>, foram seguidos os procedimentos determinados por Reed e Muench (1938).

Para a determinação da DMM da toxina beta purificada, foram seguidos os procedimentos descritos por Zayerzadeh et al. (2014). Em suma, foram feitas inoculações de diluições contendo de 0,5 a 5 µg de toxina beta, em um volume de 0,5 mL, por via intravenosa, em dois camundongos de 18 a 22 g por diluição, os quais foram observados por 72 h. Para a determinação da DMM da toxina épsilon purificada, foram seguidos os procedimentos descritos por Langroudi (2014). Basicamente, foram feitas inoculações de diluições contendo de 0,125 a 0,5 µg de toxina épsilon, em um volume de 0,5 mL, por via intravenosa, em dois camundongos por diluição, os quais foram observados por 72 h. Para tal, a toxina épsilon não foi ativada por tripsinização.

### **4.14.3. Titulação das antitoxinas C e D de *Clostridium botulinum***

A determinação dos títulos das imunoglobulinas G e Y foi realizada pela técnica de soroneutralização em camundongos, descrita pela Instrução Normativa nº 23 do MAPA de 18 de março de 2002 (Brasil, 2002). As toxinas botulínicas tipos C e D padrão oficiais foram diluídas com o diluente padrão (solução salina 0,25% peptonada a 1%) para conter 1 L+/mL em volume suficiente para a realização dos testes. O controle foi realizado com a antitoxina padrão oficial homóloga nas diluições 1:2 e 1:5. Para a leitura do teste padronizado em L+, o título da antitoxina em teste foi obtido na menor diluição em que ocorreu a morte de 100% dos camundongos inoculados. As imunoglobulinas G foram testadas para os títulos esperados de 20 UI/mL até 800 UI/mL. As imunoglobulinas Y foram testadas para os títulos esperados de 5 UI/mL até 60 UI/mL. Após a mistura das antitoxinas-teste e da antitoxina padrão homóloga com a toxina padrão contendo 1 L+/mL os tubos foram agitados e posteriormente incubados em banho-maria a 37 °C ± 1 °C por 60 minutos. Foram inoculados, por via endovenosa, dois camundongos pesando entre 18 e 22 g com 0,2 mL de cada diluição das antitoxinas em teste. Para facilitar a inoculação através da veia da cauda, os camundongos foram mantidos em caixa de aquecimento por alguns minutos e utilizou-se seringas descartáveis de 1 mL. Os camundongos inoculados foram observados por 72 horas, e o título encontrado foi igual ao valor da menor diluição da antitoxina em que ocorreu



morte dos dois camundongos inoculados. Para a validação do teste, o controle deveria apresentar título de 5 UI/mL tanto para a antitoxina padrão oficial C, quanto para a antitoxina D.

#### **4.14.4. Titulação das antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens***

A determinação do nível das antitoxinas épsilon e beta foi realizada pela soroneutralização em camundongos, segundo a Portaria número 49 do MAPA de 12 de maio de 1997 (Brasil, 1997) e pelo British Pharmacopeia (1998). As imunoglobulinas G foram testadas para os títulos esperados de 20 UI/mL até 320 UI/mL. As imunoglobulinas Y foram testadas para os títulos esperados de 10 UI/mL até 60 UI/mL.

Para realização dos testes, a toxina beta padrão oficial foi diluída com diluente padrão (solução salina 0,25% peptonada a 1%) a fim de conter 10 L+/mL e 10 L0/mL. A toxina épsilon padrão oficial também foi diluída com diluente padrão (solução salina 0,25% peptonada a 1%) para conter 10 L+/10 e 10 L0/10/mL. Os controles L+ e L0 foram realizados com as antitoxinas beta e épsilon padrões oficiais, de título conhecido. A antitoxina beta padrão oficial foi diluída para conter 10 UI/mL, nível de teste L+, e a toxina épsilon padrão oficial para conter 1 UI/mL, nível de teste L+/10. Após a mistura das antitoxinas-teste e da antitoxina padrão homóloga com a toxina padrão oficial, os tubos foram agitados e posteriormente incubados em banho-maria a 37 °C ± 1 °C por 30 minutos. Foram inoculados dois camundongos, pesando entre 16 e 20 g cada, com 0,2 mL por via endovenosa, para cada diluição em teste, e aqueles foram observados por 24 horas. Para facilitar a inoculação através da veia da cauda, os camundongos foram mantidos em caixa de aquecimento por alguns minutos e utilizou-se seringas descartáveis de 1 mL. O valor do título correspondia à maior diluição da antitoxina onde houvesse sobrevivência de todos os animais em teste.

Para a determinação dos títulos das antitoxinas épsilon, a antitoxina padrão oficial foi diluída para conter 1 UI/mL. Duas diluições foram realizadas com a toxina padrão oficial, uma para conter 10 L0/10/mL e outra para conter 10 L+/10/mL. Para os controles, misturou-se 1 UI de antitoxina padrão com 10 L0/10 de toxina padrão, e 10 UI de antitoxina padrão com 10 L+/10 de toxina padrão. Após a mistura das antitoxinas-teste e da antitoxina padrão homóloga com a toxina padrão oficial, os tubos foram agitados e posteriormente incubados em banho-maria a 37 °C ± 1 °C por 30 minutos. Foram inoculados dois camundongos, pesando entre 16 e 20 g cada, com 0,2 mL por via endovenosa, para cada diluição em teste, e aqueles foram observados por 24 horas. Para facilitar a inoculação na veia da cauda os camundongos foram mantidos em caixas de aquecimento por alguns minutos e utilizadas seringas descartáveis de 1mL. O valor do título correspondia à maior diluição da antitoxina onde houvesse sobrevivência de todos os animais em teste.

#### **4.14.5. Análises das toxinas e antitoxinas em gel de SDS-PAGE**

Para avaliação da eficiência dos métodos de purificação empregados e maior caracterização dos padrões produzidos, as toxinas e antitoxinas foram submetidas a eletroforese de proteínas por SDS-PAGE em gel de acrilamida, sob condições não redutoras, como descrito por Laemmli (1970). As concentrações de acrilamida utilizadas foram de 10% para as toxinas C e D de *C. botulinum* e para as imunoglobulinas; e 15% para as toxinas beta e épsilon de *C. perfringens*. As amostras foram diluídas em tampão de corrida na proporção 1:2 ou 1:3 e aquecidas por 5 minutos a 90 °C. As corridas foram realizadas utilizando-se 6 µL de padrão de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Standards de 10 a 250 kDa, e aplicando-se 20 µL de amostra por canaleta. A corrida foi realizada no equipamento de eletroforese vertical Mini-Protean Tetra cell21 contendo tampão Tris (25mM), Glicina (0,25M) e SDS 1% ligado à

fonte PowerPac Basic Power Supply21, a 120 V por 80 minutos. Os géis foram corados pelo método convencional utilizando Azul de Comassie (Neuhoff et al., 1988).

#### **4.14.6. Confirmação da identidade biológica das toxinas**

Para confirmar a identidade biológica das toxinas purificadas, foi realizado *Western Blot* das amostras. Primeiramente, gel de SDS-PAGE foi feito conforme o item 4.14.5. Em seguida, foi feita a transferência do gel para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema Bio-Rad Trans Blot Semi-dry21 a 30V, 120 mA por 30 minutos. A eficiência da transferência foi testada após coloração da membrana em reagente de Ponceau a 10%, por 10 minutos. Após enxague com água destilada, a membrana foi submersa em solução de bloqueio (BSA a 1,5% em PBS 0,1 M com 0,05% de Tween 20), a 4 °C por 12 horas. A membrana foi lavada três vezes com PBS 0,1 M com 0,05% de Tween 20 por 5 minutos. Foi adicionada a antitoxina padrão oficial correspondente e mantida sob agitação por 60 minutos. Foram realizadas mais três lavagens, e em seguida adicionado o conjugado anti-IgG de carneiro peroxidase diluído 1:800 (toxinas C e D de *C. botulinum*) ou 1:2000 (toxinas beta e épsilon de *C. perfringens*) em PBS 0,1 M com 0,05% de Tween 20, mantido sob agitação por 60 minutos. Em seguida, foram feitas três lavagens e adicionado o substrato DAB (Sigma-Aldrich, EUA) e o peróxido de hidrogênio, sob agitação, até aparecimento da cor. A reação foi interrompida enxaguando-se a membrana com água destilada.

A identidade biológica das toxinas também foi confirmada por meio de testes de ELISA realizados frente aos anticorpos padrão oficiais, que também testaram a avidéz das antitoxinas produzidas e são descritos a seguir.

#### **4.14.7. Testes de avidéz das antitoxinas clostridiais**

As medições de avidéz das imunoglobulinas G e Y clostridiais produzidas foram realizadas por meio de testes de ELISA indireto segundo Wiuff et al. (1997). Para tal, dependendo da antitoxina em teste, adsorveu-se 100 µL de toxina por poço, contendo 3 µg/mL de toxina botulínica tipo C ou D purificada, ou 1 µg/mL de toxina beta ou épsilon purificada de *Clostridium perfringens*, diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. As placas em sensibilização foram identificadas e incubadas por 12 horas a 4°C. Foram feitas três lavagens de 200 µL/poço, com solução de lavagem, no equipamento Wellwash. Em cada poço foram adicionados 100 µL de solução de BSA a 3% em PBS 0,1 M Tween 0,05%, para bloqueio de reações inespecíficas, e as placas incubadas em estufa a 37°C por 1 hora. Após bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes. Oito a dez diluições das antitoxinas-teste foram realizadas, com diluição inicial de 1:50 para as IgY, e 1:500 para as IgG, em solução de BSA 1,5% em PBS 0,1 M tween 0,05%, em quadruplicata, e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após incubação, metade dos poços em teste foi lavada com solução de lavagem, e a outra metade foi lavada com solução de ureia 6M em PBS 0,01 M Tween 0,05%. Três lavagens de 5 minutos sob agitação com 200 µL da respectiva solução foram realizadas. Posteriormente, toda a placa foi lavada com solução de lavagem no equipamento Wellwash por três vezes para a eliminação de toda a ureia. Cem µL/poço de conjugado comercial anti-IgG de ovino (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:10.000 em BSA 1,5% em PBS 0,01 M tween 0,05% pH 7,2; ou 100 µL/poço de conjugado comercial anti-IgY de galinha (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:30.000, foram adicionados e as placas incubadas em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes, e foi adicionado 100 µL/poço de solução de OPD diluído em tampão citrato pH 5,0, adicionando-se peróxido de hidrogênio no momento do uso. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 5 a 30 minutos até o aparecimento de cor. A reação foi interrompida pela

adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 2 N. A intensidade da coloração foi determinada em leitor de ELISA Multiscan FC a 492 nm.

O cálculo do índice de avidéz para cada diluição x (A.I.x) das antitoxinas em teste foi feito seguindo a fórmula:

$$A.I.x = \frac{OD(diluição\ x) + ureia}{OD(diluição\ x) - ureia}$$

O índice de avidéz final (A.I.) das antitoxinas em teste foi calculado seguindo a fórmula:

$$A.I. = \left( \sum_{i=1}^n A.I.x_i \right) / n$$

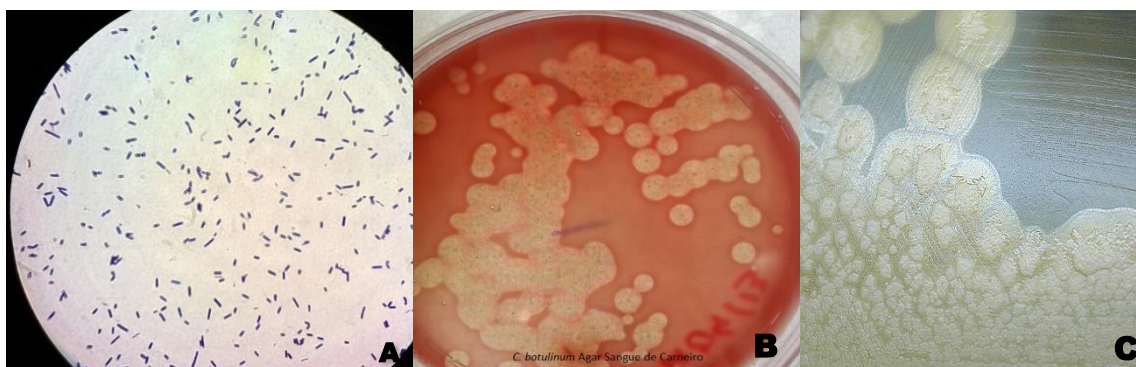
#### **4.15. Comparação dos Imunoreagentes Produzidos com os Padrões Existentes**

Para efeito de comparação e para assegurar a qualidade dos padrões produzidos, os mesmos foram comparados a aqueles existentes utilizados pelos órgãos oficiais. Para tal comparação, as toxinas e antitoxinas padrões oficiais existentes foram submetidas a alguns testes, tais como aqueles descritos nos itens 4.14.5, 4.14.6 e 4.14.7.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização das Estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D

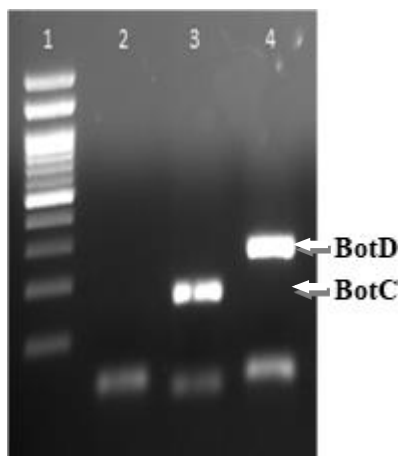
As estirpes de *C. botulinum* tipos C e D utilizadas neste estudo quando cultivadas apresentaram-se como bastonetes Gram-positivo, retos ou levemente curvos, com características e morfologias típicas e sugestivas da espécie. Em ágar sangue, formaram colônias acinzentadas, difusas, beta hemolíticas, com bordos circulares e irregulares; e em ágar gema de ovo, foram positivas à reação de lipase formando uma zona de precipitação típica de *C. botulinum* (Figura 5.1). As placas incubadas em aerobiose não apresentaram crescimento.



**Figura 5.1** – Caracterização das estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D. A) Coloração de Gram de *C. botulinum* em microscópio ótico, aumento 100X. B) Colônias de *C. botulinum* em ágar sangue de carneiro 5% em anaerobiose por 72 horas. C) Teste de lipase com colônias de aspecto rançoso rodeadas pro halo de cor semelhante a madrepérola.

As reações de lipase e lecitinase podem ser observadas em placas de agar gema de ovo. A primeira aparece como uma camada em tons de madrepérolas em torno das colônias; a segunda aparece como um halo esbranquiçado opaco de precipitação, dentro das colônias. Até recentemente, a reação da lipase era considerada uma característica chave para o isolamento de colônias de *C. botulinum*. No entanto, após o reconhecimento dos grupos IV-VI (*C. argentinense*, *C. butyricum* tipo E, *C. baratii* tipo F), que não produzem lipase, a aplicação do teste de reação de lipase tem sido restrita. A reação da lecitinase em *C. botulinum* é geralmente negativa, já que apenas *C. baratii* e alguns organismos do Grupo III produzem lecitinase.

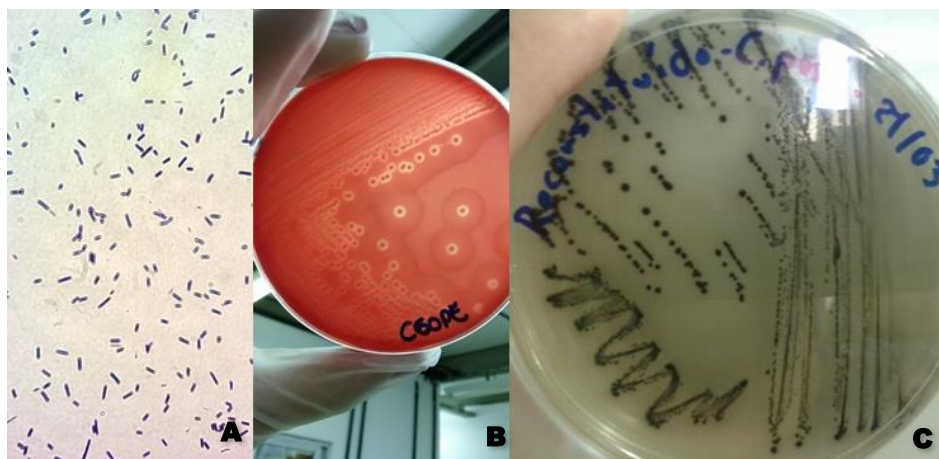
As características descritas encontradas nas estirpes de *C. botulinum* tipos C e D utilizadas nesse estudo foram confirmadas por meio da PCR (Prévot et al. 2007). A Figura 5.2 mostra uma foto de gel de PCR para identificação dos genes de *C. botulinum* tipos C e D.



**Figura 5.2** - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR Monoplex para detecção de DNA de *Clostridium botulinum* tipos C e D. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular 1 kb plus; Canaleta 2: controle negativo; Canaleta 3: canaleta referente à amplificação dos genes de *C. botulinum* tipo C; Canaleta 4: canaleta referente à amplificação dos genes de *C. botulinum* tipo D. BotC: banda referente ao gene produtor da toxina C, com 169 pb. BotD: banda referente ao gene produtor da toxina D, com 264 pb.

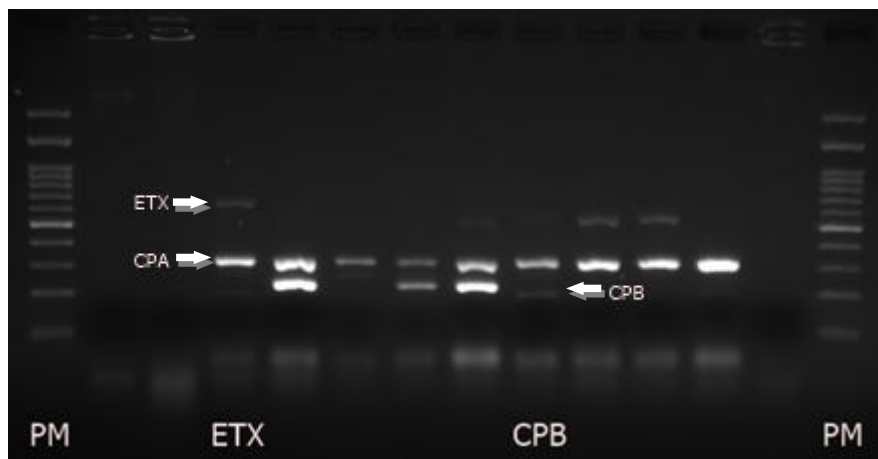
## 5.2. Caracterização das Estirpes de *Clostridium perfringens* tipos C e D

As estirpes de *C. perfringens* tipos C e D utilizadas para a produção das toxinas beta e epsilon, respectivamente, foram testadas quanto suas características morfológicas e de pureza. Não ocorreram crescimentos nos meios de cultura deixados em aerobiose. Em agar sangue, as colônias bacterianas mostraram zonas de dupla hemólise em seu entorno, características da espécie. Nas placas de agar SPS, houve formação de colônias enegrecidas características de *C. perfringens*, resultado da redução de sulfitos com a formação de precipitados negros de sulfuretos ferrosos (Hatheway, 1990). Ao microscópio, corados pela coloração de Gram, foram observados bacilos gram-positivo retos, predominantemente isolados ou em pares, sem a presença de outras formas contaminantes (Figura 5.3).



**Figura 5.3** - Caracterização das estirpes de *Clostridium perfringens* tipos C e D. A) Coloração de Gram de *Clostridium perfringens* em microscópio ótico, aumento 100X. B) Colônias de *C. perfringens* em ágar sangue de carneiro 5% mostrando zonas de dupla hemólise. C) Crescimento de *C. perfringens* em ágar SPS mostrando colônias enegrecidas devido à sulfito redução.

Além das características de crescimento e morfológicas, a tipificação das estirpes foi confirmada por meio de PCR (Vieira, et al. 2008). A Figura 5.4 mostra uma foto de gel de PCR multiplex para identificação dos genes de *C. perfringens* tipos C e D.



**Figura 5.4** - Eletroforese em gel de agarose a 2% da PCR Multiplex para detecção de DNA de *Clostridium perfringens*. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb; ETX: canaleta referente à amplificação dos genes de *C. perfringens* tipo D. Seta: banda referente ao gene produtor da toxina épsilon, com 656 pb; CPA: banda referente ao gene produtor da toxina alfa, com 385 pb; CPB canaleta referente à amplificação dos genes de *C. perfringens* tipo C. Seta: banda referente ao gene produtor da toxina beta, com 196 pb.

### 5.3. Produção das Toxinas

Após a caracterização e confirmação da pureza das estirpes, elas foram cultivadas para a obtenção das toxinas. Estas foram produzidas em biorreator de bancada (BioFlo 110) (New Brunswick Scientific C.O., Reino Unido). Três litros de meio específico para cada micro-organismo cultivado foram utilizados para a produção. O rendimento em volume de sobrenadante de cultivo contendo as toxinas também foi próximo dos mesmos três litros.

Os cultivos de *C. botulinum* tipos C e D foram mantidas por um período de 24 horas, com o pH estabilizado próximo de 7,0. A expressão máxima de toxinas botulínicas ocorre entre o final da fase de crescimento exponencial e o início da fase estacionária, as quais têm sua duração intimamente ligadas ao pH do meio. Além disso, máxima produção de toxina é esperado quando se mantém o pH do cultivo em 7,0; condições mais ácidas ou mais básicas tendem a inibir a transcrição dos genes responsáveis pela produção dessas neurotoxinas (Li et al., 2013). Após, o sobrenadante de cultivo foi retirado e seguiu para as etapas de concentração, diafiltração e purificação.

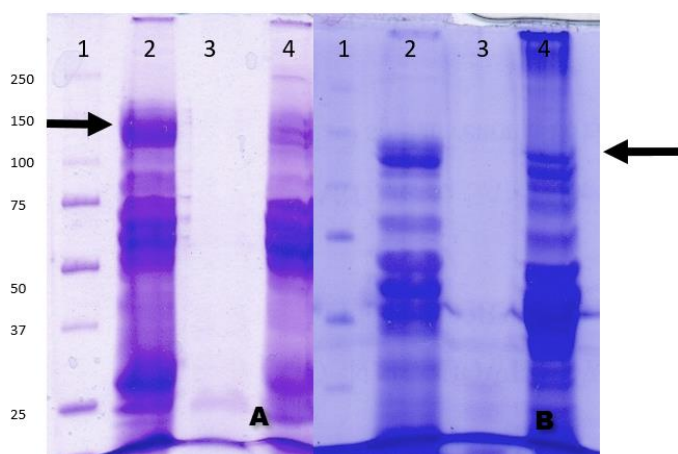
O cultivo de *C. perfringens* tipo C, para a obtenção da toxina beta, foi mantida por cinco horas, quando a medida da densidade óptica (DO) estabilizou em 0,340, e o pH atingiu o valor de 7,06, acima do limite estipulado de 6,9. Já o cultivo de *C. perfringens* tipo D, para a obtenção da toxina épsilon, foi mantida por 5 horas e 30 minutos, quando a DO caiu de 1,296 para 1,142, enquanto o pH se manteve por volta de 6,8. Os tempos de cultivo de *C. perfringens* são conhecidos por serem rápidos, comumente por volta de 8 a 9 horas de cultivo. *C. perfringens* produz e secreta suas principais toxinas primordialmente em sua fase de crescimento exponencial, durante a qual as medidas da DO aumentam progressivamente. Por esta razão, o cultivo deve ser paralisada após o término da fase de crescimento exponencial, quando a DO estabiliza e começa a declinar, visando obter o maior título possível de toxinas (Alves, 2013).

No presente trabalho, o crescimento foi acelerado, entre 5 horas e 5 horas e meia, quando houve a maior medida de DO, e, portanto, maior quantidade de toxina produzida. Isto ocorreu possivelmente devido às características dos meios, das estirpes, ou mesmo do equipamento utilizados nos cultivos. Outros trabalhos reportaram tempos de crescimento ainda menores, de 4 horas, quando foram obtidas as medidas mais altas de DO e de produção de toxinas (Kulshrestha, 1973; Brandi et al., 2014). Ademais, a faixa de pH em que há crescimento do micro-organismo varia de 5,5 a 8,0, com máxima DO quando o pH é mantido em 6,5 (Brandi et al., 2014). Assim como para *C. botulinum* tipos C e D, os sobrenadantes de cultivo retirados foram em seguida concentrados, diafiltrados e utilizados nas purificações.

## 5.4. Purificação das Toxinas

### 5.4.1. Purificação das toxinas botulínicas C e D de *Clostridium botulinum*

Anteriormente à cromatografia por filtração em gel (GF), o método utilizado para precipitação das proteínas do sobrenadante de cultivo de *C. botulinum* empregou o PEG 6000. Este foi eficiente em concentrar as proteínas das suspensões proteicas, conforme demonstrado na figura 5.5. Na figura 5.5A, canaleta 2, e figura 5.5B, canaleta 4, pode ser observado um arraste no gel e bandas mais evidentes, sugerindo uma maior concentração de proteínas devido a utilização do PEG, quando comparadas às canaletas contendo amostras não concentradas.



**Figura 5.5** - SDS-PAGE a 10% apresentando os resultados da precipitação das toxinas botulínicas C e D por PEG 6000. A) Canaleta 1: marcador de peso molecular; Canaleta 2: toxina botulínica tipo C precipitada; Canaleta 3: sobrenadante da precipitação da toxina por PEG; Canaleta 4: toxina botulínica tipo C concentrada 10 a 20X. B) Canaleta 1: marcador de peso molecular Canaleta 2: toxina botulínica tipo D concentrada 10 a 20X; Canaleta 3: sobrenadante da precipitação da toxina por PEG; Canaleta 4: toxina botulínica tipo D precipitada.

Os polietilenoglicóis (PEG) são polímeros sintéticos solúveis em água cuja capacidade para precipitar proteínas da solução pode ser melhor entendida em termos do conceito de volume excluído. Embora condições extremas, tais como temperaturas elevadas, possam resultar em interações favoráveis indesejadas entre PEG e proteínas, sob condições normais, os PEG não perturbam a estrutura nativa das moléculas de proteína. Os PEG oferecem várias vantagens sobre os agentes de precipitação comumente disponíveis e cumprem a maioria dos critérios e

necessidades de uma precipitação, conseguindo remover resíduos de células bacterianas, partes de proteínas impuras e ácidos nucleicos (Kumar, et al., 2011; Zhao et al., 2012).

Zhao et al., (2012) descreveram um processo de purificação de toxina botulínica tipo B utilizando precipitação por PEG acompanhado de três passos adicionais de purificação por cromatografia. Segundo os autores, quando comparada à precipitação por sulfato de amônio, a precipitação por PEG é um método mais suave para a extração de proteínas e contribui para a manutenção das suas atividades biológicas. A concentração de proteína é aumentada pelo incremento da concentração de PEG até a solubilidade máxima se exceder e ocorrer precipitação. Neste estudo, o produto bruto de BoNT B foi obtido por precipitação com PEG. A precipitação com PEG remove o contaminante, é estável, e pode ser ressuspensionado para a concentração desejada no momento do uso. Para alcançar este objetivo, utilizou-se 20% (p/v) de PEG-6000 em pH 5,0, e foi relatada uma taxa de recuperação de complexos de BoNT B de até 87%.

A taxa de recuperação descrita neste estudo não foi quantificada, porém o sobrenadante coletado após a centrifugação da solução de proteínas precipitadas com PEG 6000 não apresentou bandas de proteínas quando testados no gel de SDS-PAGE (Figura 5.5A e 5.5B, canaletas 3). Isto demonstra que o método empregado foi eficaz em recuperar as proteínas botulínicas, não havendo perda aparente de toxina.

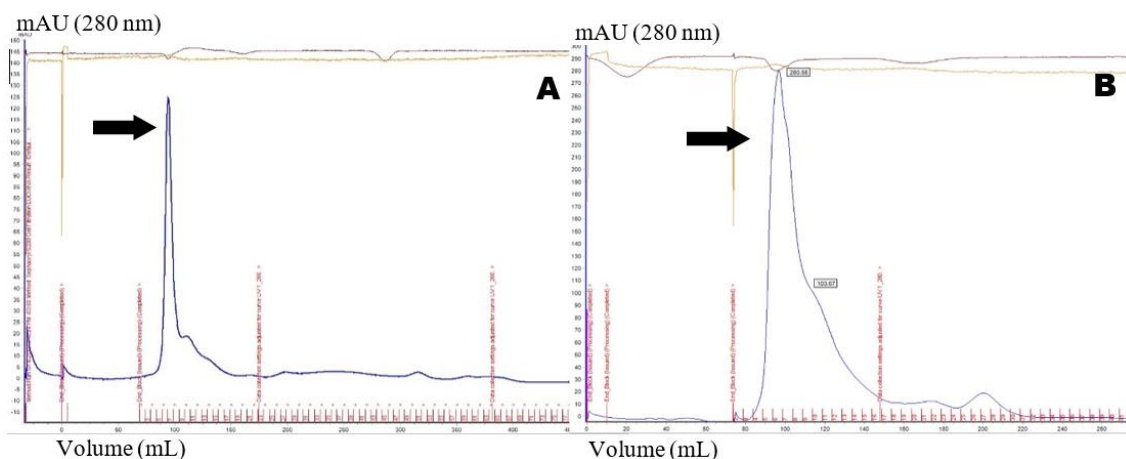
Neste trabalho, os sobrenadantes de cultivo de *C. botulinum* tipos C e D contendo as toxinas botulínicas apresentaram títulos em camundongos de  $10^{5.2}$  DL<sub>50</sub>/mL e  $10^{6.2}$  DL<sub>50</sub>/mL antes das concentrações, respectivamente. Após os processos de concentração e precipitação, os sobrenadantes, apresentaram títulos em camundongos de  $10^{7.2}$  DL<sub>50</sub>/mL e  $10^{8.2}$  DL<sub>50</sub>/mL, respectivamente. O aumento de 100 vezes observado no título das toxinas botulínicas C e D, demonstra que os métodos empregados para concentração foram satisfatórios e podem ser empregados para aumentar o rendimento desses materiais, bem como melhorar e facilitar seu armazenamento e processamento posterior.

Os primeiros experimentos para purificação de toxina botulínica tipos C e D a partir da proteína precipitada e concentrada foram realizados no equipamento Akta Pilot®, utilizado para cromatografia em maiores escalas. A amostra aplicada na coluna Hi-Prep Sephacryl S-200®, neste equipamento, percorria um caminho de cerca de 60 mL em contato com o tampão de eluição, sendo diluída ao longo desse percurso, o que interferia diretamente na capacidade de recuperação da toxina purificada após a passagem pela coluna. Além disso, foram feitos 12 experimentos de purificação no Akta Pilot® e não foi possível padronizar as corridas, obtendo-se perfis cromatográficos diferentes a cada corrida.

Posteriormente, o equipamento Akta Pure® passou a ser utilizado, onde a amostra era injetada diretamente na coluna através do *loop* de injeção de amostra, sofrendo menor diluição durante o procedimento. No Akta Pure®, todas as corridas realizadas para purificação da toxina botulínica tipos C e D, apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, havendo repetibilidade e padronização no processo de purificação.

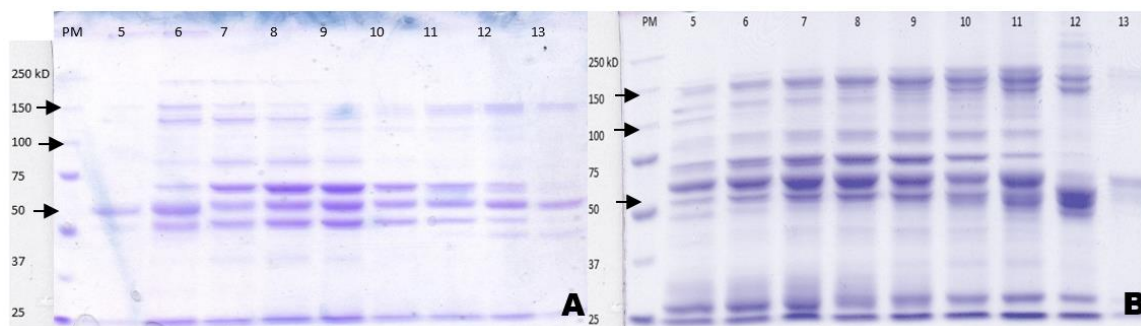
A figura 5.6 apresenta os perfis cromatográficos obtidos nas purificações das toxinas botulínicas C e D na coluna Hi-Prep Sephacryl-S200®. As setas indicam os picos referentes às frações coletadas contendo as neurotoxinas C e D purificadas. Importante observar que, por serem de alto peso molecular, nas corridas de filtração em gel, as toxinas botulínicas (150 kDa) e os complexos de proteínas que as acompanham tendem a eluir na parte inicial da cromatografia (Figura 5.6). Proteínas de alto peso molecular permeiam poucos ou nenhum dos poros presentes na resina cromatográfica e eluem rapidamente. Já as proteínas de médio e baixo peso molecular, as quais predominam nos sobrenadantes de cultivo, eluem mais tardiamente.





**Figura 5.6** – A) Perfil cromatográfico obtido na purificação da toxina botulínica C. B) Perfil cromatográfico obtido na purificação da toxina botulínica D. Setas: picos referentes às frações de neurotoxinas C e D eluídas.

Nas cromatografias para purificação da toxina botulínica C foram coletadas as frações 05 a 13, e selecionadas as frações 6 a 12, que perfizeram um total de 35 mL por corrida, e cerca de 1,5 mg/mL de toxina botulínica C purificada. Nas cromatografias para purificação de toxina botulínica D foram coletadas em tubos as frações 05 a 14, e selecionadas as frações 6 a 14, que perfizeram um total de 45 mL por corrida, e cerca de 3,0 mg/mL de toxina botulínica D purificada. A figura 5.7 apresenta o gel de SDS-PAGE com as frações coletadas na cromatografia de exclusão por tamanho das amostras de suspensão de toxina botulínica C e D.

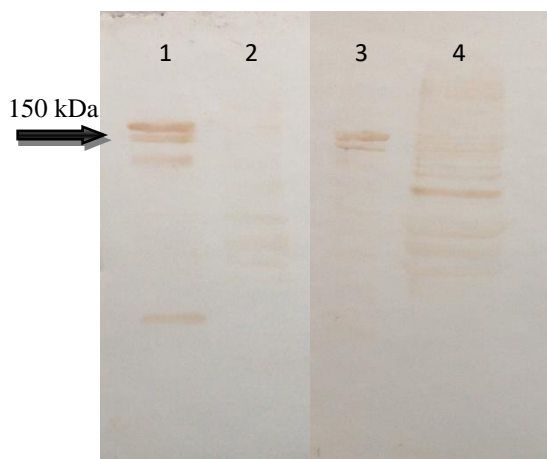


**Figura 5.7** – A) SDS-PAGE das frações de 5 a 13 coletadas na cromatografia da toxina botulínica C. B) SDS-PAGE das frações de 5 a 13 coletadas na cromatografia da toxina botulínica D. Nas canaletas PM, padrão de peso molecular, e nas canaletas seguintes, amostras das respectivas frações coletadas na cromatografia. Setas: bandas referentes as toxinas botulínicas íntegras (150 kDa) e suas subunidades de 100 e 50 kDa.

Os camundongos inoculados com as frações de toxinas botulínicas tipos C e D coletadas após as cromatografias apresentaram quadro clínico semelhante aos descritos quando se inoculam esses animais com material proveniente de casos de botulismo: respiração ofegante, acinturamento tipo “cintura de vespa” por paralisia do diafragma, paralisia muscular das patas traseiras e óbito em até 72 horas (Lobato et al., 2008).

A identidade biológica dos complexos de toxinas botulínicas C e D purificadas foi confirmada por meio de *Western Blot* utilizando s antitoxina padrão oficial. A figura 5.8 apresenta os resultados desta metodologia em membrana de nitrocelulose dos complexos de neurotoxinas

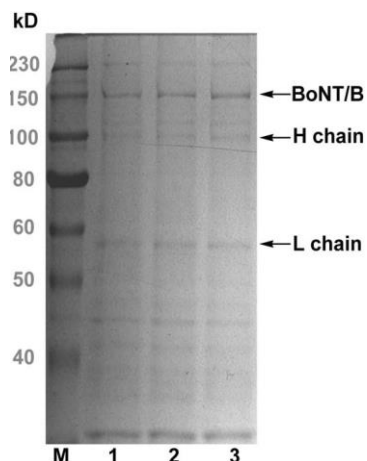
purificadas. Esta identidade biológica também foi confirmada pela realização de testes de ELISA indireto, descritos em sessão posterior.



**Figura 5.8** - Western Blot dos complexos de neurotoxinas botulínicas C e D purificadas. Canaleta 1: toxina C purificada. Canaleta 2: toxina C padrão. Canaleta 3: toxina D purificada. Canaleta 4: toxina D padrão. Seta: bandas referentes às toxinas botulínicas.

Resultados semelhantes aos perfis cromatográficos obtidos nas cromatografias por filtração em gel (GF) foram relatados por outros autores (Gessler e Bohnel 1999; Al-Saleem et al., 2012). Estes obtiveram perfis de bandas em gel de SDS-PAGE com massas moleculares de 15 a 17 kDa, de 33 a 35 kDa, 50 kDa, 71 a 76 kDa e 130 a 150 kDa, representando as diversas proteínas auxiliares não tóxicas e tóxicas que podem estar associadas com alguns sorotipos de *C. botulinum*, formando um complexo altamente resistente à proteólise e a baixos valores de pH.

Zhao et al. (2012) descreveram que a toxina botulínica B, assim como as de outros tipos, são produzidas na forma de complexos proteicos, em que o componente principal da neurotoxina está ligado não-covalentemente a outras proteínas não tóxicas. Os complexos dessas neurotoxinas são estáveis somente em intervalo de pH ligeiramente ácido (5,0–7,0), e podem dissociar em soluções alcalinas (pH > 7,0). No estudo destes autores, para a purificação da toxina botulínica B e seus complexos, foram realizados dois passos de purificação; sendo o primeiro com pH 8,0, e o segundo com o pH 5,8. No primeiro passo, foi removida uma pequena parte de proteínas contaminantes e ácidos nucleicos, utilizando a coluna de exclusão de tamanho Sephacryl S-100. Diferentemente do presente trabalho, Zhao et al. (2012) necessitavam de um altíssimo nível de purificação da toxina botulínica, que seria utilizada posteriormente como produto injetável para aplicação em seres humanos. A figura 5.9 mostra um gel de SDS-PAGE contendo as amostras de toxina botulínica B purificadas obtidas por Zhao et al. (2012).



**Figura 5.9** - SDS-PAGE do complexo de toxinas botulínicas B purificadas obtidas por Zhao et al. (2012). Canaleta M: padrão de peso molecular. Canaletas 1 a 3: amostras de toxinas purificadas.

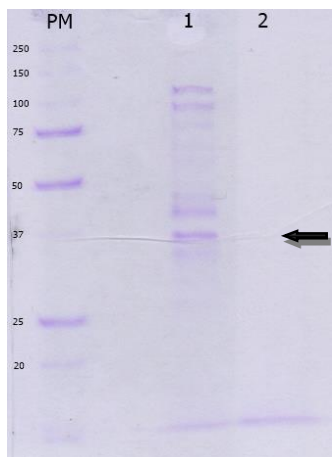
No presente estudo, optou-se por utilizar a coluna Sephacryl S-200® devido a sua capacidade para processos de filtração em gel, e usabilidade para a separação de proteínas entre 5 e 250 kDa. Optou-se também por uma única fase cromatográfica para a purificação dos complexos das toxinas botulínicas C e D, já que o resultado obtido foi suficiente em qualidade, quantidade e rendimento para a execução das etapas posteriores. Além disso, o tempo necessário para os todos procedimentos de purificação das toxinas C e D de *C. botulinum* tipos C e D foi de aproximadamente quatro dias; como comparação, a purificação da toxina botulínica B segundo os procedimentos utilizados por Zhao et al. (2012) levava nove dias.

#### 5.4.2. Purificação da toxina beta de *Clostridium perfringens*

Anteriormente ao procedimento de purificação propriamente dito, os sobrenadantes de *C. perfringens* tipo C contendo a toxina beta eram concentrados e diafiltrados. A diafiltração é um processo de filtração das amostras, que leva à remoção ou separação de solutos e outros componentes em solução por meio dos seus tamanhos moleculares. Em trabalhos de purificação de proteínas, é comum o emprego da diálise após a concentração ou precipitação para a troca do tampão original da amostra por aquele necessário para a cromatografia. No presente estudo, optou-se pelo emprego da diafiltração para tal, sem prejuízo algum à qualidade final da amostra a ser purificada. Pelo contrário, a diafiltração foi capaz de fazer as trocas de tampões necessárias, e, sendo um procedimento mais rápido que a diálise, deixou as amostras menos tempo sujeitas ao ambiente e à degradação. Além disso, o controle do volume final das amostras é muito mais preciso quanto se utiliza a diafiltração em relação à diálise, o que pode ser importante na recuperação e no controle da concentração das amostras purificadas ao final das cromatografias.

Outra etapa comum durante a purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C é a precipitação de proteínas com sulfato de amônio (Sakurai e Duncan, 1977; Sakurai e Fuji, 1987; Carvalho et al., 2006; Vidal et al., 2008; Zayerzadeh et al., 2014), com o objetivo principal de concentrar o sobrenadante e começar o processo de remoção de impurezas em algum grau. No presente trabalho, optou-se por concentrar o sobrenadante contendo as toxinas por ultrafiltração tangencial seguida por diafiltração. Este processo foi satisfatório para a concentração dos sobrenadantes, bem como é muito mais rápido que a precipitação, deixando as amostras menos tempo sujeitas ao ambiente, bem como estas não entram em contato com grandes concentrações de sais, evitando, portanto, dois fatores que podem contribuir para a degradação proteica (Lial et

al., 2004). A figura 5.10 mostra o sobrenadante de *C. perfringens* tipo C concentrado e diafiltrado, além do permeado da concentração e diafiltração. Como mostra a figura, não houve perda evidente de toxina beta durante os procedimentos de concentração e diafiltração.



**Figura 5.10** - SDS-PAGE a 15% apresentando: PM: padrão peso molecular em kDa. Canaleta 1: sobrenadante concentrado e diafiltrado de *Clostridium perfringens* tipo C, diluído 10x para melhor visualização das bandas. Canaleta 2: permeado da concentração e diafiltração. Seta: banda referente à toxina beta.

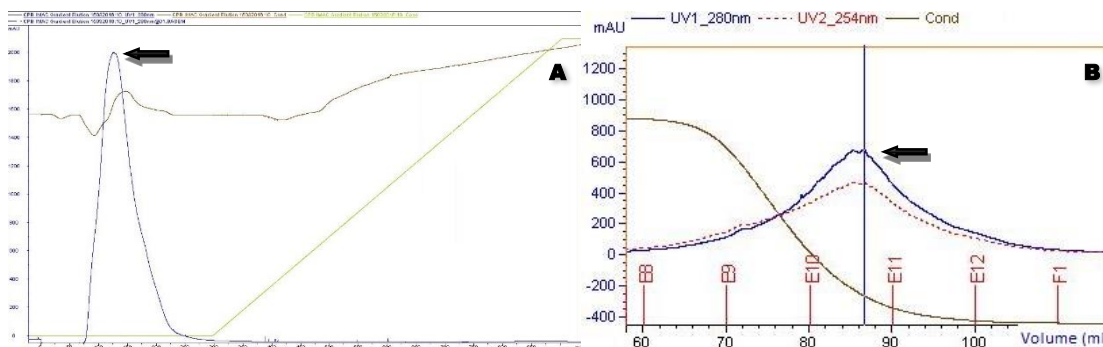
A purificação propriamente dita da toxina beta de *C. perfringens* se deu por meio de cromatografia por afinidade metálica (IMAC), utilizando-se o zinco como agente quelante em resina IMAC Sepharose 6 Fast Flow. O carregamento da resina com zinco foi feito com sulfato de zinco e cloreto de zinco; não houve diferenças em relação à utilização desses dois sais, ficando a escolha a cargo da disponibilidade de ambos.

Foram testados os volumes de 50 a 100 mL de amostra para a purificação da toxina beta. Não houve diferença visível na qualidade da purificação quando se aumentou o volume injetado na coluna; obviamente, a utilização de maior volume levou a purificação de maior quantidade de toxina. Sendo assim, 100 mL podem ser utilizados durante as purificações dentro dos parâmetros estabelecidos neste estudo. Nas condições deste trabalho, volumes maiores que 100 mL não foram testados.

Após a injeção da amostra na coluna cromatográfica, a toxina beta em pH 7,7 se liga à resina carregada com zinco e com o mesmo pH, enquanto as impurezas não, sendo então lavadas pelo tampão. Posteriormente, a redução do pH do tampão deveria fazer com que a toxina beta ligada à resina fosse eluída da coluna. Contudo, isso não ocorreu; gradientes de eluição com faixas de pH de até 5,7 foram testados como tentativas para a eluição e recuperação da proteína, sem sucesso. Diferentemente do esperado, a redução drástica da força iônica do tampão e do ambiente da coluna, por meio da lavagem da coluna com água ultrapura, foi a responsável pela eluição da toxina beta. Tal comportamento não foi descrito por Sakurai e Fuji (1987) e Carvalho et al. (2006), os quais fizeram purificações da toxina beta de *C. perfringens* tipo C por meio de cromatografia de afinidade metálica (IMAC) em matrizes similares, mas não idênticas. Tampouco a eluição da toxina em água pode ser explicada pela teoria da IMAC, a qual institui que a eluição das proteínas em purificação pode ser feita por meio da redução do pH, por meio de um agente competitivo, tal como o imidazol, ou por um agente quelante, como o EDTA (Chaga, 2001). Possivelmente, a eluição da toxina beta em água ultrapura tenha relação com as características intrínsecas e específicas da resina cromatográfica utilizada neste trabalho.

As condutividades registradas durante as etapas de equilíbrio das corridas variaram de 47,16 a 52,4 mS/cm. Já as condutividades registradas durante as passagens das amostras variaram de 43,2 a 51,6 mS/cm. A pequena variação relativa entre as condutividades demonstra o quanto o controle das forças iônicas dos tampões e das amostras era rígido. Evidencia também que as trocas de tampões dos sobrenadantes pela diafiltração foram bem-sucedidas.

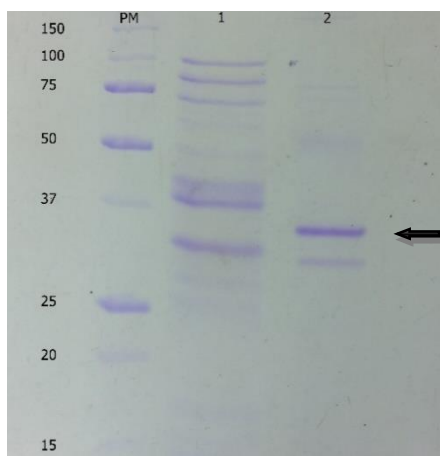
A figura 5.11 apresenta o perfil cromatográfico obtido nas purificações da toxina beta de *C. perfringens* tipo C por IMAC. O cromatograma apresentado na figura 5.11A mostra o pico da lavagem contendo as impurezas retiradas da amostra. Observa-se que não houve eluição de proteínas durante o gradiente de pH. Já no cromatograma apresentado na figura 5.11B, observa-se um pico contendo a toxina beta purificada, eluída em água ultrapura. Os pontos máximos dos picos de lavagens, que continham as impurezas, variaram de acordo com a quantidade de amostra injetada, com valores de 1079,45 a 2733 mAU. Os picos máximos dos picos de eluição, contendo a toxina beta purificada, também variaram de acordo com o volume de amostra injetado, com valores de 142,76 a 677,92 mAU. Os valores em mAU dos picos de lavagens têm correlação positiva direta com a quantidade de impurezas retiradas da amostra; quanto maiores estes picos, maior a quantidade de proteínas contaminantes retiradas e maior a pureza final da toxina alvo.



**Figura 5.11** – A) Cromatograma obtido na purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C por IMAC, que mostra a eluição por gradiente de pH. Seta: pico contendo as impurezas. B) Parte do cromatograma obtido na purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C por IMAC que mostra a eluição da toxina beta pela água ultrapura. Seta: pico contendo a toxina beta purificada.

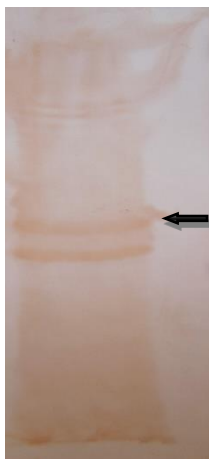
A concentração proteica média das amostras utilizadas para a purificação da toxina beta foi de 1,89 mg/mL. A concentração proteica média da toxina beta purificada obtida nas cromatografias foi de 294,26 µg/mL, sendo que quanto maior o volume de amostra injetado, maior a concentração obtida. De 5,59 % a 11,40 %, e em média 8,97% do total de proteína injetada na coluna cromatográfica como amostra eram retirados ao final das corridas como proteína beta purificada.

A figura 5.12 apresenta o gel de SDS-PAGE com as frações coletadas em cromatografia de afinidade metálica para a purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C. Observa-se no gel uma banda forte correspondente a toxina beta e uma banda de intensidade média logo abaixo, que possivelmente se trata da toxina beta com menor peso, fruto de quebra ou degradação parcial. Há ainda poucas bandas de fraca intensidade e com alto peso molecular; estas podem se tratar de formas oligomerizadas da toxina beta (Carvalho et al. 2006). Na canaleta 1 da figura 5.12, observa-se inúmeras bandas de intensidades variáveis, referentes às impurezas retiradas durante a lavagem. Nenhuma das proteínas presentes no lavado corresponde à toxina beta; portanto, não houve perda aparente da toxina durante a cromatografia.



**Figura 5.12** - SDS-PAGE a 15% apresentando: PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: lavado contendo as impurezas que não se ligaram à resina de cromatografia. Canaleta 2: eluído em água ultrapura contendo a toxina beta de *C. perfringens* tipo C. Seta: banda referente à toxina beta.

A identidade biológica da toxina beta purificada de *C. perfringens* tipo C foi confirmada por meio de *Western Blot* utilizando as antitoxinas padrões oficiais, e os resultados são apresentados na figura 5.13. Na imagem observa-se duas bandas fortemente marcadas logo abaixo de onde seria o peso molecular de 37 kDa. É possível que ambas as bandas sejam a toxina beta, sendo a de menor peso molecular fruto de quebra ou degradação parcial da toxina. A identidade biológica da toxina beta também foi confirmada pela realização de testes de ELISA indireto, descritos em sessão posterior.



**Figura 5.13** - *Western Blot* da toxina beta purificada de *Clostridium perfringens* tipo C. Seta: banda referente à toxina beta.

Carvalho et al. (2006) utilizaram a cromatografia de afinidade metálica (IMAC) para purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C, obtendo perfil de pureza semelhante ao do presente estudo; banda forte correspondente à toxina beta, e algumas outras bandas fracas, principalmente de alto peso molecular. Segundo os autores, essas bandas de alto peso seriam formas oligomerizadas da toxina beta. Estes mesmos autores também relataram em seu trabalho um baixíssimo rendimento em quantidade de proteína beta obtida por meio da IMAC. Diferentemente, o presente estudo obteve rendimento considerado bom em termos da quantidade

em massa de toxina obtida por corrida cromatográfica (até aproximadamente 21,61 mg de toxina beta purificada por corrida).

Outros trabalhos de purificação da toxina beta de *C. perfringens* necessitaram de duas ou três fases cromatográficas para a obtenção da proteína altamente purificada. Worthington e Mülders (1975) utilizaram duas filtrações em gel seguidas de cromatografia por troca iônica. Sakurai e Dunkan (1977) fizeram uso de uma etapa de filtração em gel seguida de focagem isoeletrica e cromatografia de imunoafinidade. Sakurai e Fuji (1987) associaram a cromatografia de afinidade metálica com a filtração em gel. Já Zayerzadeh et al. (2014) utilizaram cromatografia de troca catiônica, seguida de outra de troca aniônica e uma filtração em gel. Além disso, são comuns as etapas de liofilização e diálise entre as cromatografias acima citadas, aumentando ainda mais a manipulação das amostras. O que acontece quando múltiplos procedimentos e fases de purificação são empregados, é que a pureza resultante é evidenciada pela presença de apenas uma banda da proteína em gel de eletroforese. Contudo, como verificado nos trabalhos acima citados, a maior manipulação das proteínas pode levar à degradação e perdas proteicas durante as cromatografias e processos que as envolvem. Como resultado, em geral, o rendimento em massa e a atividade biológica da toxina tendem a cair quanto maior for o número de passos durante a purificação.

Outro ponto importante durante a interpretação dos resultados encontrados pelos trabalhos citados acima e o presente estudo é a escala de purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C. Grande parte daqueles trabalhos não informa a escala, volume ou quantidade de amostra submetida à purificação; aqueles que informam trabalharam com pequenas colunas e por consequência pequenos volumes de amostra. Sakurai e Fuji (1987), por exemplo, trabalharam com uma coluna de afinidade metálica com dimensões de 1,6 x 10,0 cm, e um volume máximo de resina de 20 mL. O presente estudo chegou a purificar, por corrida, até um litro de sobrenadante de cultivo em sua forma concentrada, contendo cerca de 189 mg de proteínas, sendo considerada uma purificação em média escala. É sabido que o escalonamento é um dos principais entraves na produção de produtos purificados, sendo que quanto maior a escala, maiores as dificuldades para a obtenção de um produto final com boa pureza, atividade e estabilidade (Milne, 2017).

O título da toxina beta purificada de *C. perfringens* tipo C foi determinada pela DMM (menor quantidade de toxina que mata 100% dos animais inoculados em até 72 horas após a inoculação), segundo Zayerzadeh et al. (2014). O título obtido da toxina beta após a cromatografia por afinidade metálica obtido foi de 1600 DMM/mg, sendo que o título total máximo obtido em uma única corrida cromatográfica foi de 34576 DMM. Zayerzadeh et al. (2014) mediram o título da toxina beta após cada uma das quatro etapas utilizadas para sua purificação. Após a precipitação por sulfato de amônio, o título obtido foi de 107,1 DMM/mg; após cromatografia de troca catiônica, 400 DMM/mg; depois de cromatografia de troca aniônica, 4444,5 DMM/mg; e 8333,3 DMM/mg após filtração em gel. Nota-se que quanto maior o nível de purificação da toxina, maior seu título em DMM/mg, porém os rendimentos em atividade letal e em massa caem drasticamente. Os títulos em DMM/mg aumentam quanto mais se purifica a toxina por dois motivos principais: (1) pela retirada de impurezas que não contribuem para a atividade tóxica da amostra; e (2) pela retirada de proteínas endógenas inibidoras da toxina beta. O presente trabalho, com apenas uma etapa de purificação, conseguiu título da toxina beta considerado alto, muito superior aquele obtido por Zayerzadeh et al. (2014) após duas etapas de purificação.

A purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C também foi testada por meio de uma cromatografia de troca aniônica em resina DEAE Sepharose CL-6B. Todas as tentativas de purificar a proteína por meio deste método falharam. Os resultados obtidos não foram satisfatórios em termos de nível de pureza alcançado, padronização e repetibilidade do procedimento, o qual não foi mais testado ou utilizado posteriormente.

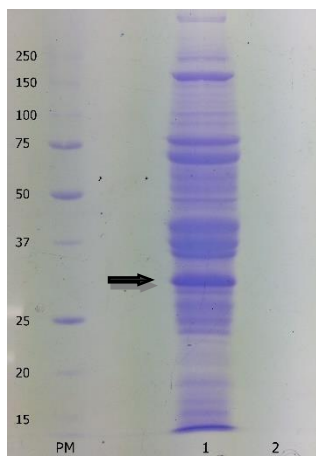
O presente estudo optou pela concentração e diafiltração dos sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* tipo C contendo a toxina beta, seguidas de uma etapa cromatográfica única, de afinidade metálica. Para os fins desejados e para as etapas posteriores deste trabalho, os níveis de purificação proteica e de recuperação em massa da toxina beta foram considerados ótimos e atenderam às necessidades.

#### **5.4.3. Purificação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens***

Anteriormente ao procedimento de purificação propriamente dito, os sobrenadantes de *C. perfringens* tipo D contendo a toxina épsilon eram concentrados e diafiltrados. A diafiltração é um processo de filtração das amostras, que leva à remoção ou separação de solutos e outros componentes em solução por meio dos seus tamanhos moleculares. Em trabalhos de purificação de proteínas, é muito comum o emprego da diálise após a concentração ou precipitação para a troca do tampão original da amostra por aquele necessário para a cromatografia. No presente estudo, optou-se pelo emprego da diafiltração para tal, sem prejuízo algum à qualidade final da amostra a ser purificado. Pelo contrário, a diafiltração foi capaz de fazer as trocas de tampões necessárias, e, sendo um procedimento mais rápido que a diálise, deixou as amostras menos tempo sujeitas ao ambiente e à degradação. Além disso, o controle do volume final das amostras é muito mais preciso quanto se utiliza a diafiltração em relação à diálise, o que pode ser importante na recuperação e no controle da concentração das amostras purificadas ao final das cromatografias.

Outra etapa comum durante a purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D é a precipitação de proteínas com sulfato de amônio (Thomson, 1963; Subramanyam et al., 2001; Parreiras et al., 2002; Fernandez-Miyakawa et al., 2008; Langroudi et al., 2014), com o objetivo principal de concentrar o sobrenadante e começar o processo de remoção de impurezas em algum grau. No presente trabalho, optou-se por concentrar o sobrenadante contendo as toxinas por ultrafiltração tangencial seguida por diafiltração. Este processo foi satisfatório para a concentração dos sobrenadantes, bem como é muito mais rápido que a precipitação, deixando as amostras menos tempo sujeitas ao ambiente, bem como estas não entram em contato com grandes concentrações de sais, evitando, portanto, dois fatores que podem contribuir para a degradação proteica (Lial et al., 2004). A figura 5.14 mostra o sobrenadante de *C. perfringens* tipo D concentrado e diafiltrado, além do permeado da concentração e diafiltração. Como mostra a figura, não houve perda evidente de toxina épsilon durante os procedimentos de concentração e diafiltração.





**Figura 5.14** - SDS-PAGE a 15% apresentando: PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: sobrenadante concentrado e diafiltrado de *Clostridium perfringens* tipo D. Canaleta 2: permeado da concentração e diafiltração. Seta: banda referente à toxina épsilon.

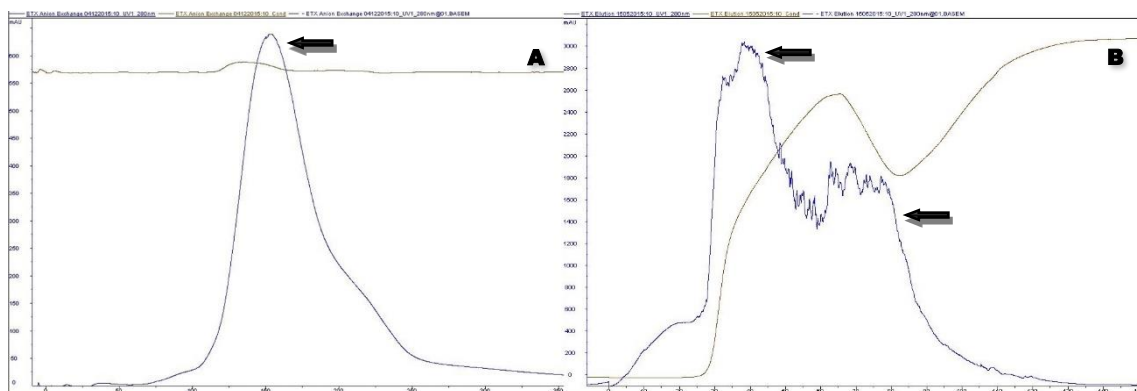
A purificação propriamente dita da toxina épsilon de *C. perfringens* se deu por meio de cromatografia de troca iônica (IEX), mais especificamente de troca aniônica, utilizando-se a resina DEAE Sepharose CL-6B. Foram testados os volumes de 50 a 100 mL de amostra para a purificação da toxina épsilon. Diferentemente do que ocorreu para a toxina beta, houve diferença na qualidade da purificação quando se aumentou o volume injetado na coluna; quanto menor a quantidade injetada na coluna, maior era a pureza da toxina épsilon obtida nas corridas. Sendo assim, 50 mL de amostra por corrida foi padronizado como o volume ideal dentro dos parâmetros estabelecidos neste estudo. Volumes menores que 50 mL não foram testados.

A toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D possui ponto isoelétrico de 8,02 (Worthington e Mülders, 1977). O pH utilizado durante as cromatografias de troca aniônica desta proteína foi de 7,2. Em tal pH, a toxina épsilon adquire carga elétrica líquida positiva; da mesma forma, a resina DEAE Sepharose CL-6B, uma trocadora de ânions, também está carregada positivamente. Como consequência, nessas condições, a toxina épsilon não se liga a esta matriz cromatográfica e elui durante a fase de lavagem da cromatografia. Neste caso, as proteínas que se ligam à resina são as impurezas contidas nas amostras, e são retiradas em uma etapa posterior de eluição. Desta forma, após a injeção da amostra na coluna cromatográfica, a toxina épsilon em pH 7,2 não se ligava à resina e era lavada pelo tampão de equilíbrio e coletada. Posteriormente, a troca deste tampão por solução de NaCl 1M era responsável pela eluição das impurezas, as quais também eram coletadas para as análises posteriores.

As condutividades registradas durante as etapas de equilíbrio das corridas variaram de 15,68 a 17,1 mS/cm. Durante as passagens das amostras, as condutividades variaram de 14,6 a 17,65 mS/cm. Já as condutividades registradas durante a eluição por NaCl 1M variaram entre 78,35 e 90 mS/cm. A pequena variação relativa entre as condutividades demonstra o quanto o controle das forças iônicas dos tampões e das amostras era rígido. Evidencia também que as trocas de tampões dos sobrenadantes pela diafiltração foram bem-sucedidas.

A figura 5.15 apresenta o perfil cromatográfico obtido nas cromatografias de troca aniônica da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. O cromatograma apresentado na figura 5.15A mostra o pico da lavagem contendo a toxina épsilon purificada em tampão de equilíbrio. Já no cromatograma apresentado na figura 5.15B, observa-se um pico contendo as impurezas retiradas da amostra, eluídas em NaCl 1M. Os pontos máximos dos picos de lavagens, que continham a toxina épsilon purificada, variaram de acordo com a quantidade de amostra injetada, com valores de 370 a 870 mAU. Os picos máximos dos picos de eluição, contendo as impurezas retiradas das

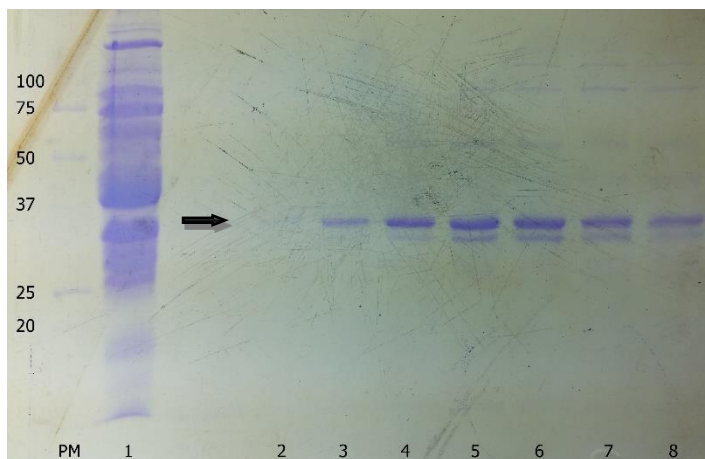
amostras, também variaram de acordo com o volume de amostra injetado, com valores de 3000 a 3500 mAU. Os valores em mAU dos picos de eluição têm correlação positiva direta com a quantidade de impurezas retiradas da amostra; quanto maiores estes picos, maior a quantidade de proteínas contaminantes retiradas e maior a pureza final da toxina alvo.



**Figura 5.15** – A) Cromatograma obtido na purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D por IEX, que mostra a lavagem da coluna com tampão de equilíbrio e eluição da toxina épsilon purificada. Setas: pico contendo a toxina épsilon purificada. B) Parte do cromatograma obtido na purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D por IEX que mostra a eluição das impurezas contidas na amostra por NaCl 1M. Setas: picos contendo as impurezas contidas na amostra.

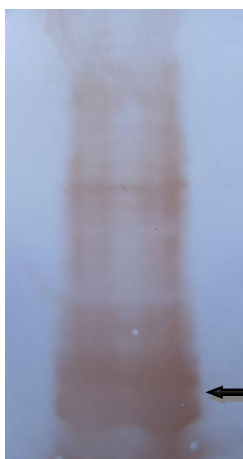
A concentração proteica média das amostras utilizadas para a purificação da toxina épsilon foi de 3,85 mg/mL. A concentração proteica média obtida da toxina épsilon purificada por troca aniônica nas cromatografias foi de 323,84 µg/mL. De 8,87 % a 12,99 %, e em média, 10,88 % do total de proteína injetada na coluna cromatográfica como amostra eram retirados ao final das corridas como proteína épsilon purificada.

A figura 5.16 apresenta o gel de SDS-PAGE com as frações coletadas em cromatografia de troca aniônica para a purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. A canaleta 1 contém o sobrenadante concentrado e diafiltrado de *C. perfringens* tipo D, ou amostra bruta. As canaletas 2 a 8 contém frações da amostra purificada, sendo evidente o grande grau de limpeza e purificação quando comparada à amostra bruta. Observa-se nas canaletas 2 a 8 do gel uma banda forte correspondente à toxina épsilon. Logo abaixo, e mais evidente nas canaletas 4 a 8, há uma banda mais fraca correspondente à toxina com degradação parcial. A épsilon é notavelmente uma das toxinas clostridiais mais lábeis e sujeitas à degradação, sendo comum a visualização de tal fenômeno como um arraste de banda em gel de SDS, como visto na figura 5.16. Outras poucas bandas de alto peso molecular e de baixíssimas intensidades podem ser vistas no gel. As frações correspondentes à parte final do pico de lavagem da cromatografia tendem a conter mais impurezas em relação às frações iniciais e médias do pico. Portanto, se maior pureza da toxina épsilon for desejada, as frações iniciais do pico de lavagem devem ser coletadas e trabalhadas. Se o rendimento e quantidade em massa for mais importante, as frações mais avançadas do pico devem também ser coletadas.



**Figura 5.16** - SDS-PAGE a 15% apresentando: PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: sobrenadante concentrado e diafiltrado de *Clostridium perfringens* tipo D. Canaletas 2 a 8: frações do pico de lavagem contendo a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Seta: bandas referentes à toxina épsilon.

A identidade biológica da toxina épsilon purificada de *C. perfringens* tipo D foi confirmada por meio de *Western Blot* utilizando a antitoxina padrão oficial, e os resultados são apresentados na figura 5.17. Na imagem observa-se uma banda forte e espessa referente a toxina épsilon (seta) e outras bandas menores de maior peso molecular, o que condiz com o padrão de purificação observado no gel SDS-PAGE (Figura 5.16). A força e espessura da banda da toxina épsilon se deve à alta concentração proteica da amostra utilizada para o preparo do *Western Blot*; o que também facilita o aparecimento de outras bandas de menor intensidade. A quebra ou degradação parcial da toxina épsilon purificada também pode ter contribuído para a espessura e arraste da sua banda, visto que mesmo um certo grau de degradação não impede o reconhecimento pelos anticorpos utilizados na metodologia. A identidade biológica da toxina épsilon também foi confirmada pela realização de testes de ELISA indireto, descritos em sessão posterior.



**Figura 5.17** - *Western Blot* da toxina épsilon purificada de *Clostridium perfringens* tipo D. Seta: banda referente à toxina épsilon.

Os primeiros trabalhos de purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D datam da década de 1960. Orlans et al. (1960) purificaram a toxina épsilon por meio de troca aniônica em resina DEAE-Cellulose. Também em 1960, Verwoerd utilizou-se do fracionamento com

metanol para a purificação. Thomson (1962) e Thomson (1963) parece ter sido o primeiro autor a purificar da toxina épsilon por meio de duas fases cromatográficas: uma troca aniônica em DEAE-Cellulose seguida por uma troca catiônica em CM-Cellulose. Worthington et al. (1974) utilizaram apenas uma troca aniônica em DEAE-Cellulose; entretanto, as bandas de épsilon em eletroforese eram heterogêneas, e um produto absolutamente puro não pôde ser alcançado pela degradação contínua da toxina. Uzal et al. (1997) fizeram uso de três fases cromatográficas para a purificação: duas trocas aniônicas em DEAE-Sepharose CL-6B, seguidas de filtração em gel em resina Sephadex G25. Estes autores, no entanto, não informam em seu trabalho nenhum resultado específico acerca da purificação da toxina. Fernandez-Miyakawa et al. (2008) obtiveram em seu estudo sob os efeitos letais da toxina épsilon banda única em gel de SDS-PAGE após sua purificação pela associação de uma troca aniônica em DEAE-Sepharose e uma troca catiônica em CM-Sepharose. Finalmente, Langroudi et al. (2014) purificaram a toxina épsilon utilizando a mesma metodologia de Thomson (1962) e Thomson (1963); uma troca aniônica em DEAE-Cellulose seguida de troca catiônica em CM-Cellulose. Em seu estudo, Langroudi et al. (2014) não apresentaram resultados específicos sobre a purificação da toxina.

Nota-se, pela literatura acima descrita acerca da purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D, que para se obter a toxina com extrema pureza, ou seja, com banda única em géis de SDS-PAGE, são necessárias de duas a três fases cromatográficas quase sempre associadas com uma fase anterior de precipitação por sulfato de amônio. Além disso, são comuns as etapas de liofilização e diálise entre as fases acima citadas, aumentando ainda mais a manipulação das amostras. Quando múltiplos procedimentos e fases de purificação são empregados, a pureza resultante do produto aumenta ao ponto de se obter banda única da proteína em purificação. Contudo, a maior manipulação das amostras leva à degradação e perdas proteicas durante as cromatografias e processos que as envolvem, como destacado por Worthington et al. (1974). Como resultado, em geral, o rendimento em massa e a atividade biológica da toxina tendem a cair quanto maiores forem o número de passos durante a purificação.

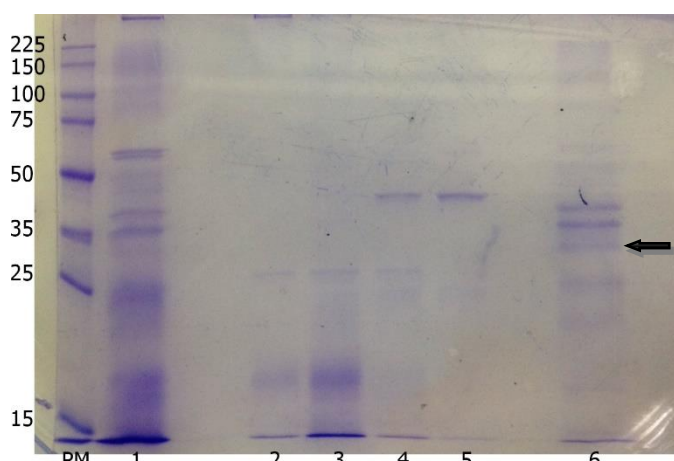
Outro ponto importante durante a purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D é a escala em que se trabalha. Grande parte dos trabalhos acima citados não informa a escala, volume ou quantidade de amostra submetida aos procedimentos, informação de extrema importância para a escolha do método de purificação e sua qualidade. É sabido que o escalonamento é um dos principais entraves na produção de produtos purificados, sendo que quanto maior a escala, maiores as dificuldades para a obtenção de um produto final com boa pureza, atividade e estabilidade (Milne, 2017). O presente estudo purificou, por corrida, 500 mL de sobrenadante de cultivo (ou 50 ml em sua forma concentrada 10 vezes), contendo cerca de 192,5 mg de proteínas, sendo considerada uma purificação em média escala.

O título da toxina épsilon purificada de *C. perfringens* tipo D foi determinada pela DMM (menor quantidade de toxina que mata 100% dos animais inoculados em até 72 horas após a inoculação), segundo Langroudi et al. (2014). O título obtido da toxina épsilon após a cromatografia por afinidade metálica obtido foi de 8000 DMM/mg, sendo que o título total máximo obtido em uma única corrida cromatográfica foi de 200046 DMM. No presente trabalho, o título da toxina épsilon foi determinado sem a ativação prévia por tratamento com tripsina. Sabe-se, porém, que a tripsinização com consequente ativação da toxina pode aumentar os títulos em DMM de 10 até 500 vezes (Thomson, 1963). A purificação da toxina épsilon também tende a aumentar seu título em DMM/mg, por dois motivos principais: (1) pela retirada de impurezas que não contribuem para a sua atividade tóxica; e (2) pela retirada de proteínas endógenas que podem degradar a toxina.

O presente estudo optou pela concentração e diafiltração dos sobrenadantes de cultivo de *C. perfringens* tipo D contendo a toxina épsilon, seguidas de uma etapa cromatográfica única, de troca iônica. Desta forma, a toxina passou pelo mínimo de procedimentos e fases de purificação

possíveis, visando maior rapidez no processo, menor perda proteica por degradação possível, bons títulos, enquanto a qualidade da purificação foi mantida. Para os fins desejados e para as etapas posteriores deste trabalho, os níveis de purificação proteica e de recuperação em massa da toxina épsilon foram considerados ótimos e atenderam às necessidades.

A purificação por troca aniônica em resina DEAE-Sepharose CL-6B também foi testada em amostras de sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* tipo B tripsinizadas contendo a toxina épsilon ativada. Apesar de o cromatograma das corridas de *C. perfringens* tipo B serem semelhantes aqueles de *C. perfringens* tipo D, o padrão de purificação obtido e evidenciado nos géis de SDS-PAGE era totalmente divergente (Figura 5.18). Sendo assim, a purificação da toxina épsilon a partir destas amostras de sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* tipo B não foi bem-sucedida. Uma provável explicação para tal está nas mudanças que ocorrem na toxina épsilon após sua ativação. Esta causa uma pequena alteração na massa molecular da toxina, mas uma grande mudança em seu ponto isoelétrico, de 8,02 para 5,36 ou 5,74 (Worthington e Mülders, 1977). Alterando seu ponto isoelétrico, alterou-se a carga elétrica líquida da proteína, perturbando os fenômenos que deveriam ocorrer em relação às trocas iônicas durante as cromatografias.



**Figura 5.18** - SDS-PAGE a 15% apresentando: PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: sobrenadante concentrado e diafiltrado de *Clostridium perfringens* tipo B. Canaletas 2 a 5: frações do pico de lavagem que deveriam conter a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo B. Canaleta 6: eluído em NaCl 1 M possivelmente contendo a toxina épsilon Seta: banda possivelmente referente à toxina épsilon.

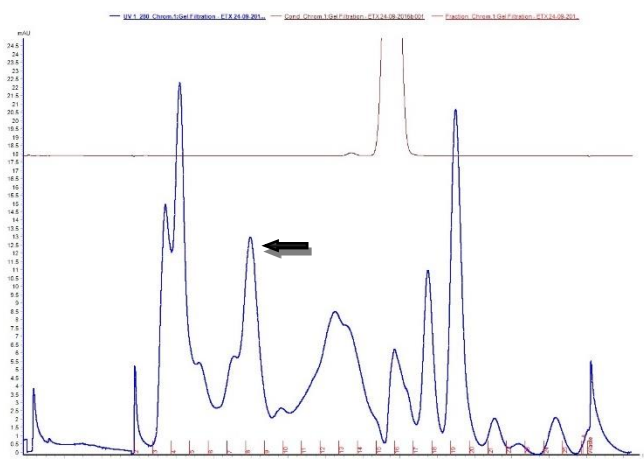
Como segunda fase da cromatografia da toxina épsilon, três estratégias foram instituídas. Na primeira, todas as frações do pico de cromatografia de troca aniônica contendo a toxina épsilon eram diretamente repassadas na coluna em uma nova corrida cromatográfica, sem liofilização prévia, e com todos os parâmetros idênticos aos da corrida anterior. Diferentemente do observado por Uzal et al. (1997), não houve melhora evidente no grau de purificação da toxina épsilon pela repetição da troca aniônica. Ademais, houve maior diluição da toxina (concentração proteica média de 42,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e provável perda em termos de proteína e atividade biológica durante o procedimento. Sendo assim, uma segunda fase cromatográfica com repetição da troca aniônica não mostrou vantagens aparentes e deixou de ser realizada.

Outra estratégia para segunda fase cromatográfica foi a repassagem das frações do pico de cromatografia aniônica contendo a toxina épsilon em uma nova corrida de troca aniônica, porém com alteração no pH dos tampões e da própria amostra de 7,2 para 8,5 ou 9,1. O objetivo deste aumento no pH era que a toxina épsilon, com ponto isoelétrico de 8,02 (Worthington e Mülders, 1977), passasse a apresentar carga elétrica líquida negativa. Com carga negativa, a toxina, em teoria, se ligaria a matriz DEAE-Sepharose CL-6B, uma trocadora de ânions, e poderia

ser eluída isoladamente das impurezas por meio de eluição em gradiente com aumento da força iônica do tampão. Entretanto, esta ligação à matriz não ocorreu mesmo em pH 9,1, e a proteína continuou a ser eluída durante a lavagem com tampão de equilíbrio. Desta maneira, uma segunda fase cromatográfica com repetição da troca aniônica em pH tão alto quanto 9,1 não mostrou vantagens aparentes e deixou de ser realizada.

Finalmente, uma terceira estratégia para segunda fase da cromatografia da toxina épsilon foi a passagem de amostras purificadas por cromatografia aniônica em coluna de filtração em gel (GF) ou cromatografia por exclusão de tamanho. Na GF, as moléculas presentes na amostra não reagem com a resina cromatográfica, mas são separadas com base nos seus tamanhos. As condutividades registradas durante as corridas variaram de 34,44 a 35,55 mS/cm, o que demonstra o quanto o controle dos tampões e do ambiente de cromatografia era rígido.

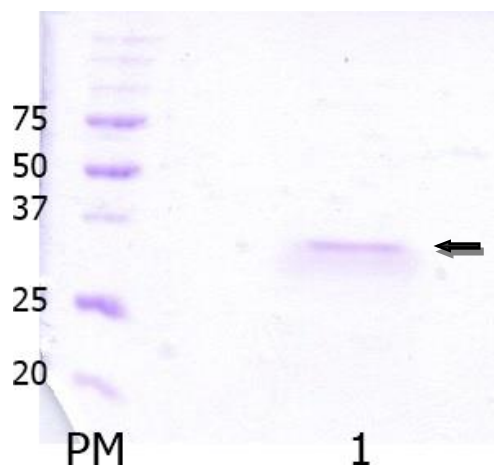
A figura 5.19 apresenta o perfil cromatográfico obtido nas filtrações em gel (GF) da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. O cromatograma mostra vários picos, sendo que aquele referente às frações 7 e 8 (seta na figura) continham a toxina épsilon purificada em todas as corridas realizadas. Os valores dos pontos máximos dos picos que continham a toxina épsilon purificada variaram de 13 a 18,1 mAU.



**Figura 5.19** – Cromatograma obtido na purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D por GF. Seta: pico contendo a toxina épsilon purificada.

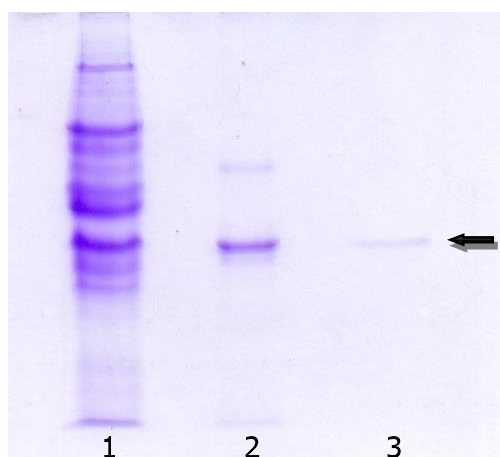
A concentração proteica das amostras utilizadas para a purificação da toxina épsilon por meio da filtração em gel (GF) foi de 71,7  $\mu\text{g/mL}$ . Como 0,5 mL de amostra era injetado na coluna, 35,85  $\mu\text{g}$  de proteína era o total injetado por corrida. A concentração proteica média obtida da toxina épsilon purificada por GF foi de 5,5  $\mu\text{g/mL}$ , e, em média, 11  $\mu\text{g}$  da toxina pura eram obtidos por cromatografia. Portanto, em média 30,68 % do total de proteína injetada na coluna cromatográfica como amostra eram retirados ao final das corridas como toxina épsilon pura.

A figura 5.20 apresenta o gel de SDS-PAGE com as frações 7 e 8 coletadas nas filtrações em gel para a purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D; observa-se na canaleta 1 a banda única referente à toxina épsilon pura. Uzal et al. (1997) utilizaram de uma filtração em gel para o polimento da purificação da toxina épsilon. Os autores utilizaram quatro fases de purificação, sendo uma precipitação por sulfato de amônio, duas cromatografias de troca aniônica e uma filtração em gel. O resultado dessas quatro etapas não foi reportado pelos autores em seu estudo. O presente trabalho foi o primeiro a purificar a toxina épsilon em nível de banda única em gel de eletroforese com apenas duas fases cromatográficas, uma de troca aniônica e outra de filtração em gel.



**Figura 5.20** - SDS-PAGE a 15% apresentando: PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: pico da cromatografia de GF contendo a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Seta: banda referente à toxina épsilon.

A figura 5.21 apresenta o gel de SDS-PAGE com a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D em três momentos distintos: no sobrenadante de cultivo bacteriano; após cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose CL-6B; e após filtração em gel em Superdex 75.



**Figura 5.21** - SDS-PAGE a 15% apresentando todas as fases de purificação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. Canaleta 1: sobrenadante concentrado e diafiltrado de *C. perfringens* tipo D. Canaleta 2: toxina épsilon após cromatografia de troca aniônica. Canaleta 3: toxina épsilon após filtração em gel. Seta: banda referente à toxina épsilon.

## 5.5. Produção e Purificação das Imunoglobulinas G

### 5.5.1. Produção dos imunógenos

No total, foram produzidos quatro imunógenos monovalentes, para cada toxina produzida, purificada e inativada, para serem inoculados nos ovinos. O adjuvante de Freund, completo e incompleto, foi o escolhido devido seu alto poder imunogênico, apesar de poder causar reações adversas locais severas nos mamíferos (Gassmann et al., 1990). Para a inativação dos

antígenos C e D de *C. botulinum* tipos C e D, e beta de *C. perfringens* tipo C foram necessários cinco dias. Já para a inativação do antígeno épsilon de *C. perfringens* tipo D, quatro dias foram suficientes. Nos testes de esterilidade, não foi observado crescimento microbiano nos imunógenos produzidos; nos testes de inocuidade, não foram observadas reações de toxicidade residual locais ou sistêmicas. Com a exceção de um animal, os ovinos não apresentaram lesões locais significativas devido às inoculações com adjuvante de Freund, havendo apenas pequenas áreas endurecidas e com pouca ou nenhuma sensibilidade. Porém, um dos animais apresentou lesões internas nodulares nos locais de inoculação com até cinco centímetros de diâmetro, consistência variável de rígida a flutuante e dor moderada.

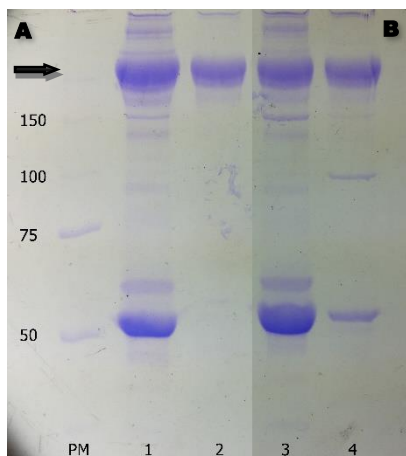
### **5.5.2. Produção das Imunoglobulinas G**

Para a produção das antitoxinas, foram feitas cinco ou seis inoculações nos ovinos com os imunógenos. Isto foi feito com o objetivo de obter altos títulos de anticorpos, assim como permitir que ocorresse a maturação de afinidade, gerando anticorpos capazes de se ligar com alta afinidade e avidéz aos seus antígenos (Danilova e Amemiya, 2009). Para a produção das imunoglobulinas G (IgG), optou-se por intervalos de imunização de 21 dias. Os intervalos de inoculação mais comuns utilizados em imunizações nessas espécies são de 14, 21 ou 30 dias. Os ovinos destinados a produção de IgG contra a toxina beta de *C. perfringens* tipo C foram vacinados uma vez a mais que os outros; isto ocorreu para aproveitar a melhora do escore corporal desses animais, quando passaram a receber alimentação de melhor qualidade. A sangria dos animais foi realizada 14 dias após a última inoculação, quando o título de anticorpos tende a ser máximo.

### **5.5.3. Purificação das Imunoglobulinas G**

As purificações dos soros dos ovinos contendo as imunoglobulinas G (IgG) contra os antígenos clostridiais foram realizadas pela associação da precipitação pelo ácido caprílico e a precipitação pelo sulfato de amônio (Page e Thorpe, 2002a; Page e Thorpe, 2002b). A figura 5.22 apresenta os resultados da purificação das IgG de ovinos. Os resultados das purificações das IgG contra todos os antígenos utilizados foram semelhantes aos apresentados na figura 5.22. Houve uma pequena variação no grau de purificação entre o mostrado na figura 5.22A, considerado maior, e aquele mostrado na figura 5.22B, considerado relativamente menor. Na figura 5.22B pode-se observar poucas bandas de baixa intensidade abaixo da banda referente às imunoglobulinas purificadas. Essas bandas de baixa intensidade podem ser resquícios de proteínas contaminantes e/ou as próprias imunoglobulinas com algum grau de degradação. Mesmo assim, ambos os níveis de purificação dos anticorpos foram considerados ótimos, atestando a qualidade da metodologia utilizada para tal.





**Figura 5.22** – SDS-PAGE a 10% apresentando os resultados da purificação das imunoglobulinas G dos ovinos. Amostras diluídas 50 vezes. A) Resultado com grau de purificação maior. PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: IgG bruta. Canaleta 2: IgG purificada. B) Resultado com grau de purificação menor. Canaleta 3: IgG bruta. Canaleta 4: IgG purificada. Seta: banda referente as imunoglobulinas G.

A concentração proteica das amostras dos soros brutos contendo as IgG a serem purificadas variou de 44,12 mg/mL a 45,88 mg/mL, com média de 45,10 mg/mL. Já a concentração proteica das amostras de IgG purificadas variou de 11,49 mg/mL a 17,89 mg/mL, com média de 14,25 mg/mL. É importante destacar que para efeito de melhor comparação, o volume inicial e final das amostras brutas e purificadas foram mantidos os mesmos durante os procedimentos que envolviam a purificação das IgG. Desta forma, o rendimento médio obtido em proteína foi de 31,6 %.

Anteriormente à purificação, as IgG brutas anti-botulínica C, anti-botulínica-D e anti-épsilon foram tituladas pela técnica de soroneutralização em camundongos, descrita pela Portaria número 49 do MAPA de 12 de maio de 1997 (Brasil, 1997), pelo British Pharmacopeia (1998) e pela Instrução Normativa nº 23 do MAPA de 18 de março de 2002 (Brasil, 2002). A IgG bruta anti-beta não foi titulada nesta etapa. O quadro 5.1 apresenta os títulos das IgG brutas contra as toxinas botulínicas C e D de *C. botulinum* tipos C e D e contra a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Os altos títulos obtidos evidenciam a qualidade das vacinas utilizadas e do esquema de vacinação. As titulações das IgG brutas, anteriormente aos procedimentos de purificação, foram importantes para atestar a quantidade de anticorpos produzidos pelas imunizações. Além disso, esses títulos puderam ser comparados com aqueles mensurados posteriormente às purificações, o que é discutido adiante.

**Quadro 5.1** – Títulos das imunoglobulinas G brutas de ovinos contra os antígenos clostridiais C, D e épsilon em UI/mL.

Imunoglobulinas G de Ovinos Contra os Antígenos Clostridiais		
Anti-Botulínica C	Anti-Botulínica D	Anti-Épsilon
730 UI/mL	360 UI/mL	112 UI/mL

Após a purificação, as IgG purificadas também foram tituladas pela técnica de soroneutralização em camundongos (Brasil, 1997; British Pharmacopeia, 1998; Brasil, 2002). O quadro 5.2 apresenta os títulos das IgG purificadas contra as toxinas botulínicas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, contra a toxina beta de *C. perfringens* tipo C e contra a toxina épsilon de

*C. perfringens* tipo D. Todas as antitoxinas apresentaram títulos em UI/mL muito altos, evidenciando a qualidade dos imunógenos utilizados, do esquema de vacinação e da purificação das IgG. Para a melhor comparação dos títulos das IgG com os títulos das IgY, mostrados no item 5.6.3, o quadro 5.2 também apresenta os resultados na forma de UI/mg.

**Quadro 5.2** – Títulos das imunoglobulinas G purificadas de ovinos contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon em UI/mL e UI/mg.

<b>Imunoglobulinas G de Ovinos Contra os Antígenos Clostridiais</b>			
<b>Anti-Botulínica C</b>	<b>Anti-Botulínica D</b>	<b>Anti-Beta</b>	<b>Anti-Épsilon</b>
280 UI/mL	280 UI/mL	280 UI/mL	160 UI/mL
19,65 UI/mg	19,65 UI/mg	19,65 UI/mg	11,23 UI/mg

Comparando os títulos das imunoglobulinas G antes e após as purificações (quadros 5.1 e 5.2), percebe-se que as IgG purificadas anti-botulínicas C e D tiveram seus títulos reduzidos de 730 para 280 UI/mL e de 360 para 280 UI/mL, respectivamente. Reduções desses títulos durante os processos de purificação é algo comum e esperado. Essas imunoglobulinas foram submetidas aos estresses químico, pelos reagentes utilizados, e físicos, como congelamento, descongelamento, agitação, centrifugação e filtração. Em contrapartida, a antitoxina anti-épsilon apresentou aumento no seu título após a purificação, de 112 para 160 UI/mL. Embora inesperado, esse aumento pode ter ocorrido devido à retirada durante a purificação de proteínas e outras substâncias contaminantes do soro; estas poderiam interferir negativamente na atividade biológica dos anticorpos ou nas técnicas utilizadas para as titulações.

Além de avaliar a pureza, rendimento e título, a avidéz das IgG produzidas e purificadas foi medida. O aumento da avidéz ocorre por meio da maturação de afinidade dos anticorpos, fazendo com que estes se liguem aos seus antígenos com alta afinidade (Danilova e Amemiya, 2009). A avidéz também possui correlação positiva direta com a atividade biológica da molécula; ou seja, anticorpos com alta avidéz possuem também alta atividade biológica. Além disso, metodologias que fazem uso de anticorpos com alta afinidade e avidéz tendem a apresentar maiores níveis de especificidade. As medições de avidéz das imunoglobulinas G clostridiais produzidas e purificadas foram realizadas por meio de testes de ELISA indireto segundo Wiuff et al. (1997). O quadro 5.3 apresenta os resultados dos índices de avidéz para as IgG purificadas contra as toxinas botulínicas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, contra a toxina beta de *C. perfringens* tipo C e contra a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Todas as IgG apresentaram índices de avidéz altos ou muito altos, de acordo com a classificação de Wiuff et al. (1997), os quais consideraram altos os índices entre 40 e 70%. Isto contribuiu para a confirmação da qualidade dos imunógenos utilizados, do esquema de vacinação e da purificação das antitoxinas. Destaque para a IgG anti-beta de *C. perfringens* tipo C que alcançou 94,48% de índice de avidéz, e a qual foi produzida com uma imunização extra em relação às outras.

**Quadro 5.3** – Índices de avidéz das imunoglobulinas G purificadas de ovinos contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon.

<b>Imunoglobulinas G de Ovinos Contra os Antígenos Clostridiais</b>				
<b>IgG</b>	<b>Anti-Botulínica C</b>	<b>Anti-Botulínica D</b>	<b>Anti-Beta</b>	<b>Anti-Épsilon</b>
<b>Avidéz</b>	70,70 %	68,67 %	94,48 %	80,07 %
<b>Desvio-Padrão</b>	2,21 %	5,46 %	0,78 %	2,87 %

Diversas formas de purificação de imunoglobulinas G estão descritas na literatura. Dentre elas destacam-se: a precipitação por sais, como sulfato de sódio ou sulfato de amônio; precipitação por polietilenoglicol (PEG); purificação por ácido caprílico; cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sepharose; cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de troca iônica; exclusão por tamanho em HPLC; cromatografia de imunoafinidade com utilização da proteína A ou da proteína G; e cromatografia de imunoafinidade em colunas contendo antígenos específicos ligados (Walker, 2002). Todos esses métodos apresentam particularidades, vantagens e desvantagens em relação ao grau de purificação, tempo de purificação, rendimento, manutenção da atividade biológica, escala e custo. Em condições levemente ácidas, a adição de ácido caprílico ao soro precipita a maior parte das proteínas séricas, com exceção das IgG. Em seguida, o sulfato de amônio precipita toda a proteína restante presente na amostra, a qual deverá ser predominantemente composta por IgG. A purificação das IgG com associação da utilização do ácido caprílico e a precipitação por sulfato de amônio rendeu amostras com ótimos graus de pureza, bom rendimento, baixo custo, sendo de rápida e fácil aplicação, assim como pode ser realizada com volumes relativamente grandes de amostra.

## **5.6. Produção e Purificação das Imunoglobulinas Y**

### **5.6.1. Produção dos imunógenos**

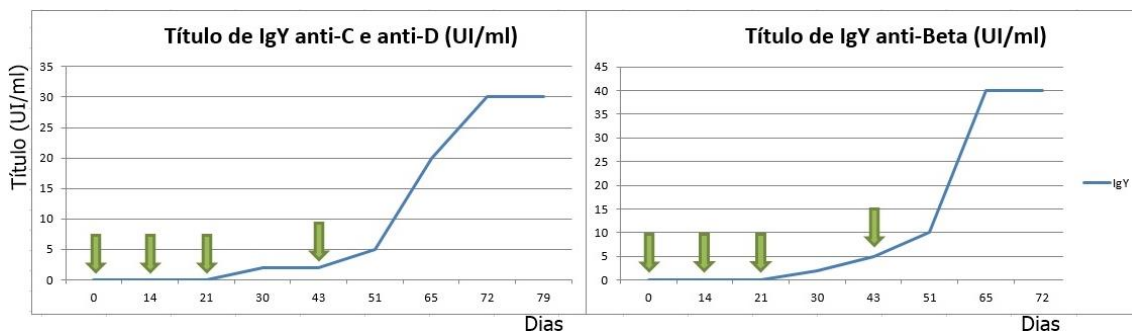
No total, foram produzidos quatro imunógenos monovalentes, para cada toxina produzida, purificada e inativada, para serem inoculados em quatro galinhas. O adjuvante de Freund, completo e incompleto, foi o escolhido devido seu alto poder imunogênico, e por, nas aves, apresentar menor reação inflamatória quando inoculado (Gassmann et al., 1990). Para a inativação dos antígenos C e D de *C. botulinum* tipos C e D, e beta de *C. perfringens* tipo C foram necessários cinco dias. Já para a inativação do antígeno épsilon de *C. perfringens* tipo D, quatro dias foram o suficiente. Nos testes de esterilidade, não foi observado crescimento microbiano nos imunógenos produzidos; nos testes de inocuidade, não foram observadas reações de toxicidade residual locais ou sistêmicas. Algumas galinhas apresentaram áreas de hemorragia no local das aplicações, que evoluíram para pequenas zonas de hematoma com dor moderada.

### **5.6.2. Produção das Imunoglobulinas Y**

Para a produção das antitoxinas, foram feitas quatro inoculações nas galinhas com os imunógenos. Isto foi feito com o objetivo de obter altos títulos de anticorpos, assim como permitir que ocorresse a maturação de afinidade, gerando anticorpos capazes de se ligar com alta afinidade e avides aos seus antígenos (Danilova e Amemiya, 2009). Para a produção das imunoglobulinas Y (IgY), optou-se por um intervalo de imunização de 14 dias, seguido por um de sete dias, e o último de 21 dias. Não há consenso quanto ao melhor protocolo de vacinação para a produção de IgY, e alguns trabalhos intercalaram as inoculações em meses (Rocke et al. 1998; Pauly et al. 2009), de duas em duas semanas (Mulvey et al. 2011) de semana em semana (Trott et al., 2009) e até em poucos dias (Araújo, 2007).

Os ovos contendo as IgY foram coletados e processados a partir da primeira inoculação. No entanto, títulos de IgY foram detectados pelas titulações por soroneutralização em camundongos 51 dias a partir da primeira inoculação, oito dias após a última. A figura 5.23 mostra a curva de produção de IgY nas gemas dos ovos das galinhas imunizadas com os antígenos C e D de *C. botulinum* tipos C e D, e beta de *C. perfringens* tipo C. Tal curva não foi realizada para o antígeno épsilon de *C. perfringens* tipo D. Após o conhecimento da curva de produção de IgY,

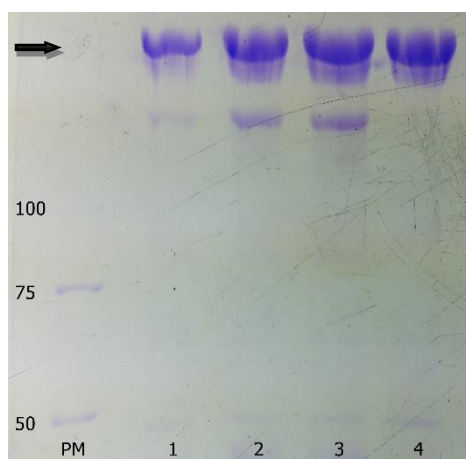
apenas os ovos que apresentavam títulos de anticorpos passaram a ser processados. Araújo (2007), ao também imunizar galinhas com adjuvante completo e incompleto de Freund, obteve títulos detectáveis em ELISA logo na segunda semana de imunização. No entanto, os ensaios enzimáticos utilizados para as titulações provavelmente foram mais sensíveis e detectaram níveis de IgY abaixo dos níveis detectáveis na soroneutralização em camundongos.



**Figura 5.23** – Curva de produção de IgY anti-C e anti-D de *Clostridium botulinum* tipos C e D, e anti-Beta de *C. perfringens* tipo C. Setas: imunizações. Títulos detectáveis por soroneutralização em camundongos foram obtidos 51 dias após a primeira imunização.

### 5.6.3. Purificação das Imunoglobulinas Y

As purificações das imunoglobulinas Y (IgY) presentes nos ovos das galinhas imunizadas com antígenos clostridiais foram realizadas segundo Araújo (2007). A figura 5.24 apresenta os resultados da purificação das IgY de galinhas. Os resultados das purificações das IgY contra todos os antígenos utilizados foram semelhantes aos apresentados na figura 5.24. Houve pequena variação no grau de purificação: por vezes o resultado obtido era de banda única (Figura 5.24, canaleta 4); outras vezes uma segunda banda fraca de peso molecular alto também aparecia nos géis (Figura 5.24, canaletas 1, 2 e 3). Todavia, os níveis de purificação dos anticorpos foram considerados ótimos, atestando a qualidade da metodologia utilizada para tal.



**Figura 5.24** – SDS-PAGE a 10% apresentando os resultados da purificação das imunoglobulinas Y das galinhas. Amostras diluídas. PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: IgY anti-botulínica C. Canaleta 2: IgY anti-botulínica D. Canaleta 3: IgY anti-beta. Canaleta 4: IgY anti-épsilon. Seta: banda referente as imunoglobulinas Y.

É importante notar a ausência de bandas referentes às cadeias pesadas e cadeias leves das IgY; se estivessem presentes, as cadeias pesadas apareceriam nos géis de SDS-PAGE na altura correspondente a 65 kDa a 68 kDa (Mulvey et al. 2011). É comum durante a purificação dos anticorpos, tais como as IgY, a separação dessas moléculas em suas subunidades, o que pode levar à redução de suas atividades biológicas, dependendo da finalidade a que se destinam. As purificações das IgY realizadas no presente estudo conservaram suas moléculas íntegras, com consequente maior probabilidade de conservação de suas atividades biológicas.

A concentração proteica das amostras de IgY purificadas variou de 4,74 mg/mL a 6,13 mg/mL, com média de 5,34 mg/mL. Cada ovo ou gema processada rendeu entre 8,75 mL a 10 mL de amostra purificada. Sendo assim, em média, de 46,72 mg a 53,4 mg de IgY purificada eram obtidas por ovo ou gema processada. Somente 3 % a 3,2 % da quantidade de IgY presente no ovo são específicos contra o antígeno inoculado (Li et al., 1998; Akita e Li-Chan, 1998); desta maneira, entre 1,4 mg e 1,71 mg por ovo é a quantidade de IgY purificada específica contra os antígenos inoculados. Utilizando as mesmas metodologias de processamento dos ovos e purificação das IgY, Araújo (2007) foi capaz de produzir, por ovo, 40,35 mg de IgY purificada, assim como 1,29 mg de IgY purificada específica. Os resultados, em termos de rendimento de IgY purificada, obtidos no presente trabalho foram bastante semelhantes, mas superiores aos obtidos por aquele autor.

Após a purificação, as IgY purificadas foram tituladas pela técnica de soroneutralização em camundongos, descrita pela Portaria número 49 do MAPA de 12 de maio de 1997 (Brasil, 1997), pelo British Pharmacopeia (1998) e pela Instrução Normativa nº 23 do MAPA de 18 de março de 2002 (Brasil, 2002). O quadro 5.4 apresenta os títulos das IgY contra as toxinas botulínicas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, contra a toxina beta de *C. perfringens* tipo C e contra a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Todas as antitoxinas apresentaram altos títulos em UI/mL, evidenciando a qualidade dos imunógenos utilizados, do esquema de vacinação e da purificação das IgY.

Para a melhor comparação dos títulos das IgY com os títulos das IgG, mostrados no item 5.5.3, o quadro 5.4 também apresenta os resultados na forma de UI/mg. Nota-se, que os títulos em UI por unidade de massa das IgG foram sempre superiores aqueles títulos em UI/mg encontrados para as IgY. Esse maior título em UI/mg das IgG não significa definitivamente que seu rendimento seja superior aquele para as IgY. Também não significa que a produção das IgY deva ser descartada a favor da produção das IgG. É importante lembrar que as galinhas receberam apenas quatro doses vacinais, enquanto os ovinos, cinco ou seis; ademais, a quantidade dos antígenos utilizada nas inoculações das galinhas foi bastante inferior àquela utilizada nos ovinos. Portanto, todos esses fatores devem ser levados em consideração durante a escolha do modelo animal para a produção das antitoxinas.

**Quadro 5.4** – Títulos das imunoglobulinas Y purificadas de galinhas contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon em UI/mL e UI/mg.

<b>Imunoglobulinas Y de Galinhas Contra os Antígenos Clostridiais</b>			
<b>Anti-Botulínica C</b>	<b>Anti-Botulínica D</b>	<b>Anti-Beta</b>	<b>Anti-Épsilon</b>
40 UI/mL	20 UI/mL	40 UI/mL	50 UI/mL
7,49 UI/mg	3,74 UI/mg	7,49 UI/mg	9,36 UI/mg

Além de avaliar a pureza, rendimento e título, a avidéz das IgY produzidas e purificadas foi medida. O aumento da avidéz ocorre por meio da maturação de afinidade dos anticorpos, fazendo com que estes se liguem aos seus antígenos com alta afinidade (Danilova e Amemiya,

2009). A avidéz também possui correlação positiva direta com a atividade biológica da molécula; ou seja, anticorpos com alta avidéz possuem também alta atividade biológica. Além disso, metodologias que fazem uso de anticorpos com alta afinidade e avidéz tendem a apresentar maiores níveis de especificidade. As medições de avidéz das imunoglobulinas Y clostridiais produzidas e purificadas foram realizadas por meio de testes de ELISA indireto segundo Wiuff et al. (1997). O quadro 5.5 apresenta os resultados dos índices de avidéz para as IgY contra as toxinas botulínicas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, contra a toxina beta de *C. perfringens* tipo C e contra a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. Todas as IgY apresentaram índices de avidéz altos ou muito altos, de acordo com a classificação de Wiuff et al. (1997), os quais consideraram altos os índices entre 40 e 70%. Isto contribui para a confirmação da qualidade dos imunógenos utilizados, do esquema de vacinação e da purificação das antitoxinas. Destaque para as IgY anti-beta de *C. perfringens* tipo C e anti-botulínica D de *C. botulinum* tipo D, as quais alcançaram respectivamente 90,46 % e 87,18 % de índice de avidéz.

**Quadro 5.5** – Índices de avidéz das imunoglobulinas Y purificadas de galinhas contra os antígenos clostridiais C, D, beta e épsilon.

<b>Imunoglobulinas Y de Galinhas Contra os Antígenos Clostridiais</b>				
<b>IgY</b>	<b>Anti-Botulínica C</b>	<b>Anti-Botulínica D</b>	<b>Anti-Beta</b>	<b>Anti-Épsilon</b>
<b>Avidéz</b>	65,71 %	87,18 %	90,46 %	73,18 %
<b>Desvio-Padrão</b>	2,50 %	1,15 %	2,85 %	3,10 %

Em seu trabalho, Araújo (2007) aplicou quatro metodologias distintas para a purificação de IgY produzidas contra veneno botrópico. Os métodos testados foram: precipitação polietilenoglicol (PEG) (Polson et al., 1985); precipitação com ácido caprílico (McLaren et al., 1994); precipitação com ácido caprílico e sulfato de amônio (Mckinney e Parkinson, 1987); e precipitação com sulfato de amônio (Bizanov e Jonauskiene, 2003). Para a precipitação com sulfato de amônio, testou ainda as concentrações finais de sal de 15, 20, 25, 30 e 35%. O autor concluiu que a precipitação com sulfato de amônio a 20% apresentou os melhores resultados em relação ao binômio formato pelo grau de pureza e rendimento. O presente trabalho corrobora a conclusão acima, visto que utilizando a metodologia considerada mais adequada obteve ótimos resultados de purificação, bem como ótimo rendimento das IgY produzidas.

Durante a revisão bibliográfica realizada no decorrer do experimento, foi constatada a existência de pouquíssimos trabalhos sobre produção de IgY a partir de antígenos clostridiais. O primeiro data de 1998, quando Rocke et al. produziram IgY contra a toxina C de *C. botulinum* tipo C. Os autores utilizaram essas antitoxinas para a sensibilização de placas de um ELISA para o diagnóstico de botulismo em aves silvestres. Pauly et al. (2009) imunizaram galinhas com toxóides A e B de *C. botulinum* tipos A e B para o monitoramento da postura, concentração de IgY e títulos dos anticorpos durante mais de dois anos. Trott et al. (2009) produziram dois tipos de IgY: um contra a neurotoxina A ativa de *C. botulinum* tipo A, e outro contra a neurotoxina A inativada; ambos os tipos para a detecção e neutralização da toxina A. Os três trabalhos mais recentes produziram IgY contra antígenos importantes para a ocorrência das infecções por *C. difficile*, todos objetivando novas terapias contra a doença causada pelo agente. Mulvey et al. (2011) produziram anticorpos específicos contra o fator de colonização (CF); Zhang et al. (2015) imunizaram galinhas para a produção de IgY contra a porção C-terminal da toxina A; e Xing et al. (2016) produziram imunoglobulinas Y contra as porções C-terminais das toxinas A e B de *C. difficile*. De acordo com a revisão bibliográfica realizada pelo presente autor, este trabalho foi o

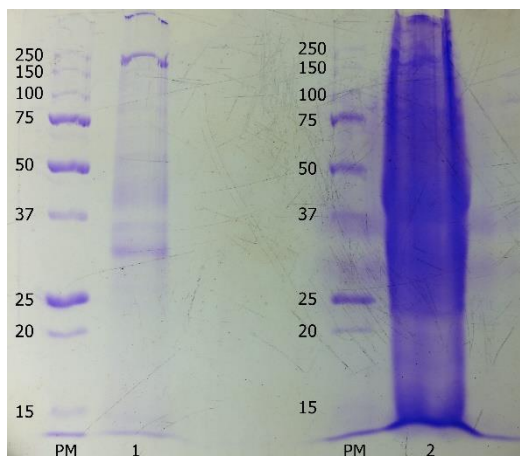
primeiro a gerar conteúdo acerca da produção e purificação de IgY de galinhas contra a toxinas D de *C. botulinum* tipo D, beta de *C. perfringens* tipo C e épsilon de *C. perfringens* tipo D.

### 5.7. Comparação dos Imunoreagentes Produzidos com os Padrões Existentes

Para efeito de comparação e para assegurar a qualidade dos padrões produzidos, os mesmos foram comparados aqueles existentes utilizados pelos órgãos oficiais. Os padrões oficiais, produzidos e utilizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não passam por nenhum tipo de purificação propriamente dita durante sua produção. As toxinas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, beta e épsilon de *C. perfringens* tipos C e D são apenas ultrafiltradas para a imunização dos animais, titulações de soros e testes de potência de vacinas oficiais. As antitoxinas padrões oficiais produzidas a partir do antígeno bruto, também são utilizadas sem beneficiamento algum para os testes diagnósticos das doenças, titulações de soros e nos testes de potência de vacinas oficiais. No entanto, toxinas e antitoxinas purificadas são essenciais para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico, novas vacinas, novos métodos de controle da qualidade das vacinas, bem como aumentam expressivamente a sensibilidade, especificidade e confiabilidade dos testes empregados para o diagnóstico e controle das vacinas clostridiais.

A figura 5.8 apresenta os resultados do *Western Blot* comparando o padrão de reconhecimento dos anticorpos contra as toxinas purificadas C e D de *C. botulinum* tipos C e D e as toxinas C e D padrões oficiais. Nas canaletas 1 e 3, observa-se as neurotoxinas C e D respectivamente purificadas por este trabalho; e nas canaletas 2 e 4, os padrões oficiais C e D respectivamente. O número de bandas reconhecidas pelos anticorpos nas canaletas contendo as toxinas purificadas foram muito menores do que naquelas contendo as toxinas padrões. Além disso, a intensidade das bandas referentes às neurotoxinas foram muito maiores para as toxinas purificadas neste trabalho que para as toxinas padrões oficiais. Fica claro, portanto, a maior qualidade dos padrões produzidos neste estudo frente aqueles existentes principalmente em relação ao seus graus de pureza.

A figura 5.25 mostra os resultados de corrida de eletroforese em gel SDS-PAGE das toxinas padrões oficiais beta e épsilon de *C. perfringens* tipos C e D, respectivamente. Na canaleta 1, observa-se o padrão oficial beta com diversas bandas de proteínas de baixos e altos pesos moleculares, semelhante ao sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* tipo C (Figura 5.10). Já na canaleta 2, observa-se o padrão oficial épsilon bastante corado pelo Azul de Comassie, dificultando a visualização das diversas bandas de proteínas novamente presentes. Ademais, o aumento da largura da canaleta 2, evidencia provável alta concentração de sais no padrão oficial épsilon. Quando comparados aos padrões produzidos no presente trabalho (Figuras 5.7, 5.12 e 5.21) fica evidente o maior grau de pureza e qualidade destes em relação aos padrões oficiais.



**Figura 5.25** – SDS-PAGE a 15% apresentando os resultados de corrida de eletroforese das toxinas padrões oficiais beta e épsilon de *C. perfringens* tipos C e D. Amostras sem diluição. PM: padrão de peso molecular em kDa. Canaleta 1: toxina beta de *C. perfringens* tipo C. Canaleta 2: toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D.

Assim como as toxinas, as antitoxinas padrões oficiais não passam por nenhum procedimento de purificação. O perfil de corrida em gel de eletroforese SDS-PAGE dessas antitoxinas se assemelha ao de soros hiperimunes, como aqueles apresentados nas canaletas 1 e 3 da figura 5.23. Novamente, quando comparados aos padrões produzidos no presente trabalho (Canaletas 2 e 4 da figura 5.23) fica claro o maior grau de pureza e qualidade destes em relação aos padrões oficiais.

Além dos graus de pureza, é importante comparar os índices de avidéz das antitoxinas produzidas no presente trabalho com as antitoxinas oficiais. O quadro 5.6 apresenta os resultados dos índices de avidéz para as IgG e IgY produzidas neste estudo, e os soros oficiais contendo IgG. Todos os soros oficiais apresentaram índices de avidéz altos; isto é esperado, já que estes são produzidos com altas doses dos seus respectivos antígenos e com múltiplas imunizações, o que leva a altos títulos e alta maturação da afinidade dos anticorpos. Nota-se, porém, com exceção para a IgG anti-D de *C. botulinum* tipo D, a superioridade nos índices de avidéz das imunoglobulinas produzidas por este trabalho em relação aos soros padrões oficiais. Isto provavelmente se deve ao fato dos antígenos utilizados para a produção das IgG e IgY apresentarem pureza muito maior. Desta forma, a quantidade do antígeno alvo presente no imunógeno é muitas vezes maior em relação às outras proteínas ali presentes que não contribuem para a sua imunogenicidade. Em outras palavras, a relação antígeno alvo/proteína total é muito maior nos imunógenos utilizados para a produção das IgG e IgY do que naqueles utilizados para a produção dos soros padrões oficiais.



**Quadro 5.6** – Comparação dos índices de avidéz das imunoglobulinas G e Y purificadas produzidas por este trabalho e dos soros padrões oficiais.

<b>Antígeno</b>	<b>Imunoglobulinas Produzidas</b>		<b>Soros Padrões Oficiais</b>
<b>C de <i>C. botulinum</i> tipo C</b>	IgG	<b>70,70 %</b>	<b>49,45 %</b> (Desvio-Padrão = 1,43 %)
	IgY	<b>65,71 %</b>	
<b>D de <i>C. botulinum</i> tipo D</b>	IgG	<b>68,67 %</b>	<b>69,52 %</b> (Desvio-Padrão = 5,99 %)
	IgY	<b>87,18 %</b>	
<b>Beta de <i>C. perfringens</i> tipo C</b>	IgG	<b>94,48 %</b>	<b>84,09 %</b> (Desvio-Padrão = 3,07 %)
	IgY	<b>90,46 %</b>	
<b>Épsilon de <i>C. perfringens</i> tipo D</b>	IgG	<b>80,07 %</b>	<b>62,77 %</b> (Desvio-Padrão = 1,71 %)
	IgY	<b>73,18 %</b>	

## 6. CONCLUSÕES

- As toxinas C e D de *C. botulinum* tipos C e D foram produzidas e semipurificadas;
- As toxinas beta e épsilon de *C. perfringens* tipos C e D foram produzidas e, após purificação, obteve-se altos graus de pureza das mesmas;
- Utilizando os imunógenos compostos pelas toxinas C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens* produzidas e purificadas no presente trabalho, foi possível produzir imunoglobulinas G (IgG) em carneiros e imunoglobulinas Y (IgY) em galinhas contra esses antígenos;
- As IgG e IgY produzidas contra as toxinas C e D de *C. botulinum*, beta e épsilon de *C. perfringens* foram purificadas e apresentaram altos títulos e altos índices de avides;
- As toxinas e antitoxinas produzidas neste trabalho apresentaram vantagens em relação aos padrões oficiais em termos de pureza, controle na produção e avides dos anticorpos;

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Alguns insumos produzidos neste estudo foram disponibilizados e utilizados com sucesso em outros projetos e trabalhos em andamento ou concluídos (Seção 9.1. Apêndice I).
- As toxinas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, beta de *C. perfringens* tipo C e épsilon de *C. perfringens* tipo D produzidas e purificadas podem ser utilizadas em pesquisas para a produção de novas vacinas, desenvolvimento e implementação de métodos alternativos para diagnóstico e controle de vacinas clostridiais;
- As imunoglobulinas G e Y contra as toxinas C e D de *C. botulinum* tipos C e D, beta de *C. perfringens* tipo C e épsilon de *C. perfringens* tipo D produzidas e purificadas podem ser utilizadas em pesquisas para o desenvolvimento e implementação de métodos alternativos para diagnóstico e controle de vacinas clostridiais;
- As metodologias, processos (Seção 4. MATERIAL E MÉTODOS) e protocolos (Seção 9.2. Apêndice II) apresentados no presente trabalho podem ser utilizadas em trabalhos e pesquisas para a produção de novas vacinas, desenvolvimento e implementação de métodos alternativos para diagnóstico e controle de vacinas clostridiais, e em outros trabalhos correlatos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akita, E. M.; Li-Chan, E. C. Y. Isolation of bovine immunoglobulin G subclasses from milk, colostrums and whey using immobilized egg yolk antibodies. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.1, p.54-63, 1998.
- Al-Saleem al. Analysis of the mechanisms that underlie absorption of botulinum toxin by the inhalation route. *Infect. Immun.*, v.80, n.12, p.4133-4142, 2012.
- Alves et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*, v.30, p.102-107, 2014.
- Alves et al. Outbreak of type C botulism in chickens in Pancas city, Espírito Santo state, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, n.1, p.355-358, 2013.
- Alves, G. G. Mapeamento dos Epitopos da Toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* Tipo D e Produção de Imunógenos de Peptídeos Sintéticos. 2013. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Aoki et al. Mode of Action of Botulinum Neurotoxins: Current Vaccination Strategies and Molecular Immune Recognition. *Critical Reviews in Immunology*, v.30, n.2, p.167-187, 2010.
- Araújo, A. S. Produção de Antiveneno Botrópico em Ovos de Galinha. 2007. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Ayyar et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, v.56, p.116-129, 2012. doi:10.1016/j.ymeth.2011.10.007.
- Barash, J. R.; Arnon, S. S. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *The Journal of Infectious Diseases*, v.209, p.183-191, 2014.
- Bizanov, G.; Jonauskienė, I. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. *Bull Vet. Inst. Pulawy*, v.47, n.1, p.403-410, 2003.
- Bokori-Brown et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.*, p.1-13, 2011.
- Bradford, M. *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248-254, 1976.
- Brandi et al. Growth conditions of *Clostridium perfringens* type B for production of toxins used to obtain veterinary vaccines. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v.37, n.9, p.1737-1742, 2014.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 23, 18 de Março de 2002.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 49, 12 de Maio de 1997.
- British Pharmacopeia. *Veterinary antisera and veterinary vaccines*. London: Department of Health and Social Security, Medicines Commission, 1998.

- Brüggemann, H. Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, p.601-605, 2005.
- Buxton, D. The Use of an Immunoperoxidase Technique to Investigate by Light and Electron Microscopy the Sites of Binding of *Clostridium welchii* Type-D Epsilon Toxin in Mice. *J. Med. Microbiol.*, v.11, p.289-292, 1978.
- Carter, A. T.; Peck, M. W. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. *Research in Microbiology*, v.166, p.303-317, 2015.
- Carvalho, A. V. A. ELISA sanduíche para detecção de toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C. 2004. 39p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Carvalho et al. Production and purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.276-278, 2006.
- Centers for Disease Control. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. *MMWR Recomm. Rep.*, v.9, p.1-14, 2000.
- Chaga, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.49, p.313-334, 2001.
- Chassin et al. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v.293, n.3, p.F927-F937, 2007.
- Chaudhry, R. Botulism: a diagnostic challenge. *Indian J. Med. Res.*, v.134, p.10-12, 2011.
- Cheung et al. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.96, p.1411-1420, 2012.
- Cuatrecasas et al. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.61, n.2, p.636-643, 1968.
- Cummins et al. Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. *Methods Mol Biol*, v.681, p.215-228, 2011.
- Cummins, P. M.; O`connor, B. F. Hydrophobic Interaction Chromatography. *Methods Mol Biol*, v.681, p.431-437, 2011.
- Danilova, N.; Amemiya, C. T. Going Adaptive: The Saga of Antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1168, p.130-155, 2009.
- European Pharmacopoeia. 2 ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S. A. 1998.

Fekete et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Analysis*, In Press, 2015.

Fennessey et al. Coenzyme depletion by members of the aerolysin family of pore-forming toxins leads to diminished ATP levels and cell death. *Mol. BioSyst.*, v.8, p.2097-2105, 2012.

Fernandez-Miyakawa et al. Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Vet. Microbiol*, v.127, n.3-4, p.379-385, 2008.

Finnie, J. W. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe*, v.10, p.145-150, 2004.

Fitzgerald et al. Immunoaffinity chromatography. *Methods Mol Biol*, v.681, p.35-59, 2011.

Garcia et al. The pathology of enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type C in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.25, n.3, p.438-42, 2013.

Gassmann et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, v.4, n.1, p. 2528-2532, 1990.

GE Healthcare. Strategies for Protein Purification. Handbook. Disponível em <https://www.gelifesciences.com/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-handbooks>. Acesso em 10 de Janeiro de 2018.

Gessler, F.; Böhnelt, H. Production and purification of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.24, p.361-367, 1999.

Goldstein et al. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Increases the Small Intestinal Permeability in Mice and Rats. *PLoS One*, v.4, n.9, p.e7065, 2009.

Gonçalves et al. Selection of a *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin producer via dot-blot test. *Arch. Microbiol.*, v.191, p.847-851, 2009.

Hage et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J. Pharm Biomed Anal*, v.69, p.93-105, 2012.

Hahn et al. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. II. Binding capacity, recovery and mass transfer properties. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v.790, n.1-2, p.99-114, 2003.

Harkness et al. Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. *Anaerobe*, v.18, p.546-552, 2012.

Hatheway, C. L. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.

Hedhammar et al. (2006). Chromatographic methods for protein purification, Royal Institute of Technology, AlbaNova University Center, Department of Biotechnology, SE-106 91 Stockholm, Sweden.

Hermanson et al. Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, New York, 1992.

Hill, K. K.; Smith, T. J. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. *Curr. Top. Micro. Immunol.*, v.364, p.1-20, 2013

Hunter et al. Molecular Genetic Analysis of Beta-Toxin of *Clostridium perfringens* Reveals Sequence Homology with Alpha-Toxin, Gamma-Toxin, and Leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v.61, n.9, p.3958-65, 1993.

Ivie et al. Gene-Trap Mutagenesis Identifies Mammalian Genes Contributing to Intoxication by *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -Toxin. *PLoS One*, v.6, n.3, p.e17787, 2011.

Janson, J. C.; Jonsson, J. A. (2011). Introduction to Chromatography, in Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, Terceira Edição (ed J.-C. Janson), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Kagedal, L. (2011) Immobilized metal ion affinity chromatography. In: Janson JC, Ryden L (eds) Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications, Terceira Edição. Wiley, New York, p.183–201.

Kulshrestha, S. B. Effect of period of incubation and pH on the production of beta and epsilon toxins by *Clostridium welchii* types B and C. *Indian J. Anim. Sci.*, v.43, p.987–990, 1973.

Kumar et al. Phase Separation of Proteins by Poly-ethylene Glycols: Implications in Preformulation and Early Stage Formulation Development. Univ Connecticut, 2011.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

Langroudi, R. P. *Clostridium perfringens* Type D Epsilon Prototoxin and Toxin Effects on the Mouse Body Weight. *Int. J. Enteric Pathog.*, v.3, n.2, p.1-6, 2014.

Lathe, G. H.; Ruthven, C. R. J. The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochem J.*, v.62, n.4, p.665-674, 1956.

Layana et al. Evaluation of different fluids for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia. *Anaerobe*, v.12, p.204-206, 2006.

Lee et al. Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science*, v.344, n.6190, p.1405-1410, 2014.

Li et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Science*, v.77, n.1, p.266-270, 1998.

- Li et al. Sialidases Affect the Host Cell Adherence and Epsilon Toxin-Induced Cytotoxicity of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718. *PLoS Pathog.*, v.7, n.12, p.e1002429, 2011.
- Li et al. The Effect of pH on Growth of *Clostridium botulinum* Type A and Expression of bontA and botR During Different Growth Stages. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.10, n.8, p.692-697, 2013.
- Lial et al. Investigation of the stabilization of freeze-dried lysozyme and the physical properties of the formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.58, p.15–24, 2004.
- Lima et al. Padronização de teste de potência *in vitro* para vacinas que contenham toxóide alfa de *Clostridium novyi* tipo B. *Arquivos do Instituto Biológico (Online)*, v.78, p.507-512, 2011.
- Lindström, M.; Korkeala, H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev.*, v.19, p.298-314, 2006.
- Lobato et al. Botulismo em ruminantes causado pela ingestão de cama-de-frango. *Ciência Rural*, v.38, n.4, p.1176-1178, 2008.
- Lobato et al. Clostridioses dos animais de produção. *Vet. e Zootec.*, v.20, p.29-48, 2013.
- Lobato et al. Clostridiosis of small ruminants. *Ver. Port. Cien. Vet.*, v.102, p.23-34, 2007.
- Lobato et al. Potência de toxoides botulínicos bivalentes C e D produzidos e comercializados no Brasil. *Rev Bras Med Vet*, v.20, n.1, p.35-38, 1998.
- Lobato et al. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, v.28, p.6125-6127, 2010.
- Lobato, F.C.F; Assis, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses. *Hora Vet.*, v.19, p.29-33, 2000.
- Lonchamp et al. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Targets Granule Cells in the Mouse Cerebellum and Stimulates Glutamate Release. *PLoS One*, v.5, n.9, p.e13046, 2010.
- Losada-Eaton, D.M.; Fernandez-Miyakawa, M.E. *Clostridium perfringens* epsilon toxin inhibits the gastrointestinal transit in mice. *Res. Vet. Sci.*, v.89, p.404-408, 2010.
- Lowry et al. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- Mahn, A.; Asenjo, J. A. Prediction of protein retention in hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol Adv*, v.23, n.5, p.359-368, 2005.
- Mckinney, M. M.; Parkinson, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascetic fluid. *Journal of Immunological Methods*, v.96, n.1, p.271-278, 1987.



- Mclaren et al. The use of caprylic acid for extraction of immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunized with ovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Immunological Methods*, v.177, n.1, p.175-184, 1994.
- Miclard et al. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Veterinary Microbiology*, v.137, p.320-25, 2009.
- Milne, J. J. Scale-up of Protein Purification: Downstream Processing Issues. *Methods Mol. Biol.*, v.1485, p.71-84, 2017.
- Minami et al. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol. Immunol.*, v.41, n.7, p.527-535, 1997.
- Miyamoto et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.189, n.1, p.109-113, 2000.
- Miyata et al. *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -Toxin Forms a Heptameric Pore within the Detergent-insoluble Microdomains of Madin-Darby Canine Kidney Cells and Rat Synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.42, p.39463-39468, 2002.
- Morris et al. Effects of *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in the bovine gut. *Anaerobe*, v.18, n.1, p.143-147, 2012.
- Moser, A. C.; Hage, D. S. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*, v.2, n.4, p.769-790, 2010.
- Mulvey et al. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*, v.60, p.1181-1187, 2011.
- Nagahama et al. Biological Activities and Pore Formation of *Clostridium perfringens* Beta Toxin in HL 60 Cells\*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.38, p.36934-41, 2003.
- Nagahama et al. Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *FEBS J.*, v.278, p.3395-3407, 2011.
- Nestorovich et al. Polymer Partitioning and Ion Selectivity Suggest Asymmetrical Shape for the Membrane Pore Formed by Epsilon Toxin. *Biophys. J.*, v.99, p.782-789, 2010.
- Neuhoff et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v.9, n.6, p.255-262, 1988.
- O'Fágáin et al. Gel-filtration chromatography. *Methods Mol Biol*, v.681, p.25-33, 2011.
- Orlans et al. *Clostridium welchii* Epsilon-Toxin and Antitoxin. *Immunology*, v.3, p.28-44, 1960.
- Page, M.; Thorpe, R. Purification of IgG by Precipitation with Sodium Sulfate or Ammonium Sulfate. In: John M. Walker. *The Protein Protocols Handbook*. Hatfield, Reino Unido: Humana Press, 2002. p.983-984.

Page, M.; Thorpe, R. Purification of IgG Using Caprylic Acid. In: John M. Walker. The Protein Protocols Handbook. Hatfield, Reino Unido: Humana Press, 2002. p.985.

Parreiras et al. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.154, n.3, p.1-3, 2002.

Parreiras, P. M. ELISA competitivo para detecção de imunoglobulina antiprototoxina épsilon produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D. 2001. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Pauly et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. Immunology, Health and Disease, v.88, p.281-290, 2009.

Petit et al. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, v.7, n.3, p.104-110, 1999.

Petit, L et al. *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin Acts on MDCK Cells by Forming a Large Membrane Complex. *J. Bacteriol.*, v.179, n.20, p.6480-6487, 1997.

Pires et al. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. Semina: Ciências Agrárias, v.33, n.6, p.2337-2346, 2012.

Popoff M. R.; Bouvet P. Clostridial toxins. *Future Microbiol.*, v.4, n.8, p.1021-1064, 2009.

Popoff, M. R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.*, 2011.

Popoff, M. R; Titball, R. W. Toxintyping by Phenotypic and Genetic Assays. In: MAINIL, J., editor. Genus *Clostridium* - Clostridia in medical, veterinary and food microbiology: Diagnosis and typing. Luxembourg: European Commission/EU Concerted Action, 2006. p. 142-186.

Porath et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v.258, n.5536, p.598-599, 1975.

Porath et al. Salting-out in Amphiphilic Gels as a New Approach to Hydrophobia Adsorption. *Nature*, v.245, p.465-466, 1973.

Poxton, I. R. Other *Clostridium* spp. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), Principles and Practice of Clinical Bacteriology 2nd ed., West Sussex: John Wiley & Sons, Lt, p. 567-574, 2006.

Prevót et al. Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Clostridium botulinum* Type C and D in Bovine Samples. *Zoonoses and Public Health*, v.54, p.320-327, 2007.

Queiroz et al. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol*, v.87, n.2, p.143-159, 2001.

Reed, L. J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal*

Hyg., v.27, n.3, p.493-497, 1938.

Robertson et al. Evidence for a Prepore Stage in the Action of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin. *PLoS One*, v.6, n.7, p.e22053, 2011.

Rocke et al. Preliminary Evaluation of a Simple In Vitro Test for the Diagnosis of Type C Botulism in Wild Birds. *Journal of Wildlife Diseases*, v.34, n.4, p.744-751, 1998.

Rodloff, A. C.; Krüger, M. Chronic *Clostridium botulinum* infections in farmers. *Anaerobe*, v.18, n.2, p.226-228, 2012.

Rosow, L. K.; Strober, J. B. Infant botulism: review and clinical update. *Pediatr. Neurol.*, v.52, n.5, p.487-492, 2015.

Rossetto et al. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.12, n.8, p.535-549, 2014.

Sakurai, J.; Duncan, C. L. Purification of Beta-Toxin from *Clostridium perfringens* Type C. *Infection and Immunity*, v.18, n.3, p.741-745, 1977.

Sakurai, J.; Fujii, Y. Purification and Characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin. *Toxicon*, v.25, p.1301-1310, 1987.

Salvarani et al. *In vitro* evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, p. 778-783, 2010.

Shatursky et al. *Clostridium perfringens* Beta-Toxin Forms Potential-Dependent, Cation-Selective Channels in Lipid Bilayers. *Infection and Immunity*, v.68, n.10, p.5546-51, 2000.

Sobrinho et al. Modified toxin-binding inhibition (ToBI) test for epsilon antitoxin determination in serum of immunized rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.138, p.129-133, 2010.

Songer, J. G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.9, n.2, p.216-234, 1996.

Souza et al. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genet. Mol. Res.*, v.9, n.1, p.266-276, 2010.

Souza Júnior et al. Padronização da titulação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em linhagem contínua de células como alternativa ao bioensaio animal. *Ciência Rural (UFSC. Impresso)*, v. 40, p. 600-603, 2010.

SteinhorsdottiR et al. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microbial Pathogens*, v.28, p.45-50, 2000.

Subramanyam et al. Purification of Epsilon Toxin of *Cl. perfringens* Type D by DEAE-Cellulose Chromatography. *Indian Vet. J.*, v.78, p.471-472, 2001.

Swaminathan, S. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins.

FEBS Journal., v.278, p.4467-4485, 2011.

Tamai et al. Accumulation of *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin in the Mouse Kidney and Its Possible Biological Significance. *Infect. Immun.*, v.71, n.9, p.5371-5375, 2003.

Thomson, R. O. Crystalline  $\epsilon$ -Prototoxin from *Clostridium welchii*. *Nature*, v.193, n.4810, p.69-70, 1962.

Thomson, R. O. The Fractionation of *Clostridium welchii*  $\epsilon$ -Antigen on Cellulose Ion Exchangers. *J. Gen. Microbiol.*, v.31, p.79-90, 1963.

Titball, R. W. *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine*, v. 27, p. D44-D47, 2009.

Trampel et al. Toxicoinfectious botulism in commercial caponized chickens. *Avian Diseases*, v.49, p.301-303, 2005.

Trott et al. Egg Yolk Antibodies for Detection and Neutralization of *Clostridium botulinum* Type A Neurotoxin. *Journal of Food Protection*, v.72, n.5, p.1005-1011, 2009.

Turba, F. (1954). *Chromatographische Methoden in der Protein - Chemie*, pp. 1–358, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Türkcan et al. Observing the confinement potential of bacterial pore-forming toxin receptors inside rafts with nonblinking Eu(3+)-doped oxide nanoparticles. *Biophys. J.*, v.102, n.10, p.2299-2308, 2012.

Tweten et al. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, v.82, p.1-9, 2001.

Uliyanchenko, E. Size-exclusion chromatography - from high-performance to ultra-performance. *Anal Bioanal Chem*, v.406, p.6087-6094, 2014.

Uzal et al. Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. *Vet. Rec.*, v.141, n.9, p.224-6, 1997.

Uzal et al. *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinol. J.*, v.3, p.24-42, 2010.

Uzal et al. *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. *Veterinary Microbiology*, v.156, p.395-402, 2012.

Uzal et al. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.15, p.94-99, 2003.

Uzal, F. A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe*, v.10, p.135-143, 2004.

- Uzal, F. A.; Songer, J.G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.20, p.253-265, 2008.
- Vaccinal Strain. *J. Med. Bacteriol.*, v.3, n.3, p.8-13, 2014.
- Van Der Horst, A.; Schoenmakers, P. J. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers. *J. Chromatogr A*, v.1000, n.1-2, p.693-709, 2003.
- Verwoerd D. W. Isolasi van die protoksien van *C. welchii* Type D. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.*, v.31, p.195, 1960.
- Vidal et al. Effects of *Clostridium perfringens* Beta-Toxin on the Rabbit Small Intestine and Colon. *Infection and Immunity*, v.76, n.10, p.4396-4404, 2008.
- Vieira et al. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.5, p513-516, 2008.
- Xing et al. Colon-Targeted Delivery of IgY Against *Clostridium difficile* Toxin A and B by Encapsulation in Chitosan-Ca Pectinate Microbeads. *AAPS PharmSciTech.*, 2016.
- Walker, J. M. Part VII. Antibody Techniques. In: John M. Walker. *The Protein Protocols Handbook*. Hatfield, Reino Unido: Humana Press, 2002. p.933-1106.
- Walls et al. A digest of protein purification. *Methods Mol Biol*, v.681, p.3-23, 2011.
- Wiuuff et al. Avidity Measurements On Anti-LPS Antibodies Induced During *Salmonella* Infections in Pigs. *Proc. 2nd Int. Symp. Epidemiology & Control of Salmonella In Pork*. Copenhagen, 1997. p. 119-121.
- Wood K. R. An Alternative to the Toxin Neutralization Assay in Mice for the Potency Testing of the *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Type B and *Clostridium perfringens* Type D epsilon Components of Multivalent Sheep. Vaccines. *Biologicals*, v.19, p.281-286, 1991.
- Worthington et al. *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin. Some chemical, immunological and biological properties of a highly purified prototoxin. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.40, n.4, p.143-149, 1974.
- Worthington, R. W.; Mülders, M. S. G. Physical Changes in the Epsilon Prototoxin Molecule of *Clostridium perfringens* During Enzymatic Activation. *Infection and Immunity*, v.18, n.2, p.549-551, 1977.
- Worthington, R. W.; Mülders, M. S. The partial purification of *Clostridium perfringens* beta toxin. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.42, n.3, p.91-98, 1975.
- Zayerzadeh et al. A New Purification Method for Beta-Toxin of *Clostridium perfringens* Type C Vaccinal Strain. *J. Med. Bacteriol.*, v.3, n.3-4, p.8-13, 2014.

Zhang et al. Development of microbeads of chicken yolk antibodies against *Clostridium difficile* toxin A for colonic-specific delivery. *Drug Delivery*, v.23, n.6, p.1940-1947, 2015.

Zhao et al. PEG Precipitation Coupled with Chromatography Is a New and Sufficient Method for the Purification of Botulinum Neurotoxin Type B. *Plos One*, v.7, n.6, e39670, 2012.

## 8. APÊNDICES

### 8.1. Apêndice I - Projetos e Trabalhos Concluídos ou em Andamento Utilizando Insumos Produzidos Nesta Tese

- **Projeto de pesquisa em andamento aprovado no edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2014:** Produção e Certificação de Imunoreagentes (Toxinas E Antitoxinas) para Avaliação de Vacinas e Diagnóstico das Clostridioses. Nº do Processo: 455717/2014-1.
- **Dissertação de Mestrado concluída e defendida em 2016 na Faculdade de Farmácia da UFMG:** Avaliação da Resposta Imune do Toxoide Épsilon de *Clostridium perfringens* Tipo D com Diferentes Adjuvantes.

#### Resumo:

A toxina épsilon ( $\epsilon$ ), produzida principalmente pelo *C. perfringens* tipo D, é a responsável por causar enterotoxemia em ruminantes, uma doença de curso agudo e altamente letal, cujos surtos acarretam grandes prejuízos aos produtores. Por sua rápida evolução e gravidade, o controle e a profilaxia da doença baseiam-se principalmente nas vacinações sistemáticas dos rebanhos. No entanto, existem dúvidas quanto a capacidade de induzir proteção e a duração da proteção conferidas pelas atuais vacinas comerciais brasileiras. Visando obter uma vacina com elevada e prolongada resposta imune protetora, o objetivo deste trabalho foi desenvolver novas vacinas contendo toxoide  $\epsilon$  bruto e purificado, utilizando como adjuvantes micropartículas de quitosana e microemulsão. As vacinas formuladas foram avaliadas, em comparação com a vacina convencional a base hidróxido de alumínio, por intermédio do teste de potência em coelhos. Os coelhos foram imunizados com 1 ou 2 doses de vacinas, com intervalo de 21 dias. As vacinas produzidas com toxoide  $\epsilon$  bruto continham 0,35 mL de toxoide em uma dose total de 2,5 mL, já as vacinas feitas a partir de toxoide  $\epsilon$  purificado continham 150  $\mu\text{g/mL}$  de proteína em uma dose total de 1,5 mL. O título de anticorpos foi avaliado nos dias 35, 60 e 90, nos grupos imunizados com vacinas contendo toxoide bruto ( $n=8$ ) e nos dias 35 e 50, nos grupos imunizados com vacinas contendo toxoide purificado ( $n=3$ ). A medida de título de anticorpos contra a toxina  $\epsilon$  foi realizada por soroneutralização em células MDCK. Os dados obtidos demonstram que as formulações contendo toxoide purificado induziu uma resposta protetora mais intensa que as formulações contendo toxoide bruto, entretanto foi necessário a administração de 2 doses de vacina para que o título de anticorpo antitoxina épsilon fosse mantido acima de 2 UI/mL, como especificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, durante todo tempo de análise. Mesmo apresentando resultados satisfatórios, o título de anticorpos neutralizantes induzidos pelas novas formulações de vacinas não foi superior ao título induzido pela vacina contendo o hidróxido de alumínio.

- **Tese de Doutorado concluída e defendida em 2016 na Escola de veterinária da UFMG:** Desenvolvimento de Testes Moleculares e Imunoenzimáticos para o Diagnóstico de Botulismo e Controle de Vacinas Anti-Botulínicas Tipos C e D.

#### Resumo:

O botulismo é uma intoxicação causada pela ingestão de neurotoxinas botulínicas secretadas por oito sorotipos de *Clostridium botulinum*. No Brasil, a principal espécie acometida é o bovino, em que a doença é causada pelas neurotoxinas botulínicas C e D, normalmente

associada a surtos em grande número de animais, com elevada taxa de mortalidade, determinando prejuízos ao sistema de produção. A vacinação com os toxóides C e D de *C. botulinum* é a principal e mais eficaz maneira de controle do botulismo bovino. As vacinas comercializadas no Brasil são testadas pelo MAPA, por meio da imunização de cobaios e soroneutralização em camundongos. Estima-se que sejam utilizados anualmente nos testes, cerca de 1500 cobaios e 3900 camundongos. Diante da necessidade da substituição do uso de animais e da utilização de metodologias *in vitro*, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar os testes de ELISA competitivo e ELISA indireto para detecção de antitoxinas botulínicas do soro de cobaios vacinados contra toxinas botulínicas tipos C e D, os testes de ELISA direto para detecção de toxinas botulínicas C e D, avaliando a sensibilidade e especificidade de ambos os testes como possíveis substitutos ao bioensaio animal para a avaliação da potência de toxóides botulínicos C e D, e para o diagnóstico de botulismo, respectivamente. O ELISA direto foi eficiente em detectar as toxinas botulínicas tipos C e D com sensibilidade analítica de 20 pg/mL e 200 pg/mL, respectivamente. O teste de ELISA competitivo não foi eficiente em detectar antitoxinas botulínicas tipos C e D em soros de cobaios, mas apresentou resultados promissores em soros de bovinos e carneiros vacinados. O teste de ELISA indireto adição de ureia 6 M foi eficiente em detectar antitoxinas botulínicas tipos C em soros de cobaios, com sensibilidade e especificidade de 80,49% e 87,5%, respectivamente, para o tipo D, os valores encontrados foram de sensibilidade de 86,67% e especificidade de 70,27%. Os resultados sugerem o uso do ELISA indireto como triagem no teste de potência de vacinas botulínicas reduzindo-se em até 88% a utilização de camundongos, representando um decréscimo na utilização de 3400 camundongos que equivalem a cerca de R\$ 18.000,00.

- **Tese de Doutorado em Andamento na Escola de veterinária da UFMG:** Desenvolvimento e avaliação de três vacinas experimentais contra a toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. O projeto visa o desenvolvimento e a avaliação de três diferentes tipos de formulações de vacinas experimentais contra *Clostridium perfringens* tipo D, empregando-se a toxina épsilon concentrada por ultrafiltração e purificada por cromatografia.
- **Tese de Doutorado em Andamento na Escola de veterinária da UFMG:** Produção e Certificação de toxinas e antitoxinas botulínicas C e D como materiais de referência para uso em avaliação de vacinas e diagnóstico de botulismo, conforme requisitos estabelecidos pelas ISO Guias Série 30. O trabalho objetiva produzir toxinas e antitoxinas botulínicas C e D e certifi-cá-las como materiais de referência, conforme requisitos estabelecidos pelas ISO Guias Série 30. Para isso serão realizados estudos de identificação fenotípica e genotípica de estirpes de *Clostridium botulinum* tipos C e D utilizadas na produção de toxinas, estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização.



## 8.2. Apêndice II – Protocolos de Purificação dos Insumos

### 8.2.1. Purificação das neurotoxinas C e D de *Clostridium botulinum* tipos C e D

#### **Purificação por Filtração em Gel (GF):**

Equipamento utilizado: AKTA Pure® (GE Healthcare, Suécia)

Coluna utilizada: Hi-Prep Sephacryl™ S-200®17

Amostra: Sobrenadante de *C. botulinum* tipo C ou D, concentrado 10 X por ultrafiltração tangencial, precipitado por PEG 6000 para concentração final de 100 X, ressuspendido em tampão NaCl 150 mM Tris 50 mM, pH 8,2

1. Centrifugar a amostra a 10000xg por 30 minutos a 4 °C, e ajustar seu pH para 8,2, logo anteriormente à sua purificação;
2. Equilibrar a coluna com a passagem de 2 CV de tampão de equilíbrio NaCl 150 mM Tris 50 mM, pH 8,2 (Fluxo: 2,3 mL/min);
3. Injetar 10 mL da amostra previamente centrifugada e com pH corrigido (Fluxo: 2,3 mL/min);
4. Realizar a eluição pela passagem de 1,5 CV de tampão de equilíbrio NaCl 150 mM Tris 50 mM, pH 8,2 (Fluxo: 2,3 mL/min);
5. Começar a coleta das amostras em frações de 5 mL após a saída de 0,2 CV de tampão durante a eluição;
6. Identificar e refrigerar as frações dos picos retirados no passo 4;
7. Submeter as frações armazenadas ao procedimento de Gel de SDS-PAGE, com gel de concentração a 4% e gel de corrida a 10%;
8. Dosar a proteína das frações contendo os complexos de neurotoxinas botulínicas purificados pela metodologia de Bradford;
9. Liofilizar e congelar as frações contendo os complexos de neurotoxinas botulínicas purificados.

### 8.2.2. Purificação da toxina beta de *C. perfringens* tipo C

#### **Purificação por Cromatografia de Afinidade Metálica (IMAC):**

Equipamento utilizado: AKTA Pilot® (GE Healthcare, Suécia)

Resina utilizada: IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Suécia)

Coluna utilizada: XK 26/20 (GE Healthcare, Suécia)

Amostra: Sobrenadante de *C. perfringens* tipo C concentrado 10 X por ultrafiltração tangencial, diafiltrado em tampão fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,7

1. Lavar a coluna contendo a resina com 2 volumes de coluna (CV) de água destilada (Fluxo: 6,6 mL/min);
2. Aplicar 1 CV de solução contendo íons zinco (cloreto ou sulfato de zinco) a 0,2 M, pH 5,5 ou menor (Fluxo: 6,6 mL/min);
3. Lavar a coluna com 5 CV de água destilada para a remoção do excesso de íons metálicos (Fluxo: 6,6 mL/min);  
Obs.: os passos 1 a 3 não precisam ser repetidos a cada cromatografia. Não há estimativa de quantas corridas podem ser realizadas após o carregamento da coluna.
4. Centrifugar a amostra a 10000xg por 30 minutos a 4 °C, e ajustar seu pH para 7,7, logo anteriormente à sua purificação;
5. Equilibrar a coluna com a passagem de 5 CV de tampão de equilíbrio fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,7 (Fluxo: 6,6 mL/min);

6. Injetar 100 mL da amostra previamente centrifugada e com pH corrigido (Fluxo: 4,5 mL/min);
7. Começar a coleta das amostras em frações de 5 mL a partir da injeção da mesma (Passo 6);
8. Lavar a coluna com 2,5 CV de tampão de equilíbrio fosfato 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,7 (Fluxo: 4,5 mL/min);
9. Lavar a coluna com água ultrapura até zerar as leituras de absorvância e condutividade (Fluxo: 4,5 mL/min);
10. Identificar e refrigerar as frações dos picos retirados nos passos 8 e 9;
11. Submeter as frações armazenadas ao procedimento de Gel de SDS-PAGE, com gel de concentração a 4% e gel de corrida a 15%;
12. Dosar a proteína das frações contendo a toxina beta purificada pela metodologia de Bradford;
13. Liofilizar e congelar as frações contendo a toxina beta purificada.

### **8.2.3. Purificação da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D**

#### **Purificação por Cromatografia de Troca Aniônica (AEX):**

Equipamento utilizado: AKTA Pilot® (GE Healthcare, Suécia)

Resina utilizada: DEAE Sepharose CL-6B (GE Healthcare, EUA)

Coluna utilizada: XK 26/20 (GE Healthcare, Suécia)

Amostra: Sobrenadante de *C. perfringens* tipo D não tripsinizado, concentrado 10 X por ultrafiltração tangencial, diafiltrado em PBS 0,01 M, pH 7,2

1. Centrifugar a amostra a 10000xg por 30 minutos a 4 °C, e ajustar seu pH para 7,2, logo anteriormente à sua purificação;
2. Equilibrar a coluna com a passagem de 5 CV de tampão de equilíbrio PBS 0,01 M, pH 7,2 (Fluxo: 10 mL/min);
3. Injetar 50 mL da amostra previamente centrifugada e com pH corrigido (Fluxo: 4,5 mL/min);
4. Começar a coleta das amostras em frações de 5 mL a partir da injeção da mesma (Passo 3);
5. Lavar a coluna com 2,5 CV de tampão de equilíbrio PBS 0,01 M, pH 7,2 (Fluxo: 4,5 mL/min);
6. Lavar a coluna com solução de eluição NaCl 1M, a 4,5 mL/min até zerar as leituras de absorvância (Fluxo: 4,5 mL/min);
7. Lavar a coluna com água ultrapura até zerar as leituras de condutividade (Fluxo: 4,5 mL/min);
8. Identificar e refrigerar as frações dos picos retirados nos passos 5 e 6;
9. Submeter as frações armazenadas ao procedimento de Gel de SDS-PAGE, com gel de concentração a 4% e gel de corrida a 15%;
10. Dosar a proteína das frações contendo a toxina épsilon purificada pela metodologia de Bradford;
11. Liofilizar e congelar as frações contendo a toxina épsilon purificada.

#### **Purificação por Filtração em Gel (GF):**

Equipamento utilizado: AKTA Pure® (GE Healthcare, Suécia)

Coluna utilizada: Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Suécia)

Amostra: Toxina épsilon pré-purificada por AEX, liofilizada e ressuspendida em tampão PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2

1. Centrifugar a amostra a 10000xg por 30 minutos a 4 °C, e ajustar seu pH para 7,2, logo anteriormente à sua purificação;
2. Equilibrar a coluna com a passagem de 2 CV de tampão de equilíbrio PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2 (Fluxo: 0,5 mL/min);

3. Injetar 500 µl da amostra previamente centrifugada e com pH corrigido (Fluxo: 0,5 mL/min);
4. Realizar a eluição pela passagem de 1,5 CV de tampão de equilíbrio PBS 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2 (Fluxo: 0,5 mL/min);
5. Começar a coleta das amostras em frações de 1 mL após a saída de 0,2 CV de tampão durante a eluição;
6. Identificar e refrigerar as frações dos picos retirados no passo 4;
7. Submeter as frações armazenadas ao procedimento de Gel de SDS-PAGE, com gel de concentração a 4% e gel de corrida a 15%;
8. Dosar a proteína das frações contendo a toxina épsilon purificada pela metodologia de Bradford;
9. Liofilizar e congelar as frações contendo a toxina épsilon purificada.

#### **8.2.4. Purificação das imunoglobulinas G clostridiais**

##### **Precipitação por Ácido Caprílico:**

1. Centrifugar o soro a 10000 g por 20-30 minutos;
2. Descartar o pellet e adicionar o dobro do volume de tampão de acetato de sódio 0,06M, pH 4,6 ao sobrenadante;
3. Adicionar ácido caprílico gota a gota sob agitação em temperatura ambiente. Para cada 25 mL de soro, adicionar:
  - a. 1,52 mL de ácido caprílico em soro humano ou equino;
  - b. 2,0 mL de ácido caprílico em soro caprino;
  - c. 2,05 mL de ácido caprílico em soro de coelho;
  - d. 1,7 mL de ácido caprílico em soro bovino.
4. Agitar por 30 minutos em temperatura ambiente;
5. Centrifugar a 4000 g por 20-30 minutos e descartar o pellet;
6. Filtrar o sobrenadante com papel filtro para retirar qualquer fragmento do pellet;
7. Dialisar o sobrenadante contra PBS 0,01 M, pH 7,2 a 4 °C.

##### **Precipitação por Sulfato de Amônio:**

1. Resfriar a amostra a 4 °C sob agitação;
2. Adicionar solução de sulfato de amônio saturada gota a gota para produzir uma saturação final de 35-45%, sob agitação a 4 °C;  
OBS.: alternativamente, adicione sulfato de amônio sólido para atingir a saturação desejada (2,7 g de sulfato de amônio/10 mL de fluido = 45% de saturação).
3. Agitar a 4 °C por 1-4 horas ou *overnight*;
4. Centrifugar a 2000-4000 g por 15-20 minutos a 4 °C;
5. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet para 25-50% do volume original da amostra com PBS ou outro tampão;
6. Dialisar a amostra contra PBS 0,01 M, pH 7,2 a 4 °C.
7. Armazenar a amostra a 4 °C ou congelá-la a -20 °C se não for necessária para utilização imediata.

##### **Reagentes e Soluções Utilizados:**

- Ácido Caprílico P.A.
- Sulfato de Amônio P.A.

- Tampão de Acetato de Sódio 0,6M, pH 4,6:  
0,6 M (~4,92 g) de acetato de sódio;  
Água destilada q.s.p 100 mL;  
Verificar e ajustar o pH para 4,6 com ácido acético 0,6M.
- Sulfato de Amônio Saturado:  
Adicionar excesso de sulfato de amônio em água destilada (cerca de 950 g para 1000 mL);  
Deixar sob agitação *overnight* em temperatura ambiente;  
Resfriar e armazenar a 4°C.
- PBS 0,01 M, pH 7,2:  
0,14 M (~8,18 g) de NaCl;  
2,7 mM (~0,201 g) de KCl;  
1,5 mM (~0,204 g) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
8,1 mM (~1,15 g) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;  
Água destilada q.s.p 1000 mL;  
Verificar e ajustar o pH para 7,2.

### 8.2.5. Purificação das imunoglobulinas Y clostridiais

#### Processamento dos Ovos:

1. Coletar os ovos diariamente, identificar (antígeno, animal e data) e estocar a 4 °C até seu processamento;
2. Com luvas, quebrar a casca e depositar a gema nas mãos;
3. Separar a gema da clara, alternando-a entre os dedos das mãos e com auxílio de água destilada;
4. Com o auxílio de uma peneira, romper e retirar a membrana da gema;
5. Reunir as gemas em *pools* do mesmo antígeno/grupo;
6. Alocar os *pools* de gemas em frascos estéreis;
7. Caso as etapas seguintes não sejam realizadas no mesmo dia, adicionar azida sódica a 0,01% para a conservação das amostras a 4°C.

#### Delipidação da Gema:

1. Diluir os *pools* de gemas em água destilada para uma diluição final 1:10 (1 parte do *pool* com 9 partes de água destilada);
2. Ajustar o pH das gemas diluídas para 5,0;
3. Congelar as gemas diluídas a -20°C por 12 horas;
4. Descongelar as gemas diluídas em temperatura ambiente;
5. Após seu descongelamento total, centrifugar a amostra a 800 x g, por 40 minutos a 4 °C;
6. Para retirar as lipovitelinas, filtrar o sobrenadante (ou extrato aquoso) do centrifugado com auxílio de papel filtro 0,45µm e funil. Utilizar diferentes papéis filtro e funis para *pools* de antígenos/grupos distintos;
7. Descartar o precipitado;
8. Ajustar o pH do extrato aquoso filtrado para 7,4.

#### Purificação da IgY:

1. Sob agitação e preferencialmente sob refrigeração de 4 °C, adicionar sulfato de amônio sólido lentamente ao extrato aquoso até a concentração final de 20 % (p/v) deste sal (Ex.: 20g/100mL);

2. Após a adição de toda a massa de sulfato de amônio, prolongar a agitação por mais 30 minutos sob refrigeração de 4 °C;
3. Centrifugar a amostra a 2000 x g, por 20 minutos a 4 °C;
4. Coletar o precipitado e ressuspender em água destilada para uma diluição final de 1:5 até 1:10 (1 parte do precipitado com 9 partes de água destilada);
5. Ajustar o pH da amostra para 7,4;
6. Dialisar a amostra contra PBS 0,01 M, pH 7,4 a 4 °C.

**Reagentes e Soluções Utilizados:**

- Água Destilada.
- Sulfato de Amônio P.A.
- PBS 0,01 M, pH 7,4:  
0,14 M (~8,18 g) de NaCl;  
2,7 mM (~0,201 g) de KCl;  
1,5 mM (~0,204 g) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
8,1 mM (~1,15 g) de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;  
Água destilada q.s.p 1000 mL;  
Verificar e ajustar o pH para 7,4.

