

Theonys Diogenes Freitas

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
ANTI ÉPSILON TOXINA DE *Clostridium perfringens* TIPO D.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Co-orientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

**Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2006**

F866p Freitas, Theonys Diogenes, 1980-
Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti épsilon
toxina de *Clostridium perfringens* Tipo D / Theonys Diogenes Freitas.
-2006.
32 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Heneine
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. *Clostridium perfringens* – Toxinas – Teses. 2. Anticorpos monoclonais -
Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias.
III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 692

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso e grande arquiteto do Universo que com auxílio da minha Mãe Rainha sempre esteve presente nos momentos mais difíceis e nos bons momentos da minha vida me cobrindo com o seu manto de amor e Paz..Amém..

Aos Meus Pais, por todo incentivo, carinho e amor durante toda essa caminhada sempre me apoiando...

A minha esposa Aracelli pelo o amor e paciência que sempre teve comigo e por me dá a coisa mais maravilhosa desse mundo a nossa filha Maria Luiza que Papai tanto ama.

Ao Professor Francisco Carlos Faria Lobato pela oportunidade de realizar o mestrado em uma das melhores Universidades do País. E por todo o incentivo e atenção durante toda a realização desse trabalho.

Ao Professor Luiz Guilherme Dias Heneine pela dedicação e os ensinamentos durante esse período..

A todos os Colegas de trabalho da EV-UFMG em especial Augusto Vinícios e Ronnie Assis pelo aprendizado e incentivo durante os meus primeiros meses em BH. E a todos os demais Nelson Éder, Luciana, Andreia I e II, Felipe, Suely, Leonardo, João, Alexis e Priscilla.

Aos funcionários da EV-UFMG em especial Nádia , Eduardo, Doracy , Cláudio e Nilda..

Aos colegas de trabalho da Fundação Ezequiel Dias em especial, Patricia Cota, Marcia e Luciana e Paulo Henrique..e a todos os demais Horácio, Elaine, Maria Helena, Carol, Flávio, Ronnan, Luciene, Rafael, Álvaro, Roberta, Maria Inácia, Regina, Denise, Nelma, Siléia, Ana Valentim, Katia, Aila, Marcela, Gerso, Júlio César e todos que não me recordo o nome nesse momento mas que estarão sempre guardados na minha lembrança...

Aos professores Nelson Martins e Zélia Lobato pela paciência que tiveram comigo durante os momentos difíceis de realização desse trabalho dando-me apoio científico e intelectual...

Aos meus amigos Nordestinos Ivís Luíz, Vinicius Gama, Helio e Gisandra Braz e os amigos de república Leandro, Rogério, Carla e Sílvia.

E todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.. Agradecer a Capes por ter concedido a bolsa de estudo e ao CNPq pelo apoio financeiro ao trabalho.

SUMÁRIO		Pág
	RESUMO	9
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	LITERATURA CONSULTADA	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1	Local de Realização do trabalho	13
3.1.1	Animais Utilizados	13
3.2	Produção e padronização das toxinas	13
3.2.1	Meios de cultura	13
3.2.2	Produção da toxina.....	13
3.2.3	Teste de toxicidade	13
3.2.4	Purificação da toxina	13
3.2.5	Dosagem protéica	13
3.2.6	Eletroforese	13
3.2.7	Teste de toxicidade da protoxina <i>épsilon</i> purificada	14
3.3	Obtenção dos soros padrão	14
3.3.1.a.	Soros positivos	14
3.3.1.b.	Soros negativos.....	14
3.4	Elisa indireto para detecção da antitoxina <i>épsilon</i>	14
3.5.	Produção dos hibridomas.....	14
3.5.1	Obtenção das células de mieloma	14
3.5.2	Contagem das células	15
3.5.3	Imunização dos camundongos e preparação dos linfócitos	15
3.5.4	Fusão	15
3.5.5	Preparo dos macrófagos	15
3.5.6	Seleção dos híbridos após a fusão	16
3.5.7	Clonagem dos híbridos.....	16
3.5.8	Congelamento dos híbridos positivos	16
3.5.9	Caracterização Isotípica dos AcMo por ELISA antígeno-mediado	16
3.5.10	Obtenção do líquido ascítico	16
3.5.11	Purificação dos AcMo	16
3.5.12	Dosagem protéica dos AcMo purificados.....	17
3.5.13	Western Blotting	17
4.	RESULTADO E DISCUSSÃO	17
4.1.	Imunização dos camundongos swiis e obtenção dos soros padrão	19
4.2	Elisa para avaliação dos soros policlonais.....	19
4.3	Produção dos anticorpos monoclonais	21
4.3.1	Imunização dos camundongos BALB/c.....	21
4.3.2	Produção dos hibridomas.....	21
4.3.3	Clonagem dos híbridos.....	23
4.3.4	Caracterização isotípica	23
4.3.5	Obtenção do liquido ascitico.....	27
4.3.6	Purificação dos AcMo	27
4.3.7	Caracterização dos AcMo purificados por Western blotting	27
5	CONCLUSÕES	29
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção e Clonagem dos hibridomas anti <i>épsilon</i> toxina de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D	23
Tabela 2	Identificação dos clones provenientes da linhagem Sp ₂ /0. Ag14 secretores de AcMo anti <i>épsilon</i> toxina de <i>C. perfringens</i> tipo D com respectiva classe isotípica.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela prata da amostra da protoxina <i>épsilon</i> purificada em diferentes lotes de produção.....	19
Figura 2	Resultado em D.O (492nm) da avaliação dos soros policlonais utilizados como controle positivo e negativo no ELISA indireto.....	19
Figura 3	Avaliação dos níveis de anticorpos anti- <i>épsilon</i> toxina de <i>C. perfringens</i> tipo D dos camundongos da linguagem BALB/c ao processo de imunização com o toxóide <i>épsilon</i>	21
Figura 4	Clones MLC-02 em diferentes fases de crescimento.	25
Figura 5	Wester Blotting dos AcMo anti -toxina <i>épsilon</i> purificados.	29

RESUMO

Foram produzidos anticorpos monoclonais contra *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D, a partir da fusão das linhagens de mieloma Sp₂/0. Ag14 e P3-X63-Ag8. 653 com células do baço de camundongos BALB/c imunizado com o toxóide *épsilon*. Os números de wells positivos foram 59 para linhagem Sp₂/0. Ag14 e 19 para P3-X63-Ag8. 653, representando 6,68 e 6,59% de positividade respectivamente. Seis linhagens de híbridos secretores de AcMo das classes e IgM (κ) e IgG subclasse IgG3 (κ) foram estabelecidas. A partir do sobrenadante da cultura dos híbridos foi possível obter-se uma média de 21,52 $\mu\text{g/mL}$ de IgM e 15 $\mu\text{g/mL}$ de IgG3 anti *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D.

Palavras chave: *épsilon* toxina, *Clostridium perfringens*, anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies reactive against *épsilon* toxin from *Clostridium perfringens* type D were produced. Myeloma cell lines Sp₂/0. Ag14 and P3-X63-Ag8.653 were fused with spleen cells from mice BALB/c immunized with *epsilon* toxoid. After fusion 59 wells were positive for the Sp₂/0. Ag14 cell line and 19 for the P3-X63-Ag8.653, representing 6.68 and 6.59% respectively. Six hybrids were established secreting MoAb of the IgM (κ) class and IgG3 (κ) subclass. An average of 21.52 $\mu\text{g/ml}$ of IgM and 15 $\mu\text{g/ml}$ of IgG3 anti-*epsilon* toxin MoAb were obtained from the hybrids culture supernatant.

Key words: *Épsilon* toxin, *Clostridium perfringens*, Monoclonal antibodies

1 - INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram positiva anaeróbia, que esta presente no solo, água, pastagens e no trato intestinal dos animais e do homem. Atualmente existem cinco tipos de *C. perfringens* que são classificados de A-E baseado na elaboração das toxinas alfa, beta, épsilon e iota. Experimentalmente, tem sido demonstrado que a *épsilon* toxina causa um aumento da permeabilidade vascular, provocando lesões em vários órgãos incluído coração, fígado, pulmão, rins e cérebro.

A *épsilon* toxina é produzida pelo *C. perfringens* tipo B e D na forma de prototoxina, sua ativação ocorre por ação de enzimas proteolíticas principalmente a tripsina. Essa ativação enzimática aumenta a toxicidade da *épsilon* toxina em 1000 vezes, colocando-a como uma das mais potentes toxinas clostridiais, ficando atrás apenas das toxinas botulínica e tetânica. A infecção entérica associada a diferentes tipos toxigênicos de *C. perfringens* é denominada de enterotoxemia, sendo o tipo D, o mais freqüentemente encontrado nos quadros em herbívoros. A enterotoxemia causada pelo tipo D de *C. perfringens* é conhecida como doença do rim pulposo em ovinos. A infecção ocorre principalmente em animais entre três dias e seis meses de idade. Entretanto, a doença tem sido descrita em animais adultos.

A enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo D apresenta algumas particularidades, no que se diz respeito à evolução clínica da doença. Quando altas doses da *épsilon* toxina são absorvidas no intestino, a doença é rapidamente fatal, apresentando lesões microscópicas no coração e edema vasogênico generalizado. Porém, quando pequenas doses da toxina são absorvidas, ou quando os animais estão parcialmente imunes, a enfermidade é resultado de uma intoxicação crônica, causando uma encefalomalácia focal simétrica.

O diagnóstico de enterotoxemia é baseado normalmente no histórico, sinais clínicos e achados de necropsia, entretanto, a análise laboratorial é de fundamental importância para confirmação da presença da toxina.

O teste mais comumente utilizado para o diagnóstico é a soroneutralização em camundongos, que necessita de longo período de tempo e de grande número de animais para sua realização. Além destes inconvenientes, falhas ocorrem em decorrência de variações na sensibilidade do animal e por toxicidade não específica causada por outras substâncias que podem estar presentes nas amostras clínicas, particularmente em conteúdo intestinal (Wood, 1991).

Entre os testes *in vitro* utilizados para detecção de toxina *épsilon* como alternativa ao teste de soroneutralização em camundongos, o ensaio imunoenzimático-ELISA tem apresentado melhores resultados, sendo sensível, quantitativo, específico e rápido dando resultados quantitativos dentro de quatro horas, ao contrário das 76 horas necessárias para a soroneutralização em animais, além de ser considerado ético e economicamente importante (Uzal, 1997).

O teste de ELISA com anticorpos específicos pode ser desenvolvido para detectar toxinas beta, *épsilon* e iota. O ELISA é sensível o suficiente para detectar quantidades como 1 ng/ml de toxina beta e iota purificada e 0,1 ng/ml de toxina *épsilon* purificada (Nagahama, 1991). Anticorpos monoclonais (AcMo) são particularmente úteis nestes testes porque podem ser desenvolvidos para a identificação de um único epitopo antigênico de um agente etiológico em particular e não oferecer reações cruzadas com agentes intimamente relacionados.

Além da possibilidade de utilização dos AcMo como uma ferramenta de diagnóstico específico, essa técnica também pode ser desenvolvida para utilização de testes *in vitro* para o controle de qualidade de vacinas contendo toxoides clostridiais, em

substituição aos testes *in vivo* que são atualmente utilizados.

Em razão do exposto, este trabalho teve como objetivo a produção e caracterização isotípica de anticorpos monoclonais anti-*épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D.

2 - LITERATURA CONSULTADA

A tecnologia da produção de anticorpos monoclonais teve início com Kohler e Milsteir (1975), que publicaram um trabalho sobre a fusão de células de mieloma com células esplênicas (linfócitos B) de animais imunizados (hibridização), sendo esses híbridos capazes de produzir anticorpos específicos para um particular determinante antigênico e tem revolucionado os campos da pesquisa. A hibridização celular permite dissecar o complexo da resposta humoral em seus componentes individuais. A técnica baseia-se na fusão celular, em que, as células fusionadas passam a exibir características de ambas as células parentais, ou seja, cada híbrido pode secretar anticorpos de especificidade determinada pelo doador imune e também ser imortal, característica cedida pelas células de mieloma (Antczak, 1982).

Uma das aplicações dos anticorpos monoclonais é sua utilização na purificação de antígenos (Ag). A cromatografia por imunoafinidade utilizando AcMo mostra-se, um método simples e de fácil aplicação para a purificação de toxinas (GODING 1986). As toxinas do *C. perfringens* tipo D são consideradas como um dos principais fatores responsáveis pela letalidade nas doenças clostridiais. A real relação entre a letalidade e a ação enzimática é interesse da comunidade científica, porém, muitos pontos precisam ser elucidados. Os AcMo podem ser utilizados como uma estratégia inovadora para o estudo e investigação da *épsilon* toxina na sua patogênese bem como nos estudos de ativação estrutural. A *épsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D além de atuar em receptores endoteliais, possui a capacidade necrosante e letal. Os AcMo podem ser utilizados com o objetivo de

mapeamento dos epitopos responsáveis pela neutralização dessas ações Logan *et al.* (1991).

A produção de AcMo contra *épsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D foi descrita pela primeira vez por Boarer *et al.* (1988) os quais, produziram AcMO através da fusão da linhagem de mieloma NS-1 com linfócitos B provenientes do baço de camundongos BALB/c imunizados. O processo de imunização foi realizado a partir de quatro inoculações com o toxóide *épsilon* na concentração de 100µg/200µl adsorvido com hidróxido de alumínio (v/v). Intervaladas de 21 dias por via intraperitoneal. Sendo, a última inoculação realizada 72 horas antes da fusão com 40µg da protoxina por via intravenosa. Foram realizadas duas fusões resultando em: dezenove híbridos secretores de AcMo anti protoxina *épsilon* e após sucessivas clonagens apenas cinco permaneceram viáveis. Todos secretores da Imunoglobulina IgG1 cadeia (k). A média de imunoglobulina IgG1 produzida a partir do sobrenadante da cultura dos híbridos variaram entre 13-42µg/mL purificadas por cromatografia de imunoafinidade. Após realização do Western blots e preparação da *épsilon* toxina tripsinizada as proteínas identificadas apresentavam peso moleculares de 37,6 Kdal, 35,6 Kdal e 33,7 Kdal, compatíveis com os pesos moleculares já descritos para *épsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D. Apenas dois dos monoclonais produzidos apresentaram capacidade neutralizantes no ensaio de letalidade em camundongos. Sendo esses anticorpos considerados viáveis para utilização como reagentes de diagnósticos.

A concentração de AcMo presentes no líquido ascítico apresentavam valores semelhantes ao encontrado no soro policlonal dos animais imunizados com valores, entre 2-20 mg/mL. Porém, os níveis de AcMo encontrados no sobrenadante da cultura dos híbridos são na ordem de 5-50µg/mL (Goding 1986). Wnek *et al.* (1985), produziram e caracterizaram AcMo anti-enterotoxina de *C. perfringens* tipo A estabeleceram 10 linhagens de híbridos

secretores e estáveis. O sobrenadante da cultura desses híbridos continha de 40-160µg/mL de IgG.

Persival *et al.* (1990) durante o desenvolvimento do seu trabalho com a produção de anti idiotipos utilizou a linhagem de mieloma P3-X63. Ag8-653 para a produção de AcMo anti *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D. A partir da fusão daquela linhagem com as células do baço dos camundongos BALB/c os quais foram imunizados com 20µg de protoxina *épsilon* em três doses intervaladas de sete dias, recebendo um reforço dois dias antes da fusão por via intravenosa. Esse trabalho resultou na produção de dez híbridos secretores de AcMo anti *épsilon* toxina da classe IgG1. Onde foi possível caracterizar a proteção frente à toxina em sistema *in vivo* e *in vitro*. Chegaram a importante conclusão que a simples inibição de um único epítipo da *épsilon* toxina é suficiente para diminuir as seqüelas clínicas envolvidas no curso da doença. Desta forma, os AcMo anti *épsilon* toxina tem contribuindo de forma significativa para elucidação de pontos importantes da interação Ag-Ac no processo doença.

Trabalhando com a enterotoxina de *C. perfringens* tipo A Horiguchi *et al.* (1986), utilizaram células de mieloma de camundongo das linhagens SP2/0-Ag14 (SP2) e P3-NS1-1-Ag4-1(NS-1). A imunização dos animais com a enterotoxina foi realizada com a aplicação intraperitoneal do toxóide na concentração de 5µg em 100µl de PBS emulsificado com adjuvante completo de Freud no mesmo volume. A segunda e terceira dose com intervalos de sete dias na concentração de 5µg e 20µg respectivamente, emulsificado com adjuvante incompleto de Freud. Foram identificados pelo teste de ELISA nove clones para SP2 e sete para linhagem NS-1 produtores de AcMo. Após subseqüentes clonagens foram estabelecidos dois híbridos provenientes das células de mieloma SP2 e dois derivados da NS-1, todos secretores de IgG1(k), porém, a partir da avaliação estrutural foi possível observar que AcMo produzidos neste trabalho apresentava

reatividade para diferentes epítipos da enterotoxina.

Sato *et al.* (1989) descreveram a produção e caracterização isotópica de um painel de AcMo anti-alfa e theta-toxina de *C. perfringens*. Na imunização utilizada neste trabalho as concentrações dos toxoides variaram de 12 a 60µg/100µl. A fusão foi realizada com as células de mieloma da linhagem SP2/0-Ag14. Dez linhagens de híbridos foram estabelecidas sendo seis caracterizadas isotopicamente como produtoras de IgG1, um IgG2a e três IgG2b. A partir dos resultados obtidos o autor demonstrou que era possível a purificação de toxina nativa ou modificada por cromatografia de imunoafinidade utilizando AcMo. A tecnologia de organismos recombinantes tem causado um grande impacto na biotecnologia moderna e dessa forma Hsieh *et al.* (2003), utilizaram AcMo para a purificação e caracterização de um recombinante de *C. perfringens*, mostrando-se um método bastante eficiente.

Ebert *et al.* (1999), utilizando AcMo em dois sistemas de ELISA para o teste de vacinas veterinárias contendo β e ϵ -toxina de *C. perfringens*, demonstrou que, o ELISA de captura para a titulação da anti-toxina- β e o ELISA competitivo para avaliação dos níveis de anti-toxina- ϵ podem ser utilizados como alternativa ao método de soroneutralização *in vivo* na avaliação de potência de vacinas veterinária mono ou polivalente.

Hauer e Clough (1999), desenvolveram um painel de AcMo com diversos antígenos clostridiais de interesse veterinário, inclusive com a toxina *épsilon* de *C. perfringens* tipo D. Os AcMo anti *épsilon* produzido neste trabalho e obtidos a partir do líquido ascítico possuíram a capacidade neutralizante em camundongos. No Western blot identificou a proteína em torno de 31Kda, correspondente ao peso molecular estimado da *épsilon* toxina. Com o intuito da utilização em testes de potência de vacina os autores propõem a criação de um banco internacional de AcMo *Clostridium* específico que possa ser utilizado pela comunidade científica de diversas partes do

mundo e contribuindo de forma significativa na redução do uso de animais no controle de qualidade de vacinas veterinárias.

Streicher-Roskopf *et al.* (2004), utilizaram AcMo no teste vacinas para *C. perfringens* provenientes de sete laboratórios internacionais. Os resultados mostraram-se satisfatórios e preciso, e que os testes de ELISA utilizando AcMo podem ser utilizados com segurança no controle de vacinas contendo toxóide *épsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Local de realização do trabalho

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) e no Laboratório de Imunologia e Cultivo Celular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

3.1.1. Animais utilizados

Foram utilizados camundongos BALB/c com peso aproximado de 20 gramas e camundongos fêmeas da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17 e 20g, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais e Centro de Bioterismo da Fundação Ezequiel Dias respectivamente.

3.2. Produção e padronização de toxinas

3.2.1. Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Tarozzi, BHI, Agar sangue de carneiro a 5%, meio para produção de toxinas (Uzal *et al.*, 1997).

3.2.2. Produção da toxina

A toxina foi produzida a partir de amostras de *Clostridium perfringens* tipo D fornecidas pelo Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – INTA- Bariloche-Argentina.

A amostra liofilizada foi reconstituída com 1mL de BHI, transferida para tubos de ensaio contendo o mesmo meio e incubados por dezoito horas. Em seguida, foi transferida para o meio empregado para produção de toxinas, de acordo com Uzal (1997), incubada a 37°C, em anaerobiose por oito horas. Após este período, o material foi centrifugado a 8000 xg em centrífuga refrigerada a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante da cultura líquida foi novamente centrifugado e concentrado através do Sistema de Filtração Amicon (Millipore), utilizando membrana com de 10 Kda de retenção.

3.2.3. Teste de toxicidade

A prototoxina foi ativada pela adição de tripsina (Difco, 1:250) na concentração de 0,1% (V/V). A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C, por 30 minutos, e diluída nas concentrações 1:50; 1:100; 1:200 e 1:800. Para cada diluição, foram inoculados quatro camundongos, pesando entre 17 e 20g com 0,2 ml por via endovenosa e observados por 72 horas (Sebald e pelit, 1997).

3.2.4. Purificação da toxina

A purificação da toxina foi realizada em coluna de troca iônica DEAE Sepharose CL 6B, utilizando tampão fosfato 0,01M, pH 7,2 de acordo com Parreiras 2001.

3.2.5. Dosagem protéica

A dosagem da proteína foi realizada pelo método de coeficiente de extinção descrito por Worthington *et al.* (1973).

3.2.6. Eletroforese

A eletroforese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970) utilizando a prototoxina *épsilon* não purificada e aquela precipitada pelo sulfato de amônio e posteriormente submetida à purificação cromatográfica.

Coloração do gel

Coloração pela prata

Foi utilizada a metodologia descrita por Tunon e Johanson (1984). Após a eletroforese o gel foi lavado em água destilada e colocado em solução fixadora (metanol 40%, ácido acético 10%, água destilada 50%). Posteriormente o gel foi lavado durante cinco minutos com água destilada cinco vezes. Fixado em glutaraldeído a 10%, por 30 minutos e lavado como anteriormente. Incubou-se o gel, durante sete minutos em solução de prata com a seguinte formulação: misturou-se 21 mL de NaOH 0,36%; 1,4 mL de NH₄OH 25% e gotejando AgNO₃ 19,4% até a solução ficar turva. Em seguida lavou-se o gel com água destilada durante cinco minutos, cinco vezes e adicionou-se a solução reveladora preparada da seguinte forma: 2,5 mL de ácido acético a 10%; 0,27 mL de formaldeído e o volume completado para 500 mL de água destilada.

À medida que as bandas eram reveladas a reação era interrompida com adição de ácido acético a 5%.

3.2.7- Teste de toxicidade da protoxina *épsilon* purificada

O teste de toxicidade da protoxina *épsilon* ativada foi realizada conforme descrito no item 3.2.3.

3.3. Obtenção de soros padrão

3.3.1.a Soro controle positivo

Foram produzidos a partir da imunização de cinco camundongos da raça Swiss, segundo o método descrito por El Idrissi e Ward (1992 a) com a seguinte modificação: a inativação da toxina *épsilon* foi realizada empregando-se o método da iodação controlada de acordo com Heneine *et al.* (1986) e Daniel (1987). O toxóide *épsilon* na concentração de 5µg/100µl, foi misturado com igual volume de adjuvante completo de Freud e administrado por via subcutânea oito dias após a primeira vacinação uma segunda dose na mesma concentração utilizando adjuvante incompleto de Freud, e 15 dias após a última uma terceira dose na concentração de 10µg/100µl e 21 dias

depois uma quarta dose 20µg/100µl. Após oito dias da última dose os animais foram sangrados por punção cardíaca. O sangue coletado foi primeiramente mantido por duas horas em estufa a 37°C, e depois transferidos para 4°C por 12 horas e os soros obtidos por centrifugação a 800 x g por 30 minutos foram armazenados a -20°C.

3.3.1.b Soros negativos

Foram obtidos a partir de da sangria por punção cardíaca de cinco Camundongos da raça Swiss, negativos ao ELISA para presença de anticorpos antitoxina *épsilon*. O sangue foi processado da mesma forma descrita no item 2.3.1.a.

3.4. ELISA indireto para detecção de antitoxina *épsilon*

Microplacas de ELISA foram adsorvidas com 1 µg/mL de solução de prototoxina *épsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D purificada, permanecendo *overnight* a 4°C. Diluições duplas dos soros policlonais foram adicionados as microplacas e posteriormente anticorpos marcados com peroxidase, anti-camundongo (SIGMA Chemical C.o., St. Louis Mo, USA). Após incubação e lavagem da placa, o substrato foi acrescentado para revelar a reação que foi paralisada após uma hora (Parreira 2001).

3.5. Produção dos hibridomas

A produção dos híbridos secretores de anticorpos monoclonais foi realizada segundo Rocha (2000) e Souza (2000).

3.5.1. Obtenção de células de mieloma

Foram adquiridas as linhagens celulares BALB/c Sp₂/0. Ag14 e P3-X63-Ag8. 653 (NS653), da American Type Culture Collection (ATCC) pertencentes ao banco de linhagem contínua de células do Laboratório de cultivo celular da Fundação Ezequiel Dias.

As Células de mieloma Sp₂/0. Ag14 e P3-X63-Ag8. 653, mantidas em nitrogênio líquido, foram transferidas para um banho-maria a 37°C. Depois de descongeladas foram colocadas em frascos de 25cm³ contendo 5ml de Meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA) 10% SFB (acrescido de 10% de soro fetal bovino), 2mm L-glutammina (GIBCO), durante oito dias a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂ realizando-se a troca do meio a cada 48 horas. Após apresentarem crescimento exponencial, foram contadas em câmaras de Neubauer e repicadas no momento da fusão na proporção de 1x10⁸ células do baço para 1x10⁷ de mieloma.

3.5.2- Contagem das células

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. A coloração foi feita de acordo com a técnica descrita por Hudson e Hay, 1989.

3.5.3-Imunização dos camundongos e preparação dos linfócitos

Foram utilizados 10 Camundongos BALB/c fêmeas, com seis semanas de vida, imunizados da mesma forma que no item 3.3.1a. Os soros foram obtidos semanalmente através da punção da veia caudal e posteriormente testados por ensaio imunoenzimático, ELISA. Aqueles que apresentaram uma leitura em 492nm com D.O superior a 1 receberam a imunização final com 20µg/100µl de protóxina, por via subcutânea, quatro dias antes da fusão celular.

Os camundongos BALB/c, previamente imunizados e selecionados, foram sacrificados por deslocamento cervical, o baço foi removido assepticamente e transferidos para uma placa de Petri estéril, contendo meio RPMI 1640 (sigma, EUA). Posteriormente com o auxílio de seringas de 10ml estéreis contendo meio de cultura foi realizado a retirada das células do baço por explosão e as mesmas transferidas para tubo Falcom 45 mL e submetidas à centrifugação a 200xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células

ressuspendidas com 5ml de solução de lise (Tris-base 0,2g; cloreto de amônia 0,77g; 100ml de H₂O Miliqui) e submetido à nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e a ressuspensão feita adicionado 5ml de RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (Gibco).

3.5.4- Fusão

Depois de contadas em câmara de Neubauer 1x10⁸ células provenientes do baço do camundongo imunizado foram misturadas com 1x10⁷ células de mieloma em tubos de fundo cônico e posteriormente centrifugadas a 200xg por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento resultante adicionou-se 1ml de uma solução de PEG 1500 a 50% peso/volume (Sigma, EUA), pré-aquecida a 37°C por um minuto. Em seguida foram adicionados 5mL de meio RPMI 1640 livre de soro, por um período de um minuto, e finalmente 10mL do mesmo meio por um período de cinco minutos. O tubo foi centrifugado a 400xg por cinco minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 35 ml de meio RPMI-HAT acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2mm L-glutammina (GIBCO), penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100µg/ml, gentamicina 50µg/ml, anfotericina-B 2,5µg/ml (SIGMA), Insulina 0,05%, transferrina 0,05% (GIBCO). As células foram distribuídas em três placas de 96 orifícios incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O meio seletivo RPMI-HAT-10 foi utilizado na realimentação dos híbridos até a morte dos controles e posteriormente foi substituído pelo meio RPMI-HT-10.

3.5.5- Preparo dos macrófagos

Com o objetivo de estimular o crescimento dos híbridos e fazer a limpeza das culturas, foram adicionadas às placas e frascos de culturas, previamente à clonagem, monocamadas de macrófagos. O preparo foi realizado segundo Harlow e Lane (1988).

Foi realizada a eutanásia do camundongo por deslocamento cervical. Após, assepsia e

desinfecção foi levado para o laboratório. Realizou-se a lavagem da cavidade intraperitoneal em condições assépticas, utilizando meio RPMI-1640 sem soro fetal. Após a lavagem as células eram transferidas para placas de 96 wells, permanecendo incubadas a 37°C por um período de 48 horas.

3.5.6 - Seleção dos híbridos após fusão

A presença de anticorpos contra o antígeno de interesse no sobrenadante das culturas foi detectada por teste de ELISA indireto, para a pesquisa de AcMo da mesma forma descrita para policlonais no item 3.4. Substituiu-se os soros dos camundongos por sobrenadante de cultura não diluído.

3.5.7 - Clonagem dos híbridos

O método utilizado foi o de diluição limitante de acordo com Harlow e Lane (1988) e Hudson e Hay (1989).

Os híbridos positivos foram selecionados através do ELISA indireto conforme o item 3.5.5 para uma primeira clonagem. As células a serem clonadas foram ressuspensas em RPMI-HT acrescido de 15% de soro fetal bovino, 2mm L-glutamina (GIBCO), penicilina 100 unidades/ml, estreptomicina 100µg/ml, gentamicina 50µg/ml anfotericina-B 2,5µg/ml (SIGMA), Insulina 0,05% , transferrina 0,05% (GIBCO) e o crescimento observado diariamente. As colônias que apresentaram bom crescimento e permaneceram positivas no ELISA (pré-clones), foram submetidas a re-clonagem por diluição limitante de modo a obter em média uma célula por orifício.

Os clones que apresentaram crescimento foram expandidos para placas e frascos para obtenção de sobrenadante de cultura, líquido ascítico e submetidas ao congelamento.

3.5.8 - Congelamento dos híbridos positivos

Os híbridos positivos dos diferentes clones foram congelados em meio de congelamento contendo 94% de meio RPMI-1640-10%-SFB mais 6% de DMSO. Foram utilizadas duas técnicas de congelamento. Na primeira as células foram mantidas a -70°C, por 24 horas e posteriormente transferidas para nitrogênio líquido a -172°C. A segunda técnica utilizou-se o aparelho de congelamento automático Cryomed®.

3.5.9 - Caracterização isotípica dos anticorpos monoclonais por ELISA antígeno-mediado

A determinação da classe e subclasses de anticorpos monoclonais no sobrenadante dos cultivos e líquido ascítico foram realizados por um ELISA antígeno mediado utilizando-se os protocolos descritos no Kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagentes (SIGMA Chemical C.o., St. Louis Mo, USA).

3.5.10 - Obtenção de líquido ascítico

Camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 0,5ml de pristane. Sete dias após, cada animal foi inoculado, pela mesma via, com aproximadamente 1×10^7 células produtoras de anticorpos monoclonais.

Aproximadamente 15 dias após inoculação e/ou quando os camundongos apresentavam o abdômen aumentado de volume, o líquido ascítico era colhido puncionando-se o abdômen dos animais com agulha 40x12. O líquido depois de coletado foi centrifugado a 4000 x g por 10 minutos e os sobrenadantes conservados a -70°C para posterior purificação.

3.5.11 - Purificação dos AcMo

A partir do sobrenadante da cultura dos híbridos e do líquido ascítico os AcMo foram purificadas através da técnica de cromatografia líquida utilizando a coluna

HiTrap IgM purification HP 1mL (Amersham Biosciences) para purificação de IgM. Antes da passagem na coluna o líquido ascítico foi precipitado com sulfato de amônio a 50% e posteriormente dialisado em PBS 0,01M com três trocas. Inicialmente a coluna foi preparada com a passagem de cinco volumes da coluna para cada tampão, na seguinte seqüência: tampão de ligação (20mM fosfato de sódio, 0,8 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,5), tampão de eluição (20mM fosfato de sódio, pH 7,5) e tampão de regeneração (20mM fosfato de sódio, pH 7,5 com 30% de isopropanol). Posteriormente a coluna foi equilibrada com cinco volumes (V) da coluna com tampão de ligação e aplicação do sobrenadante. Após aplicação da amostra a coluna era lavada com 15V de tampão de ligação, e a amostra eluída com 12V do tampão de eluição. O material eluído era colhido em tubos de soro no volume de 1 mL, e posteriormente levados ao espectrofotômetro para a dosagem protéica. Finalmente a coluna era reequilibrada com 7V do tampão de regeneração e 5V do tampão de ligação.

Para purificação de AcMo da classe IgG foi utilizado cromatografia em coluna de proteína A sepharose CL-4B, ativada com brometo de cianogêneo (SIGMA Chemical C.o., St. Louis Mo, USA). Preparada conforme as orientações do fabricante.

3.5.12 - Dosagem protéica dos AcMo purificados

A dosagem protéica dos AcMo purificados foi realizada através do coeficiente de extinção descrito por Harlow e Lane (1988).

3.5.13 - Western Blotting

O Western Blot (WB) foi realizado a fim de se verificar a especificidade do AcMo purificados frente à toxina *epsilon*. Depois de realizada a eletroforese conforme descrito no item 3.4. com a toxina *epsilon* purificada na concentração de 30µg/ml. Foi procedida a transferência rápida da proteína conforme o manual de instruções

Transblot® semi-dry electrophoretic transfer cell (1995). Posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS-tween-20 por uma hora. Depois de bloqueada seccionou-se a membrana em vários fragmentos, e cada porção recebia o material a ser testado conforme era delineado. Adicionou-se o sobrenadante da cultura que foi deixado sob agitação por uma hora. Após esse período foi adicionada imunoglobulina de cabra anti-mouse conjugada com peroxidase (SIGMA Chemical C.o., St. Louis Mo, USA) diluída 4000x em PBS-Tween 0,05% por mais uma hora. Por último adicionou-se o substrato DAB (3, 3' diamino benzidine tetrahydroclotero (120µg/mL) e H₂O₂ (0,2µ/mL) até o aparecimento da banda.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da amostra *C. perfringens* tipo D, após 24 horas de incubação no Agar sangue em anaerobiose observou-se formação de colônias acinzentadas lisas e brilhantes rodeadas por um halo de dupla hemólise. Pelo método de Gram, observou-se bastonetes Gram positivos, sendo estes resultados característicos de *C. perfringens* tipo D de acordo com Sarris *et al.* (2001). No teste de toxicidade a protoxina *epsilon* causou morte dos animais nas inoculações de 1:100 a 1:800 dentro das primeiras 24 horas e o grupo controle permaneceu vivo.

Nesse trabalho foi possível observar que o rendimento médio da purificação da protoxina 10x concentrada foi de 0,426mg/ml, esses resultados estão de acordo com Parreira (2001), que obteve uma média de 0,416mg/ml demonstrando a eficiência do processo de purificação em coluna de sepharose CL 6B.

No presente trabalho após a purificação da protoxina e quando analisada pela eletroforese, apresentou um padrão eletroforético correspondente a 36.898 Kda (Figura 1). Diferentemente de Sakurai *et al.* (1997) e Parreira 2001 que relataram o peso molecular do protoxina *epsilon* purificada em 31.402 e 34.299 Kda respectivamente.

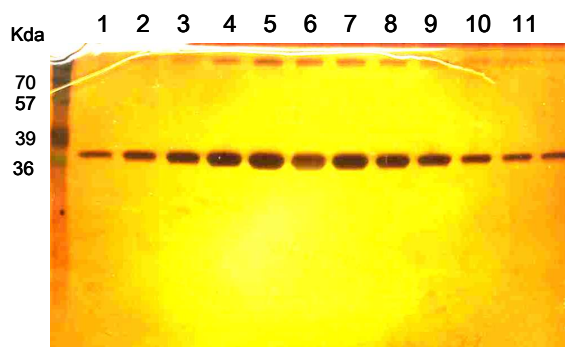


Figura 1: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) corado pela prata, da amostra da protoxina *épsilon* purificada 1-11 em diferentes frações de produção.

4.1 - Imunização dos camundongos Swiis e obtenção dos soros padrões

A partir dos camundongos Swiis imunizados com o toxóide *épsilon* purificado e os não submetidos ao processo de imunização, foi possível a obtenção de 5mL de soro policlonal anti-*épsilon* e negativo respectivamente. Estes foram utilizados como controles positivos e negativos no teste de ELISA indireto para seleção dos híbridos positivos.

resposta imune humoral durante o processo de imunização dos camundongos. Verificou-se que a diluição 1:80 do soro e adsorção de 0,1µg/well de toxina *épsilon* purificada resultou em valores de absorbância para distinção dos soros positivos e negativos (Figura 2). Esses resultados vão de encontro com Ebert *et al.* (1999) que trabalhando no desenvolvimento e prevalidação de dois diferentes sistemas de ELISA para teste de potência de vacina contendo o toxóide *épsilon* obteve bons resultados utilizando a sensibilização da placa de 0,1 a 1µg/well.

4.2 - ELISA para avaliação dos soros policlonais

Através do ELISA indireto foi possível fazer o acompanhamento da evolução da

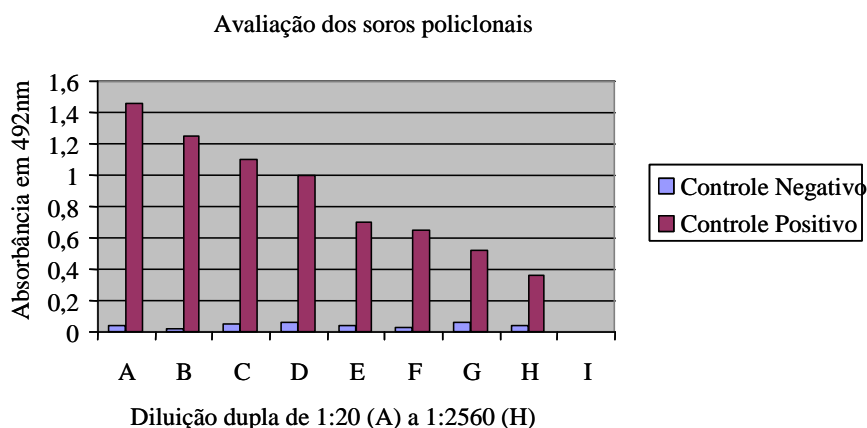


Figura 2- Resultado da avaliação dos soros policlonais utilizados como controle positivo e negativo no ELISA indireto.

4.3- Produção de anticorpos monoclonais

4.3.1- Imunização dos Camundongos BALB/c

As fêmeas da linhagem BALB/c que foram imunizadas utilizando o toxóide *epsilon* desenvolveram resposta imune humoral satisfatória, apresentado resultados de absorbância superior a 1,0 quando avaliados por ELISA. Os resultados referentes á evolução da resposta humoral

pode ser verificada na Figura 3. Esses resultados concordam com Persival *et al.* (1990) que utilizaram concentrações de 10 á 20µg do toxóide *epsilon* na imunização de Balb/c para produção de híbridos produtores de AcMo anti *epsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D e afirma que essas concentrações são ideais para se obter uma boa resposta imune. Após oito dias da ultima imunização os animais que apresentavam resultados de absorbância no ELISA superior a 1,0 foram selecionados para a realização da fusão.

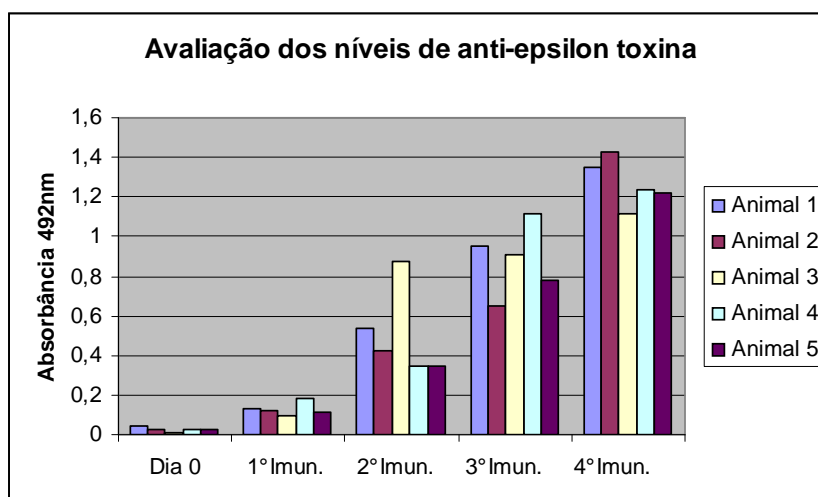


Figura 3: Avaliação dos níveis de anticorpos anti-*epsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D dos camundongos da linguagem BALB/c ao processo de imunização com o toxóide *epsilon*.

4.3.2 - Produção dos hibridomas

Durante o experimento foram realizadas seis fusões. Cinco utilizando as células da linhagem Sp₂/0. Ag14 (SP2) e uma com a P3-X63-Ag8. 653 (NS653) (P3X). Após a hibridização das células do baço com as células da linhagem de mieloma foram testados ao todo 864 poços para SP2 e 288 para (P3X) quanto à produção de imunoglobulinas anti-*epsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D. O número de poços positivos foram 59 para linhagem Sp₂/0.

Ag14 e 19 para P3-X63-Ag8. 653, representando 6,68 e 6,59% de positividade respectivamente. Os resultados referentes á produção e clonagem dos híbridos estão descritos na Tabela 2. Esse resultado do número de híbridos selecionados foi superior aos obtidos por Horiguchi *et al.* (1985) que encontraram uma positividade de apenas 1,5% dos poços testados. Essa variação pode estar relacionada com o método utilizado pelo autor de selecionar os híbridos positivos.

Tabela 1 – Produção e Clonagem dos hibridomas anti *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D

	Sp ₂ /0. Ag14	P3-X63-Ag8. 653 (NS653)
Nº de fusões	05	01
Nº de poços testados p/Ig	864	288
Nº de poços positivos (+/%)	59 (6,82)	19 (6,59)
Nº de híbridos selecionados	20	10
Nº de híbridos positivos após clonagem (+/%)	07 (40,00)	06 (60,00)

4.3.3 - Clonagem dos híbridos

Depois de realizada a seleção, vinte culturas de híbridos provenientes da linhagem Sp₂/0. Ag14 e dez da linhagem P3-X63-Ag8. 653 que apresentaram as maiores leituras de densidade óptica (D. O) em 492nm no ELISA foram submetidos a sucessivas clonagens por diluição limitante e os demais foram congelados para futura utilização.

Após sucessivas clonagens com os híbridos provenientes da linhagem Sp₂/0. Ag14 apenas sete permaneceram positivos no ELISA e foram submetidos a isotipagem. Os híbridos apresentavam crescimento insatisfatório. Durante o experimento várias alternativas a fim de estimular o crescimento celular foram utilizadas como: aumento nas concentrações do soro fetal bovino para 15 e 20%, adição de insulina e transferrina bovina, fatores de crescimento EGF, sobrenadantes de cultura de baço de camundongos, meios de cultura (Hibridoma Médium GIBCCO) e substratos (placas e frascos) específicos para produção de hibridomas. Essas alternativas foram úteis em determinados momentos. Mas não o suficiente para solucionar o problema.

Essa dificuldade de se estabelecer uma linhagem contínua de híbridos a partir da fusão dos linfócitos B com as células do mieloma da linhagem Sp₂. Ag-14 nos levam a crer, que havia problema relacionado especificamente a linhagem utilizada neste trabalho, uma vez que vários autores conseguiram a imortalização da cultura de híbridos utilizando a linhagem Sp₂. Ag14 (Horiguchi *et al.*, 1985; Sato, 1989).

Após clonagens sucessivas dos híbridos provenientes da linhagem P3-X63-Ag8. 653, foi possível o estabelecimento de seis linhagens contínuas de híbridos secretores de AcMo, o que vai de encontro com os resultados obtidos por Persival *et al.* (1990).

4.3.4 - Caracterização isotípica

A caracterização isotípica realizada a partir dos sobrenadantes dos clones provenientes dos da linhagem Sp₂ esta descrito na (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com Sato e Sato (1989) que estabeleceram seis linhagem secretoras de AcMo da classe IgG1, uma IgG2a e três IgG2b.

Tabela 2 – Identificação dos clones provenientes da linhagem Sp₂/0. Ag14 secretores de AcMo anti *épsilon* toxina de *C. perfringens* tipo D com respectiva classe isotípica.

Identificação do Clone	Classe Isotípica
3C4	IgG1
7G1	IgG1
10B	IgA
11H	IgG2b
12B	IgG2b
4C	IgG1, IgG3, IgA
1A1	IgG2a, IgM

Após a caracterização isotópica esses clones não possuíam número suficiente de células que favorecesse o congelamento dos mesmos, nem para a obtenção de líquido ascítico. Apresentaram um crescimento insatisfatório evoluindo para morte celular. Não sendo possível a expansão dos clones e conseqüente produção de AcMo em escala oriundos dos mesmos.

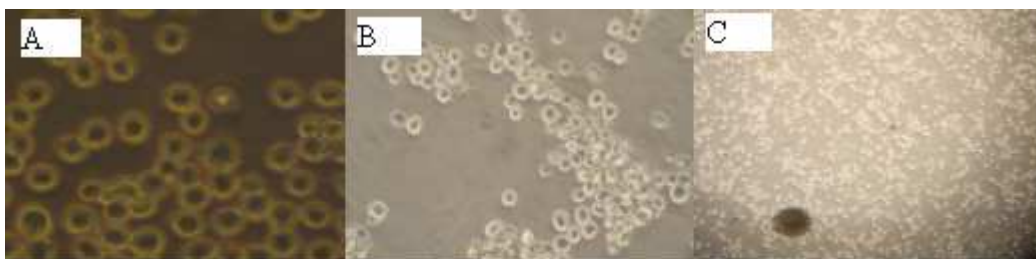
Desta forma, a partir, das tentativas e com os resultados insatisfatórios apresentados pela linhagem Sp₂/0. Ag14, utilizada neste trabalho. Optou-se por utilizar uma outra linhagem de mieloma. Dentre as diversas linhagens recomendadas por Dawson (1996), optou-se pela utilização da P3-X63-Ag8. 653 (NS653).

A partir dos clones provenientes da fusão das células P3-X63-Ag8. 653 com os linfócitos B, foi possível caracterizar isotopicamente seis linhagens secretoras de AcMo. Após o estabelecimento da linhagem contínua os clones receberam a denominação MLC-01 a MLC-06. Após congelamento foram depositados no banco de células do laboratório de cultivo celular da Fundação Ezequiel Dias e esta sob o registro de número 921-926. Os clones

MLC-01 e MLC-02 foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho.

Todas as seis linhagens estabelecidas provenientes da fusão com as células P3-X63-Ag8. 653, são secretoras de imunoglobulina IgM e IgG3. Isso indica que nessas linhagens existe mais de um clone secretor, porém apenas para as classes IgM e IgG3. Após a purificação os sobrenadantes provenientes dos clones, foram submetidos a uma nova isotipagem, apresentando reatividade apenas para IgM e IgG3. Apesar dos seis clones secretarem a mesma classe isotópica, os mesmo podem apresentar reatividade para diferentes epitopos da toxina, uma vez que, MccClane *et al.* (1985), estabeleceu dez linhagens secretoras apenas de IgG1, os quais cinco apresentaram reatividade para epitopos diferentes da enterotoxina de *Clostridium perfringens* tipo A.

Os clones MLC-01 e MLC-02 (Figura 4) foram submetidos a três diluições limitantes. Porém, apesar da diluição ser realizada na tentativa de que ficasse apenas uma célula por poço, não foi possível precisar com exatidão esta separação. Fazendo-se necessário que se realize varias diluições limitantes para se obter a homogeneidade da cultura.



A- Linhagem MLC-02 secretora de AcMo anti-epsilon toxina de *C. perfringens* tipo D. B- Linhagem MLC-02 utilizando um macrófago como base para crescimento. C- Linhagem MLC-02 confluência de 50%.

Figura 4- Clones MLC-02 em diferentes fases de crescimento.

4.3.5 - Obtenção do Líquido ascítico

O camundongo que foi inoculado com as células provenientes da linhagem MLC-02 apresentou líquido ascítico com seis dias após inoculação das células, apresentando um rendimento de 7 mL. Estes resultados foram diferentes dos encontrados por Goding (1986) o qual, estima que são necessários, 15 dias para o desenvolvimento do tumor líquido. O desenvolvimento rápido do tumor pode estar relacionado com a grande capacidade de expansão apresentada por essa linhagem híbrida. O outro camundongo que foi inoculado com a linhagem MLC-01, desenvolveu um tumor sólido, que com 15 dias pós-inoculação apresentava uma massa tumoral de aproximadamente 3cm de comprimento, por 1,5 cm de largura com bordos irregulares, de consistência firme aderido à parede abdominal. Segundo Harlow e Lane (1988) formação de tumores sólidos, após a inoculação de células híbridas provenientes da fusão com células de mieloma podem ocorrer.

Durante o processo de obtenção do líquido ascítico foi realizada a recuperação das células híbridas e posterior expansão em meio de cultura. Um fator importante a ser observado durante esse processo, é que as células provenientes do líquido ascítico apresentavam uma melhor característica morfológica, menor tempo de divisão celular com grande capacidade de expansão quando comparadas com os híbridos do cultivo primário.

A fim de se verificar a estabilidade do híbrido em relação à classe isotípica secretada, foi realizado uma isotipagem com o sobrenadante da cultura das células MLC-02 pós-inoculação em camundongo Balb/c e com o líquido ascítico após ser precipitado com sulfato de amônio a 50% (V/V) e posteriormente dialisado em PBS 0,01M. A partir dos resultados foi possível observar que no líquido ascítico assim como o sobrenadante da cultura MLC-02 pós-inoculação, estava presente anticorpos anti-*epsilon* toxina das classes IgM e IgG3. O que de certa forma indica que os híbridos

inoculados no animal permaneceram secretando as mesmas classes isotípicas, não ocorrendo variação nem perda do isotipo secretado *in vivo*.

4.3.6 - Purificação dos AcMo

A partir do sobrenadante da cultura dos híbridos MLC-01 e MLC-02 foi realizada a purificação das imunoglobulinas IgM e IgG. Após a passagem de um volume de 62 mL de sobrenadante da cultura dos híbridos na coluna HiTrap IgM purification HP foi possível obter um total de 1,334 mg, resultando em uma média de 21,52µg/mL de IgM anti-*epsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D. Posteriormente 20 mL do sobrenadante foi submetida a coluna de Proteína A Sepharose CL-4B com o rendimento de 15µg/mL de IgG3. Esses resultados estão de acordo com Goding (1986), o qual relata que o rendimento da produção de AcMo em sobrenadante de cultura celular variam de 5-50µg/mL, e depende do desenvolvimento individual do clone assim como da densidade celular na cultura. Porém, esses valores são inferiores aos obtidos por Wnek *et al.* (1985). A baixa produção no sobrenadante pode estar relacionada com o fato de que a cultura apresenta mais de um clone, ocasionando uma redução na produção de ambas às classes de imunoglobulina no cultivo. Boarer *et al.* (1988) sugerem a utilização de biorreatores como uma alternativa para melhora a produção de AcMo *in vitro*. Após purificados os AcMo foram submetidos a mais uma isotipagem e apresentaram resultado positivo tanto para IgM como para IgG3, comprovando a especificidade do AcMo produzido.

4.3.7 - Caracterização dos AcMo purificados por Western blotting

Os AcMo das classes IgM e IgG3 purificados a partir da cultura MLC-01 e MLC-02, foram submetidos a um western blotting. A partir desse ensaio foi possível verificar que, tanto a IgG3 quanto a IgM foram capazes de identificar a *epsilon* toxina purificada. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Boarer *et al.* (1988) Hauer e Clough (1999).

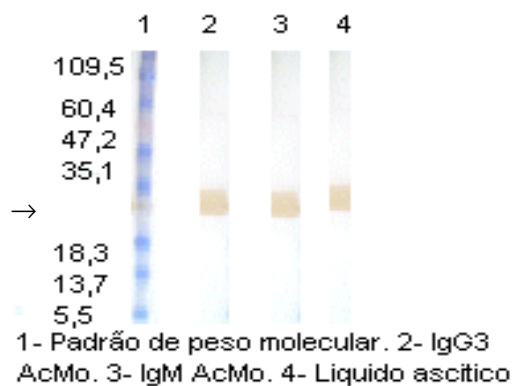


Figura 5- Wester Blotting dos AcMo anti -toxina épsilon purificados

Desta forma, os resultados obtidos são promissores e que os AcMo anti *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D produzidos neste trabalho podem ser utilizados em estudos futuros no desenvolvimento de métodos alternativos para controle de vacinas contendo o toxóide *épsilon*, elaboração de kit de diagnóstico utilizando AcMo, assim como, no estudo da estruturação antigênica e ativação da *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* tipo D.

5 - CONCLUSÕES

- Para um melhor aproveitamento dos AcMo produzidos pelas linhagens estabelecidas neste trabalho. Faz-se necessário que outras diluições limitantes sejam realizadas a fim de se obter uma cultura homogênea secretora apenas de uma classe isotípica.
- A linhagem de células P3-X63-Ag8. 653 foi mais eficiente na produção de anticorpos monoclonais anti *épsilon* toxina neste experimento do que a linhagem Sp₂/0. Ag14.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTCZAK, D. F. Monoclonal antibodies: technology and potencial use. *Journal American Medical Assoc.*, v.181, p.1005-1011,1982.
- BOARER, C. D.; SOJKA M. G.; WHITE V. J.; ROEDER P. L. The production and evaluation of monoclonal antibodies to *Clostridium perfringens* type D *épsilon* toxin. *Journal Biological Stand*, v.16, n.3, p.207-18,1988.
- DANIEL, J. P. Geration of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. *Brazilian Journal Medicine Biological Research*, v.20, p.713-720, 1987.
- DAWSON, M.; BUTLER, M. *Cell culture labfax*, Oxford. BIOS Scientific, 1992. p.247.
- EBERT E.; ÖPPLING V.; WERNER E.; CUSSLER, K. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β - and ϵ -toxoid containing veterinary vaccines. *FEMS Immunology and medical Microbiology*, v.24, p.299-311,1999.

- EL IDRISSEI, A. H.; WARD, G. E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Veterinary Microbiology*, v.31, p.89-99, 1992a.
- FINNIE, J. W. Neurological discords produced by clostridium perfringens type D ϵ toxin. *Anaerobe*. v.16, p-54-59, 2003.
- GODING, J. W. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. London: 1986.
- HARLOW, E.D.; LANE, D. *Antibodies a laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.
- HAUER, P.J.; CLOUGH, N.E. Development of monoclonal antibodies suitable for in antigen quantification potency tests for clostridial veterinary vaccines. *Desen Bio Stand*, Karger, v. 101, p.85-94.1999.
- HENEINE, L. G. D. Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives. *Toxicon*, v.24, p.501-505, 1986.
- HORIGUCHI, Y.; UEMURA, T.; KAMATA, Y. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to Clostridium perfringens Enterotoxin. *Infection and Immunity*, v.52, n.1, p. 31-35.1985.
- HSIEH, HSIN-YEH.; CALCUTT, M.J.; CHAPMAN, L.F. et al. Purification and characterization of a recombinant from Clostridium perfringens. *Protein expression and purification*. V.32 , p 309-316. 2003.
- HUDSON, L.; HAY, F. C., *Practical Immunology*. 3 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989. 517p.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970.
- LOGAN, A.J.; WILLIAMSON, E.D.; TITBAL, R.W. et al. Epitope mapping of the alpha-toxin of clostridium perfringens. *Infection and Immunity*, v.59, n.12, p. 4338-4342,1991.
- MCCLANE, A. BRUCE.; WNEK, P. A. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Clostridium perfringens type A Enterotoxin. *Infection and Immunity*, v.50, n.2, p. 442-448.1985.
- NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI., S et al. Enzyme – lynded imunosorbent assay for assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*, *FEMS microbiology Letten*, v.84, p.41-44, 1991.
- NAYLON, R. D.; MARTIN, P. K.; SHAPE, R. T. Detection of *Clostridium perfringens* β - toxin by ELISA. *Research in Veterinary Science*, v. 42, p.255-256, 1987.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256, p.495-497, 1975.
- PARREIRA, P.M. Elisa competitivo para detecção de imunoglobulina antiprotóxina ϵ produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D. 2001. 44f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais
- PERSIVAL, A. D.; SHUTTLEWORTH, A. D.; WILLIAMSON, E.D.; KELLY, D.C. Anti-Idiotypic antibody-induced protection against *Clostridium perfringens* type D. *Infection and Immunity*, v.58, n.8, p. 2487-2492. 1990.
- ROCHA, F. R. T. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra glicoproteína S₁ do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Belo Horizonte:, 2000. 31f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

- SARRIS, K.; GKIOURTZIDIS K.; FREY J. PCR detection and Prevalence of α -, β -, ϵ -, ι - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Veterinary Microbiology*, n. 82, p.39-46, 2001.
- SATO, H.; CHIBA, J.; SATO, Y. Monoclonal antibodies against alpha toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters*, v.59, p.173-176, 1989.
- STREICHER-ROSSKOPF, V.; VOLKES, P.; NOESKE, K.; WERNER, E. Quality assurance of *C. perfringens* ϵ toxinoid vaccines ELISA versus mouse neutralization test. *Altex*, v. 21, Suppl. 3, p.65-69, 2004.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; OCHI, S. Major toxins of clostridium perfringens. *Journal of Toxicology*, v.16, n.4, p.195-214, 1997.
- SEBALD, M.; PETIT, J.C.; Group identification. In: LABORATORY methods anaerobic bacteria and their identification. 2 ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. p. 189-197.
- SILVEIRA, D.; SOUZA, A. M.; MESQUITA.; A. J. et al. Enterotoxemia em bovinos: uma enfermidade de importância emergente. *Bol. Tec. Inf. Rhodia-Mérieux*, v.2, n.3, p.1-4, 1995.
- SOUZA, C. M. Produção de anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. 2000. 40f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva): Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TUNON, P., JOHANSON, K.E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, v.9, p.171-179, 1984.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R. Enterotoxemia in goats. *Veterinary Research Communications*, v. 20, p.481-492. 1996.
- UZAL, F. A.; NIELSEN K.; KELLY, W. R. Detection of *Clostridium perfringens* type D ϵ toxin antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*. v.51, p.223-231, 1997.
- ZHOU, D.Y.; TU, S. W.; ZHANG, Y. L. Development of an ELISA KIT using monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A. 2004. *World Gastroenterol.* v.10. n.18, p.2747-9.2004.
- WNEK, A. P.; STROUSE, R. J.; MACCLANE B. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infection and Immunity*, v. 50, n 2, p. 442-448.1985.
- 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 ϵ toxin components of multivalent sheep vaccines. *Biologicals*, v.19, p.281-286, 1991.
- WORTHINGTON, R. W.; MÜLDERS, M. S. G.; VAN RENSBURG, J. J. *Clostridium perfringens* type D ϵ toxin. Some chemical immunological and biological properties of a highly purified protoxin. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.40, n.4, p.143-152, 1973.