

Padronização da titulação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em linhagem contínua de células como alternativa ao bioensaio animal

Standardization of the titration of the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D in cell line as an alternative to animal bioassay

Milton Formiga Souza Júnior^I Zélia Inês Portela Lobato^{II} Prhiscylla Sadanã Pires^I
Rodrigo Otávio Silveira Silva^I Felipe Masiero Salvarani^I Ronnie Antunes de Assis^{III}
Francisco Carlos Faria Lobato^{I*}

RESUMO

Enterotoxemia, também chamada de doença do rim pulposo, doença que acomete os ruminantes domésticos, é causada pela ação da toxina épsilon produzida pelo Clostridium perfringens tipo D, um anaeróbio comumente isolado do solo e das fezes de animais sadios. O método tradicional de diagnóstico baseia-se na detecção e classificação dessa exotoxina no conteúdo intestinal por meio da soroneutralização em camundongos. Com isso, o objetivo deste estudo foi padronizar um teste para detecção e titulação dessa toxina in vitro e compará-lo ao fenômeno in vivo. Para isso, uma partida de toxina épsilon de Clostridium perfringens tipo D foi titulada em camundongos e em várias linhagens contínuas de células. Após a determinação da linhagem celular mais sensível, realizaram-se ensaios de titulação in vitro de diluições de uma partida de toxina, comparando-os com os títulos in vivo conhecidos. Os resultados foram agrupados, e foi desenvolvida a equação matemática que melhor adaptou-se aos intervalos trabalhados. A linhagem MDCK, além de mais sensível, demonstrou que o fenômeno observado in vitro pode ser expresso por meio da equação matemática que apresenta uma correlação de 98,33%, com a dose mínima mortal determinada in vivo. Portanto, a linhagem MDCK permite titular a toxina épsilon de C. perfringens tipo D de forma específica e sensível, além de ser uma técnica prática, rápida e que dispensa o uso de animais.

Palavras-chave: enterotoxemia, bioética, soroneutralização, MDCK.

ABSTRACT

Enterotoxemia (also called pulpy kidney disease) is an enteric disease, that affect ruminants, produced by epsilon toxin from Clostridium perfringens type D, an anaerobic commonly isolated from soil and feces of healthy animals. The diagnostic is based on detection of this exotoxin in the intestinal content by soroneutralization in mice. Therefore, this study

aimed to standardize a test for detection and titration of the toxin in vitro, and compare it with the phenomenon in vivo. A volume of epsilon toxin was titrated in mice and in some cell lines. After concluding the most sensitive cell line, were held in vitro titrations of dilutions from a toxin wich one had in vivo titer known. The results were grouped and a mathematical equation was developed. MDCK cell line showed that the phenomenon observed in vitro can be expressed by a mathematical equation wich shows a correlation of 98.33% with a minimum lethal dose determined in vivo. Therefore, the soroneutralization using MDCK allows a specific, sensitive, practical, fast, and doesn't require use of animal titration of epsilon toxin.

Key words: enterotoxemias, bioethics, soroneutralization, MDCK.

INTRODUÇÃO

A enterotoxemia, uma das mais importantes doenças entéricas que acomete os ruminantes domésticos, determina consideráveis perdas econômicas à cadeia produtiva de carne e leite (FERNANDEZ-MIYAKAWA et al., 2007). A causa dessa enteropatia foi estabelecida pela primeira vez em 1932, na Austrália, quando a toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D foi detectada no conteúdo intestinal de carneiros (GRINER et al., 1956). Essa toxina é secretada como protoxina e sua ativação ocorre após clivagem enzimática pela tripsina, resultando em um peptídeo de aproximadamente 31,2KDa, responsável pelas alterações patológicas observadas (PETIT et al., 1997).

^ILaboratório de Bacteriose e Pesquisa, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: flobato@vet.ufmg.br. *Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Virologia, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

^{III}Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, LANAGRO-MG, Setor de Clostridioses, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

A soroneutralização em camundongos (SNC), técnica padrão empregada no diagnóstico da enterotoxemia, permite a detecção da toxina épsilon, tanto no conteúdo intestinal de animais acometidos (LOBATO et al., 2006), quanto em sobrenadantes de culturas de *C. perfringens* tipo D, utilizados na indústria e em centros de pesquisa (BRASIL, 1997). Apesar da reconhecida sensibilidade, esse bioensaio é demorado e relativamente caro, além de gerar inúmeras discussões éticas por parte de grupos humanitários e pesquisadores que buscam o bem-estar animal (PARREIRAS et al., 2002).

Os questionamentos bioéticos impulsionaram a realização de diversos estudos com intuito de padronizar testes alternativos *in vitro* com resultados rápidos, confiáveis, sensíveis e específicos, aliados a um baixo custo e à redução substancial no número de animais utilizados (METZ et al., 2002). Nesse contexto, a soroneutralização *in vitro* parece ser uma alternativa viável à SNC (SHORTT et al., 2000). No entanto, para realização dessa técnica, deve-se primeiramente determinar a sensibilidade das diversas linhagens celulares frente à toxina épsilon e verificar a existência de uma correlação entre o fenômeno biológico observado *in vivo* e *in vitro*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo padronizar um teste para titulação dessa toxina *in vitro* e compará-lo com o fenômeno *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Várias partidas de toxina épsilon foram produzidas a partir da amostra de *C. perfringens* tipo D fornecida pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INTA – Bariloche, Argentina), segundo metodologia descrita por AZEVEDO et al. (1998). As partidas de toxina foram mantidas a -80°C até o momento do uso. Os diferentes lotes de toxinas foram tipificados conforme metodologia descrita por STERNE & BATTY (1975) e titulados com diluições na base dois, sendo inoculados 0,2ml de cada diluição, por via intravenosa, em dois camundongos que foram observados por 72 horas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1998).

A toxina de título mais alto foi testada nas linhagens celulares *Madin-Darby kidney bovine cells* – ATCC/CCL-22 (MDBK), *Madin-Darby canine cells* – ATCC/CCL-34 (MDCK), *African green kidney monkey* – ATCC/CCL-81 (VERO) e Linfossarcoma de camundongos – NCTC Clone 929 – ATCC/CCL-1.1 (L-929). As linhagens foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (E-MEM- Gibco, EUA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB- Difco, EUA), penicilina e estreptomicina nas concentrações de 40.000UI ml^{-1} e 20.000UI ml^{-1} , respectivamente, e mantidas em frascos de 150 cm^2 , em estufa úmida, a 37°C , com atmosfera de 5% CO_2 , até a confluência mínima de 90% (KNIGHT et al., 1990).

Para avaliar a sensibilidade das diferentes linhagens celulares frente à toxina épsilon, os cultivos celulares foram semeados 24 horas antes do teste, em placas de 96 poços, na concentração de $4,8 \times 10^4$ células por poço. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, e triplicatas da toxina épsilon diluídas em E-MEM foram acrescentadas em um volume de 100 μl por poço. Após 24 horas de incubação em estufa úmida, a 37°C , retirou-se o sobrenadante e adicionou-se, em todos os poços, a solução de vermelho neutro. A placa foi incubada por três horas na mesma estufa e então lavada duas vezes consecutivas com solução de lavagem. Após esse procedimento, foram adicionados, em cada poço, 100 μl da solução de absorvância, e as placas foram mantidas sob agitação constante (100rpm) por 30 minutos, sob temperatura ambiente. A leitura foi realizada utilizando-se um leitor de ELISA calibrado na absorvância de 540nm (WHITE & SEAMAN, 1995).

Foram feitos dois ensaios, como descrito anteriormente, sendo empregadas sete diluições, com fator de diluição de 1,2, com 12 repetições, em um intervalo entre 3 e 1,004 dose mínima mortal por ml (DMM/ml) para padronização da titulação da toxina épsilon em célula. Os valores observados nas repetições de todas as diluições da toxina foram expressos em um fator de correção (FC), correspondente ao valor da D.O. observada para cada concentração de toxina, dividido pelo valor da D.O. do controle negativo. Optou-se pela utilização do FC para minimizar as variações nas concentrações de células por poço que podem ocorrer de ensaio para ensaio.

Os resultados obtidos nos ensaios foram agrupados e, com o auxílio do programa de sistema de análise estatística (SAS), por meio de regressão linear, desenvolveu-se uma equação matemática que melhor adaptou-se aos intervalos encontrados e que permitiu estimar a DMM ml^{-1} por meio da observação da DO (SAMPAIO, 1998).

O estudo da correlação do fenômeno biológico observado *in vivo* e *in vitro* foi feito titulando-se diluições dos sobrenadantes das culturas de *C. perfringens* tipo D cujo fator de correção estivesse entre 0,1 e 0,9. O título *in vitro* estimado, expresso em dose mínima mortal estimada por ml (DMM_E ml^{-1}), foi obtido pela equação matemática, e a determinação da correlação entre os testes foi feita por meio da análise estatística de Spearman (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem celular mais sensível foi a MDCK. Em DMM ml^{-1} , a sensibilidade dessa linhagem foi 60 vezes superior à célula VERO, que foi a linhagem com a segunda maior sensibilidade neste estudo (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por

Tabela 1 - Sensibilidade das diferentes linhagens celulares testadas frente à toxina e épsilon, em DMM ml⁻¹.

Linhagens celulares	-----DMM ml detectada-----	
	Superior	Inferior
VERO	350	60
MDCK	3	1
L929	600	79
MDBK	830	260

* foram testadas concentrações de 0,5 a 1000DMM ml⁻¹;

¹. dose mínima mortal ml⁻¹ calculada em camundongo.

PAYNE et al. (1994), que, ao avaliarem 12 linhagens celulares, observaram que somente a MDCK foi sensível à toxina épsilon, e SHORTT et al. (2000), que avaliaram 17 linhagens e confirmaram a maior sensibilidade da MDCK, que é, entre as linhagens celulares até hoje testadas, a mais indicada para a pesquisa da toxina épsilon (PETIT et al., 1997)

Apesar do limitado conhecimento sobre o mecanismo de ação *in vivo* da toxina épsilon, sabe-se de sua ligação a sítios receptores no epitélio vascular com aumento da permeabilidade celular (BORRMANN et al., 2001). Como as células MDCK originam-se de células epiteliais renais, receptores específicos na membrana celular dessa linhagem se ligam à toxina, promovendo a formação de poros, fenômeno semelhante ao observado *in vivo*, o que justifica a maior sensibilidade e especificidade dessa frente à toxina épsilon (BORRMANN et al., 2006).

Na padronização da titulação da toxina épsilon em células MDCK, a partir da média dos dados

obtidos nas 12 repetições empregando-se as diluições entre 3 e 1,004DMM ml⁻¹, foi construído um gráfico de dispersão (Figura 1), do qual extraiu-se a equação $DMM_E \text{ ml}^{-1} = 0,31 - 0,23 \times FC$, que apresenta $R^2 = 0,97$ para FC entre 0,1 e 0,9. Portanto, essa equação permite a estimativa do título da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D, sem que seja necessária a titulação *in vivo*, demonstrando a semelhança entre o fenômeno biológico observado nos dois testes.

Os resultados obtidos nas titulações de diferentes sobrenadantes de culturas de *Clostridium perfringens* tipo D estão na tabela 2.

Comparando-se a média dos valores obtidos na titulação em células, expressos em DMM_E ml⁻¹, e os títulos estabelecidos *in vivo*, observa-se uma correlação de 98,33% entre os testes. Nota-se que, apesar de os títulos não serem exatamente iguais, há uma correspondência entre DMM ml⁻¹ e DMM_E ml⁻¹. O teste em cultura de células acompanhou a tendência dos títulos *in vivo*, indicando que os fenômenos biológicos observados *in vivo* e *in vitro* são os mesmos. Portanto, a linhagem MDCK permite titular a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D de forma precisa, sensível, prática, rápida e sem o uso de animais.

Dessa forma, o teste padronizado se mostra como uma boa opção para substituir o bioensaio em camundongos na triagem de sobrenadantes de culturas de *C. perfringens* tipo D utilizados na produção industrial e ou experimental de toxóides. Em comparação com outros métodos *in vitro*, o uso desse modelo indicador de citotoxicidade *in vitro* permite avaliar e estudar a atividade biológica da toxina épsilon, o que não é possível com outras técnicas como ELISA e IDGA (BORRMANN et al., 2001). Além disso, na cultura

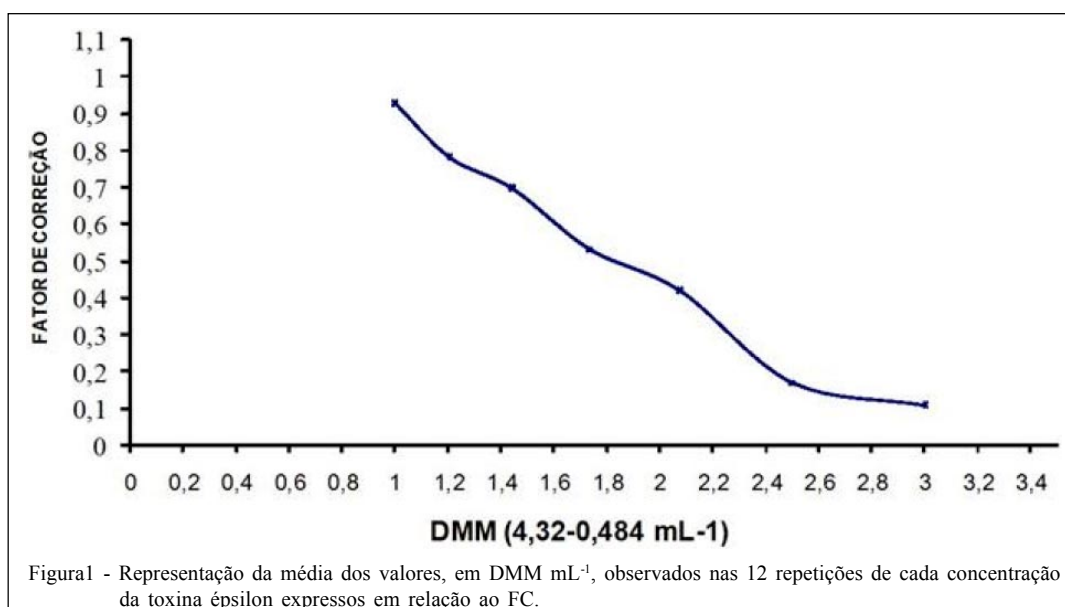


Tabela 2 - Títulos de toxina épsilon em dose mínima mortal (DMM ml⁻¹) e efeito citopático (ECT ml⁻¹).

Titulação <i>in vivo</i> ¹ (DMM ml ⁻¹)	Título máximo e mínimo obtido <i>in vitro</i> ² (DMM _E ml ⁻¹)	Média <i>in vitro</i> ³ (DMM _E ml ⁻¹)
25600	18937-54751	38318
4200	4087	4087
3072	2878-4432	3655
2300	2249-1404	1859
2100	2124-2619,1	2371,55

¹. valores determinados por bioensaio em camundongos.

². valores de ECT 100% ml⁻¹ para a célula MDCK estimados pela equação (ECT=0,31-0,23 FC).

celular, os meios e reagentes químicos utilizados encontram-se disponíveis no mercado, o que reduz os custos e permite a reprodução dessa técnica. A utilização da linhagem MDCK, na titulação da épsilon toxina de *C.perfringens* tipo D, evitará o uso de animais como modelos indicadores de letalidade de forma precisa, sensível, prática e rápida, atendendo assim aos anseios bioéticos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, E.O. et al. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.3, p.239-242, 1998.
- BORRMANN, E. et al. Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.41-50, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD64HV74J61&_user=686413&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000037539&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686413&md5=1268914a35aab5354fa739c4b459be5e>. Acesso em: 03 nov. 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.043.
- BORRMANN, E. et al. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.31, p.85-92, 2001. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118980246/HTMLSTART>>. Acesso em: 03 nov. 2009. doi: 10.1111/j.1574-695X.2001.tb00503.x.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49, 12 de maio de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1:10168-10169.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium. 3.ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve, 1998. p.363.
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M.E. et al. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* Type D infection. **Infection and Immunity**, v.75, N.9, p.4282-4288, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951146/?tool=pubmed>>. Acesso em: 03 nov. 2009. doi: 10.1128/IAI.00562-07.
- GRINER, L.A. et al. *Clostridium perfringens* type D (epsilon) enterotoxemia in brown swiss dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.8 p.375-376, 1956.
- KNIGHT, P.A. et al. In vitro test for the measurement of clostridial toxins, toxoids and antisera: II.Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. **Biologicals**, v.18, p.263-270, 1990.
- LOBATO F.C.F. et al. Enterotoxemia em um bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.952-954, 2006.
- METZ, B. et al. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v.20, p.2411-2430, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD445GKK8C3&_user=686413&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000037539&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686413&md5=a16457e0f96fc6be2dc7c9760ae27638>. Acesso em: 03 nov.2009. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00192-5.
- PARREIRAS, P.M. et al. Production and purification of epsilon prototoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.328-330, 2002.
- PAYNE, D.W. et al. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **FEMS Microbiology Letters**, v.116, p.161-168, 1994.
- PETIT, L. et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. **Journal Bacteriology**, v.179, n.20, p.6480-6487, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179566/pdf/1796480.pdf>>. Acesso em: 03 nov.2009.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SHORTT, B.J. et al. An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D ?-toxin in human and animal cells. **Human and Experimental Toxicology**, v.19, p.108-116, 2000.
- STERNE, M.; BATTY, I. **Pathogenic clostridia**. London, England: Butterworth, 1975. 143p.
- WHITE, D.J.; SEAMAN C. LLC-RK1 cell screening test for nephrotoxicity. In. O'HARE, S.; ATTERWILL, C.K. (Ed.). **Methods in molecular biology: in vitro toxicity testing protocols**. Totowa, N.J: Humana, 1995. Cap.2, p.11-15.