

Andréa Márcia de Souza

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA TOXINA *ÉPSILON* DE
Clostridium perfringens TIPO D E SUA APLICAÇÃO NA
IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS**

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

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Prof. Francisco Carlos Faria Lobato (Orientador)

Prof. Evanguedes Kalapothakis (Co-orientador)

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2008

S729c Souza, Andréa Márcia de, 1964-
Clonagem e expressão do gene da toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D e sua aplicação na imunização de animais / Andréa Márcia de Souza. –2008.
56 p.: il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato
Co-orientador: Evanguedes Kalapothakis
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. *Clostridium perfringens* – Teses. 2. Enterotoxinas – Teses. 3. Animais - Doenças – Teses. 4. Vacinas – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Kalapothakis, Evanguedes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 693

Aos meus pais, Nilo Alves de Souza (*in memoriam*) e Maria Gomes Cardoso de Souza, por todos os esforços e sacrifícios que me permitiram chegar até aqui;

À Patrícia e Mônica, minhas irmãs, pelo companheirismo;

Ao Rafael e Júlia, por serem tão importantes para mim.

*Dê sempre o melhor...
E o melhor virá!*

*Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo!*

*Se você é gentil,
As pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja gentil assim mesmo!*

*Se você é um vencedor,
Terá alguns falsos amigos e alguns amigos verdadeiros...
Vença assim mesmo!*

*Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo...
Seja honesto e franco assim mesmo!*

*O que você levou anos para construir,
Alguém pode destruir de uma hora para outra...
Construa assim mesmo!*

*Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...
Tenha paz e seja feliz assim mesmo!*

*O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo!*

*Dê ao mundo o melhor de você,
Mas isso pode nunca ser o bastante,
Dê o melhor de você assim mesmo!*

*E veja você que no final das contas é entre você e Deus,
Nunca foi entre você e eles!*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco Carlos Faria Lobato, pela dedicação, colaboração e ricas sugestões, além de estar sempre disponível e acessível;

Ao Professor Evanguedes Kalapothakis, pela paciência, pela paz transmitida dia-a-dia, pelo apoio e ensinamentos que foram tão importantes para mim;

Ao Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, pela tranquilidade, disponibilidade e colaborações que foram de grande valia para este trabalho;

À Profa. Zélia Inês Portela Lobato, que participou da minha qualificação e colaborou de forma expressiva para a condução desse trabalho;

À Pós-graduação em Ciência Animal e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da UFMG;

Aos amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução, do ICB/UFMG e, especialmente, ao Professor Gérman Arturo Bohorquez Mahecha, pela disponibilidade e importante colaboração para os trabalhos de microscopia;

Às amigas da Escola de Veterinária/UFMG, Telma (Fófis), Ana Cláudia, Gissandra, Andreza, Bárbara, Nádia, Cleusa, Sueli, Cassinha, Luciana Aramuni (Lu) e Andréa Vieira (Déia) pelo carinho da nossa amizade e pelos momentos alegres (Adoro vocês!);

Aos antigos e atuais amigos do Laboratório de Bacterioses e Pesquisa, Theonys, Eduardo, Felipe, Catarina, Phricylla, Rodrigo da Escola de Veterinária, pela ajuda direta e indireta;

Aos antigos e atuais amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Biotecnologia, ICB/UFMG, Ana Luisa, Gabriel, Lidiane, Juliana (Ju), Híggor, Ana Paula, Isabella, Flavinha, Anderson, André, Denise, Carol (PUC), Tatiana, Tatiana Barroca e Maria, pela rica convivência pessoal e acadêmica, e, por mostrarem como é possível trabalhar em uma equipe grande, em um espaço pequeno, com enorme harmonia, mantendo e respeitando a individualidade de cada um. (Adorei trabalhar com vocês!);

À Elizângela (Zanja), que é praticamente minha irmã, pela nossa amizade sempre...

À Carol Campolina, que eu considero tanto, e, sei que posso contar sempre;

À Thaís, pela imprescindível ajuda, não só pela colaboração direta neste trabalho, mas também pelos momentos de convivência, amizade leal e ensinamentos (Aprendi muito com você!);

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, Nelson Éder, Gustavo, Renata, Mirli, Júnia, Grazielle, Eduardo, Doraci, Joãozinho pela atenção e disponibilidade em ajudar;

Às funcionárias da Diretoria da Escola de Veterinária, sempre solícitas e educadas;

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) - Pedro Leopoldo/MG do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nas pessoas do Dr. Maurício Baltazar de Carvalho Filho e Dr. Ronnie Assis, pela imprescindível colaboração;

À Fazenda Experimental "Prof. Hélio Barbosa", pelo pronto-atendimento no fornecimento de animais;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos pessoais, que não participam da minha vida acadêmica, e, meus familiares que me apoiaram e me ajudaram indiretamente para a concretização desta etapa da minha vida;

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1- INTRODUÇÃO	12
2- LITERATURA CONSULTADA	12
2.1- <i>Clostridium perfringens</i> e a toxina épsilon.....	12
2.2- Enterotoxemias	13
2.3- Expressão de proteínas em <i>Escherichia coli</i>	14
2.4- Vacinas	15
3- MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1- Fluxograma geral do trabalho.....	18
3.2- Local de realização dos trabalhos experimentais.....	19
3.3- Animais utilizados	19
3.4- Cultivo bacteriano e testes bioquímicos	19
3.5- Produção, padronização e titulação da toxina épsilon nativa	19
3.6- Extração e quantificação do DNA.....	19
3.7- Reação da cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene <i>etx</i> nas amostras de <i>C. perfringens</i> tipo D	19
3.8- Amplificação do gene <i>etx</i> através de PCR.....	21
3.9- Análise dos produtos de PCR.....	23
3.10- Purificação dos produtos de PCR.....	23
3.11- Estratégia para clonagem e expressão do gene <i>etx</i>	23
3.11.1- Sistema de expressão	24
3.11.2- Clonagem no sistema TOPO TA	25
3.11.3- Preparação do vetor pET para a subclonagem.....	25
3.11.4- Subclonagem no sistema pET-11a	25
3.11.5- PCR e sequenciamento para a confirmação da clonagem	25
3.11.6- Expressão do gene <i>etx</i>	25
3.11.7- Solubilização dos corpos de inclusão.....	25
3.11.8- Estimativa da dosagem de proteína recombinante	25
3.12- Titulação da toxina recombinante.....	25
3.13- Preparo do inóculo para a imunização	25
3.14- Produção de soro antitoxina épsilon recombinante.....	25
3.15- Toxinotipia e soroneutralização cruzada	27
3.16- Teste de potência	27
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1- Cultivo bacteriano e testes bioquímicos	27
4.2- Extração do DNA das amostras 34 e U10 de <i>Clostridium perfringens</i>	28
4.3- PCR para detecção do gene <i>etx</i>	28
4.4- Padronização da PCR para amplificação do gene <i>etx</i>	29
4.5- Clonagem e expressão do gene <i>etx</i>	29
4.5.1- Clonagem do gene <i>etx</i>	29
4.5.2- Expressão do gene <i>etx</i>	34
4.6- Obtenção da proteína recombinante na forma solúvel.....	38
4.7- Solubilização dos corpos de inclusão.....	42
4.8- Dosagem da toxina recombinante	45

4.9- Titulação da toxina épsilon recombinante	47
4.10- Produção de soro antitoxina épsilon recombinante.....	49
4.11- Toxinotipia e soroneutralização cruzada	49
4.12- Teste de potência	50
5- CONCLUSÕES.....	52
6- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes bioquímicos das amostras 34 e U10 de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D	28
Tabela 2 - Níveis de antitoxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D em pool de soros de coelhos imunizados com a toxina épsilon recombinante	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA que codifica a toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> (Hunter <i>et al.</i> , 1992).....	21
Figura 2 - Esquema do mapa do plasmídeo pET-11a.....	24
Figura 3 - Clonagem e expressão do gene <i>etx</i>	29
Figura 4 - Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento de DNA codificante da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, subclonado no plasmídeo pET-11a	33
Figura 5 - Expressão do gene <i>etx</i> de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D no sistema pET-11a	35
Figura 6 - Expressão do gene <i>etx</i> de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D no sistema pET-11a em relação ao tempo de indução	37
Figura 7 - Expressão do gene <i>etx</i> de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D no sistema pET 11a nas formas solúvel e insolúvel, após a lise bacteriana	39
Figura 8 - Expressão do gene <i>etx</i> de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D no sistema pET 11a a 20°C, antes e após a indução	41
Figura 9 - Solubilização com uréia 6,0 M dos corpos de inclusão obtidos a partir da expressão do gene <i>etx</i> de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D	43
Figura 10 - Estimativa da dosagem da toxina épsilon recombinante	47
Figura 11 - Níveis de antitoxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D em soro de coelhos imunizados com a toxina épsilon recombinante, aos 37 dias e 169 dias	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Blastn - Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide
BSA – bovine serum albumine (soro albumina bovina)
CFR – Code Federal Regulation
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
dA – resíduo de deoxiadenosina
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxinucleotídeo 5'-trifosfato
DO – densidade óptica
dT – resíduo de deoxitirosina
F – fita senso
g – grama
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IPTG - Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário
LB - Luria Bertani
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ND – não detectado
NIBISC – National Institute for Biological Standards and Control
PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
pM – picomoles
R- fita anti-senso
RNA – ácido ribonucléico
SDS – Sódio Dodecil Sulfato
taq - *Thermus aquaticus*
TM – temperatura na qual 50% do DNA se encontra desnaturado
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UI – unidade internacional
USDA - United States Department of Agriculture
x-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose

RESUMO

A toxina épsilon é produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B ou D, sendo responsável pela enterotoxemia em ovinos, caprinos e bovinos. A doença é de caráter agudo ou super agudo, causando morte súbita e grandes perdas econômicas. A evolução da doença dificulta qualquer medida terapêutica, e o processo pode ser prevenido através de imunizações com vacinas comprovadamente eficientes. O gene *etx*, que codifica a toxina épsilon, foi clonado no plasmídeo TOPO TA e subclonado em pET-11a, utilizando a linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3), para a expressão do gene da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. A toxina épsilon recombinante foi expressa, principalmente, na forma insolúvel, retida em corpos de inclusão, e, a dosagem, realizada por SDS-PAGE comparativamente com quantidades conhecidas de BSA, foi estimada em 10 mg/mL, com título em camundongo de 25×10^2 DL₅₀/mL. Os resultados foram confirmados pelo teste de soroproteção e soroneutralização cruzada em camundongos. Coelho foram imunizados com 200, 100 e 50 µg da fração insolúvel da proteína recombinante, para o teste de potência, utilizando suspensão de hidróxido de alumínio como adjuvante, obtendo títulos de 40, 30 e 10 UI/mL, respectivamente. Esses valores foram superiores aos níveis de 5 UI/mL, exigido pela Farmacopéia Européia (1998), e, 2 UI/mL, exigido pelo *Code of Federal Regulation/USA*. A toxina épsilon recombinante produzida neste trabalho mostrou-se uma forte candidata para a produção de uma vacina contra enterotoxemia causada pela toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D.

Palavras-chaves: *Clostridium perfringens*; toxina épsilon; gene *etx*; enterotoxemia; expressão em *Escherichia coli*; vacina.

ABSTRACT

The epsilon toxin is produced by *Clostridium perfringens* types B and D, causing enterotoxaemia in sheep, goats and calves. Enterotoxaemia is a disease with acute or super-acute profile, causing sudden death and huge economic loss. The therapeutic intervention may be difficult since the disease evolution is very rapid. However, this process can be prevented by immunizations with specific immunogenic vaccines. In the present work the *etx* gene encoding the epsilon toxin was cloned into pET-11a and the recombinant epsilon toxin was expressed as inclusion bodies. The protein concentration was determined and the lethal doses (LD) were estimated in mice, reaching 25×10^2 LD₅₀/mL. Serum protection and cross-serum neutralization tests in mice were also used to characterize the recombinant toxin. For potency test, rabbits were immunized with 200, 100 and 50 µg of recombinant toxin, using aluminum hydroxide gel as adjuvant. Obtained titers of 40, 30 and 10 UI/mL, respectively, were higher than the minimum level of 5 UI/mL required by the European Pharmacopoeia (1998) and the minimum level of 2 UI/mL required by the Code of Federal Regulation/USA. The recombinant epsilon toxin produced emerges as a strong candidate for the production of a vaccine against enterotoxaemia caused by epsilon toxin of *C. perfringens* type D.

Keywords: *Clostridium perfringens*; epsilon toxin; *etx* gene; enterotoxaemia; expression in *Escherichia coli*; vaccine.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos anaeróbios, Gram-positivo, formador de esporos, que apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado no solo, água doce e salgada, alimentos de origem animal e vegetal, além de, fazer parte da microbiota residente do trato intestinal do homem e de animais.

Clostridium perfringens é uma bactéria ubíqua, responsável por vários quadros clínicos como diarréias, enterotoxemia, gangrena gasosa e enterite hemorrágica em animais. A patogenicidade desse grupo está associada com as toxinas produzidas, o que está intimamente relacionado à virulência das linhagens bacterianas. A toxina *épsilon*, uma das mais potentes toxinas de origem microbiana, após as neurotoxinas tetânica e botulínica, é produzida pelo *C. perfringens* tipo B ou D, linhagens que apresentam um número limitado de hospedeiros. Produz uma enterotoxemia fatal e grave, sendo que a infecção causada por *C. perfringens* tipo B em carneiros, leva à disenteria, enquanto que aquela causada por *C. perfringens* tipo D causa doença neurológica nesses animais. A taxa de mortalidade em ambos os quadros clínicos chega a 100% e, o surto dessas doenças é de grande importância econômica em criações intensivas (Rood *et al.*, 1997).

A enterotoxemia não é transmissível, mas surtos esporádicos podem ocorrer quando o equilíbrio da microbiota intestinal é afetado, seja pelo tratamento dos animais com antibióticos, seja por mudanças bruscas na dieta.

A evolução da doença em animais jovens é quase sempre de caráter agudo ou super agudo, dificultando qualquer medida terapêutica. Todavia, o processo pode ser prevenido através da imunização com vacinas monovalentes e polivalentes (Lobato *et al.*, 2000a). A imunização utilizando toxóides de *C. perfringens* tipo C e D tem sido realizada para controlar as

enterotoxemias, e, para aumentar a potência desses toxóides, estratégias para obter altos títulos de toxinas que induzem altos títulos de anticorpos têm sido estudadas (Goswami *et al.*, 1996).

Este trabalho teve por objetivo produzir a toxina *épsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D, a partir da expressão do gene *etx* em *Escherichia coli* e testar sua aplicação na imunização de animais.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 *Clostridium perfringens* e a toxina *épsilon*

C. perfringens é classificado em cinco tipos toxigênicos: A, B, C, D e E, dependendo da toxina produzida (Rood *et al.*, 1997). A toxina alfa é comumente produzida pelos cinco tipos, sendo a toxina predominante de *C. perfringens* tipo A; é uma fosfolipase C, que hidrolisa lecitina em fosforilcolina e diglicerídio, considerado o grande fator responsável pela patologia tecidual (Awad *et al.*, 1995). A toxina beta é produzida por *C. perfringens* tipos B e C, sendo um polipeptídeo de cadeia única com aproximadamente 40 kDa, altamente sensível à ação da tripsina (Hunter *et al.*, 1993). A toxina iota é produzida somente pelo *C. perfringens* tipo E, como uma prototoxina que atravessa a parede vascular, resultante de uma ativação proteolítica (Perelle *et al.*, 1993). A toxina *épsilon*, com aproximadamente 32,7 kDa, é produzida pelo *C. perfringens* tipos B e D, apresentando estas linhagens um número limitado de hospedeiros. Estirpes de *C. perfringens* tipo B ou D são isoladas principalmente de ovinos, ocasionalmente de caprinos e bovinos, sendo raramente encontradas no homem (Rood *et al.*, 1997).

C. perfringens cresce vigorosamente em temperaturas entre 20-50°C, sendo a temperatura ótima em torno de 45°C, para a maioria das linhagens. Sobre ágar sangue, as colônias formam uma dupla hemólise característica, sendo o halo interno devido à toxina teta, e, o halo externo devido à toxina

alfa. Sobre ágar gema de ovo, as colônias são circundadas por uma ampla área de precipitação, conhecida como reação de lecitinase, relacionada à produção de toxina alfa. São imóveis, reduzem nitrato e fermentam glicose, lactose, maltose, sacarose e outros açúcares. Liquefazem gelatina, causam fermentação turbulenta no leite devido à fermentação da lactose com produção de gás e coágulos, entretanto, não digerem caseína (Hatheway, 1990).

A produção de toxinas por *C. perfringens* é um dos aspectos mais importantes na patogenia das doenças causadas por essa bactéria. A toxina épsilon, produzida pelos *C. perfringens* tipos B e D, é secretada como uma prototoxina inativa de 311 aminoácidos e peso molecular de 32.700 daltons. A remoção proteolítica de 13-14 resíduos de aminoácidos da porção amino-terminal e 29 resíduos da porção carboxi-terminal da prototoxina, resulta na produção de uma toxina ativa de 31.200 daltons, na mudança do ponto isoeletrico de 8.02 (prototoxina) para 5.36 (toxina totalmente ativa) ou 5.74 (toxina parcialmente ativa) e, uma mudança significativa na conformação (Worthington e Mulders, 1977), produzindo uma toxina ativa, com uma dose letal de 100 ng/kg em camundongos (Cole *et al.*, 2004).

A estrutura da prototoxina épsilon é alongada, sendo dividida em três domínios contendo principalmente folha β , mostrando uma similaridade estrutural com a aerolisina, uma toxina formadora de poros, da bactéria Gram negativa *Aeromonas hydrophilia*. Esta analogia, juntamente com estudos experimentais, sugere que a toxina épsilon é também uma formadora de poros (Cole *et al.*, 2004). Apesar das similaridades, as duas toxinas diferem em especificidade das células-alvo e na toxicidade; a toxina épsilon é 100 vezes mais potente que aerolisina, e, não é hemolítica (Petit *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 2001).

A toxina épsilon ativa leva a um aumento na permeabilidade intestinal, facilitando a entrada da bactéria na corrente sanguínea. Seu acúmulo nos rins e cérebro altera o potencial osmótico desses tecidos causando o extravasamento de proteínas séricas e

hemáceas, produzindo um edema generalizado no animal infectado (Cole *et al.*, 2004).

O gene *etx*, que codifica a toxina épsilon, se encontra em plasmídios que diferem em tamanho nas diferentes linhagens de *C. perfringens* (Rood *et al.*, 1997). A comparação entre os genes *etxB* e *etxD* de *C. perfringens* tipo B e D, respectivamente, mostra dois nucleotídeos diferentes dentro da janela de leitura do gene, resultando na substituição de um único aminoácido na proteína (Havard *et al.*, 1992).

Os genes *etxB* e *etxD* foram clonados e seqüenciados por Hunter *et al.* (1992). A clonagem e a expressão do gene da toxina épsilon de *C. perfringens* tipo B, linhagem NCTC 8533 induziu níveis de expressão em *Escherichia coli* extremamente baixos, resultado atribuído à instabilidade do produto obtido ou aos processos de transcrição e tradução ineficientes. Goswami *et al.* (1996), em um estudo similar, obtiveram altos níveis de expressão do gene *etx* de *C. perfringens* tipo D, produzindo uma toxina recombinante altamente imunogênica.

A atividade da toxina épsilon é determinada utilizando o teste de letalidade em camundongos, considerado o teste padrão para determinação de sua toxicidade (European Pharmacopeia, 1998).

2.2. Enterotoxemias

São patologias determinadas pela multiplicação de *Clostridium* sp. no trato intestinal e órgãos abdominais de animais susceptíveis. São distribuídas no Brasil, sendo responsáveis pelo aparecimento dos quadros clínicos, pela mortalidade de animais jovens ou pelo retardo no crescimento e desenvolvimento dos animais que sobrevivem à infecção (El Idrissi *et al.*, 1992; Rood *et al.*, 1997)

A doença provocada pelo *C. perfringens* tipo D, que normalmente habita o sistema digestivo de ovinos e outros ruminantes, varia amplamente entre os rebanhos. A

bactéria não persiste muito tempo no solo e, sob certas condições, podem proliferar rapidamente no intestino e produzir quantidades letais de toxinas. As condições zootécnicas em que a doença ocorre, incluem a pastagem em pastos viçosos em rápido crescimento ou com cereais recém-brotados, e, alimentação intensiva em rebanhos que recebem grãos (Songer, 1996).

Em bovinos, a doença é de evolução rápida, com cerca de 2-36 horas, com o animal apresentando febre, anorexia, apatia, evoluindo para um quadro de convulsões espasmódicas, coma e morte súbita. As enterotoxemias são, junto com aborto, uma das infecções mais importantes em ovinos; acometem principalmente animais jovens, mais susceptíveis, em especial os filhotes de mães não vacinadas. Como todos os animais de um rebanho são submetidos aos mesmos fatores de risco, as enterotoxemias podem provocar a morte simultânea de vários animais em um mesmo rebanho (Helwig, 1967).

Nos últimos anos, alterações na criação de gado, particularmente o uso de alimentos altamente energéticos em bovinos de corte ou leiteiro, levaram a um aumento na suscetibilidade de enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo D (Lobato *et al.*, 2000a).

2.3. Expressão de proteínas em *Escherichia coli*

Proteínas puras e funcionais são de grande demanda em biotecnologia e, a grande maioria normalmente é produzida, em sua forma nativa, em pequenas quantidades. A engenharia genética permite a introdução de genes codificantes em células hospedeiras facilmente cultiváveis, após promotores reguláveis presentes em elementos genéticos independentes, principalmente, plasmídeos (Yokohama, 2003).

O sistema de expressão em *E. coli* é utilizado pela maioria dos pesquisadores e as técnicas para expressar quantidades suficientes da proteína desejada são relativamente simples. O tempo necessário

para crescer um clone que produz a proteína desejada é muito curto e, a familiaridade com a tecnologia do DNA recombinante é o necessário para realizar experimentos-piloto de expressão. Além disso, a *E. coli* tem outras vantagens para a sua utilização na expressão de proteínas comercialmente importantes: o custo para o crescimento de biomassa é baixo e o vasto conhecimento sobre sua genética, fisiologia, bioquímica e biologia molecular permite que *E. coli* seja o primeiro sistema de escolha para expressão de muitas proteínas heterólogas (Makrides, 1996).

Modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* têm sido frequentemente feitas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original, que somado ao advento de novos sistemas de expressão em células de eucariotos, apontam para uma abordagem poderosa, revolucionando os estudos de estrutura, função, purificação e identificação de novas proteínas (Sorensen e Mortensen, 2005a; Cabrita *et al.*, 2006).

Apesar da literatura científica descrever com sucesso a expressão de proteínas a partir de vários genes clonados, cada novo gene apresenta suas próprias particularidades. Nenhum manual de laboratório pode descrever métodos que garantirão o sucesso da produção de todas as proteínas. Até o momento, essa tecnologia envolve tentativas para obter o melhor resultado, sendo que a maioria das proteínas pode ser produzida em *E. coli* de forma a ser utilizada em uma variedade de funções. Os procedimentos empregados são rápidos e descomplicados, sendo muito grande a chance de sucesso (Ausubel *et al.*, 2003).

Vários vetores encontram-se disponíveis no mercado para a expressão de proteínas em *E. coli*. Um dos mais referidos são da série pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*), cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição *10* e dos sinais de iniciação de tradução *s10* da proteína do gene *10* (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem deste vetor é que ele é transcrito

pela T7 RNA polimerase, que é muito seletiva e ativa, sendo capaz de traduzir cadeias de RNA aproximadamente cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase da *E. coli*. Alguns vetores da série pET apresentam o promotor T7-*lac*, colocando a expressão da proteína sob o controle *lac* e reduzindo portanto o *background* de expressão da proteína alvo na ausência de IPTG (Studier *et al.*, 1990; Sorensen e Mortensen, 2005b).

A expressão de grandes quantidades de proteínas em bactérias frequentemente resulta no acúmulo dos produtos na forma de depósitos insolúveis no citoplasma celular, denominados corpos de inclusão (Ausubel *et al.*, 2003). Diante disto, os pesquisadores têm propostos métodos para minimizar a formação desses agregados através do controle de parâmetros, como: crescimento das culturas em temperaturas mais baixas (Chalmers *et al.*, 1990), redução da taxa de expressão do gene recombinante (Galloway *et al.*, 2003), co-expressão das proteínas de interesse com *chaperones* (Wall e Plückthun, 1995), engenharia de proteínas (Murby *et al.*, 1995; Forrer e Jaussi, 1998), entre outras. Entretanto, a expressão de proteínas na forma de corpos de inclusão pode ser vantajosa, pois, além da grande quantidade de proteínas produzida, grande parte delas está protegida da degradação proteolítica. Sendo a proteína de interesse tóxica ou letal para a célula hospedeira, sua produção na forma insolúvel pode ser o método mais viável (Misawa e Kumagai, 1999).

Os corpos de inclusão são depósitos protéicos amorfos e densos, que podem ser encontrados tanto no citoplasma quanto no espaço periplasmático da bactéria (Georgiou e Valax, 1999). Apesar de serem partículas densas são altamente hidratados e mostram uma arquitetura porosa (Carrió e cols, 2000). O grande desafio é tirar vantagem dos altos níveis de expressão de proteínas na forma de corpo de inclusão, sendo capaz de convertê-los em produtos bioativos solúveis (Sorensen e Mortensen, 2005b) ou utilizá-los na forma insolúvel (Clark, 2001; Middelberg, 2002).

O gene *etx* que codifica a toxina épsilon de *C. perfringens* tipo B foi clonado e expresso em *E. coli* por Hunter *et al.* (1992), que utilizaram o plasmídeo pUC18, e, obtiveram um nível de expressão relativamente baixo, devido à instabilidade do produto, ou, pela transcrição e tradução ineficientes. O gene *etx* de *C. perfringens* tipo D também foi clonado e expresso em *E. coli* por Goswami *et al.* (1996), que expressaram uma proteína ligada à histidina utilizando o plasmídeo pQE 32, na forma de corpo de inclusão. A proteína recombinante obtida por esses autores mostrou-se antigênica e altamente imunogênica.

2.4. Vacinas

O desenvolvimento pioneiro de Jenner, a quase dois séculos, da vacina contra varíola, marcou o início de uma nova era para a medicina moderna. Desde então, a imunoprofilaxia contra doenças infecciosas, tem provado ser um dos melhores métodos custo-efetivo de redução do sofrimento humano e animal, e, das perdas econômicas resultantes das infecções bacterianas e virais. A erradicação da varíola, o sucesso do programa de vacinação contra a poliomielite e a redução da morbidez e mortalidade causadas por doenças infecciosas no homem e animais, são provas contundentes da importância da vacinação.

As doenças causadas por *Clostridium* levam às perdas consideráveis no rebanho, uma vez que o tratamento, na grande maioria dos casos, é impraticável. Além disso, a erradicação das doenças relacionadas a essas bactérias é praticamente impossível, devido às características ecológicas do agente e a sua forma esporulada de resistência.

Neste contexto, para Lobato e Assis (2000a), o controle e profilaxia devem-se basear em medidas adequadas de manejo e em vacinações sistemáticas de todo o rebanho. A eficiência das vacinas clostridiais relaciona-se à natureza do(s) antígeno(s) que as compõem – toxóides e/ou bacterinas, e quando bem elaboradas, oferecem boa proteção aos animais. A

maioria das vacinas comerciais é polivalente, o que na prática visa minimizar o problema de estresse e manejo dos animais confinados, decorrente de múltiplas inoculações, assim como de reações anafiláticas à inoculação de produtos tóxicos, inflamações locais, traumas de inoculação, reações aos adjuvantes, dor e febre.

De acordo com Hatheway (1990), sabe-se que o gene relacionado à produção de toxina, na maioria das espécies patogênicas, está localizado em bacteriófagos ou plasmídeos que infectam a bactéria. Repiques sucessivos das amostras *in vitro* podem levar à perda desses materiais genéticos levando a uma diminuição ou mesmo à perda de toxigenicidade das amostras.

A produção de toxinas pelo *Clostridium* sp. é um dos aspectos mais relevantes a ser considerado na linha de produção de toxóides eficientes. As linhagens utilizadas, a composição dos meios de cultura, pH, tempo, temperatura, atmosfera de incubação são fatores importantes e devem ser rigorosamente controlados para a produção de uma vacina eficiente.

Jansen (1961) e Pivnick e cols (1964; 1965) descrevem que os meios de cultivo para clostrídeos devem conter fontes de aminoácidos utilizáveis, podendo ser sintéticos, com infusão de carne ou pedaços de carne cozida que também propiciam ambiente de anaerobiose. A presença de carboidrato no meio de cultura como fonte de energia pode influenciar o crescimento e a produção de toxinas. Concentrações de glicose entre 1%–2% apresentam melhores resultados de produção. Segundo Rood e Cobe (1991), a presença destes carboidratos favorece a produção de gases como H₂ e CO₂, que por sua vez ajudam a manter o ambiente de anaerobiose. Entretanto, a presença destes gases leva à acidificação do meio, interferindo na produção de toxinas, sendo este um dos pontos críticos na obtenção de culturas altamente tóxicas. O pH do meio utilizado deve ser mantido em torno da neutralidade

para produção de toxinas pela grande maioria dos clostrídios (Smith, 1977).

O período de incubação também é um fator a ser considerado tanto na produção, quanto na estabilidade das toxinas produzidas, como comentado por Sakurai e Duncan (1977), sendo variável de acordo com a espécie envolvida. Por exemplo, a produção máxima de beta toxina por *C. perfringens* tipo C é obtida quando as culturas são incubadas por um período de 4-8 horas e para produção de épsilon toxina por *C. perfringens* tipo D é entre 5-12 horas. Períodos superiores podem levar à degradação das toxinas por ação de outras substâncias produzidas pelo microrganismo.

Segundo Smith (1977), apesar dos clostrídios serem anaeróbios estritos, há uma variação quanto à tolerância de oxigênio, assim, a manutenção da atmosfera de anaerobiose é também um fator preponderante na produção de toxinas, sendo mantida com a utilização de geradores de anaerobiose, misturas gasosas ou meio de cultura contendo extrato de carne.

De acordo com Lobato e Assis (2000b), atualmente, no Brasil, há um incremento na produção e comercialização de vacinas para as clostridioses, em razão de modificações ocorridas nos sistemas criatórios, levando ao surgimento de novas doenças e recrudescimento de outras. No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2004, foram produzidas 150.254.123 doses de vacinas contra clostridioses, sendo que, 123.615.623 foram de vacinas polivalentes com diferentes associações entre *C. sordellii*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* B, C e D, *C. tetani* e *C. botulinum* C e D. Essas vacinas polivalentes contêm de cinco a onze antígenos, sendo que apenas *C. chauvoei* e o toxóide botulínico tipo C e D são controlados oficialmente quanto à esterilidade, inocuidade e potência pelo MAPA, ficando os demais antígenos a critério dos laboratórios produtores (Lobato *et al.*, 2004).

Trabalhos realizados por pesquisadores brasileiros sobre a eficiência de toxóides clostridiais demonstraram a baixa antigenicidade dos produtos testados. Lobato *et al.* (2000b) ao avaliarem a eficiência de toxóides botulínicos dos tipos C e D, comercializados no País, verificaram que nenhum produto foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes suficientes para atender aos requisitos mínimos exigidos no teste de potência. Azevedo *et al.* (1998) testaram a potência de seis vacinas clostridiais, com múltiplos antígenos, que continham em sua composição toxóides contra *C. perfringens* tipos C e D, demonstrando um baixo poder imunogênico dos produtos nacionais disponíveis no mercado. Lobato *et al.* (2000b) avaliaram seis vacinas comerciais contra *C. perfringens* tipos C e D e um toxóide bivalente padrão, constatando que duas vacinas comerciais e o toxóide padrão atenderam aos requisitos exigidos pelo teste de potência em coelhos e, induziram a produção de anticorpos neutralizantes em bovinos vacinados. Balsamão *et al.* (2000) ao avaliarem 11 vacinas comerciais e uma bacterina-toxóide padrão contra *C. sordellii*, verificaram que apenas o padrão e mais três vacinas comerciais atenderam aos requisitos do teste de potência.

As vacinas ditas clássicas, ou seja, aquelas que não possuem a tecnologia recombinante, empregam o cultivo do agente infeccioso para inativá-lo (vacina inativada), ou, para selecionarem mutantes não-infecciosos, através de passagens sucessivas da cultura, que não causam doença, podendo até causar infecções subclínicas (vacina viva modificada).

Neste contexto, o desenvolvimento de novos procedimentos para a produção de vacinas tem despertado o interesse de pesquisadores e empresas de produção de imunobiológicos. Esta possibilidade se torna possível devido aos recentes avanços na imunologia, ao melhor entendimento da patogênese da doença e ao desenvolvimento de novas técnicas, como: a tecnologia do DNA recombinante.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United, 2003) classifica as vacinas recombinantes em quatro categorias: vacinas de subunidades, de genes deletados, vetoriais e de DNA, que estão sendo amplamente pesquisadas para uso tanto em humanos quanto em animais.

Vam Kampen (2001) comenta que avanços científicos trazidos pelo desenvolvimento dessa nova geração de vacinas têm sido implementados. As vacinas de subunidades não possuem o patógeno íntegro, sendo altamente eficazes, seguras e capazes de centralizar a resposta imune a antígenos específicos, relacionados com a proteção imunológica contra a doença, ou seja, não sendo necessário expor o sistema imunológico a uma série de antígenos, além de apresentar uma relação custo-benefício vantajosa. Somando a tudo isto, existe a possibilidade de produção de vacinas combinadas (polivalentes) contra vários agentes patogênicos, com moduladores de resposta imune, para proteger em uma única vacinação contra diferentes doenças, abrindo as portas para essa nova proposta.

Babiuk (1999) comenta que a vacina de subunidade contém somente as proteínas do patógeno que estimulam uma resposta específica do sistema imune, sendo que, atualmente, é possível identificar as proteínas imuno-estimulantes e produzi-las através da tecnologia do DNA recombinante ou, como peptídeos sintéticos. O aumento da segurança e imunogenicidade devido à ausência de componentes imunossupressores, constituem uma das vantagens dessa categoria de vacina. Além disso, uma maior compatibilidade entre as vacinas e, por conseguinte, uma arquitetura vacinal melhorada, a capacidade para atingir o sítio de imunidade e, finalmente, a capacidade de distinção entre o animal vacinado e infectado, também são possíveis com o uso da tecnologia do DNA recombinante.

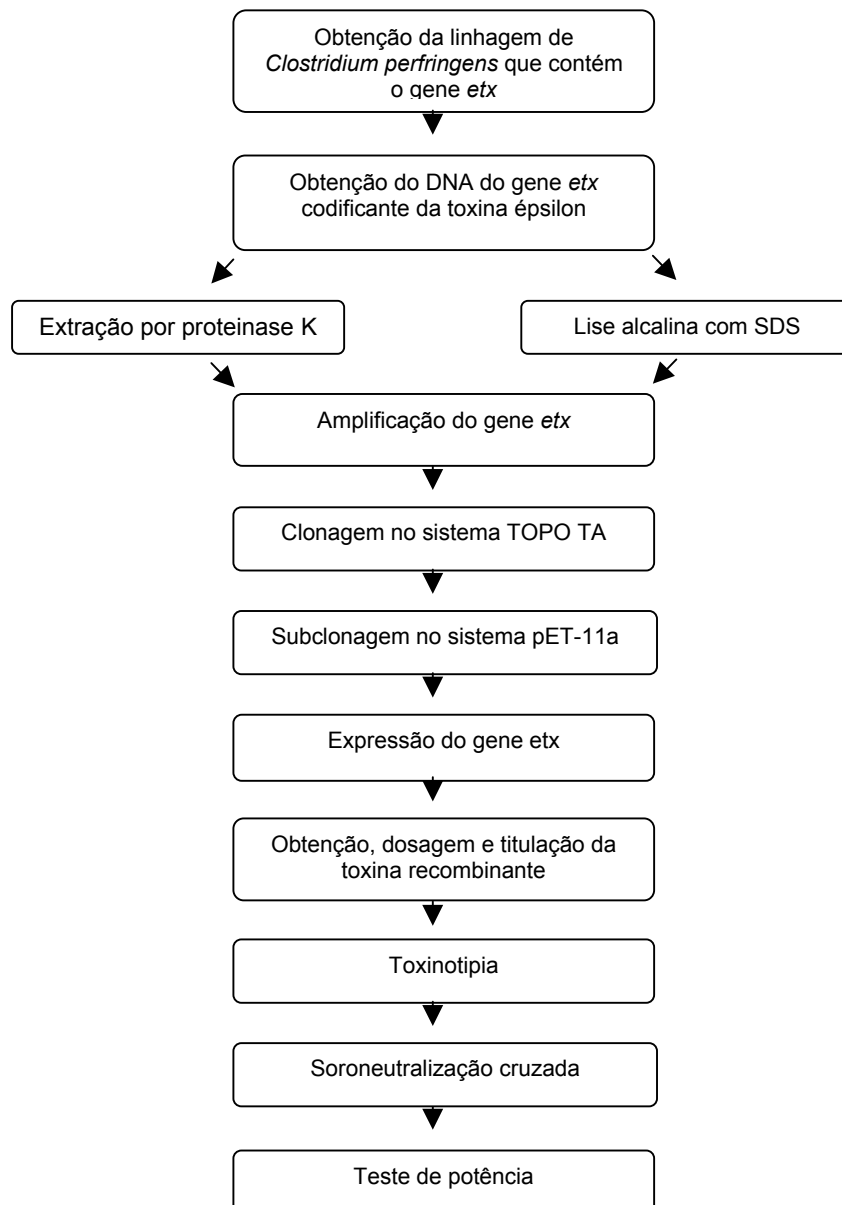
Para Babiuk (1999) e Ellis (1999), a tecnologia recombinante permite produzir vacinas de subunidades em grande escala, tornando-a uma técnica muito mais econômica quando comparada com vacinas

inativadas de componentes sub-celulares extraídos diretamente de microrganismos patogênicos. As principais vantagens desta vacina são: segurança; menor competição antigênica, já que poucos componentes imunogênicos são encontrados na vacina; e, a possibilidade de produzir vacinas contra proteínas importantes comuns para vários membros da mesma família.

No País, atualmente, são comercializadas duas vacinas de subunidades expressas em *E. coli*, uma contra a doença de Lyme em cães, e, outra contra a leucemia felina. Para ruminantes, entretanto, não há nenhuma vacina disponível que emprega essa tecnologia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fluxograma geral do trabalho:



3.2. Local de realização dos trabalhos experimentais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e, no Laboratório de Marcadores Moleculares e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas, ambos na Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3. Animais utilizados

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da raça *swiss*, linhagem *webster*, de ambos os sexos, gentilmente cedidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Pedro Leopoldo/MG, e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, gentilmente cedidos pela Fazenda Experimental “Prof. Hélio Barbosa”, Igarapé/MG.

3.4. Cultivo bacteriano e testes bioquímicos

Foi utilizada, nesse trabalho, a linhagem de *Clostridium perfringens* tipo D (Uzal *et al.*, 1997a) – amostras 34 e U10, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacterioses e Pesquisa do DMVP/EV e, mantidas liofilizadas. Após a reconstituição com meio de cultura BHI (*Brain and Heat Infusion*), foram inoculados 100 µL de cada amostra em 10 mL de caldo tioglicolato (v/v); a incubação foi realizada a 37°C, em jarra de anaerobiose contendo mistura gasosa (80% N₂; 10% CO₂; e 10% H₂), por 24 horas. Foram realizadas coloração de Gram e caracterização bioquímica, por meio dos seguintes testes: maltose, lactose, sacarose, glucose, salicina, leite-ferro, indol, nitrito, tio-gel, conforme descrito por Chief e Chief (1981).

3.5. Produção, titulação e padronização da toxina épsilon nativa

A produção, titulação e padronização da toxina épsilon nativa foram realizadas no Laboratório de anaeróbios do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), em Pedro Leopoldo/MG.

As amostras 34 e U10 de *C. perfringens* tipo D foram testadas quanto à produção da toxina *épsilon* em meio de produção de toxina (Lobato e cols, 2000b). A titulação foi feita em camundongos, após ativação com solução de tripsina 1% (p/v), segundo metodologia descrita por Sebald e Petit (1997), para a determinação da dose letal 50% – DL₅₀ (quantidade de toxina que mata 50% dos animais inoculados). Em seguida, a toxina épsilon foi padronizada no nível de teste L+/10 (menor quantidade de toxina que quando misturada com 0,1 UI de antitoxina padrão homóloga, causará a morte de 50% dos camundongos inoculados), contendo, no mínimo, 20 DL₅₀ em cada L+/10 (European Pharmacopoeia, 1998).

A toxina nativa, titulada e padronizada, foi utilizada como controle durante os experimentos com a toxina recombinante.

3.6. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das amostras 34 e U10 de *C. perfringens* tipo D foi feita utilizando duas metodologias: Método de extração com fenol-clorofórmio (Takeuchi *et al.*, 1997) e Método de lise alcalina com SDS (Sambrook e Russell, 2001). Para a quantificação do DNA extraído utilizou-se uma estimativa em gel de agarose 1% (p/v).

3.7. Reação da cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *etx* nas amostras de *C. perfringens* tipo D

Para detectar a presença do gene *etx* e confirmar que as amostras 34 e U10 são de *Clostridium perfringens* tipo D, realizou-se a PCR descrita por Uzal *et al.* (1997). Foram utilizados os pares de iniciadores para a amplificação dos genes alfa, beta e épsilon:

- alfa: 247pb

senso: 5' TGC TAA TGT TAC TGC CGT TGA TAG 3' – TM (50mM NaCl): 55°C

anti-senso: 5' ATA ATC CCA ATC ATC CCA
ACT ATG 3' – TM (50mM NaCl): 52,6°C

- beta: 1025pb

senso: 5' AGG AGG TTT TTT TAT GAA G
3' – TM (50mM NaCl): 44,8°C

anti-senso: 5' TCT AAA TAG CTG TTA CTT
TGT 3' – TM (50mM NaCl): 46,6°C

- épsilon: 403pb

senso: 5' TAC TCA TAC TGT GGG AAC
TTC GAT ACA AGC 3' – TM (50mM NaCl):
68°C

anti-senso 5' CTC ATC TCC CAT AAC TGC
ACT ATA ATT TCC 3' – TM (50mM NaCl):
65°C

Além dos testes bioquímicos, as amostras foram consideradas como *C. perfringens* tipo D por apresentarem ampliações positivas com os iniciadores alfa e épsilon.

3.8. Amplificação do gene *etx* de *C. perfringens* tipo D por PCR

Com a finalidade de amplificar o gene *etx* das amostras de *C. perfringens* tipo D foi padronizada uma PCR, sendo os iniciadores desenhados com base na seqüência do fragmento de DNA que codifica a toxina

épsilon, depositada no *GeneBank* sob número de acesso AY858558 (HUNTER *et al.*, 1992). Foram desenhados cinco iniciadores – três senso (F) e dois anti-senso (R) cujas seqüências são mostradas abaixo. Para a inserção do fragmento amplificado no plasmídeo pET-11a foi adicionando o sítio de restrição da enzima *Bam*HI à extremidade 5' dos iniciadores F3 e R2.

- senso:

F1- 5' GTCGTAATGTTGGAGCTACCCC
3' – TM (50mM NaCl): 57,6°C

F2- 5' TGAAAGGGTGGTTTTATG 3' – TM
(50mM NaCl): 47,1°C

F3- 5' GCAATCGCATCAGCGGTGATATCC
3' – TM (50mM NaCl): 60,3°C

- anti-senso:

R1- 5' GAACCCTCACGATCTCTTGG 3' –
TM (50mM NaCl): 55°C

R2- 5' CTTATTTTATTCCTGGTGCC 3' –
TM (50mM NaCl): 48,8°C

A localização dos iniciadores no fragmento de DNA que codifica a toxina épsilon é apresentada na figura 1.

```
GATCGTTTTAGTTCTATTTAAATAAACGATTTAATAATAAAAAATTTTTAACTTGGGTTTTGTCGTAATGTTGG
AGCTACCCCAATATAATAAAATTTGTATATTAATAAATTTTATTTATATTTACTTTTTTAAAAAATATAGA
AAAATATAGAAAAATATATTAATTGAAAGGGTGGTTTT | ATGAAAAAAAAATCTTGTA AAAAAGTTAGCAATCGCAT
CAGCGGTGATATCCATCTATTCAATAGTTAATATTGTTTCACCAACTAATGTAATAGCTAAGGAAATATCTAATA
CAGTATCTAATGAAATGTCCAAAAAAAAG . . . . . TATTAAGGCACCAGGAATAAAATAA | GATTATTTATTAGAA
GTAAAAATAAGATTTTAGTTTTATAGATTAATATTAATCTAATAAAAACTCTAATATAGATTTGTATGTAATCT
AATTTTCCTCTTAAAGATAAATTAGACTTTCAAATTTAAACTTTGTAATCTTAAGTCTAATTTGAGAGTGTAATA
ATAGTCTGTGTAAACTAATAA|GATGATATAATTAATATCATATAAAAAGGAGGGTGCACAGACTATATCTTATGC
CGAAAAAGAATTGATAAAACAATAATATAGAGACTGCTGAATATGCTCAAATGTTATTTAAAGTTTTATTTGGT
GGTTTAATTCAACAAATACTTGAAGCTGAAATGGAAGAATATTTAGGATATTTAAATATGATTATTTCAAATAAA
AATACTACTGATTCCTCGTAATTGGGAAAATGAGAAAACGTAAATTTG|ATTTAGATATCCCAAGAGATCGTGAG
GGTTCTTTC . . . . .
```

Legenda: Barra vertical vermelha indica o início e o final do gene; em *itálico* e sublinhado, a seqüência do peptídeo sinal; em **negrito**, a seqüência do peptídeo N-terminal clivado para ativação da prototoxina; as seqüências dos iniciadores estão marcadas em: F1 - laranja; F2 - verde; F3 - amarelo; R1 - rosa; R2 - azul.

Figura 1 – Seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA que codifica a toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D (Hunter *et al.*, 1992).

Foram testadas todas as seis combinações possíveis e o respectivo do tamanho do fragmento amplificado, está descrito abaixo:

- F1R1: 1.569 pb
- F1R2: 1.112 pb
- F2R1: 1.460 pb
- F2R2: 1001 pb
- F3R1: 1420 pb
- F3R2: 960 pb (flanqueado com sítio de *Bam*HI)

Para essa reação foram utilizados: tampão da enzima 1X, 1,7 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 U Taq polimerase, 2,5 pMoles de cada iniciador, 1 µg de DNA molde. A reação foi feita utilizando termociclador MJ Research Inc. – modelo PTC 100 e os parâmetros de amplificação descritos no programa 1:

Programa 1

- 1- 94°C - 3 minutos
- 2- 94°C – 30 segundos
- 3- 56°C - 1 minuto
- 4- 72°C - 1 minuto
- 5- 5 vezes de 2 a 4
- 6- 94°C – 30 segundos
- 7- 52°C – 1 minuto
- 8 – 72°C – 1 minuto
- 9 – 30 vezes de 6 a 8
- 10 – 72° - 5 minutos
- 11 – 4°C - ∞.

Em seguida, foi realizada uma segunda PCR, utilizando as seis combinações de iniciadores, as mesmas concentrações de reagentes e o programa um de amplificação,

utilizando como DNA molde, o produto amplificado na primeira reação com os iniciadores F1R1.

Para obter uma melhor amplificação e definir os parâmetros da reação de PCR foram testadas diferentes temperaturas de anelamento, aumentando e diminuindo em 2°C os passos três e sete do programa um.

3.9. Análise dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e submetidos a um sistema de eletroforese horizontal a 100 volts/150 mA. O gel foi tratado com uma solução de brometo de etídio 1µg/mL, analisado sob luz ultravioleta e fotodocumentado (Sambrook e Russell, 2001).

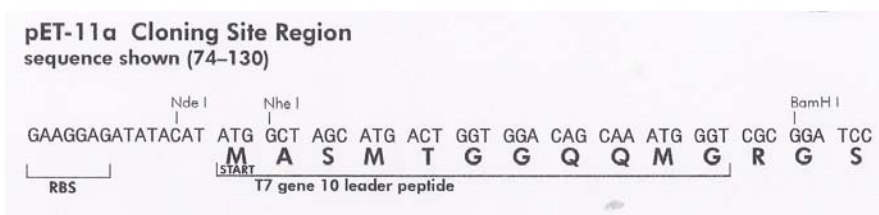
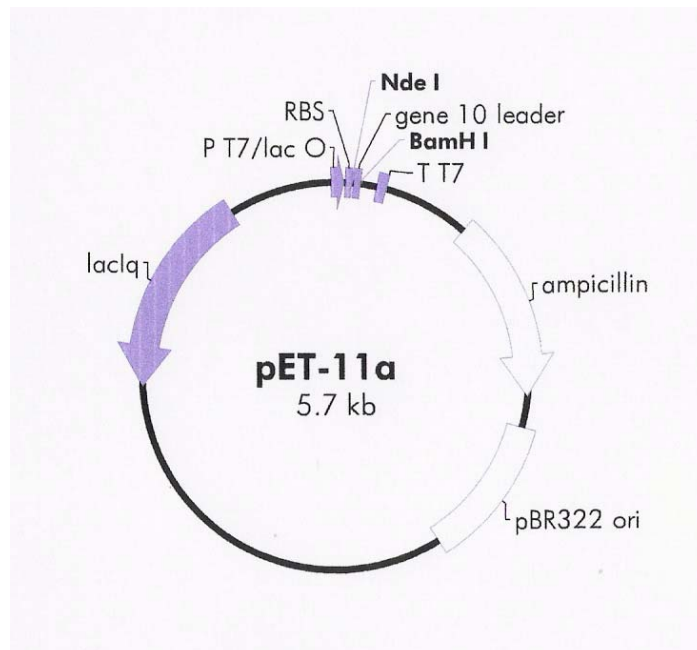
3.10. Purificação dos produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado o kit *DNA Purification System* (Promega, cat. A7170), conforme recomendação do fabricante.

3.11. Estratégia para clonagem e expressão do gene etx

3.11.1. Sistema de expressão

A família de vetores *pET*, desenvolvida originalmente por Studier *et al.* (1990), permite a expressão regulada de genes heterólogos pela RNA polimerase do bacteriófago T7. Estes vetores carregam o replicon da colicina E1 (*colE1*) e conferem resistência a ampicilina ou kanamicina. Seu sítio de clonagem múltipla permite que a sequência codificante inserida seja colocada sob o controle do promotor natural da RNA polimerase de T7 ou promotor *T7lac* (Fig. 2).



Legenda: PT7/lacO: promotor/operator T7/lacO; RBS: sítio de ligação do ribossomo; gene 10 leader: seqüência do gene 10; ampicillin: gene de resistência a ampicilina; pBr322: origem de replicação.

Figura 2 - Esquema do mapa do plasmídeo pET-11a.

3.11.2. Clonagem no sistema TOPO TA

O produto de PCR obtido com os iniciadores F1R1 foi utilizado como molde para uma PCR utilizando novos iniciadores com sítio de restrição de *Bam*HI (F3R2B). O produto final desta reação foi purificado, de acordo com item 3.9 e, foi clonado no vetor Topo TA (kit Topo TA Cloning, Invitrogen).

Para a propagação do plasmídeo com inserto, utilizou-se a linhagem *E. coli* XL1-Blue quimiocompetente, transformada por choque térmico (amostras mantidas em gelo por 30 minutos, seguido por incubação a 42°C, por 90 segundos). Após o

plaqueamento em ágar LB/ampicilina contendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo), foi realizada a incubação a 37°C em aerobiose, por 18 horas. A seleção das colônias foi feita pela diferenciação entre brancas (com inserto) e azuis (sem inserto) (Sambrook e Russell, 2001).

O DNA das colônias selecionadas foi extraído por lise alcalina, conforme descrito por Sambrook e Russell (2001) e realizada a digestão enzimática com *Bam*HI, conforme recomendação do fabricante, para verificação da presença do inserto.

A análise da restrição foi feita em gel de agarose 1% (p/v) (Sambrook e Russell, 2001) e, para a confirmação, os clones sugestivos de conterem o inserto foram utilizados como molde para uma reação de PCR, utilizando o par de iniciadores internos F3R2B, conforme a padronização no item 3.8. Em seguida, o produto de PCR obtido foi purificado a partir do gel de agarose, utilizando o kit *DNA Purification System* (Promega, cat. A7170), conforme recomendação do fabricante, e, usado para a subclonagem no sistema pET-11a.

3.11.3. Preparação do vetor pET-11a para a subclonagem

A propagação do plasmídeo pET-11a foi realizada em *E.coli* XL1-Blue quimiocompetente. Após a lise alcalina, o DNA foi tratado com RNase, e, purificado em gradiente de cloreto de céσιο (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

3.11.4. Subclonagem no sistema pET-11a

O produto de PCR purificado e obtido no item 3.11.2 foi subclonado no plasmídeo pET-11a preparado na etapa anterior. Após a etapa de clonagem, realizada conforme a recomendação do fabricante, *E. coli* XL1-Blue quimiocompetente foi transformada por choque térmico (amostras mantidas em gelo por 30 minutos, seguido por incubação a 42°C, por 90 segundos). O plaqueamento foi feito em ágar LB/ampicilina e as placas foram incubadas a 37°C, por 18 horas e as colônias foram selecionadas aleatoriamente e realizada a lise alcalina (Sambrook e Russell, 2001).

3.11.5. PCR e sequenciamento para confirmação da clonagem

Para a confirmação da presença do inserto no plasmídeo pET-11a, foi realizada uma PCR utilizando o par de iniciadores internos F3R2, e, os parâmetros da reação padronizada no item 3.8., e, a digestão enzimática com *Bam*HI, conforme recomendação do fabricante.

O sequenciamento das amostras positivas foi feito utilizando os sistemas MegaBace (Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e ABI 3130 (Applied Biosystem). As reações foram feitas de acordo com recomendações dos fabricantes. Para o primeiro sistema foi utilizado o *kit Dyenamic Dye Terminator* (código US81090A) e, para o segundo sistema, foi utilizado o kit *Big Dye* versão 3.1, sendo as seqüências analisadas no programa *Sequence Scanner*.

Para sequenciar a construção pET/inserto, no sistema MegaBace, utilizou-se o iniciador M13; no sistema ABI 3130, utilizou-se os iniciadores T7 *promoter* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3') e T7 *reverse* (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

3.11.6. Expressão do gene etx

O plasmídeo contendo o inserto foi utilizado para a transformação da linhagem *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetente por choque térmico (amostras mantidas em gelo por 30 minutos, seguido por incubação a 42°C, por 90 segundos). Após o plaqueamento em ágar LB/ampicilina, foi realizada a incubação a 37°C em aerobiose, por 18 horas. As colônias foram selecionadas aleatoriamente para a indução da expressão utilizando IPTG (Sambrook e Russell, 2001).

A expressão foi analisada no lisado celular em gel de poliacrilamida 12% (T30% - C2,7%) contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*) e *Western blot* (Towbin *et al.*, 1970). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e, para a coloração do gel foi utilizada solução de Azul de Coomassie (Laemmli, 1970). O *western blot* foi realizado utilizando como anticorpo primário, um policlonal de coelho antitoxina épsilon nativa, produzido por Parreiras (2001).

Para avaliar a expressão com relação ao tempo de indução, foi feita uma curva de expressão com 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Uma cultura da bactéria com plasmídeo sem inserto foi utilizada como controle.

Após a indução da expressão, a lise bacteriana foi realizada com lisozima e

submetida a vários ciclos de sonicação (amplitude 40%, três pulsos, 8 segundos) para liberação da proteína recombinante.

Para tentar produzir a proteína recombinante na forma solúvel, a expressão foi realizada a 20°C, e, utilizando IPTG 0,1M. Para efeito comparativo, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) das amostras e, aplicado no gel a mesma quantidade em todos os experimentos.

3.11.7. Solubilização dos corpos de inclusão

A fração insolúvel da proteína recombinante contida em corpos de inclusão foi solubilizada utilizando as seguintes substâncias desnaturantes – NaOH 4,0 N, SDS 10% (p/v), acetato de sódio 3,0 M pH 5,2, tiocianato de guanidina 6,0 M pH6,8, iodeto de sódio 3,0 M, uréia (0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 M).

A análise da solubilização dos corpos de inclusão foi feita em gel de poli(acrilamida) 12% (T30% - C2,7%) contendo SDS. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e, para a coloração do gel foi utilizada solução de Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

3.11.8. Estimativa da dosagem da proteína recombinante

A quantidade de proteína na fração insolúvel foi estimada em gel de poli(acrilamida) 12% (T30% - C2,7%) contendo SDS, comparativamente a quantidades conhecidas de soro albumina bovina (BSA): 5 µg, 10 µg e 20 µg. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e, para a coloração do gel foi utilizada solução de Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

3.12. Titulação da toxina recombinante

Utilizaram-se camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando cerca de 17 a 20 gramas (g); foram utilizados cinco animais por diluição, inoculados 0,2 mL por

via endovenosa. Foram testadas as frações solúveis e insolúveis da toxina recombinante.

As frações foram tratadas com tripsina durante 30 minutos em banho maria 37°C, e, as diluições decimais das amostras foram feitas em salina peptonada 1%. Para controle, foram testadas as frações sem o tratamento com tripsina. O resultado foi calculado pela dose letal que causa 50% de óbito por mililitro (DL₅₀/mL), segundo Reed e Muench (1938).

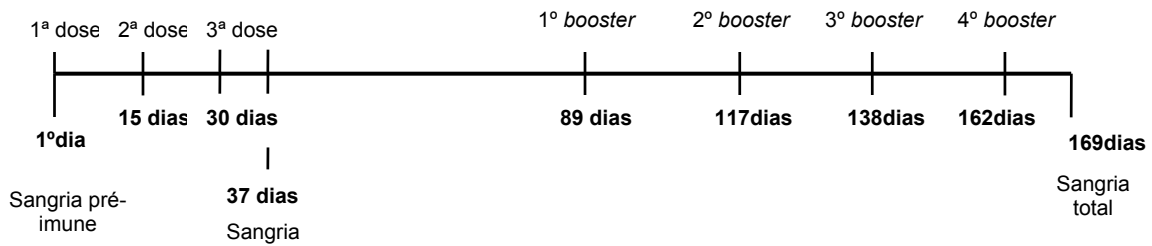
3.13. Preparo do inóculo para imunização

A preparação do inóculo para imunização de coelhos, para a produção de soro antitoxina épsilon recombinante e o teste de potência, foi feita conforme instruções do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBISC), com modificações. Foi utilizada a proporção de uma parte da fração insolúvel para uma parte de suspensão de hidróxido de alumínio (concentração de Al₂O₃ 2,5≥3,5%, pH 5,5-8). A mistura foi mantida sob agitação, em temperatura ambiente, *overnight*.

3.14. Produção de soro antitoxina épsilon recombinante

Foram utilizados coelhos machos, da raça Himalaia, pesando cerca de 2,0 kg, inoculados com a toxina recombinante, contendo 160 µg de proteína recombinante. A administração da vacina foi feita via subcutânea. As sangrias parciais foram realizadas através da veia marginal da orelha, após assepsia local e, para a sangria total, os animais foram anestesiados com zoletil® (20 mg/kg) para a canulação da artéria carótida. A determinação do nível de antitoxinas nos soros dos animais vacinados foi feita pela técnica de soroneutralização em camundongos, descrita no item 3.15.

O esquema de imunização foi realizado de acordo com diagrama abaixo:



3.15. Toxinotipia e soroneutralização cruzada

Para a confirmação do tipo de toxina recombinante produzida, foi utilizada a metodologia descrita por Batty e Glenn (1947) com modificações, que consistiu na mistura de 1,0 mL da fração insolúvel da toxina épsilon recombinante, com 1,0 mL de antitoxina homóloga, produzida contra a toxina épsilon nativa, contendo 1,0 UI/mL. Como controle positivo, 1,0 mL da fração insolúvel da toxina recombinante foi misturado com 1,0 mL de salina peptonada 1% (p/v).

A soroneutralização cruzada foi realizada misturando 1,0 mL da toxina nativa com 1,0 mL (contendo 1,0 UI/mL) da antitoxina recombinante produzida em coelhos, e, misturando 1,0 mL da toxina épsilon recombinante com 1,0 mL (contendo 1,0 UI/mL) da antitoxina nativa produzida em coelhos. Os controles positivos foram preparados misturando 1,0 mL de cada uma das toxinas, nativa e recombinante, com 1,0 mL de salina peptonada 1% (p/v).

Nos dois testes, as misturas toxina-antitoxina e os controles foram mantidos em banho-maria, a 37°C, por 30 minutos, antes da inoculação, e, em seguida, administrado 0,2 mL, por via endovenosa em quatro camundongos. Os animais foram observados por 72 horas e o resultado foi determinado pela sobrevivência dos animais.

3.16. Teste de potência

Foi realizado conforme recomendações da Farmacopéia Européia (European

pharmacopeia, 1998), utilizando oito coelhos saudáveis, machos, de 3–6 meses de idade. A injeção foi feita por via subcutânea, aplicando duas doses do inóculo, sendo a segunda dose aplicada após 21 dias. As sangrias foram realizadas antes das imunizações e após 14 dias da segunda dose, através da veia marginal da orelha, realizando assepsia local. Ao final dos experimentos, os animais foram disponibilizados para doação. Foram utilizados três grupos inoculados com quantidades diferentes da toxina recombinante. Foram aplicados 200, 100 e 50 µg, respectivamente aos grupos I, II e III.

O valor de referência para a aprovação do *pool* de soro, não deve ser menor que cinco UI/mL, segundo recomendação da farmacopéia européia (European pharmacopeia, 1998). A determinação do nível de antitoxinas nos soros dos animais vacinados foi feita por soroneutralização em camundongos, descrita no item 3.15.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivo bacteriano e testes bioquímicos

As amostras de *Clostridium perfringens* tipo D 34 e U-10, quando avaliadas pelo método de Gram, apresentaram-se puras, observando-se somente bastonetes Gram positivos. Os resultados das provas bioquímicas estão apresentados na tabela 1, confirmando ser ambas as amostras *Clostridium perfringens*.

Tabela 1 - Testes bioquímicos das amostras 34 e U10 de *Clostridium perfringens* tipo D.

Testes Bioquímicos	Amostra 34	Amostra U10
Maltose	Positivo	Positivo
Lactose	Positivo	Positivo
Sacarose	Positivo	Positivo
Glicose	Positivo	Positivo
Salicina	Positivo	Positivo
Leite-ferro	Coagulase positiva Produção de gás	Coagulase positiva Produção de gás
Indol	Reativo de Kovac's negativo Ác. Sulfanílico positivo	Reativo de Kovac's negativo Ác. Sulfanílico positivo
Nitrato	Alfa-naftilamina negativo	Alfa-naftilamina negativo
Tio-gel	Negativo	Negativo

4.2. Extração do DNA das amostras 34 e U10 de *C. perfringens* tipo D

O DNA obtido por lise alcalina mostrou-se, em gel de agarose, como uma banda forte e limpa, sem bandas inespecíficas.

A lise alcalina em combinação com o detergente SDS, descrito por Sambrook e Russel (2001), tem sido utilizada a mais de duas décadas para isolamento de DNA plasmidial de *E. coli*. É uma técnica adequada para trabalhar com todas as linhagens de *E. coli* e outras culturas bacterianas fornecendo um DNA de qualidade que pode ser utilizado em vários experimentos. O método de proteinase K também oferece um DNA de boa qualidade, entretanto, o fenol apresenta efeitos adversos à saúde, podendo causar queimaduras graves, além de ser neurotóxico e carcinogênico, exigindo procedimentos rígidos de biossegurança.

Canard e cols (1992) realizando o mapeamento genético para investigar a diversidade genômica e virulência em linhagens de *C. perfringens*, demonstraram que o gene *etx* da toxina épsilon encontra-se em grandes plasmídeos que diferem em tamanho nas diferentes linhagens. Neste contexto, o método de extração de DNA por lise alcalina mostrou-se apropriado para a obtenção do gene *etx* de *C. perfringens* tipo D, fornecendo um material adequado e de boa qualidade para utilização como molde nas reações de PCR, sendo o método

escolhido para a extração de DNA, neste trabalho.

4.3. PCR para detecção do gene *etx*

A detecção do gene *etx* por PCR mostrou que na amostra U10 foram amplificados os genes para as toxinas épsilon e alfa, não apresentando amplificação para o gene da toxina beta, confirmando a presença do gene *etx*, e, a identidade da amostra de *C. perfringens* tipo D. Na amostra 34 foi amplificado somente o gene para a toxina alfa, confirmando ser a amostra de *C. perfringens*, mas sem a presença do gene *etx*.

Os estudos de Blaschek e Solberg (1981), Canard e cols (1992) e Cornillot e cols (1995) demonstraram que o gene *etx* da toxina épsilon encontra-se em plasmídeos, que são elementos genéticos instáveis. As amostras 34 e U10 são provenientes da mesma linhagem, sendo submetidas a repiques sucessivos. Esses procedimentos, assim como condições de cultivo e armazenamento, podem causar mudanças fenotípicas nas amostras, como perda ou aquisição da toxicidade. Essa mudança de biótipo em *C. perfringens* constitui a principal barreira encontrada para a produção da toxina épsilon em larga escala, utilizando linhagens nativas. Diante desses resultados, a amostra 34 foi descartada e somente o DNA extraído da amostra U10, onde foi detectada a presença do gene *etx*, foi utilizada nesse estudo para a obtenção da toxina épsilon recombinante.

4.4. Padronização da PCR para amplificação do gene *etx*

Na padronização para a amplificação do gene *etx*, a melhor reação foi conseguida com uma PCR do tipo *nested*, caracterizada pela utilização de um produto de PCR, com iniciadores mais externos ao gene (F1R1) como molde para uma segunda reação com os iniciadores mais internos (F3R2), obtendo um produto de 972 pb. O aumento em 2°C nas temperaturas de anelamento dos passos três e sete do programa um, descrito no item 3.8., melhoram as condições da reação, resultando na obtenção de uma boa amplificação, sem bandas inespecíficas. O produto de PCR obtido foi purificado e mostrado na figura 3, sendo utilizado para a etapa de clonagem.

A PCR do tipo *nested* é feita por meio do processamento de duas etapas de PCR. Na segunda rodada é utilizado um par de seqüências iniciadoras que reconhecem uma região interna do produto da amplificação da primeira reação. Com isso,

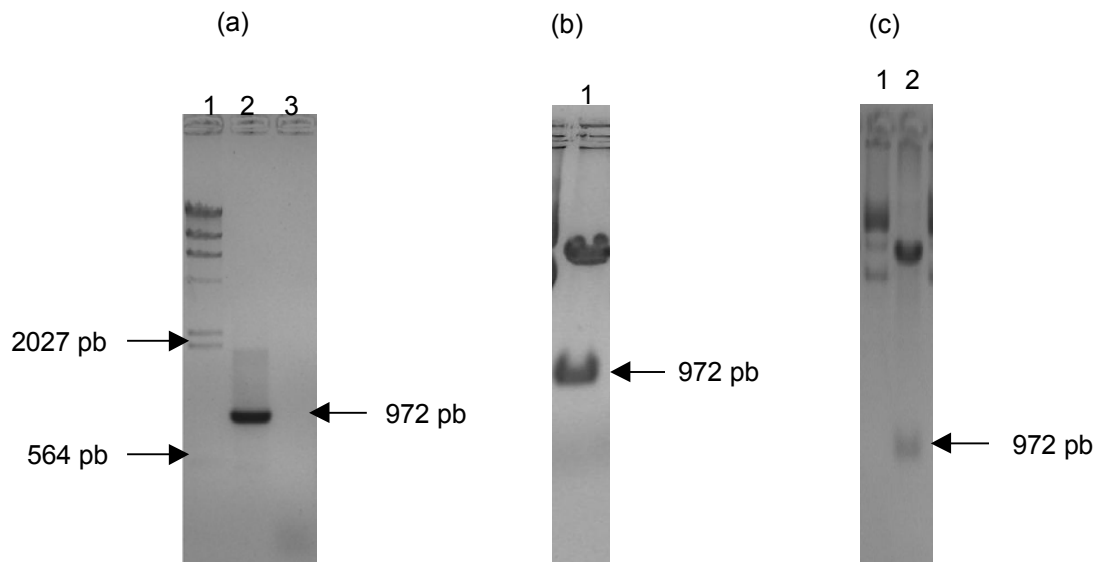
além de ocorrer uma diluição de possíveis moléculas inibidoras presentes na amostra, também ocorrerá um aumento na proporção da seqüência-alvo entre a primeira e segunda etapa da reação, aumentando a sensibilidade da reação e fornecendo um DNA de boa qualidade, que é pré-requisito para o sucesso dos experimentos de clonagem gênica.

4.5. Clonagem e expressão do gene *etx*

4.5.1. Clonagem do gene *etx*

Foram selecionados 30 clones após a transformação da bactéria *E. coli* XL1-Blue com TOPO TA recombinante. Três clones digeridos com *Bam*HI liberaram o fragmento de 972 pb (Figura 3), que após purificação foi subclonado em pET-11a.

Dos 24 clones obtidos após a transformação da bactéria *E. coli* BL21(DE3) com pET-11a recombinante, três foram submetidos à digestão com *Bam*HI para a confirmação da subclonagem e liberaram o fragmento de 972 pb (Figura 3), como esperado.



Legenda: Gel de agarose 1%. (a) 1- padrão de peso molecular; 2- fragmento de 972 pb purificado obtido após a padronização da PCR tipo *Nested*, usando os iniciadores externos F1R1 e, internos F3R2B (com sítio de *Bam*HI); (b) Clonagem em TOPO TA; 1- fragmento de 972 pb liberado após digestão com *Bam*HI; (c) Subclonagem em pET-11a; 1- plasmídeo antes da digestão com *Bam*HI; 2- fragmento de 972 pb liberado após digestão com *Bam*HI

Figura 3 – Clonagem e expressão do gene *etx* de *Clostridium perfringens* tipo D.

Estratégias para a expressão de altos níveis de proteínas heterólogas em bactérias têm sido discutidas por Makrides (1996), Georgiou e Valax (1999) e, Olins e Lee (1993). Devido ao vasto conhecimento sobre sua genética, bioquímica e biologia molecular, *E. coli* tem sido o primeiro sistema de escolha para a expressão de muitas proteínas heterólogas, e, nos últimos anos, várias proteínas recombinantes têm sido expressas nesse sistema.

Como Ausubel e cols (2003) discutem, fatores como tamanho, quantidade e, se a proteína heteróloga é requerida na forma ativa ou não, influenciam a escolha do sistema para a expressão. A estratégia escolhida para a clonagem do gene *etx*, utilizando um vetor de clonagem antes do vetor expressão, teve como objetivo garantir a eficiência da obtenção da proteína recombinante na forma ativa e em grandes quantidades. A *taq* polimerase utilizada na reação de PCR adiciona à extremidade 3' dos produtos amplificados, um resíduo de deoxiadenosina (dA), devido à sua atividade terminal-transferase. O vetor TOPO TA linearizado permite a clonagem direta desses fragmentos de DNA, devido a um resíduo de deoxitirosina (dT) na sua extremidade 3', adjacente a uma seqüência 5'-CCCT-3'. Este arranjo permite o pareamento dos resíduos de dA e dT do produto de PCR e do vetor, respectivamente, sendo essa ligação catalisada pela topoisomerase I, isolada do vírus *Vaccinia*, sem utilização de ligases, sítios específicos de enzimas de restrição ou qualquer outro procedimento pós-PCR, permitindo a clonagem em um único passo. A função biológica da topoisomerase I é clivar e reunir a fita de DNA durante sua replicação, reconhecendo especificamente a seqüência pentamérica 5'-CCCTT-3'. O sítio de clonagem do vetor TOPO, situado dentro do fragmento do gene *lacZ*, que codifica a β -galactosidase, não interrompe a janela de leitura desse gene, permitindo a síntese da enzima ativa. Entretanto, quando um fragmento de DNA é clonado dentro dessa região, a janela de leitura do gene *lacZ* é interrompida, não permitindo sua transcrição. Quando *E. coli* transformada

com TOPO sem inserto é plaqueada em meio contendo X-gal, um análogo da lactose, sua clivagem pela β -galactosidase produz uma substância azul insolúvel, e, as colônias com plasmídeo sem inserto, apresentam a coloração azul. Ao contrário, quando colônias com plasmídeo, contendo o inserto, crescem em meio de cultura com X-gal, a β -galactosidase não é produzida e as colônias são brancas, sendo facilmente distinguidas daquelas colônias azuis, sem inserto.

O sistema pET de vetores, originalmente desenvolvidos por Studier *et al.* (1990) permite a expressão regulada de genes heterólogos pela RNA polimerase do bacteriófago T7. É um poderoso sistema para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. O gene de interesse é clonado no plasmídeo pET sob o controle de forte promotor do bacteriófago T7. A RNA polimerase é tão seletiva e ativa que quase todos os recursos da célula hospedeira são convertidos para a expressão do gene de interesse e, o produto desejado pode compreender mais de 50% das proteínas totais celulares após poucas horas de indução, como estudado por Kelley e cols (1995) que descreveram os parâmetros que afetam a regulação da expressão de proteínas em vetores da família pET. Uma outra vantagem importante desse sistema é a sua habilidade em manter o gene de interesse em "silêncio transcricional" no estado não induzido. Além disso, esses vetores possuem também o gene 10 do bacteriófago T7 que promove um alto nível de transcrição e tradução. A RNA polimerase do bacteriófago é altamente específica para a seqüência do promotor, garantindo que este não será reconhecido pela RNA polimerase da célula hospedeira, promovendo uma tradução altamente eficiente, uma vez que a seqüência codificante do gene de interesse é clonada em *Bam*HI, após o gene 10.

Ainda, no sentido de garantir a eficiência da clonagem, utilizando DNA de boa qualidade, foi realizada a purificação do plasmídeo pET em gradiente de cloreto de céσιο. Essa purificação, apesar de laboriosa, é eficiente

na remoção de RNA, polissacarídeos, proteínas e outros contaminantes da amostra de DNA. Clegg *et al.* (1997) utilizaram esse método para purificar DNA de comunidades bacterianas diretamente do solo, obtendo amostras de excelente qualidade.

Os clones com o fragmento de 972 pb, considerados positivos, foram seqüenciados, e mostraram que o DNA de interesse foi inserido corretamente na janela de leitura do plasmídeo, após o códon de iniciação ATG, como pode ser visto na figura 4. A seqüência obtida neste trabalho, analisada pelo programa *Blastn*, apresentou

100% de homologia com a seqüência do gene *etx* de *C. perfringens* tipo D, depositada no *GeneBank* por Hunter *et al.* (1992).

Goswani *et al.* (1996) descrevem com sucesso a obtenção da toxina épsilon recombinante no sistema *E. coli*, utilizando a clonagem direta no vetor de expressão pQE 32. Apesar do amplo conhecimento acumulado sobre a clonagem e expressão de proteínas recombinantes, cada gene apresenta suas particularidades e, pode mostrar expressão eficiente mesmo com estratégias diferentes.


```

                                rbs
1   G   K   G   N   I   P   L   STO   N   N   F   V   STO   L   STO   E   G
   ggt aag ggg aac att ccc ctc tag aat aat ttt gtt taa ctt taa gaa gga
                                Códon de iniciação
   D   I   H   M   A   S   M   T   G   G   Q   Q   M   G   R   G   S
52  gat ata cat atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgc gga tcc
   Início do gene etx
   A   I   A   S   A   V   I   S   I   Y   S   I   V   N   I   V   S
103 gca atc gca tca gcg gtg ata tcc atc tat tca ata gtt aat att gtt tca
   P   T   N   V   I   A   K   E   I   S   N   T   V   S   N   E   M
154 cca act aat gta ata gct aag gaa ata tct aat aca gta tct aat gaa atg
   S   K   K   A   S   Y   D   N   V   D   T   L   I   E   K   G   R
205 tcc aaa aaa gct tct tat gat aat gta gat aca tta att gag aaa gga aga
   Y   N   T   K   Y   N   Y   L   K   R   M   E   K   Y   Y   P   N
256 tat aat aca aaa tat aat tac tta aag aga atg gaa aaa tat tat cct aat
   A   M   A   Y   F   D   K   V   T   I   N   P   Q   G   N   D   F
307 gct atg gca ttt gat aag gtt act ata aat cca caa gga aat gat ttt tat
   Y   I   N   N   P   K   V   E   L   D   G   E   P   S   M   N   Y
358 tat att aat aat cct aaa gtt gaa tta gat gga gaa cca tca atg aat tat
   L   E   D   V   Y   V   G   K   A   L   L   T   N   D   T   Q   Q
409 ctt gaa gat gtt tat gtt gga aaa gct ctc tta act aat gat act caa caa
   E   Q   K   L   K   S   Q   S   F   T   C   K   A   T   T   T   V
460 gaa caa aaa tta aaa tca caa tca ttc act tgt aaa aat act gat aca gta
   T   A   T   T   T   H   T   V   G   T   S   I   Q   A   T   A   K
511 act gca act act act cat act gtg gga act tcg ata caa gca act gct aag
   F   T   V   P   F   N   E   T   G   V   S   L   T   T   S   Y   S
562 ttt act gtt cct ttt aat gaa aca gga gta tca tta act act agt tat agt
   F   A   N   T   N   T   N   T   N   S   K   E   I   T   H   N   V
613 ttt gca aat aca aat aca aat act aat tca aaa gaa att act cat aat gtc
   P   S   Q   D   I   L   V   P   A   N   T   T   V   E   V   I   A
664 cct tca caa gat ata cta gta cca gct aat act act gta gaa gta ata gca
   Y   L   K   K   V   N   V   K   G   N   V   K   L   V   G   Q   V
715 tat tta aaa aaa gtt aat gtt aaa gga aat gta aag tta gta gga caa gta
   S   G   S   E   W   G   E   I   P   S   Y   L   A   F   P   R   D
766 agt gga agt gaa tgg gga gag ata cct agt tat tta gct ttt cct agg gat
   G   Y   K   F   S   L   S   D   T   V   N   K   S   D   L   N   E
817 ggt tat aaa ttt agt tta tcg gat aca gta aat aag agt gat tta aat gaa
   D   G   T   I   N   I   N   G   K   G   N   Y   S   A   V   M   G
868 gat ggt act att aat att aat gga aaa gga aat tat agt gca gtt atg gga
   D   E   L   I   V   K   V   R   N   L   N   T   N   N   V   Q   E
919 gat gag tta ata gtt aag gtt aga aat tta aat aca aat aat gta caa gaa
   Y   V   I   P   V   D   K   K   E   K   S   N   D   S   N   I   V
970 tat gta ata cct gta gat aaa aaa gaa aaa agt aat gat tca aat ata gta
                                Final do gene etx BamHI
   K   Y   R   S   L   S   I   K   A   P   G   I   K   STP   G   S   G
1021 aaa tat agg agt ctt tct att aag gca cca gga ata aaa taa gga tcc ggc
                                Códon de terminação
   C   STO   Q   S   P   K   S   V   I   C
1072 tgc taa caa agc ccg aaa gaa gtt att tgt

```

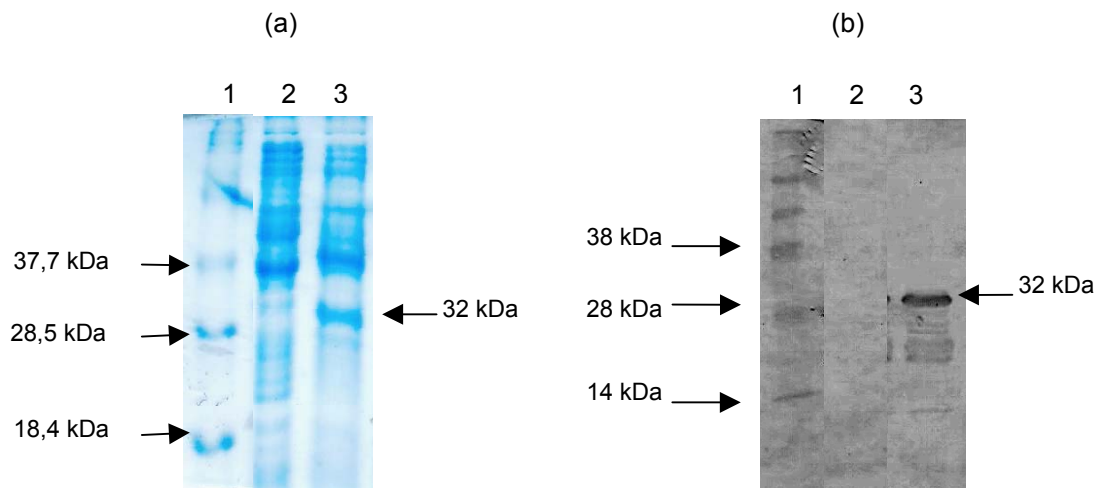
Legenda: Em rosa, destaca-se o sítio de ligação do ribossoma (rbs) do vetor pET-11a; Em vermelho, destaca-se os códons de iniciação e terminação do vetor pET-11a; Em azul, destaca-se o sítio de clonagem *Bam*HI; O início e o final do gene *etx* seqüenciado se encontra entre os nucleotídeos 103 e 1062, respectivamente; Em verde, destaca-se o peptídeo N-terminal clivado proteoliticamente durante a ativação da prototoxina.

Figura 4 – Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento de DNA codificante da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D, subclonado no plasmídeo pET-11a.

4.5.2. Expressão do gene etx

O produto da expressão do gene etx, analisada no lisado celular, foi significativa

quando comparada com o controle, como pode ser visto na figura 5.



Legenda: (a) SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12%; 1- padrão de peso molecular; 2- *E. coli* BL21(DE3) sem plasmídeo/sem inserto após indução; 3- *E. coli* BL21(DE3) recombinante após indução. (b) *Western blot*; 1- padrão de peso molecular; 2- *E. coli* BL21(DE3) sem plasmídeo/sem inserto após indução; 3- *E. coli* BL21(DE3) recombinante após indução.

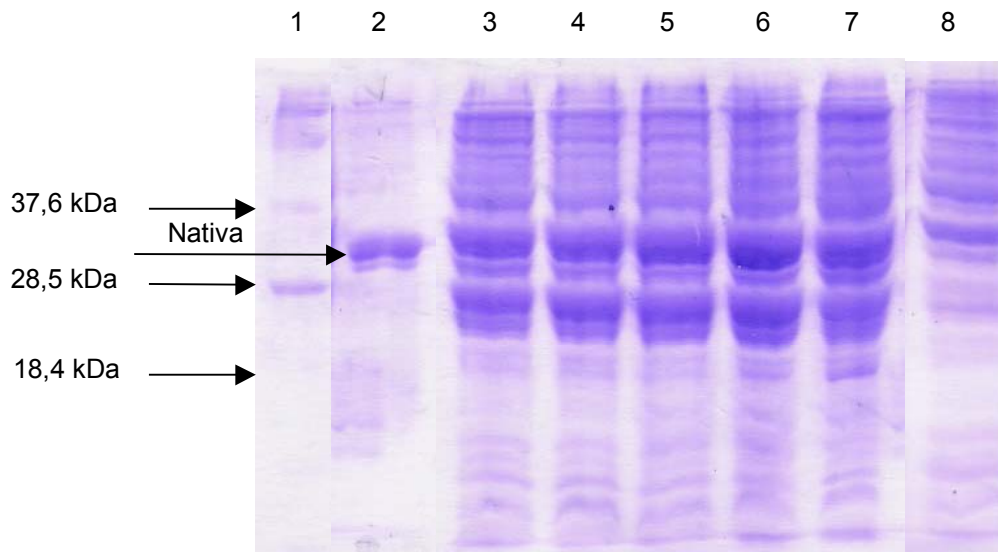
Figura 5 – Expressão do gene etx de *Clostridium perfringens* tipo D no sistema pET-11a.

Após a transferência, houve reação específica com antitoxinas produzidas em coelhos imunizados com a toxina épsilon nativa, mostrando uma identidade antigênica da toxina recombinante com a nativa.

A clonagem e expressão do gene etx que codifica a toxina épsilon, também foi realizada por Hunter *et al.* (1992) e Goswami *et al.* (1996). O primeiro trabalho utilizou o gene etx de *C. perfringens* tipo B, clonado e expresso em *E. coli*, usando como vetor o

plasmídeo pUC18, e, o segundo, clonou o gene etx de *C. perfringens* tipo D diretamente no plasmídeo pQE-32 e o expressaram usando também o sistema *E. coli*, obtendo uma concentração máxima da proteína recombinante com 6 horas após a indução.

Após a avaliação de alguns parâmetros bioquímicos e imunológicos da toxina recombinante obtida neste trabalho, avaliou-se a expressão em relação ao tempo de indução, como mostrado na figura 6.



Legenda: SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12%; 1- padrão de peso molecular; 2- Toxina épsilon nativa; 3-4-5-6-7- *E. coli* BL21(DE3) recombinante após 2, 4, 6, 8, 24 horas de indução, respectivamente; 8- *E. coli* BL21(DE3) sem plasmídeo/sem inserto após 6 horas de indução.

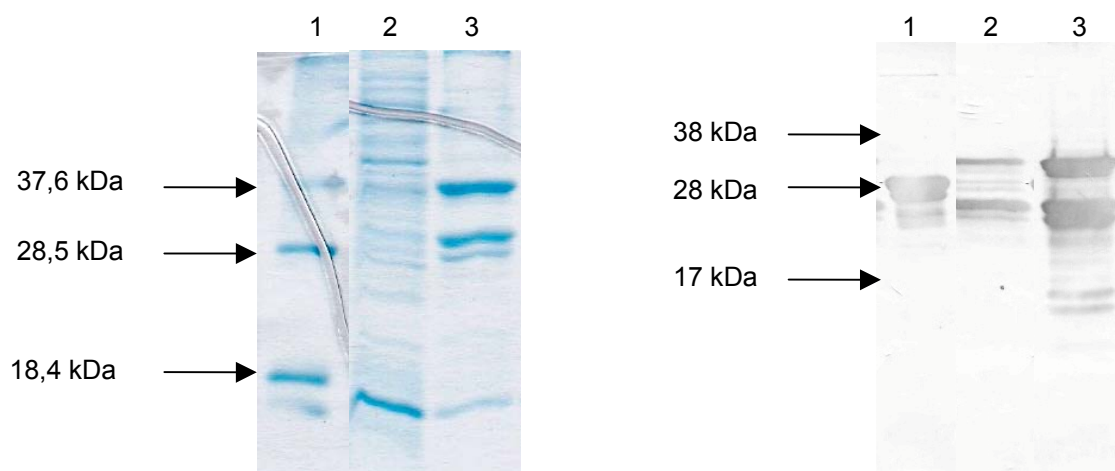
Figura 6 – Expressão do gene *etx* de *Clostridium perfringens* tipo D no sistema pET 11a em relação ao tempo de indução.

Observou-se que a toxina épsilon recombinante foi expressa até 24 horas após a indução, e, atingiu um nível satisfatório de produção com 6 a 8 horas. No processo de otimização da produção dessa toxina recombinante em larga escala, este período de tempo pode ser facilmente assimilado pela indústria.

A expressão de proteína recombinante é um processo que envolve várias tentativas para se obter o melhor resultado e, frequentemente, a principal proposta desta tecnologia consiste na obtenção de altos níveis de produto solúvel, como discutido por Sorensen e Mortensen (2005b) em uma revisão sobre a expressão de proteínas em *E. coli*. Entretanto, nesse sistema procaríoto, uma quantidade significativa de proteína recombinante é produzida contida em

corpos de inclusão, na forma insolúvel, podendo uma outra parte ser expressa também solúvel. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram essas afirmações e mostraram que, após a lise bacteriana, uma grande quantidade da toxina épsilon recombinante ficava retida no *pellet*, contida em corpos de inclusão (Figura 7)

Após a reação de *Western blot*, observa-se uma reação específica das antitoxinas produzidas em coelhos imunizados com a toxina épsilon nativa. Esses resultados confirmam a identidade antigênica da proteína recombinante produzida neste trabalho, com a toxina épsilon nativa, tanto na forma solúvel quanto insolúvel, como mostrado na figura 7.



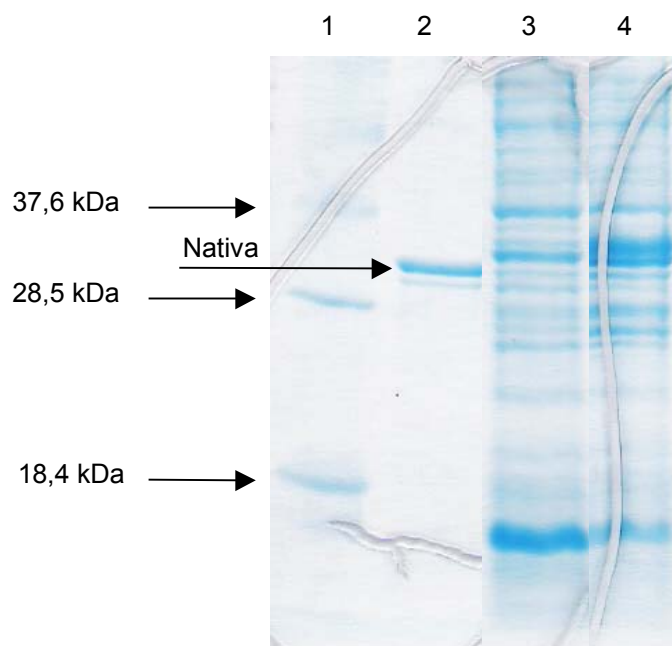
Legenda: (a) SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12%; 1- padrão de peso molecular; 2- sobrenadante contendo a fração solúvel; 3- pellet contendo a fração insolúvel. (b) *Western blot*; 1- padrão de peso molecular; 2- sobrenadante contendo a fração solúvel; 3- pellet contendo a fração insolúvel.

Figura 7 – Expressão do gene *etx* de *Clostridium perfringens* tipo D no sistema pET 11a nas formas solúvel e insolúvel, após a lise bacteriana.

4.6. Obtenção da proteína recombinante na forma solúvel

A formação de corpos de inclusão ocorre como uma resposta ao acúmulo de proteínas desnaturadas no citoplasma da célula hospedeira. Bentley e Kompala (1990) descrevem como a expressão de proteínas heterólogas sobrecarregam o metabolismo da célula hospedeira e, como aumentar a formação de proteína solúvel *in vivo*, controlando alguns parâmetros durante a indução da expressão.

Na tentativa de se obter a toxina épsilon recombinante na forma solúvel, algumas estratégias foram testadas. Quando a temperatura do cultivo foi diminuída de 37°C para 20°C, antes e após a indução, observou-se que parte da proteína estava na forma solúvel, mas a maior parte, ainda continuava no *pellet*, insolúvel, retida em corpos de inclusão, como mostrado na figura 8.



Legenda: SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12%; 1- padrão de peso molecular; 2- toxina épsilon nativa; 3- sobrenadante contendo a fração solúvel; 4- pellet contendo a fração insolúvel.

Figura 8 – Expressão do gene *etx* de *Clostridium perfringens* tipo D no sistema pET 11a a 20°C, antes e após a indução.

Essas estratégias são comentadas por Villaverde e Carrió (2003), Sorensen e Mortensen (2005a) e Sorensen e Mortensen (2005b) que descrevem como a formação dos corpos de inclusão pode ser minimizada por meio do tipo de plasmídeo usado, da linhagem bacteriana, da seqüência da proteína recombinante, da co-expressão de genes que codificam *chaperones* e, das condições do cultivo. A indução da expressão a baixas temperaturas (15-20°C), segundo Sorensen e Mortensen (2005b) e o manual do plasmídeo pET (System Manual, 11th edition, Novagen), pode facilitar a expressão da proteína recombinante na forma solúvel.

A concentração de IPTG usado para induzir o promotor *lac* do vetor pode também influenciar a taxa de expressão, que se for mais lenta, pode facilitar a produção da proteína recombinante na forma solúvel, sobrecarregando menos a maquinaria da célula hospedeira. Sambrook *et al.* (2001)

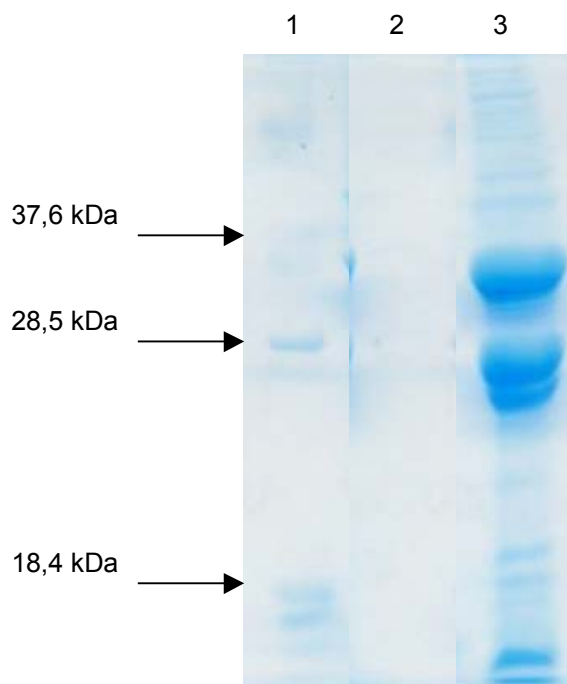
sugerem testar empiricamente várias concentrações de IPTG, começando com 1,0 mM, para estabelecer uma concentração ótima. Neste trabalho, quando a concentração final do IPTG foi diminuída de 0,5 mM para 0,08 mM, observou-se que a maior quantidade da proteína recombinante ainda continuava insolúvel nos corpos de inclusão. Goswani *et al.* (1996), que expressaram o gene *etx* de *C. perfringens* tipo D, usaram uma concentração de IPTG que variou de 1,0 mM a 0,05 mM para induzir a expressão em *E. coli* e, a maior parte da proteína recombinante também ficou retida em corpos de inclusão.

4.7. Solubilização dos corpos de inclusão

Como não se conseguiu obter grandes quantidades da toxina recombinante na forma solúvel, reagentes desnaturantes foram utilizados na tentativa de solubilizá-la. Vários autores descrevem a utilização de agentes desnaturantes para solubilizar os corpos de inclusão, o que pode causar impacto nas etapas subsequentes de renaturação e no custo total do processo. Clark (2001) descreveu a utilização de cloreto de guanidina e uréia, mais comumente utilizados para a solubilização dos corpos de inclusão. O processo se dá devido ao rompimento completo da estrutura primária da proteína ou pelo rompimento de interações intermoleculares, levando a uma desnaturação parcial da proteína. Para este procedimento, foi utilizado NaOH 4,0N, SDS 10% (p/v), acetato de sódio 3,0M pH 5,2, tiocianato de guanidina 6,0 M pH 6,8, iodeto de sódio 3,0 M e uréia 6,0 M. A

solubilização foi parcial quando se utilizou SDS 10% (p/v) e iodeto de sódio 3,0M. Não se observou solubilização, utilizando NaOH 4,0N e acetato de sódio 3,0M. Os melhores resultados, obtendo uma solubilização total dos corpos de inclusão foram utilizando tiocianato de guanidina 6,0 M e uréia 6,0 M.

Quando se comparam esses reagentes desnaturantes em termos de metodologia e custo-benefício, Cho *et al.* (2007), Afzal *et al.* (2007) e Gallucio *et al.* (2007) indicam a utilização da uréia para a solubilização dos corpos de inclusão, como método simples, econômico e eficiente. Para se conseguir uma solubilização adequada e determinar a quantidade mínima do agente desnaturante, optou-se, neste trabalho, em utilizar a uréia e, os resultados utilizando as quantidades que variaram de 0,5 a 6,0 M, mostraram uma solubilização completa somente com uréia 6,0 M, como mostrado na figura 9.



Legenda: SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12% (p/v); 1- padrão de peso molecular; 2- solubilização com salina 0,85% (p/v); 3- solubilização com uréia 6,0 M.

Figura 9 – Solubilização com uréia 6,0 M dos corpos de inclusão obtidos a partir da expressão do gene *etx* de *Clostridium perfringens* tipo D.

Observa-se que na coluna 3, uma banda de 32 kDa correspondente à toxina épsilon, após a solubilização dos corpos de inclusão com uréia 6,0 M. Na coluna 2, utilizou-se salina 0,85% (p/v), como controle do experimento e, não observou-se nenhuma banda na fração solúvel da amostra.

A maioria dos trabalhos demonstra que para se obter, por meio de processos desnaturantes, a proteína solúvel e ativa, é necessário realizar uma etapa posterior de reenovelamento *in vitro*. Como discutido por Villaverde e Carrió (2003), Sorensen e Mortensen, (2005b), Afzal (2007) e Medynski *et al.* (2007), este processo pode afetar a integridade da proteína recombinante obtida, e envolve um empenho grande, de alto custo, com resultados muitas vezes indesejáveis, nem sempre conduzindo a processos úteis para produção em alta escala. Neste contexto, procedimentos de reenovelamento *in vitro* não foram realizados neste trabalho.

Uma vez que os corpos de inclusão podem ser facilmente purificados por repetidas centrifugações a baixas rotações e, em alguns casos, podendo ser utilizados diretamente como antígenos para a produção de anticorpos, como demonstrado por Harlow e Lane (1988). A produção de proteínas recombinantes na forma insolúvel, contida em corpos de inclusão, mantém as características de antigenicidade e imunogenicidade, preservando os epítomos. Além disso, a obtenção dos corpos de inclusão a partir do lisado celular, não demanda processos complicados e onerosos, viabilizando sua utilização em escala industrial.

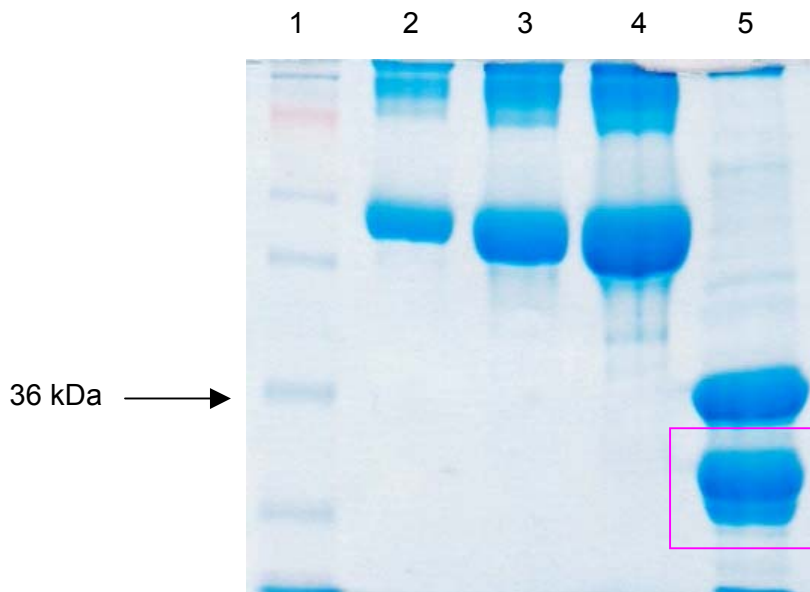
Visto que, nenhuma das estratégias para se conseguir a proteína recombinante na forma solúvel foi satisfatória, e, devido à simplicidade de obtenção e purificação dos corpos de inclusão, o que em termos de custos totais, chega a ser até 80% inferior aos processos mais complexos de purificação de proteínas utilizando resinas

e/ou HPLC (¹), decidiu-se utilizar essa forma insolúvel nos experimentos de imunogenicidade, inocuidade e proteção, que são objetivos desse trabalho.

4.8. Dosagem da toxina recombinante

Para estimar a quantidade de toxina recombinante na forma de corpos de inclusão, os métodos tradicionais (Lowry *et al.*, 1951; Bradford, 1976) não se mostraram viáveis. Foi feita uma comparação entre concentrações conhecidas de BSA com volumes conhecidos da suspensão da toxina na forma insolúvel, em gel de poliacrilamida SDS – PAGE. Observou-se que a toxina épsilon recombinante obtida neste trabalho, após as etapas de lavagens e recuperação dos corpos de inclusão, se apresentou como duas bandas fortes, uma com cerca de 32 kDa, como esperada e, outra de aproximadamente 36 kDa. Considerando a banda esperada de 32 kDa, a concentração estimada, para este trabalho, de toxina recombinante obtida, foi de 10 mg/mL, como mostrado na figura 10. Todavia, investigações futuras deverão esclarecer se a banda de aproximadamente 36 kDa é correspondente a uma variação da proteína recombinante. Neste caso, haveria um acréscimo na concentração de aproximadamente 100%, ou seja, 20 mg/mL.

¹ Comunicação pessoal feita pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis (Laboratório de Marcadores Moleculares e Biotecnologia, ICB, UFMG, 2008).



Legenda: SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12%; 1- Padrão de peso molecular; 2-3-4- BSA: 5 µg, 10 µg e 20 µg, respectivamente; 5- toxina épsilon recombinante.

Figura 10 – Estimativa da dosagem da toxina épsilon recombinante.

Hunter *et al.* (1992) conseguiram uma concentração máxima de toxina épsilon recombinante após 6 horas de indução e, o nível de toxina foi estimado entre 5 a 25 µg/mL de cultivo, valores ligeiramente menores ao obtido neste trabalho.

4.9. Titulação da toxina épsilon recombinante

As frações solúvel e insolúvel da toxina épsilon recombinante foram tituladas em camundongos e os resultados obtidos foram de $12,5 \times 10^2$ e 25×10^2 DL₅₀/mL, respectivamente.

Os títulos da toxina obtidos neste trabalho foram muito superiores àqueles obtidos com a toxina nativa como demonstrado por Azevedo (1997), que produziu a toxina nativa utilizando diferentes meios de cultura e métodos para concentrá-la, obtendo um título máximo de $8,0 \times 10^2$ DL₅₀/mL, que foram ainda superiores aos obtidos por El Idrissi e Ward (1992) que trabalharam com toxinas purificadas.

Tradicionalmente, a atividade da toxina épsilon é determinada usando o teste de letalidade em camundongos, como descrito por Rood *et al.* (1997). Neste trabalho, uma DL₅₀, determinada em camundongo equivaleu a 4.000 ng da fração insolúvel da toxina épsilon recombinante. Payne *et al.* (1994), ao titularem a toxina épsilon nativa purificada, determinou que em uma DL₅₀ continha 78 ng da proteína, valor 51 vezes inferior ao encontrado, que foi de 4.000 ng. Pode-se inferir que a toxina recombinante foi menos tóxica, sendo inclusive empregada na imunização dos coelhos sem passar por um processo de destoxificação. Esta observação foi também feita por Harlow e Lane (1988), em relação à proteína na forma insolúvel retida em corpos de inclusão, podendo a mesma ser empregada diretamente na imunização de animais.

4.10. Produção de soro antitoxina épsilon recombinante

Os níveis de antitoxina épsilon recombinante em soro de coelhos imunizados, utilizando como adjuvante

suspensão em hidróxido de alumínio, com a toxina épsilon recombinante, mostrou conter após três doses, aos 37 dias, um título de 30 UI/mL. Após mais quatro doses, aos 169 dias, o título chegou a 80 UI/mL (Fig. 11).

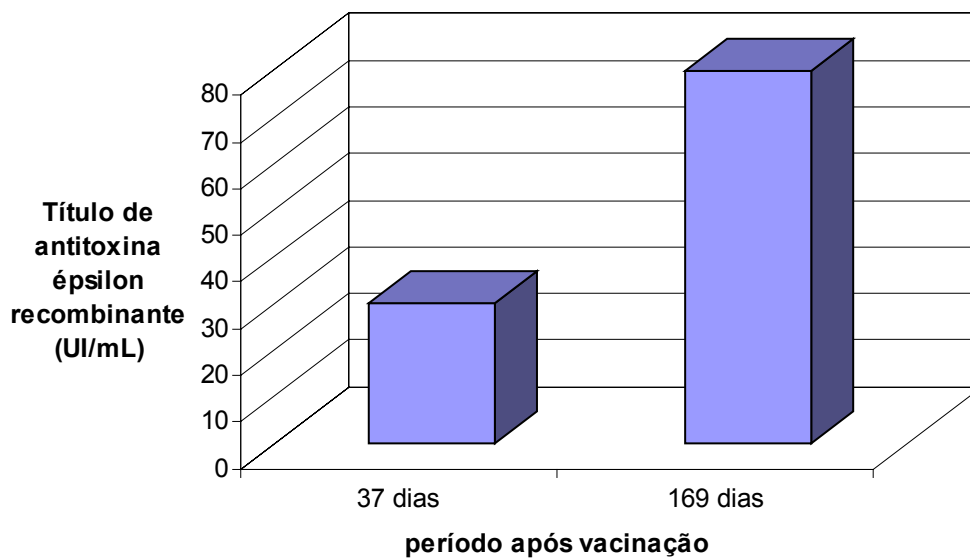


Figura 11 – Níveis de antitoxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em soro de coelhos imunizados com a toxina épsilon recombinante, aos 37 dias e 169 dias.

Esses resultados mostram que a toxina épsilon recombinante foi eficiente em produzir uma boa resposta imunológica em coelhos. Acredita-se que, com o esquema de imunização feito com adjuvante completo e incompleto de Freund, e, possivelmente, associado aos métodos de purificação dos anticorpos, os títulos obtidos seriam expressivamente superiores aos encontrados.

4.11. Toxinotipia e soroneutralização cruzada

O tipo da toxina recombinante foi confirmado ser épsilon, pela neutralização com uma antitoxina padrão homóloga. O teste de soroneutralização cruzada mostrou que todos os camundongos inoculados com

a mistura toxina recombinante e antitoxina nativa, e, toxina nativa e antitoxina recombinante, sobreviveram. Todos os animais inoculados com as misturas-controle morreram. Esses resultados confirmam a identidade antigênica da toxina épsilon recombinante produzida neste trabalho, com a toxina épsilon nativa.

As alterações patológicas e fisiológicas, após a inoculação da toxina épsilon recombinante, produzidas em camundongos, geraram sintomas neurológicos característicos da toxina épsilon nativa, corroborando com os resultados bioquímicos e imunológicos, obtidos neste trabalho.

Estes resultados foram obtidos também por Goswani *et al.* (1996), que produziram uma toxina épsilon recombinante que foi reconhecida por anticorpos monoclonais antitoxina épsilon nativa, mostrando também uma identidade antigênica com a toxina nativa, e, o soro policlonal produzido em coelhos imunizados com essa toxina

recombinante, reconheceu tanto a recombinante quanto a nativa.

4.12. Teste de potência

Os resultados dos testes de potência da toxina épsilon recombinante obtida neste trabalho estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Níveis de antitoxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em pool de soros de coelhos imunizados com a toxina épsilon recombinante.

Grupo/ quantidade de toxina inoculada	Título de antitoxina épsilon recombinante (UI/mL)	
	Pré-imunização	32 dias
I /200 µg	ND*	40
II /100 µg	ND*	30
III / 50 µg	ND*	10

*ND – título de antitoxina não detectado

O grupo I, imunizado com 200 µg da toxina recombinante, apresentou título de 40 UI/mL; o grupo II, imunizado com 100 µg, apresentou título de 30 UI/mL; e, o grupo III, imunizado com 50 µg, apresentou título de 10 UI/mL. Observa-se que os níveis de anticorpos neutralizantes obtidos apresentaram uma relação direta com a concentração da proteína recombinante empregada em cada grupo.

Considerando os níveis mínimos de aprovação de antitoxina épsilon de 5 UI/mL, pela Farmacopéia Européia, e de 2 UI/mL, pelo CFR, os níveis de anticorpos neutralizantes obtidos com a dose de 50 µg de toxina recombinante, a menor utilizada neste trabalho, ainda foram 2 vezes superiores àquele exigido pela Farmacopéia Européia e, 5 vezes superiores ao exigido pelo *Code Federal Regulation* (CFR). No Brasil, o teste de potência exigido pelo MAPA para a aprovação do toxóide épsilon é o mesmo valor exigido pelo CFR, o que permitiria a utilização de níveis mais baixos da proteína recombinante. Os níveis de proteína empregados foram inferiores aos recomendados na preparação de referência internacional do toxóide épsilon de *C. perfringens*, utilizada para a padronização de vacinas contendo o toxóide épsilon, recomendada pelo *National Institute for*

Biological Standards and Control (NIBISC). Cada dose de toxóide épsilon contém 9.192 µg da toxina nativa. Comparando esta quantidade com a menor dose utilizada neste trabalho, 50 µg, observa-se que foi utilizado uma quantidade 184 vezes menor que a contida no padrão de referência internacional, elicitando uma boa resposta nos animais imunizados.

Neste estudo, após processos de lavagem por centrifugação, com um litro da cultura obteve-se uma concentração aproximada de 10.000 µg de toxina épsilon recombinante, o que seria teoricamente suficiente para produzir 200 doses do toxóide. Entretanto, o rendimento de proteína recombinante por litro de cultura, ainda poderia ser incrementado. De acordo, com resultados anteriores de expressão de outras proteínas, obtidos pelo Laboratório de Marcadores Moleculares e Biotecnologia (ICB/UFMG), o rendimento máximo, usando o sistema pET-11a, já alcançou níveis de expressão em torno de 50 mg/litro de cultura, o que daria um rendimento de aproximadamente cinco vezes o obtido neste trabalho.

Os títulos de antitoxina produzidos contra a toxina épsilon recombinante foram significativamente superiores aos obtidos

com vacinas comerciais produzidas a partir da toxina nativa. Azevedo (1997) vacinou coelhos utilizando seis vacinas polivalentes comerciais contendo *C. perfringens* tipo D e obteve níveis de antitoxinas épsilon de 9,0 UI/mL em *pool* de soro de coelhos, coletados aos 35 dias após a aplicação de duas doses, para uma única vacina. As outras cinco vacinas não apresentaram níveis detectáveis de antitoxina sérica. Quando a imunização foi feita utilizando o toxóide padrão, o título sorológico foi 15 UI/mL, aos 35 dias, após a vacinação.

Outros estudos que testaram a eficiência das vacinas comercializadas no Brasil, mostraram resultados semelhantes aos de Azevedo (1997), com títulos de antitoxina mais baixos em relação aos obtidos com a toxina épsilon recombinante produzida neste trabalho. Dholakia *et al.* (1980) vacinaram coelhos com uma vacina comercial e obtiveram títulos de antitoxina épsilon de 4,0 UI/mL, aos 35 dias após a segunda dose. Lobato *et al.* (2000a) avaliando a resposta imune contra seis vacinas polivalentes comerciais e toxóide padrão em coelhos, obtiveram títulos de 5, 6 e 7,0 UI/mL, somente para duas das vacinas testadas. As outras não apresentaram níveis detectáveis de antitoxinas, enquanto o toxóide padrão mostrou um título de 45,2 UI/mL.

As doenças causadas por *Clostridium* levam a perda considerável no rebanho, uma vez que o tratamento, na grande maioria dos casos, é impraticável. Além disso, a erradicação das doenças relacionadas a essas bactérias é praticamente impossível, devido às características ecológicas do agente e a sua forma esporulada de resistência. O controle e profilaxia das clostridioses devem-se basear em medidas adequadas de manejo e em vacinações sistemáticas de todo o rebanho.

De acordo com os últimos dados disponíveis do Instituto Brasileiro de Geografia (www.sidra.ibge.gov.br), o Brasil possui um efetivo bovino de cerca de 205.886.244 cabeças, 10.401.449 cabeças de caprinos e 16.019.170 de ovinos, no ano de 2006, sendo um dos principais mercados

consumidores de vacinas contra clostridioses no mundo. Como discutido por Lobato e Assis (2000b), em relação às vacinas clostridiais, não há controle oficial que ateste quanto à inocuidade, esterilidade e potência de todos os antígenos presentes nas vacinas, com exceção de *C. chauvoei* e o toxóide botulínico tipos C e D, que são sistematicamente avaliados pelo MAPA, sendo a qualidade dos demais antígenos, deixados a cargo das próprias indústrias.

A vacinação contra enterotoxemia causada por *C. perfringens*, desde que realizada com vacinas comprovadamente eficientes, é a forma de profilaxia indicada para se evitar os prejuízos econômicos causados pela doença, pois os animais estão sujeitos à infecção em todas as etapas de sua vida reprodutiva, como mostrado por Lobato *et al.* (2000b).

O processo de produção de vacinas para saúde animal tradicionalmente se baseia em vacinas inativadas ou vivas atenuadas. A partir dos anos 70, estudos utilizando a biologia molecular abriram as portas para novas tecnologias de produção de vacinas, as vacinas recombinantes. O mercado veterinário já dispõe de vacinas com tecnologia recombinante para algumas doenças e estas podem oferecer um novo perfil de eficiência contra as enfermidades dos animais. Dados publicados pela Merial Saúde Animal (Últimas, 2007) mostram a eficácia de vacinas recombinantes, já disponibilizadas pela indústria veterinária, produzidas contra leucemia felina e cinomose.

A toxina recombinante produzida neste trabalho se mostrou uma forte candidata para a produção de uma vacina contra enterotoxemia causada pela toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D. O sistema utilizado para a produção da toxina recombinante em *Escherichia coli* permite trabalhar em condições aeróbicas, e, a utilização direta da fração insolúvel da toxina recombinante apresenta a vantagem de diminuir os custos de produção, evitando processos de purificação e concentração da proteína, além de ser eficiente na estimulação de bons níveis sorológicos de antitoxina em

animais, podendo ser o sistema melhorado conforme as necessidades e demandas da indústria.

5. CONCLUSÕES

A estratégia de clonagem e expressão de gene *etx*, que codifica a toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D, em *Escherichia coli*, apresentou-se eficiente, produzindo altas concentrações de toxina recombinante, com identidade antigênica e farmacológica frente à toxina nativa.

A toxina épsilon recombinante produzida neste trabalho foi imunogênica, induzindo altos níveis de anticorpos em animais vacinados, mostrando-se forte candidata a uma vacina contra enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* tipo D.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliação da resposta imunológica da toxina épsilon recombinante, produzida neste trabalho, nas espécies-alvo: caprinos, ovinos e bovinos.

Produção de outras toxinas recombinantes de *Clostridium perfringens*, como as toxinas alfa e beta, com o objetivo de preparar vacinas polivalentes contra enterotoxemias produzidas por essa bactéria.

Estudo imunológico do *pool* de proteínas recombinantes em animais.

Otimização do processo de produção da toxina épsilon recombinante em escala industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A.J.; LIGHTFOOT, D.A. Soybean disease resistance protein RHG1-LRR domain expressed, purified and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies: preparation for a functional analysis. *Protein Expr. Purif.*, v. 53, n.2, p.346-55, 2007.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E., *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, Inc., 2003.

AWAD, M.M.; BRYANT, A.E.; STERENS, D.L.; Virulence studies on chromosomal α -toxin and θ -toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of α -toxin in *Clostridium perfringens* mediated gas gangrene. *Mol. Microbiol.*, v.15, p.191-202, 1995.

AZEVEDO, E.O. Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. 1997. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais.

AZEVEDO, E.O.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V. *et al.* Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arq. Brasil. Med. Vet. e Zootecnia*, v.50, n.3, p.239-242, 1998.

BABIUK, L.A. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine*, v.17, p.1587-95, 1999.

BALSAMÃO, G.M.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. *et al.* Evaluación de la potencia de vacunas contra *Clostridium sordellii*. In: XXI WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2000, Punta del Este. ANAIS DEL XXI WORLD BUIATRICS CONGRESS, Punta del Este: 2000. p.117.

BATTY, I.; GLENNY, A.T. Titration of *Clostridium welchii* epsilon-toxin and antitoxin. *Br. J. Exp. Pathol.*, v.28, p.110-126, 1947.

BENTLEY, W.E.; KOMPALA, D.S. Optimal induction of protein synthesis in recombinant bacterial cultures. *Ann. N. Y. Acad. Science*, v. 589, p.121-138, 1990.

BLASCHEK, H.P.; SOLBERG, M. Isolation of a plasmid responsible for caseinase activity in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, v.147, p.262-266, 1981.

- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- CABRITA, L.D.; DAI, W.; BOTTOMLEY, S.P. A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnology*, v.6, n.12, p.1-8, 2006.
- CANARD, B.; SAINT-JOANIS, B.; COLE, S.T. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.*, v.6, p.1421-29, 1992.
- CARRIÓ, M.M.; CUBARSÍ, R.; VILLAVARDE, A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS LETT.*, v.471, n. 1, p.7-11, 2000.
- CHALMERS, J.; KIM, E.; TELFORD, J.N. *et al.* Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl. Environment. Microbiol.*, v.56, n.1, p.104-111, 1990.
- CHIEF Jr., V.R.D.; CHIEF, T.M.H. *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology*: Atlanta, Georgia: CDC Laboratory Manual, US. Department of Health and Human Services, 1981.
- CHO, D.; SHIN, S.; TALAAT, A.M. Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Protein expression and purification*, v.53, n.2, p.411-20, 2007.
- CLARK, E.B. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, v.12, p.202-207, 2001.
- CLEGG, C.D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.25, n.1, p.30-3, 1997.
- COLE, A.R., GIBERT, M., POPOFF, M. *et al.* *Clostridium perfringens* ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nature Structural & Molecular Biology*, v.11, n.8, p.797-798, 2004.
- CORNILLOT, E., SAINT-JOANIS, B., DAUBE, G. *et al.* The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol. Microbiol.*, v.140, p.97-104, 1995.
- DHOLAKIA, P.M.; SAXENA, S.P.; DHAWEDKAR, R.G. Observations on the comparative efficacy of alum precipitated and aluminium hydroxide gel adsorbed toxoids against *Clostridium welchii* type D. *Indian Vet. J.*, v.57, p.875-878, 1980.
- EL IDRISSE, A.H.; WARD, G.E.; JOHNSON, D.W. *et al.*, Bacteriological investigation of sudden sheep mortality in Morocco. *Prev. Vet. Med.*, v.12, p.35-46, 1992.
- ELLIS, R.W. New technologies for making vaccines. *Vaccine*, v.17, p.1596-604, 1999.
- EUROPEAN pharmacopeia. 3.ed. Saint Ruffine: Maisonneuve S.A., 1998.
- FORRER, P.; JAUSSE, R. High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* by fusion to the bacteriophage lambda head protein D. *Gene*, v.224, p.45-52, 1998.
- GALLOWAY, C.A.; SOWDEN, M.P.; SMITH, H.C. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques*, v.34, n.3, p. 524-526, 2003.
- GALLUCIO, M., BRIZIO, C., TORCHETTI, E.M. *et al.* Over-expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of isoform 2 of human FAD synthetase. *Protein Expression and Purification*, v.52, p.175-181, 2007.

- GEORGIU G.; VALAX, P. Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol.*, v.309, p.48-58, 1999.
- GOSWANI, P.P.; RUPA, P.; PRIHAR, N.S. *et al.* Molecular cloning of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its high level expression in *E. coli*. *Bioch. And Bioph. Res. Communications*, v.226, p.735-40, 1996.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies, a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988. 956p.
- HATHEWAY, C.L. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, n.1, p.66-98 1990.
- HAVARD, H.L.; HUNTER, S.E.; TITBALL, R.W. Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of *Clostridium perfringens* type B and Type D. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.76, p.77-81, 1992.
- HELWIG, D.M.; THOMAS, J.H.; WILLIAMS, L.G. The bovine enterotoxaemia complex. Its aetiology, antibody response to vaccination and problems in diagnosis. *Aust. Vet. J.*, v.43, n.9, p.364-7, 1967.
- HUNTER, S.E.; CLARKE, I.N.; KELLY, D.C. *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infection immun.*, v.60, p.102-110, 1992.
- HUNTER, S.E.C.; BROWN, J.E.; OYSTON, P.C.F. *et al.* Molecular genetic analysis of beta toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v.61, p.3958-65, 1993.
- JANSEN, B.C. The beta toxin of *C. welchii* type B, Wildosn, in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. *Onderstepoort Journal Veterinay Research*, v.28, n.4, p.495-549, 1961.
- KELLEY, K.C.; HUESTIS, K.J.; AUSTEN, D.A. *et al.*, Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. *Gene*, v.156, n.1, p.33-36, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-686, 1970.
- LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. Controle e profilaxia das clostridioses. *Hora Veterinária*, ano 19, n.113, p.29-33, 2000a.
- LOBATO, F.C.F.; MORO, E.; UMEHARA, O. *et al.* Avaliação da resposta de antitoxinas beta e epsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arq. Brasil. Méd. Vet. Zootecnia*, v.52, n.4, p.313-318, 2000b.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p. 265-275, 1951.
- MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, v.60, n.3, p.521-538, 1996.
- MEDYNSKI, D.; TUAN, M.; LIU, W. *et al.* Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, v. 52, n. 2, p.395-402, 2007.
- ÚLTIMAS notícias sobre as vacinas recombinantes. *Webvet Merial*. Disponível em: www.merial.com.br. Acessado em: 15/11/2007
- MIDDELBERG, A.P.J. Preparative protein refolding. *Trends in biotechnology*, v.20, n.10, p.437-443, 2002.
- MISAWA, S.; KUMAGAI, I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers*, v.51, n.4, p. 297-307, 1999.

- MURBY, M.; SAMUELSON, E.; NGUYEN, T.N. *et al.* Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. *Eur. J. Biochem.*, v.230, n.1, p.38-44, 1995.
- OLINS, P. O.; LEE, S. C. Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.4 n. 5, p.520–525, 1993.
- PARREIRAS, P.M.; LOBATO, F.C.F. *ELISA competitivo para detecção de imunoglobulina antiprototoxina épsilon produzida pelo Clostridium perfringens tipo D*. 2001. 44fls. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PAYNE, D.W.; WILLIAMSON, E.D.; HAVARD, H. *et al.* Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.116, p.161-167, 1994
- PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOQUET, P. *et al.* Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.61, p.5147-56, 1993.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; GILLET, D. *et al.* *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J. Bacteriol.*, v.179, n.20, p.6480-87, 1997.
- PETIT, L.; MAIER, E.; GIBERT, M. *et al.* *Clostridium perfringens* epsilon-toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.15736-40, 2001.
- REED, R.H., MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-497, 1938.
- ROOD, J.I.; COBE, S.T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, v.55, n.4, p.621-648, 1991.
- ROOD, J.I.; McCLANE, B.A.; SONGER, J.G. *et al.* *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997, 533p.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C.L. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Infect Immun.*, v.18, n.3, p.741–45, 1977.
- SAMBROOK J.; RUSSEL D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 720p.
- SEBALD, M.; PETIT, J.C. Group identification. In: *Laboratory methods anaerobic bacteria and their identification*, 2. ed. Paris: Institut Pasteur, 1997, p.189-197.
- SMITH, L.D.S. Botulism: the organism, it's toxins, the disease. Illinois: Charles C. Thomas, 1977. 236p.
- SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.2, n.2, p.216-234, 1996.
- SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechn.*, v. 115, p.113-128, 2005a.
- SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, v.4., n.1, p. 1-8, 2005b.
- STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J. *et al.* Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, v.185, p.60-89, 1990.

TAKEUCHI, S.; HASHIZUME, N.; KINOSHITA, T. *et al.* Detection of *Clostridium septicum* chemolysin gene by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Science*, v.59, n.9, p.853-855, 1997.

UNITED States Department of Agriculture. *Veterinary Services Memorandum number 800.205: General Licensing Considerations. Biotechnology-delivery Veterinary Biologics Categories I, II and III.* United States of América, 2003, 4p.

UZAL, F.A.; GLASTONBURY, J.R.; KELLY, W.R. *et al.* Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. *Vet. Rec.*, v.141, n.9, p.224-6, 1997.

VAN KAMPEN, K.R. Recombinant vaccine technology in veterinary medicine. *Vet. Clin. North Am.*, v.31, n.3, p. 535-38, 2001.

VILLAVERDE A.; CARRIÓ, M.M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, v.25, p.1385-1395, 2003.

WALL, J. G.; PLÜCKTHUN, A. Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.6, p.507-516, 1995.

WORTHINGTON, R.W.; MULDER, M.S. Physical changes in the epsilon prototoxin molecule of *Clostridium perfringens* during enzymatic activation. *Infect Immun.*, v.18, p.549-551, 1977.

YOKOHAMA, S. Protein expression system for structural genomics and proteomic. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.7, p.39-43, 2003.