

Guilherme Guerra Alves

**MAPEAMENTO DOS EPITOPOS DA TOXINA ÉPSILON DE *Clostridium perfringens* TIPO D E PRODUÇÃO DE IMUNÓGENOS DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2013







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

Aos meus irmãos, Juliano Guerra Alves e Rafael  
Guerra Alves, pela amizade incondicional e por  
serem muito importantes em minha vida;

À Larissa Matos Mattioli, pelo amor, paixão e  
companheirismo.

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

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

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

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

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

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

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

## AGRADECIMENTOS

À minha família, e nela incluo Larissa, por todo amor, esforços, incentivos e paciência ao longo desses dois anos de mestrado.

Aos amigos, em especial ao Paolo Vivenza, por sempre estar presente e pelas conversas descontraídas nos fins de tarde tomando aquele açai.

Ao Prof. Francisco Lobato, pela oportunidade, confiança, compreensão e exemplo como profissional, mas acima de tudo, como pessoa.

Ao Prof. Dr. Carlos Chavez, pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Felipe Masiero, por ter me dado a oportunidade de iniciar nesta vertente da Medicina Veterinária.

Ao Ricardo Andrez, pelos ensinamentos, disponibilidade, calma, paciência, vontade de ajudar e, por que não dizer, pela amizade construída.

Ao Rodrigo Silva e Prhiscylla Pires, por estarem ao meu lado desde o início de tudo isto.

Ao Prof. Marcos Bryan, pelos ensinamentos dentro e fora das salas de aulas.

Ao Dr. Luiz Heneine, pela disponibilidade de ajudar sempre que a ele recorri.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG, Amanda, Ana, Carlos, Gustavo, Isabela, Júlia, Juliana, Laura, Lucas, Luciana, Marina, Monique, Renata e Thais, pela convivência respeitosa e harmoniosa.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do ICB-UFMG, Benjamim, Bruna, Camila, Carolina, Clara, Daysi, Edgar, Eric, Fabiana, Fernanda, Filipe, Francisco, Gabriela, Karen, Liza, Luana, Luis, Maria Clara, Marianas, Poliana, Pollyanne, Rafaela, Raphael, Rebecka, Stephanie, Tasla e Thais, por me fazerem sentir em casa no período em que estive no Imunolab.

Ao Prof. Dr. Frederic Frezard, e seus orientados Lígia e Matheus, por permitirem que eu utilizasse seu laboratório e pela ajuda.

Ao Jamil Oliveira, do laboratório do Prof. Dr. Marcelo Santoro, pela disponibilidade e ajuda.

À Patrícia Parreiras e Valéria, pela ajuda na última etapa do trabalho.

Aos funcionários e estagiários da FUNED, em especial ao Guilherme, Isabela e Ricardo, pela ajuda nos momentos finais do trabalho.

E a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta etapa da minha vida, meu muito obrigado.

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>QUADRO DE AMINOÁCIDOS</b> .....	13
<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	17
2.2 TOXINA ÉPSILON.....	18
2.2.1 Genética.....	18
2.2.2 Estrutura.....	19
2.2.3 Ativação.....	21
2.2.4 Receptores celulares.....	22
2.2.5 Absorção intestinal.....	22
2.2.6 Ação tóxica.....	23
2.3 ENTEROTOXEMIA DOS RUMINANTES DOMÉSTICOS.....	29
2.3.1 Ovinos.....	29
2.3.2 Caprinos.....	30
2.3.3 Bovinos.....	30
2.3.4 Diagnóstico.....	31
2.3.5 Profilaxia e controle.....	31
2.4 A TOXINA ÉPSILON E O HOMEM.....	33
2.5 VACINAS DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 GERAL.....	35
3.2 ESPECÍFICOS.....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 FLUXOGRAMA GERAL DO TRABALHO.....	36
4.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	36
4.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	36
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	37
4.5 PRODUÇÃO DA TOXINA ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	37
4.5.1 Cultivo da amostra.....	37
4.5.2 Produção e purificação da toxina épsilon.....	37

---

---

4.5.3 Titulação, tipificação e dosagem da toxina épsilon.....	38
4.6 PRODUÇÃO DO TOXÓIDE ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	38
4.6.1 Inativação da toxina.....	38
4.6.2 Adição de hidróxido de alumínio Al(OH) <sub>3</sub> .....	39
4.6.3 Teste de esterilidade.....	39
4.6.4 Teste de inocuidade.....	39
4.7 PRODUÇÃO DO SORO HIPERIMUNE ANTI-ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	39
4.7.1 Imunizações e obtenção dos soros.....	39
4.7.2 Titulação dos soros.....	40
4.8 MAPEAMENTO DOS EPITOPOS DA TOXINA ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	40
4.8.1 Síntese de peptídeos em membrana de celulose.....	40
4.8.2 Ensaio imunológico.....	41
4.8.3 Análise da reatividade dos spots.....	42
4.8.4 Regeneração da membrana.....	42
4.8.5 Seleção dos epitopos.....	42
4.9 SÍNTESE SOLÚVEL DOS EPITOPOS SELECIONADOS.....	42
4.10 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	43
4.11 PREPARAÇÃO DOS IMUNÓGENOS.....	43
4.11.1 Lipossomas.....	43
4.11.2 Adição de hidróxido de alumínio Al(OH) <sub>3</sub> .....	43
4.12 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO.....	44
4.13 TITULAÇÃO DOS SOROS ANTI-PEPTÍDEOS.....	44
4.14 ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1 PRODUÇÃO DA TOXINA ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	45
5.1.1 Cultivo da amostra de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	45
5.1.2 Titulação, tipificação e dosagem da toxina épsilon.....	45
5.1.3 Purificação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	46
5.2 PRODUÇÃO DO TOXÓIDE ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	46
5.3 PRODUÇÃO DO SORO HIPERIMUNE ANTI-ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	47
5.3.1 Imunizações.....	47
5.3.2 Titulação dos soros.....	47
5.4 MAPEAMENTO DOS EPITOPOS DA TOXINA ÉPSILON DE <i>Clostridium perfringens</i> TIPO D.....	

---

---

D.....	49
5.4.1 Síntese de peptídeos em membrana de celulose.....	49
5.4.2 Ensaios imunológicos.....	49
5.4.3 Análise da reatividade dos spots.....	52
5.5 SELEÇÃO DOS EPÍTOPOS PARA A SÍNTESE SOLÚVEL.....	60
5.5.1 Epítipo 3.....	61
5.5.2 Epítipo 4.....	62
5.5.3 Epítipo 10.....	62
5.5.4 Epítipo 11.....	63
5.5.5 Epítipo 13.....	63
5.5.6 Epítipo 16.....	64
5.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	64
5.7 IMUNIZAÇÕES E TITULAÇÃO DOS SOROS ANTI-PEPTÍDEOS.....	66
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1 -</b>	Principais características das principais toxinas sintetizadas por <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	18
<b>Tabela 2 -</b>	Linhagens celulares sensíveis à toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D. .....	24
<b>Tabela 3 -</b>	Protocolo de Imunização dos coelhos e ovino com o toxóide épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D. ....	39
<b>Tabela 4 -</b>	Protocolo de Imunização dos camundongos com os peptídeos sintetizados a partir dos epitopos da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	44
<b>Tabela 5 -</b>	Resultados das dosagens da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	46
<b>Tabela 6 -</b>	Lista dos peptídeos sintetizados em membrana de celulose, cobrindo toda a estrutura primária da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	50
<b>Tabela 7 -</b>	Lista dos peptídeos com alteração em suas sequências de aminoácidos e seus respectivos peptídeos de origem. Em destaque, os aminoácidos alterados. .....	51
<b>Tabela 8 -</b>	Lista dos spots positivos nos ensaios imunoquímicos, com a sequência de aminoácidos dos respectivos peptídeos e as intensidades de reatividade médias, em escala de 1 a 5. ....	53
<b>Tabela 9 -</b>	Lista dos spots positivos exclusivamente frente ao soro ovino nos ensaios imunoquímicos, com a sequência de aminoácidos dos respectivos peptídeos e as intensidades de reatividade médias, em escala de 1 a 5.....	54
<b>Tabela 10 -</b>	Epitopos mapeados na toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D, suas respectivas sequências de aminoácidos, número de aminoácidos, massas moleculares, pI e índice GRAVY.....	54
<b>Tabela 11 -</b>	Epitopos, resíduos e sequências de aminoácidos não visualizados na estrutura 3D da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	56
<b>Tabela 12 -</b>	Peptídeos sintetizados em fase solúvel, suas respectivas sequências de aminoácidos, massas moleculares, pI e índice GRAVY.....	61
<b>Tabela 13 -</b>	Resultado da titulação dos soros anti-peptídeos pelo ELISA competitivo.....	67

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1 -</b>	Estrutura das proteínas da família das toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina.....	20
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura primária da protoxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D e locais de clivagem pelas proteases durante sua ativação.....	21
<b>Figura 3 -</b>	Ação da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D em células MDCK II....	26

---

---

<b>Figura 4 -</b>	Sumário da patogênese dos danos encefálicos causados pela toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	28
<b>Figura 5 -</b>	Lesões encefálicas observadas em cordeiro causadas pela toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	30
<b>Figura 6 -</b>	Fluxograma geral do trabalho.....	36
<b>Figura 7 -</b>	Foto do biorreator BioFlo 110 utilizado no cultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D. .....	38
<b>Figura 8 -</b>	Foto do sintetizador automático ResPep Automatic Spot Synthesizer, da Intavis, utilizado para a síntese de peptídeos em membrana de celulose e para a síntese solúvel de peptídeos.....	41
<b>Figura 9 -</b>	Resultados da titulação dos soros hiperimunes anti-épsilon de coelho e ovino por ELISA indireto. ....	48
<b>Figura 10 -</b>	Membrana de celulose contendo 130 peptídeos sintetizados, cobrindo toda a estrutura primária da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	49
<b>Figura 11 -</b>	Fotos das membranas de celulose após realização dos Ensaio Imunoquímicos. .....	51
<b>Figura 12 -</b>	Fotos das membranas de celulose após realização dos ensaios imunoquímicos para teste dos conjugados.....	52
<b>Figura 13 -</b>	Visualização dos epitopos mapeados na estrutura 3D da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	57
<b>Figura 14 -</b>	Visualização do epitopo 3 na estrutura 3D da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	62
<b>Figura 15 -</b>	Visualização do epitopo 10 na estrutura 3D da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	63
<b>Figura 16 -</b>	Visualização do epitopo 13 na estrutura 3D da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	64
<b>Figura 17 -</b>	Espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF <sup>TM</sup> dos peptídeos sintetizados em fase solúvel.....	65
<b>Figura 18 -</b>	Visualização dos epitopos 3 e 4 na estrutura 3D da toxina épsilon de <i>Clostridium perfringens</i> tipo D.....	68

---

## QUADRO DE AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação
Glicina	Gly, Gli	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Iso	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe, Fen	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys, Cis	C
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido Aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido Glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys, Lis	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp, Tri	W
Metionina	Met	M

## RESUMO

A toxina épsilon ( $\epsilon$ ) produzida por *Clostridium perfringens* tipo D é a principal responsável pelo desenvolvimento das enterotoxemias dos ruminantes domésticos. Devido à sua alta toxicidade, ela é atualmente considerada um potencial agente de bioterrorismo ou para guerra biológica. Atualmente não há tratamentos ou vacinas contra os efeitos da toxina  $\epsilon$  em humanos. Em contrapartida, a vacinação é a principal medida para o controle da enterotoxemia em ovinos, caprinos e bovinos. Embora os imunógenos comerciais possam ser efetivos na prevenção da enterotoxemia, a qualidade dos mesmos oscila enormemente entre os países e os fabricantes. Desta forma, pesquisas em imunologia e vacinologia que fundamentem as buscas por novas vacinas e tratamentos contra os efeitos da toxina  $\epsilon$  nos ruminantes domésticos e humanos são necessárias. Baseado no supracitado, o presente trabalho teve como objetivo o mapeamento dos epitopos da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D e a produção de imunógenos de peptídeos sintéticos. Para tal, foram sintetizados 130 peptídeos de 15 aminoácidos cada, em sobreposição e intercalados dos três resíduos iniciais, em membrana de celulose, por meio da técnica de síntese em *spot*. Soros de coelho e ovino contra a toxina  $\epsilon$  purificada foram utilizados em ensaios imunológicos para testar a interação dos anticorpos policlonais anti- $\epsilon$  com os peptídeos sintetizados. Com apoio nas reatividades observadas nesses ensaios e características físico-químicas, seis epitopos mapeados foram empregados separadamente na imunização de camundongos. Para isto, peptídeos contendo a estrutura primária desses epitopos foram sintetizados por meio da síntese química solúvel, encapsulados em lipossomas e conjugados ao hidróxido de alumínio. Seis grupos com seis camundongos cada receberam quatro doses intervaladas de 10 dias dos respectivos imunógenos; ao final deste processo, os soros obtidos foram titulados por meio de ELISA competitivo. Com base nos resultados e análise dos ensaios imunológicos, ao todo 16 prováveis epitopos foram identificados na estrutura primária da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, apresentando diferentes graus de interação ou reatividade com as imunoglobulinas anti- $\epsilon$ . Este resultado condiz com os mecanismos imunológicos de resposta imune frente aos antígenos proteicos, os quais sofrem processamento em diversos peptídeos menores abrangendo toda a sua estrutura, e são então apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Três epitopos empregados nas inoculações induziram a produção de anticorpos detectáveis no ELISA competitivo, e provavelmente são imunodominantes. As porcentagens de inibição verificadas para os epitopos de número 3, 4 e 16 foram respectivamente de 4,35, 9,95 e 7,68 %. Os determinantes antigênicos 3 e 4 estão parcialmente sobrepostos, linearmente e espacialmente próximos, além de fazerem parte do domínio I da toxina  $\epsilon$ . Esta região está provavelmente envolvida na ligação da toxina com seus receptores celulares, além de possuir aminoácidos essenciais para a interação proteína-receptor e a citotoxicidade da toxina. Já o epitopo 16 é constituído pela porção carboxi-terminal da toxina  $\epsilon$ , o qual faz parte do domínio III da mesma; esta região parece estar envolvida na oligomerização da toxina que precede a formação do poro celular. Os resultados do presente trabalho fornecem informações preciosas para o entendimento das características estruturais, patogênicas e imunológicas da toxina  $\epsilon$ , e podem auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas e terapias contra os efeitos deletérios da toxina em animais e humanos.

**Palavras-chave:** enterotoxemia, ovinos, caprinos, bovinos, bioterrorismo, síntese em *spot*, vacina, lipossomo, tratamento, imunologia.

## ABSTRACT

*Clostridium perfringens* type D epsilon toxin (ETX) is the main responsible for domestic ruminants enterotoxemias. Due to its high toxicity, it is now considered to be a potential agent of bioterrorism or biowarfare. There are currently no vaccines or treatments against the effects of this toxin in humans. In contrast, vaccination is the primary control measure of enterotoxemia in ruminants. Although commercial immunogens can be effective in preventing enterotoxemia, their quality varies greatly between countries and manufacturers. Thus, researches in immunology and vaccinology that support the development of new vaccines and treatments against ETX in domestic ruminants and humans are imperative. In light of this, the objective of the present study was to map the epitopes of *C. perfringens* type D ETX and to produce immunogens containing synthetic peptides. One hundred thirty overlapping 15-mer peptides frameshifted by three residues corresponding to ETX sequence were prepared in a cellulose membrane by using the Spot technique. Sheep and rabbit sera against purified ETX were used in immunochemical assays to test the interaction between anti-ETX antibodies and the synthesized peptides. Based on the reactivity results of these assays and on physicochemical characteristics, six mapped epitopes were separately employed to immunize mice. Peptides containing the primary structure of these six epitopes were synthesized by solid phase synthesis, encapsulated in liposomes and aluminum hydroxide was added. Six groups of six mice each received four doses of the respective immunogens spaced by 10 days. At the end of this process, the collected sera were titrated by competitive ELISA. Based on the results of the immunochemical assays, a total of 16 probable epitopes were identified in the primary structure of ETX. This result is consistent with immunological mechanisms of immune response against proteic antigens, which are processed to several smaller peptides ranging the entire protein structure, and are then presented to CD4+ T lymphocytes. Three out of the six antigenic determinants used in the immunizations induced antibodies that were detected by a competitive ELISA, and are probably immunodominant epitopes. The inhibition rates were 4.35, 9.95 and 7.68% for the epitopes number 3, 4 and 16, respectively. The determinants number 3 and 4 are partially overlapped, linear and spatially close to each other, and also belong to ETX domain I. This region is likely to be involved in the binding of ETX to its cellular receptors. It also has amino acids essential to the protein-receptor interaction and thus essential to the toxin cytotoxicity. Epitope 16 is part of the carboxy-terminal portion of ETX, and belongs to domain III of the protein. This region seems to be involved in the oligomerization of ETX, phase that precedes cell pore formation. The results of the present study provide valuable information for understanding the structural, pathogenic and immunological characteristics of ETX, and can thus assist in the development of new vaccines and therapies against the deleterious effects of the toxin in animals and humans.

**Keywords:** enterotoxemia, sheep, goat, cattle, bioterrorism, Spot technique, vaccine, liposome, treatment, immunology.

## 1. INTRODUÇÃO

*Clostridium perfringens* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia, em forma de bastonetes, que possui a habilidade de passar para uma forma de resistência denominada esporo. Dessa forma, este micro-organismo está amplamente distribuído no ambiente, como no solo, água e matéria orgânica em decomposição, além de fazer parte da microbiota intestinal normal de animais e humanos (Lobato et al., 2007). Porém, sob certas circunstâncias, *C. perfringens* pode tornar-se patogênica, causando quadros de gangrena gasosa, intoxicação alimentar e enterite necrótica em humanos; e gangrena gasosa, doenças gastrointestinais e enterotoxemias nos animais (Petit et al., 1999).

*C. perfringens* não invade células normais, mas produz várias toxinas e enzimas responsáveis por causar lesões e sinais clínicos. As toxinas produzidas dependerão da cepa envolvida, e gerarão síndromes específicas (Petit et al., 1999). Esta espécie de clostrídio é dividida em cinco tipos (A, B, C, D e E) com base na produção de quatro toxinas principais, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) e iota ( $i$ ). A toxina  $\epsilon$  é produzida pelos tipos B e D, sendo a principal responsável pelo desenvolvimento de algumas doenças de importância nos animais domésticos. Aquela faz parte do grupo de toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina, e é considerada a terceira toxina clostridial mais potente, com uma dose letal em 50% dos camundongos ( $DL_{50}$ ) de 100 ng/kg (Uzal et al., 2010). *C. perfringens* tipo B é o agente etiológico da disenteria dos cordeiros recém-nascidos, principalmente, além de outras afecções. Já *C. perfringens* tipo D é o causador das enterotoxemias em ovinos, caprinos e bovinos (Songer, 1996).

Os casos de enterotoxemia nos ruminantes domésticos estão predominantemente relacionados com mudanças bruscas na dieta, sem período de adaptação, quando há

incremento de grandes níveis de carboidratos altamente fermentáveis. Como consequência, grande parte desses carboidratos chegam intactos ao intestino delgado, o que leva a um desequilíbrio da microbiota intestinal, com abundante crescimento de *C. perfringens* tipo D, e grande produção de toxinas (Uzal e Songer, 2008). A toxina  $\epsilon$  age inicialmente no intestino, aumenta a permeabilidade da parede intestinal, e amplia, portanto, sua própria absorção. Dessa forma, ela atinge a circulação sanguínea, e age nos tecidos de outros órgãos, tais como o cérebro, os rins, pulmões, entre outros, causando lesões (Mathur et al., 2010).

*C. perfringens* é considerada a bactéria patogênica de maior ocorrência no mundo (Hatheway, 1990). Sendo assim, os ruminantes domésticos, de uma forma geral, estão sob constante desafio por este agente infeccioso, bem como são frequentemente expostos aos fatores predisponentes da enterotoxemia. Dessa forma, esforços devem ser realizados visando o controle e a profilaxia da doença, com consequente redução das perdas econômicas nos diversos sistemas de produção de ruminantes. Esses esforços baseiam-se em medidas adequadas de manejo, que levem à redução dos fatores predisponentes, mas, principalmente, na vacinação sistemática do rebanho (Lobato et al., 2007).

As vacinas de toxóides contra a toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* estão disponíveis comercialmente, e têm sido mundialmente utilizadas de forma extensiva nas últimas décadas. Somente no Brasil, mais de 150 milhões de doses de vacinas contendo esse toxóide, são produzidas por ano, refletindo a crescente necessidade dos atuais sistemas de criação em proteger um grande número de animais frente às clostridioses (Gonçalves et al., 2009). Embora essas vacinas possam ser efetivas na prevenção da enterotoxemia, a qualidade das mesmas oscila enormemente entre os países e os fabricantes, ocorrendo

grande variação das respostas imunes dos animais vacinados (Uzal e Songer, 2008; Titball, 2009).

A toxina  $\epsilon$  é considerada um potencial agente de bioterrorismo ou para guerra biológica (Bokori-Brown et al., 2011; Popoff, 2011). Desta forma, a toxina está classificada como agente biológico da categoria B pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (Centers for Disease Control, 2000). Não há tratamento aprovado em humanos contra os efeitos dessa toxina. Seu possível uso como arma biológica em conjunto com a inexistência de uma terapia ressaltam a necessidade de se desenvolver vacinas e tratamentos para humanos (Titball, 2009; Bokori-Brown et al., 2011). Portanto, pesquisas contemplando novas abordagens em imunologia e vacinologia em relação à toxina  $\epsilon$  devem ser realizadas, com o objetivo de produzir imunógenos confiáveis e de qualidade contra a enterotoxemia em ruminantes, bem como o desenvolvimento de tratamentos e vacinas contra os efeitos da toxina em humanos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Clostridium perfringens* Tipo D

Primeiramente denominado *Bacillus aerogenes capsulatus*, e posteriormente *Clostridium welchii* tipo D, *C. perfringens* tipo D é um bacilo imóvel, GRAM-positivo, anaeróbio, o qual possui a habilidade de passar para uma forma de resistência denominada esporo. Ele cresce em temperaturas variando de 20 a 50 °C, com ponto ótimo entre 37 e 45 °C para a maioria das estirpes, reduz o nitrato, e fermenta a glicose, lactose, maltose, sacarose, entre outros açúcares. Suas colônias no ágar

sangue frequentemente geram ao seu redor zonas de dupla hemólise; a zona mais interna e clara causada pela toxina teta, e a externa causada pela toxina alfa. Já no ágar gema de ovo, observa-se zonas opacas circulares ao redor das colônias denominadas reação de lecitinase, geradas pela toxina alfa (Hatheway, 1990).

*C. perfringens* tipo D está amplamente distribuído no ambiente, como no solo, vegetação, água, instalações, equipamentos e matéria orgânica em decomposição, além de fazer parte da microbiota intestinal normal de animais e humanos. Porém, sob certas circunstâncias, esta bactéria pode tornar-se patogênica, causando quadros gastrointestinais e enterotoxemias nos ruminantes domésticos (Lobato et al., 2007). Pouco se sabe sobre a importância de *C. perfringens* tipo D para a saúde humana. Existem apenas dois relatos de casos em pessoas de enfermidades do sistema gastrointestinal relacionadas com o clostrídio (Popoff, 2011). Além destes, há outros dois relatos de casos em que *C. perfringens* tipo D foi identificado como sendo responsável por lesões de gangrena gasosa em humanos, doença primordialmente causada pelo tipo A (Morinaga et al., 1965; Miller et al., 2004).

*C. perfringens* tipo D é o maior produtor da toxina  $\epsilon$ , a qual é o principal componente patogênico responsável pelo desenvolvimento daquelas doenças dos ruminantes. O agente também produz outras toxinas, tais como a alfa ( $\alpha$ ), enterotoxina, beta-2 ( $\beta_2$ ), perfringolisina-O, lambda ( $\lambda$ ), entre outras toxinas secundárias (Uzal et al., 2010). As propriedades das principais toxinas sintetizadas por *C. perfringens* tipo D estão sumarizadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Principais características das principais toxinas sintetizadas por *Clostridium perfringens* tipo D (Adaptado de Uzal et al., 2010).

	<b>Toxina Alfa</b>	<b>Toxina Épsilon</b>	<b>Perfringolisina O</b>	<b>Enterotoxina</b>	<b>Toxina Beta-2</b>
<b>Massa Molecular</b>	42,528 kDa	34 kDa	54 kDa	35 kDa	28 kDa
<b>DL<sub>50</sub>* (camundongo)</b>	3 µg	0,1 µg	Não relatado	50 µg	0,3 µg
<b>Atividade Biológica</b>	Letal Necrotizante Hemolítica Contratória do Músculo Liso	Dermonecrótica Letal Edematogênica Contratória do Músculo Liso	Letal Necrotizante	Eritemogênica Letal Enterotóxica	Dermonecrótica Edematogênica Enterotóxica Citotóxica
<b>Estabilidade Térmica</b>	Estável	Até 1 semana em temperatura ambiente; meses a -20 °C; anos a -80 °C.	Desconhecida	Inativada a 60 °C; menos de 1 semana a temperatura ambiente; 1 mês a -20 °C; anos liofilizada	Desconhecida
<b>Reação à Tripsina</b>	Susceptível	Resistente (ativada)	Susceptível	Resistente (ativada)	Sensível (inativada)

\* Dose letal para 50% dos animais, por kg de camundongo.

## 2.2 Toxina Épsilon

A toxina  $\epsilon$  é o principal fator de virulência de *C. perfringens* tipo D, sendo responsável pelas lesões e sinais clínicos observados nas enterotoxemias dos ruminantes domésticos. É componente da família das toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina (*aerolysin like,  $\beta$ -pore-forming toxin family*), juntamente com a toxina  $\alpha$  de *C. septicum*, apresentando similaridades estruturais marcantes com ambas, embora elas careçam de homologia em relação à sequência de aminoácidos (Cole et al., 2004). Com uma DL<sub>50</sub> em camundongos de apenas 100 ng/kg, a toxina  $\epsilon$  é considerada a terceira toxina clostridial mais potente, ficando atrás apenas das toxinas botulínica e tetânica, respectivamente (Harkness et al., 2012). Algumas características da toxina são apresentadas na Tabela 1.

### 2.2.1 Genética

O gene *etx*, responsável pelas informações para a síntese da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, é carregado em plasmídios. Na verdade, o gene *etx* pode ser carregado em cinco ou mais plasmídeos diferentes, cujos tamanhos variam entre 48 e 110 kb, dos quais pelo menos dois são conjugativos, ou seja, possuem replicação autônoma e mediam a conjugação e transferência de material genético. Um único isolado bacteriano pode carrear múltiplos plasmídeos, e cada um destes podem carrear até três genes diferentes que codificam outras toxinas adicionais ou outros fatores de virulência acessórios. Também é frequente o carregamento do locus *tcp*, o qual media a transferência do plasmídio de resistência à tetracilina (pCW3), o que é consistente com o fato de que pode haver transferência conjugativa do plasmídio do gene *etx* entre dois isolados de *C. perfringens* tipo D (Hughes et al., 2007; Sayeed et al., 2007; Miyamoto et al., 2008).

A localização do gene *etx* em elementos extracromossomais, os plasmídios conjugativos, e a constituição genética destes tornam possível a transferência horizontal intra-espécie de genes de toxinas, com consequente aquisição ou perda de fatores de virulência, e até mesmo contribuindo para a mudança de tipos toxigênicos observada em algumas estirpes de *C. perfringens* (Petit et al., 1999).

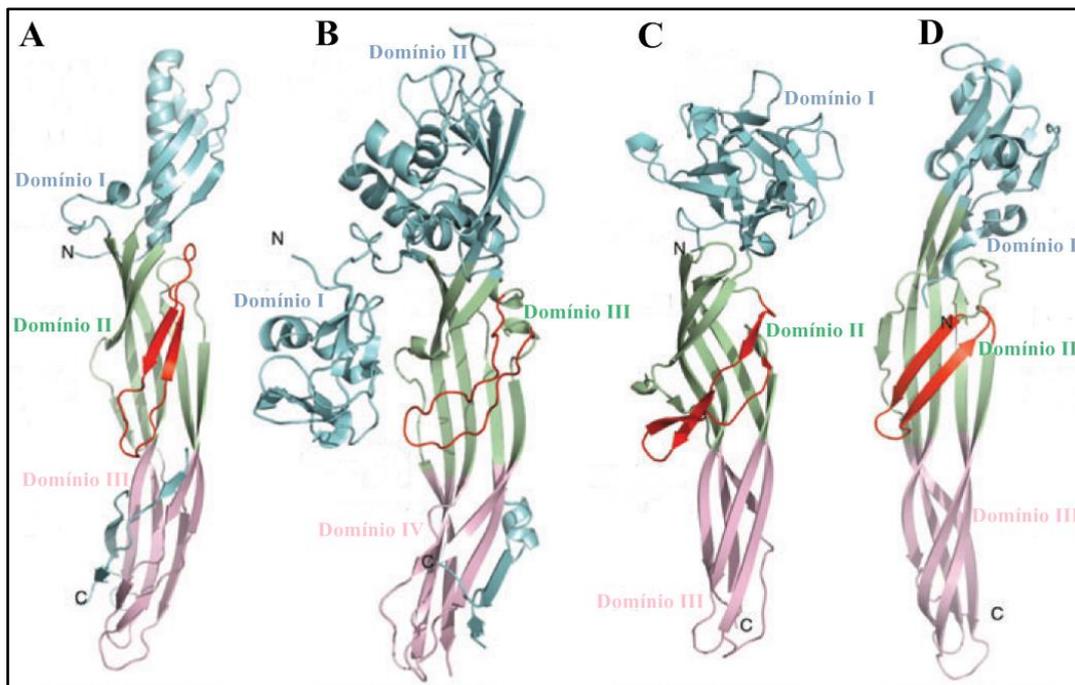
### 2.2.2 Estrutura

A estrutura da toxina  $\epsilon$  foi resolvida de maneira definitiva por Cole et al. (2004) por meio da difração de raios-x. A proteína é alongada [(100 x 20 x 20) Å] e possui três domínios constituídos basicamente de folhas- $\beta$ . O domínio I contém uma grande  $\alpha$ -hélice seguida por um laço e uma  $\alpha$ -hélice. Entre os domínios I e II há outra  $\alpha$ -hélice seguida por um laço. O domínio II é um  $\beta$ -sanduíche composto por duas folhas- $\beta$  antiparalelas e um grampo- $\beta$ . O domínio III também é um  $\beta$ -sanduíche com duas folhas- $\beta$ , e a porção carboxi-terminal da toxina é constituída da última fita paralela presente neste domínio (Cole et al., 2004).

A toxina  $\epsilon$  possui similaridades estruturais marcantes com outras constituintes da família das toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina. Entre elas,

destacam-se a aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, a parasporina-2 de *Bacillus thuringiensis* e uma lecitina formadora de poros (LSL) de *Laetiporus sulphureus* (Figura 1). Embora estas proteínas apresentem identidade de menos que 20 % entre suas estruturas primárias, elas possuem alta semelhança estrutural em relação às suas formas e aos arranjos de suas folhas- $\beta$ . Todas são formadoras de poros, sendo que a aerolisina e a  $\epsilon$  formam poros heptaméricos, enquanto aqueles formados pela LSL são hexaméricos. Ademais, as toxinas  $\epsilon$ , aerolisina e parasporina-2 são secretadas na forma de protoxina e ativadas pela remoção proteolítica de suas sequências amina e carboxi-terminais (Bokori-Brown et al., 2011).

Apesar das similaridades estruturais marcantes, a toxina  $\epsilon$  é enormemente mais potente que todas as outras, possuindo uma atividade letal em camundongos cerca de 100 vezes maior que a aerolisina e a toxina  $\alpha$  de *C. septicum*, também membro da mesma família (Popoff, 2011). Provavelmente, esta grande diferença de toxicidade entre essas toxinas seja resultado de composições de aminoácidos distintas, mas principalmente pela interação dessas proteínas com regiões de ligação a receptores distintas (Cole et al., 2004).



**Figura 1** – Estrutura das proteínas da família das toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina. **A.** Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D **B.** Aerolisina de *Aeromonas hydrophila* **C.** Lecitina formadora de poros de *Laetiporus sulphureus* **D.** Parasporina-2 de *Bacillus thuringiensis*. (Adaptado de Bokori-Brown et al., 2011)

Alguns componentes da família das toxinas formadoras de poros, principalmente a aerolisina, possuem as funções das suas regiões bem caracterizadas. Baseado nas similaridades entre os domínios da toxina  $\epsilon$  e outros membros da família, bem como em algumas pesquisas, tem-se estudado a caracterização funcional dessas regiões da toxina. O domínio I da toxina  $\epsilon$  parece ser de fundamental importância para a sua interação inicial com a célula. Um aglomerado de resíduos aromáticos (Tyr<sup>42</sup>, Tyr<sup>43</sup>, Tyr<sup>49</sup>, Tyr<sup>209</sup>, Phe<sup>212</sup>) presentes nessa região e especialmente próximos pode estar diretamente envolvido na ligação da proteína com seus receptores celulares (Cole et al., 2004; Popoff, 2011; Ivie e McClain, 2012).

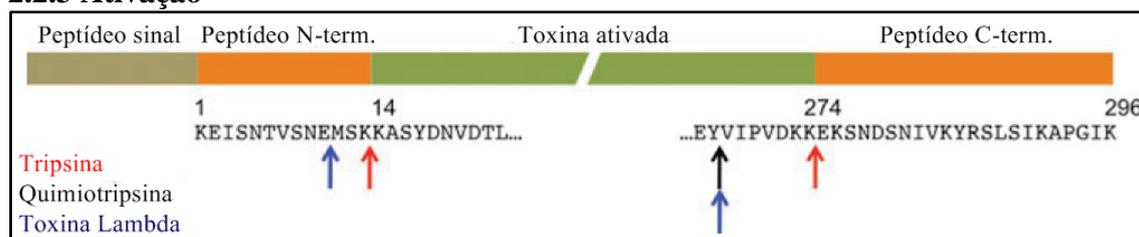
O alinhamento das sequências do domínio II da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D e dos domínios semelhantes da toxina  $\alpha$  de *C. septicum*, aerolisina e duas toxinas mosquitocidas (MT-X 2 e MT-X 3)

evidencia áreas anfipáticas nessas regiões. Áreas com tal característica são essenciais para a inserção de proteínas nas membranas celulares e estão presentes em outras toxinas da família das toxinas formadoras de poros semelhantes à aerolisina. Baseado em estudos com as outras proteínas dessa família, este domínio da toxina  $\epsilon$  pode ser uma região de inserção na membrana, estar relacionado à oligomerização da proteína, formação e estabilização do poro (Cole et al., 2004; Bokori-Brown et al., 2011). Mutações de aminoácidos dentro do domínio II da toxina  $\epsilon$  resultam em mudanças na citotoxicidade e efeitos nas características dos canais formados pela toxina. Os resíduos Ser<sup>124</sup> e Thr<sup>143</sup> parecem ser excepcionalmente importantes para essas características e atividade dos canais. Análises da sequência e hidrofobicidade da região sugerem que o segmento His<sup>119</sup>-Ala<sup>149</sup> forma um grampo- $\beta$  anfipático, constituinte do canal transmembrana dos heptâmeros da

toxina  $\epsilon$  (Knapp et al., 2009). Além disto, esse mesmo segmento também possui uma ou mais regiões de epitopos neutralizantes (McClain e Cover, 2007).

O domínio III da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, o qual abriga a porção carboxi-terminal da mesma, também têm sido associado com a inserção na membrana, mas principalmente com a heptamerização da proteína. Nas protoxinas  $\epsilon$  e aerolisina, os peptídeos carboxi-terminais parecem bloquear a oligomerização das toxinas. Quando esses peptídeos não são removidos durante a ativação das protoxinas, a interação entre os monômeros é impactada, então bloqueando a oligomerização (Cole et al., 2004; Bokori-Brown et al., 2011). As protoxinas  $\epsilon$  apresentam a habilidade de se ligar aos seus receptores celulares; no entanto, são inábeis em formar os complexos heptaméricos na membrana celular. Para que isto ocorra, como já relatado, a remoção do peptídeo carboxi-terminal presente no domínio III é necessária. Desta maneira, esse peptídeo funciona como uma espécie de chaperona intramolecular, auxiliando no dobramento da proteína e prevenindo que moléculas de toxina  $\epsilon$  ativa se agreguem quando em solução (Miyata et al., 2001).

### 2.2.3 Ativação



**Figura 2** – Estrutura primária da protoxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D e locais de clivagem pelas proteases durante sua ativação (Adaptado de Bokori-Brown et al., 2011).

Recentemente, foi descoberta uma estirpe de *C. perfringens* não produtora de toxina  $\lambda$ , a qual processa a protoxina  $\epsilon$  intracelularmente. Por meio de uma protease ainda não identificada, essa estirpe cliva as porções amina e carboxi-

A toxina  $\epsilon$  é secretada na forma de protoxina, com aproximadamente 32,981 kDa, a qual é convertida em toxina ativa, cerca de 1000 vezes mais tóxica que sua progenitora. A ativação da protoxina causa uma pequena mudança na sua massa molecular, e uma grande alteração no seu ponto isoelétrico (pI), de 8,02 para 5,36 ou 5,74. Essa ativação é catalisada por proteases, como a tripsina, quimiotripsina e a toxina  $\lambda$ , uma metaloprotease sintetizada por *C. perfringens* (Worthington e Mülders, 1977; Uzal et al., 2010).

Para que a ativação ocorra é necessária a remoção de ambos os peptídeos amino-terminal e carboxi-terminal da protoxina. A proteína resultante difere em sua sequência primária de acordo com a protease que catalisa a clivagem. Também há diferenças em relação à sua potência tóxica, sendo que máxima potência ocorre quando a toxina é ativada pelas proteases tripsina e quimiotripsina conjuntamente (Minami et al., 1997). A título de exemplo, se a enzima responsável pela ativação for a tripsina, um peptídeo de 13 resíduos é removido da porção carboxi-terminal e outro peptídeo de 22 resíduos é removido da porção amina-terminal da toxina  $\epsilon$  (Figura 2).

terminais da protoxina, e libera um produto tóxico ao sofrer lise bacteriana, o que começa a ocorrer quando a cultura atinge sua fase estacionária de crescimento (Harkness et al., 2012). Outra descoberta que acrescenta um

modo de ativação diferente àquele clássico, é que em estudos com uma linhagem celular denominada mpkCCD<sub>c14</sub>, a protoxina  $\epsilon$  foi processada e completamente ativada por proteases presentes na superfície apical da membrana plasmática destas células (Chassin et al., 2007).

#### 2.2.4 Receptores celulares

Há muito tempo se sabe que a toxina  $\epsilon$  se liga a receptores presentes na superfície externa da membrana celular do endotélio vascular de alguns órgãos, tais como o cérebro, os rins e o fígado (Buxton, 1978b). Há muito também se sabe que a interação da toxina com esses receptores depende de um ambiente lipídico (Nagahama e Sakurai, 1992). Apesar disto, até a presente data, a identidade exata do receptor celular da toxina  $\epsilon$  permanece sem ser descoberta.

A proteína se liga a receptores confinados dentro de certas zonas com área média entre 0,35 a 0,45  $\mu\text{m}^2$ . Esses receptores são dependentes de colesterol e esfingomielina, e estão presentes em regiões específicas da membrana celular chamadas jangadas lipídicas (*lipid rafts*), também conhecidas como membranas resistentes a detergente (DRMs) (Türkcan et al., 2012). Além disto, o número de receptores celulares parece ser maior na membrana apical do que na membrana basolateral das células (Petit et al., 1997; Chassin et al., 2007). A natureza confinada desses receptores propicia uma grande concentração dos monômeros da toxina  $\epsilon$ , o que facilita a oligomerização dos mesmos, e explica em parte a alta toxicidade da proteína (Türkcan et al., 2012).

Por analogia com a toxina aerolisina, poder-se-ia pensar que a toxina  $\epsilon$  também tivesse como receptores as proteínas ancoradas com GPI (glicosilfosfatidilinositol) presentes nas DRMs. Entretanto, não há pesquisas que fundamentem isto, além de que os domínios

das toxinas aerolisina e  $\epsilon$  que interagem com os receptores celulares diferem enormemente entre si (Knapp et al., 2009). Recentemente, Ivie et al. (2011) demonstraram que a toxina  $\epsilon$  se liga *in vitro* aos receptores celulares 1 do vírus da hepatite A (HAVCR1), e confirmaram que esses receptores contribuem para a citotoxicidade da proteína. Segundo os autores, o HAVCR1 pode ser de fato um receptor para a toxina ou atuar como uma espécie de co-receptor da mesma. Após esta descoberta, estudos caracterizando as interações entre a toxina  $\epsilon$ , os receptores HAVCR1 e uma linhagem celular sensível indicaram que os aminoácidos Y<sup>42</sup>, Y<sup>43</sup>, Y<sup>49</sup> e Y<sup>209</sup> são essenciais para que essas interações ocorram (Ivie e McClain, 2012).

#### 2.2.5 Absorção intestinal

Para que a toxina  $\epsilon$  exerça seus efeitos sistêmicos, *C. perfringens* tipo D precisa primeiramente colonizar o intestino do animal acometido e produzir a toxina. Posteriormente, esta deve agir localmente e ser absorvida para a circulação sanguínea. Sialidases produzidas pela própria bactéria podem exercer papel fundamental durante estas etapas. Essas enzimas parecem contribuir para a adesão do micro-organismo nas células entéricas, permitindo a colonização do intestino por *C. perfringens* tipo D. As sialidases também aumentam a sensibilidade das células à toxina  $\epsilon$ , o que ocorre por uma maior ligação entre elas e maior oligomerização da toxina. Isto acontece provavelmente por meio de dois mecanismos: as sialidases expõem receptores adicionais da toxina  $\epsilon$  nas superfícies celulares; e/ou elas modificam componentes da superfície celular que não são receptores, transformando-os de fato em receptores para a toxina. A tripsina desempenha papel fundamental durante essas etapas descritas, visto que, além de ativar a toxina  $\epsilon$ , também ativa e aumenta a atividade das sialidases. (Li et al., 2011).

*C. perfringens* tipo D cresce e produz toxinas em ambos os intestinos delgado e grosso. A toxina  $\epsilon$  produzida é absorvida em todos os segmentos intestinais, embora em maior proporção no cólon. Além disto, alguns fatores como baixo pH e altas concentrações de glicose e cloreto de sódio (NaCl) no intestino, possivelmente presentes durante a enterotoxemia, contribuem para uma maior absorção da toxina no intestino dos ruminantes (Losada-Eaton, et al., 2008).

Embora as lesões intestinais causadas pela toxina  $\epsilon$  causem alterações no funcionamento do órgão, permitindo a absorção da toxina, essas lesões não são frequentemente observadas nos casos de enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D. Isto sugere que a toxina age sobre o intestino alterando sua permeabilidade por mecanismos independentes de lesões morfológicas (Goldstein et al., 2009).

Pesquisas têm mostrado que a toxina  $\epsilon$  induz acúmulo de fluidos e aumento da permeabilidade intestinal por meio da abertura das junções oclusivas da mucosa, dilatação dos espaços intercelulares e alterações degenerativas da lâmina própria, afetando a homeostase dos fluidos, possivelmente pela via paracelular (Goldstein et al., 2009; Morris et al., 2012). Como consequência, água, eletrólitos e macromoléculas passam para o lume intestinal, o que explica a ocorrência de diarreia ou conteúdos aquosos no intestino de alguns animais com enterotoxemia. Apesar da toxina  $\epsilon$  se ligar aos enterócitos, não está definido se as alterações causadas são efeitos diretos desta ligação, ou se há interação da toxina com outros componentes da mucosa e/ou submucosa, levando à modulação fisiológica dos enterócitos (Goldstein et al., 2009).

Adicionalmente aos acima descritos, dois outros mecanismos podem participar da absorção intestinal da toxina  $\epsilon$ . Ela também

causa danos diretamente às células endoteliais do intestino, e aumenta a permeabilidade das paredes vasculares e intestinais (Goldstein et al., 2009). Além disto, a toxina  $\epsilon$  é capaz de inibir o trânsito gastrointestinal de camundongos, o que poderia contribuir para a multiplicação de *C. perfringens* tipo D, maior produção da toxina  $\epsilon$  e aumento da sua própria absorção. Duas hipóteses explicam esta inibição do trânsito gastrointestinal: ação local da toxina no intestino; e/ou ação no sistema nervoso central com danos neuronais, prejudicando a função motora intestinal (Losada-Eaton e Fernandez-Miyakawa, 2010).

### 2.2.6 Ação tóxica

Apenas algumas linhagens celulares são sensíveis aos efeitos nocivos da toxina  $\epsilon$ , sendo elas a GPPM, MDCK, G402, mpkCCD<sub>c14</sub>, HRTEC e ACHN. (Buxton, 1978a; Payne et al., 1994; Shortt et al., 2000; Chassin et al., 2007; Fernandez-Miyakawa et al., 2010; Ivie et al., 2011) (Tabela 2). Este espectro restrito de linhagens susceptíveis se deve muito provavelmente à presença de receptores específicos nas células sensíveis.

A linhagem celular GPPM parece ter sido a primeira linhagem sensível à toxina  $\epsilon$  a ser descoberta. Segundo Buxton (1978a), além de causar a morte destas células, a toxina altera a sua morfologia. Elas se tornam maiores, aparentemente com bolhas em seu interior, com irregularidades da membrana plasmática, e o citoplasma se torna mais refrangente. Ademais, as células apresentam diferentes sinais e graus de degeneração: redução do núcleo, núcleo com depósitos de cromatina mal definidos, anormalidades da membrana celular, membranas nuclear e citoplasmática com “bolhas” e descontínuas, e perda de organelas intracitoplasmáticas (Buxton, 1978a).

**Tabela 2** – Linhagens celulares sensíveis à toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D.

Nome da Linhagem	Descrição	Referência
GPPM	Macrófagos Peritoneais de Cobaio	Buxton, 1978a
MDCK	Rim Canino Madin-Darby	Payne et al., 1994
G402	Leiomioblastoma Renal Caucasiano	Shortt et al., 2000
mpkCCD <sub>c14</sub>	Ducto Coletor Cortical de Rato	Chassin et al., 2007
HRTEC	Células Epiteliais Tubulares Renais Humanas	Fernandez-Miyakawa et al., 2010
ACHN	Adenocarcinoma de Rim Humano	Ivie et al., 2011

A linhagem celular MDCK têm sido a mais utilizada nas pesquisas com a toxina  $\epsilon$ . Intoxicação das células dessa linhagem pela toxina leva a alterações morfológicas como edema e formação de bolhas. A lise celular ocorre devido à formação de um grande complexo membranar com cerca de 155 kDa, formação de poros, efluxo de íons potássio e influxo de íons sódio e cloreto. A concentração da toxina necessária para matar 50% (LC<sub>50</sub>) de uma cultura de células MDCK é de 15 ng/ml, e sua toxicidade é dependente da temperatura e pH do meio (Payne et al., 1994; Petit et al., 1997; Bokori-Brown et al., 2011). Em seus estudos, Nagahama et al. (2011) demonstraram que a toxina  $\epsilon$  sofre oligomerização nas “jangadas lipídicas”, e é internalizada via endocitose nas células MDCK. Após a endocitose, a proteína passa pelos endossomos iniciais, tardios e lisossomos. Uma vez nestas vesículas, a toxina oligomerizada e induz a formação de múltiplos vacúolos nas células.

As alterações morfológicas vistas na linhagem celular G402 intoxicadas são em parte semelhantes àquelas vistas na MDCK. Ocorrem alterações no citoesqueleto celular, arredondamento, separação do substrato e morte celular por necrose. A LC<sub>50</sub> da toxina  $\epsilon$  em 24 h para a linhagem G402 é de 280 µg/ml (Shortt et al., 2000).

Na linhagem mpkCCD<sub>c14</sub>, várias diferenças ocorrem em relação à ação da toxina em outras linhagens. Há entrada massiva de íons de Na<sup>+</sup> nas células, como também aumento das concentrações intracelulares de íons Ca<sup>2+</sup>. A morte celular ocorre devido tanto à formação de poros na membrana celular, quanto por oncose induzida pela depleção de ATP celular, e estímulo à proteína quinase ativada por AMP. Ocorre indução de necrose celular caracterizada por grande redução do tamanho do núcleo, mas sem fragmentação do DNA. Há difusão intracelular da toxina e depleção de coenzimas necessárias para a produção de energia pelas células. Uma série de alterações também acontece na fisiologia mitocondrial: abertura dos poros de transição de permeabilidade das membranas mitocondriais, permeabilização dessas membranas, redução do seu potencial de membrana, e translocação nuclear mitocondrial do fator indutor de apoptose (AIF) (Chassin et al., 2007; Fennessey et al., 2012a).

Os efeitos da toxina  $\epsilon$  na linhagem HRTEC se caracterizam por células severamente edemaciadas contendo bolhas grandes em seu interior e lise celular. Após o aparecimento destas alterações, as células se destacam umas das outras e ficam em suspensão na cultura. Complexos de aproximadamente 160 kDa, correspondentes ao complexo oligomérico formado pelos

monômeros da toxina, são formados e podem ser detectados nessas culturas. A LC<sub>50</sub> da toxina  $\epsilon$  em 24 h para a linhagem HRTEC é de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto a LC<sub>50</sub> em 1 h é de 3  $\mu\text{g/ml}$  (Fernandez-Miyakawa et al., 2010).

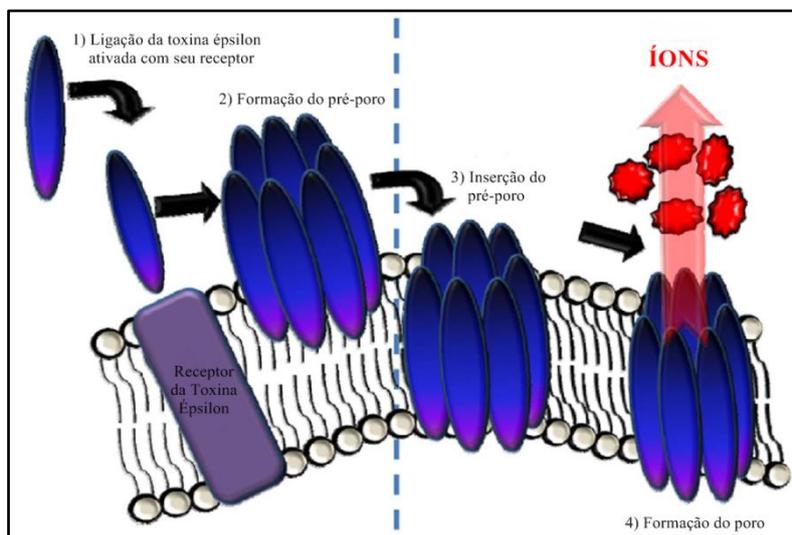
Última linhagem susceptível descoberta até o momento, a ACHN expressa uma variante do HAVCR1, receptor celular dos vírus da hepatite A, o qual se especula ser um receptor ou co-receptor da toxina  $\epsilon$  (Ivie et al., 2011). Utilizando essa linhagem, Fennessey et al. (2012b) demonstraram que as caveolinas 1 e 2 (CAV 1 e 2) potencializam a citotoxicidade induzida pela toxina. As caveolinas são proteínas integrais de membrana que podem exercer diversas funções, tais como: endocitose, potocitose, transcitose, transporte de colesterol, regulação da concentração intracelular de cálcio, internalização de toxinas, bactérias e vírus e regulação da transdução celular de sinais (Krajewska e Maslowska, 2004). As caveolinas estão presentes e concentradas nas “jangadas lipídicas” chamadas de caveolae. As toxinas  $\epsilon$  interagem com as CAV 1 e 2 como parte de um complexo protéico com cerca de 670 kDa. De maneira ainda não estabelecida, essas caveolinas promovem a oligomerização dos monômeros, potencializando a ação da toxina (Fennessey et al., 2012b).

Em suma, o modelo atual geral de ação da toxina  $\epsilon$  se dá da seguinte forma. (1) A protoxina  $\epsilon$  é ativada primordialmente pelas proteases tripsina, quimiotripsina e toxina  $\lambda$  (Uzal et al., 2010). (2) A toxina ativada se liga a receptores não identificados, que podem ser os HAVCR1, presentes em regiões da membrana celular chamadas de “jangadas lipídicas” (Miyata et al., 2002; Ivie et al., 2011). (3) A oligomerização também acontece dentro dessas regiões (Miyata et al., 2002), e há formação de grandes complexos protéicos com cerca de 155 kDa ou 220 kDa de massa molecular (Petit et al., 1997; Chassin et al., 2007;).

Esses complexos são monômeros da toxina e oligomerizados em um estado de pré-poro não inserido na membrana celular (Robertson et al., 2011). (4) Em seguida, os heptâmeros da toxina são inseridos nas mesmas regiões da membrana onde foram formados; e formam os poros ativos que permitem o trânsito de íons e moléculas de até cerca de 0,5 kDa, o que gera alterações e danos celulares (Miyata et al., 2002; Nestorovich et al., 2010). Há indícios de que esses heptâmeros também sejam internalizados e causem danos intracelulares (Chassin et al., 2007; Nagahama et al., 2011; Fennessey et al., 2012a) A Figura 3 sintetiza as etapas acima descritas, utilizando como modelo as células MDCK II.

Como relatado anteriormente, a toxina  $\lambda$  contribui para os efeitos nocivos da toxina  $\epsilon$ , por meio da sua ativação. Outras toxinas também produzidas por *C. perfringens* tipo D podem ter efeito sinérgico com a toxina  $\epsilon$  e potencializar suas ações. Entre elas, a toxina  $\alpha$  e a perfringolisina O atuam em sinergismo com a toxina  $\epsilon$ , reduzindo a dose letal desta em camundongos. Contudo, como isto acontece exatamente e se realmente ocorre na doença natural ainda não estão definidos. A toxina  $\alpha$  pode agir em nível celular, atuando em membranas celulares como uma fosfolipase C e com atividade de lecitinase. A clivagem de fosfolipídeos, esfingomielina e outros componentes da membrana celular poderia aumentar a interação da toxina  $\epsilon$  com a superfície celular ou, até mesmo, sua oligomerização. Citocinas e mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória contra a toxina  $\alpha$  contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e edema, os quais, por sua vez, podem permitir um maior acesso da toxina  $\epsilon$  aos seus órgãos alvo. A perfringolisina O, uma citolisina, lisa as hemácias e ativa a resposta inflamatória. O sinergismo entre perfringolisina O e toxina  $\epsilon$  pode ocorrer pelo aumento da permeabilidade intestinal causado pela última, favorecendo a absorção da

perfringolisina e sua ação. (Fernandez- Miyakawa et al., 2008).



**Figura 3** – Ação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D em células MDCK II (Adaptado de Robertson et al., 2011).

Como relatado anteriormente, a toxina  $\lambda$  contribui para os efeitos nocivos da toxina  $\epsilon$ , por meio da sua ativação. Outras toxinas também produzidas por *C. perfringens* tipo D podem ter efeito sinérgico com a toxina  $\epsilon$  e potencializar suas ações. Entre elas, a toxina  $\alpha$  e a perfringolisina O atuam em sinergismo com a toxina  $\epsilon$ , reduzindo a dose letal desta em camundongos. Contudo, como isto acontece exatamente e se realmente ocorre na doença natural ainda não estão definidos. A toxina  $\alpha$  pode agir em nível celular, atuando em membranas celulares como uma fosfolipase C e com atividade de lecitinase. A clivagem de fosfolídeos, esfingomiéline e outros componentes da membrana celular poderia aumentar a interação da toxina  $\epsilon$  com a superfície celular ou, até mesmo, sua oligomerização. Citocinas e mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória contra a toxina  $\alpha$  contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e edema, os quais, por sua vez, podem permitir um maior acesso da toxina  $\epsilon$  aos seus órgãos alvo. A perfringolisina O, uma citolisina, lisa as

hemácias e ativa a resposta inflamatória. O sinergismo entre perfringolisina O e toxina  $\epsilon$  pode ocorrer pelo aumento da permeabilidade intestinal causado pela última, favorecendo a absorção da perfringolisina e sua ação. (Fernandez-Miyakawa et al., 2008).

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

No intestino, a ação da toxina  $\epsilon$  pode resultar em acúmulo de fluidos, hemorragia da mucosa e presença de conteúdo hemorrágico. Alterações histopatológicas nos intestinos delgado e grosso compreendem congestão e erosão da mucosa com hemorragia afetando a mucosa, lâmina

própria e sub-mucosa, e infiltrado de polimorfonucleares moderado. Ultraestruturalmente, a toxina causa destacamento de células epiteliais e necrose celular, hemorragia da lâmina própria e infiltração de polimorfonucleares. Também há abertura das junções oclusivas e dilatação dos espaços intercelulares, principalmente no intestino grosso (Goldstein et al., 2009; Morris et al., 2012). Juntamente com a toxina  $\epsilon$ , a toxina  $\beta 2$  parece contribuir para a patogênese das lesões observadas no intestino. Ela seria a responsável pela necrose e formação das úlceras observadas em alguns casos de enterotoxemia, principalmente nos caprinos (Uzal et al., 2008).

Após ganhar a circulação sanguínea, a toxina  $\epsilon$  é distribuída em seus órgãos alvo, mas se acumula predominantemente nos rins. A toxina pode ser detectada em todo o rim, exceto em sua medula e túbulos proximais, mas predominantemente nos glomérulos, capilares e ductos coletores. Dentro do sistema renal, a toxina  $\epsilon$  também pode ser detectada nas células epiteliais da bexiga (Tamai et al., 2003; Dorca-Arévalo et al., 2012). Histologicamente, observa-se dilatação do espaço de Bowman e alterações degenerativas dos túbulos distais e ductos coletores, tais como: redução da altura das células epiteliais, dilatação dos lumens e esfoliação celular. Paradoxalmente ao grande acúmulo da toxina nos rins, as lesões renais e os sinais clínicos derivados delas são pouco importantes durante a doença. Na verdade, a nefrectomia bilateral de camundongos injetados com a toxina  $\epsilon$  reduz os seus tempos de sobrevivência. Possivelmente, os rins contribuem para a redução da toxina circulante, e então protegem os animais dos seus efeitos nocivos em outros órgãos (Tamai et al., 2003).

No sistema cardiorrespiratório e nas pleuras, a ação da toxina  $\epsilon$  no endotélio dos vasos sanguíneos leva à formação de poros e causa

aumento da permeabilidade vascular. Como consequência, há extravasamento de líquidos, e formação de hidropericárdio, hidrotórax e edema pulmonar (Uzal e Songer, 2008; Popoff, 2011).

Quando altas doses da toxina  $\epsilon$  chegam ao cérebro, as lesões são predominantemente microscópicas e constituem-se em edema vasogênico severo e generalizado. Quando doses menores chegam ao órgão, ou o animal acometido possui imunidade parcial à toxina, as lesões são frequentemente macroscópicas, e constituem-se em malácia focal bilateral simétrica. Esta alteração pode se desenvolver nos gânglios basais, cápsula interna, tálamo, substância nigra, hipocampo ou pedúnculos cerebelares, sendo chamada de encefalomalácia focal simétrica (EFS). Menos comumente, a lise e liquefação de certas regiões da matéria branca também podem ocorrer (Finnie, 2004). Uma alteração microscópica característica e patognomônica da ação da toxina  $\epsilon$  no tecido nervoso é o edema perivascular proteináceo, caracterizado pelo acúmulo de proteínas ao redor de pequenas e médias artérias e veias. Essa alteração é possivelmente causada pelos danos causados pela toxina às células endoteliais destes vasos (Uzal e Songer, 2008).

A superfície luminal das células endoteliais do cérebro é provavelmente o local de ligação da toxina  $\epsilon$ , e o endotélio microvascular é onde acontecem as principais alterações. As células endoteliais danificadas pela toxina apresentam inicialmente edema, perda de organelas citoplasmáticas, formação de vesículas, redução do citoplasma e picnose nuclear. Como consequência das lesões vasculares, ocorre a perda da barreira hematoencefálica (BHE), aumento da permeabilidade vascular, edema cerebral generalizado e aumento da pressão intracraniana. Há edema periaxonal e intramielínico na matéria branca do cerebelo, acompanhado por edema dos terminais axonais e dendritos da

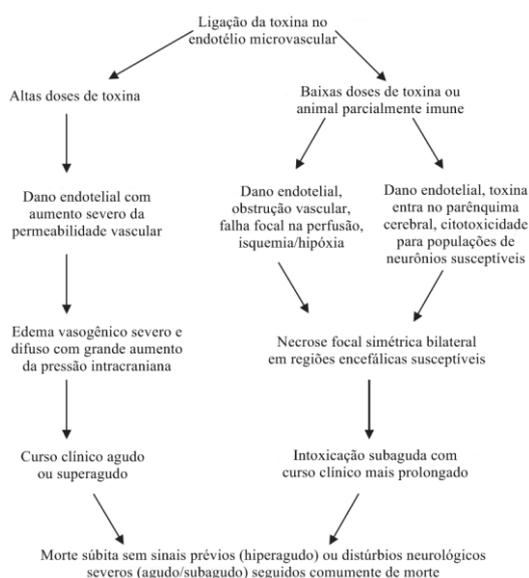
matéria cinzenta adjacente e edema dos astrócitos da camada granulosa cerebelar. Além do endotélio, a toxina parece também atuar nas membranas sinaptossomais (Finnie, 2004).

Os eventos vasculares no cérebro parecem estar envolvidos no desenvolvimento das áreas de EFS. Danos endoteliais podem causar microtrombozes e oclusão dos vasos por agregados plaquetários; juntamente com o edema adjacente, estas alterações podem levar ao colapso, obstrução capilar e estase sanguínea. Como resultado, ocorre falha da perfusão sanguínea e isquemia ou hipóxia focais. É também possível que a toxina  $\epsilon$ , após romper a BHE, aja diretamente em neurônios e outros elementos neurais, exercendo citotoxicidade (Finnie, 2004).

De fato, a hipótese de ação direta da toxina  $\epsilon$  foi recentemente comprovada por Lonchamp et al. (2010). Estes autores demonstraram em seus experimentos que a toxina se liga a diversas estruturas encefálicas, tais como: o hipocampo, tálamo, corpo estriado, substância nigra, bulbo olfativo, colículos, substância branca cerebral, mas

principalmente o cerebelo. Nesta área, a toxina se liga aos oligodendrócitos e células granulares, nas quais induz a liberação de glutamato, um neurotransmissor excitatório. Também ocorre a indução da liberação desse neurotransmissor pelas células neuronais do hipocampo que sofrem a ação da toxina (Miyamoto et al., 2000). Essa indução da liberação do glutamato pelas células granulares se dá provavelmente de forma indireta, por meio de danos à morfologia e fisiologia neuronais. A toxina  $\epsilon$  provoca queda na resistência das membranas neuronais, abertura de poros, despolarização da membrana e aumento intracelular dos íons  $Ca^{2+}$ , o que culmina com o disparo da maquinaria neuronal e estimulação da liberação do neurotransmissor. Os efeitos do glutamato liberado no sistema nervoso central podem contribuir para os sinais neurológicos frequentemente observados nos animais acometidos pela enterotoxemia (Lonchamp et al., 2010).

A Figura 4 sumariza as ações da toxina  $\epsilon$  no sistema nervoso central.



**Figura 4** – Sumário esquemático da patogênese dos danos encefálicos causados pela toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D (Adaptado de Finnie, 2004).

## 2.3 Enterotoxemia dos Ruminantes Domésticos

A enterotoxemia, também chamada de doença do rim polposo e doença da superalimentação, é causada primordialmente pela toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, e afeta os ruminantes domésticos (Lobato et al., 2007). As principais espécies acometidas são os ovinos e caprinos, sendo esta enfermidade a clostridiose que acarreta o maior impacto econômico e sanitário nas criações destes animais em todo o mundo (VIII Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Média Mogiana, 2005). Além dessas espécies, os bovinos também podem apresentar a enfermidade, sendo mais comum nos bezerros (Morris et al., 2012).

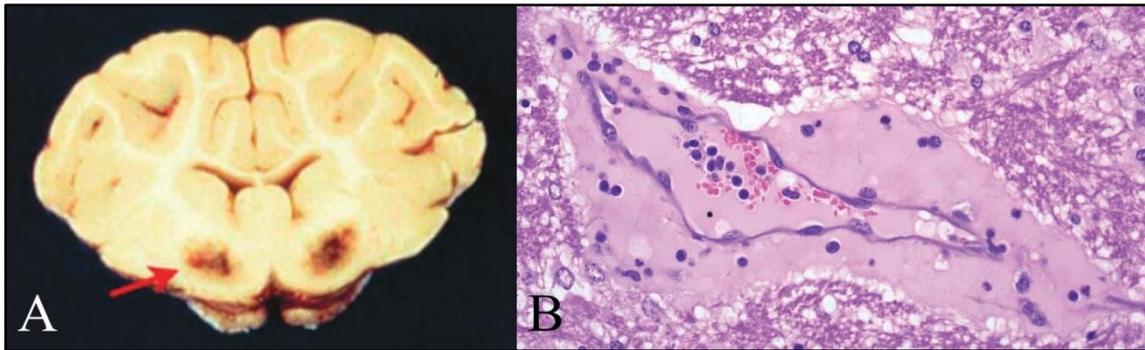
*C. perfringens* tipo D pode ser um habitante normal dos intestinos dos ruminantes, mas sob certas circunstâncias pode haver desequilíbrio da microbiota intestinal, multiplicação exacerbada da bactéria, e consequente alto nível de produção de toxinas. Os fatores predisponentes para que isto ocorra são frequentemente: mudanças repentinas de dieta, principalmente para aquelas ricas em carboidratos fermentáveis, tais como pastos luxuriantes, grãos e rações concentradas; superalimentação; infestação por vermes intestinais; infestação por coccídeos; administração de drogas, como a fenotiazina e netobimina; frio ou calor excessivos; outros fatores que levem ao estresse; e baixa imunidade contra a toxina  $\epsilon$  (Uzal, 2004). Subsequentemente à grande produção de toxinas, elas agem localmente no intestino, causando ou não lesões, aumentam a permeabilidade vascular neste órgão, são absorvidas e distribuídas para outros sistemas pela circulação sanguínea. Uma vez que a toxina  $\epsilon$  alcança os rins,

pulmões e encéfalo, ela desenvolve sua ação nociva e gera as lesões e sinais clínicos presentes nas enterotoxemias, como relatado anteriormente.

### 2.3.1 Ovinos

As enterotoxemias causadas por *C. perfringens* são as doenças clostridiais mais comuns dos ovinos nos países criadores destes animais (Lewis, 2011). A espécie é, de longe, a mais acometida pela enterotoxemia causada por *C. perfringens* tipo D, o que leva a grandes perdas econômicas nas criações. A doença acomete principalmente cordeiros de quatro a 10 semanas de idade e naqueles com seis meses ou mais; porém ela também pode ocorrer em animais recém-nascidos e de até cinco dias de vida (Scholes et al., 2007).

O curso da enfermidade pode ser agudo, subagudo ou crônico, e a ocorrência de mortes súbitas é frequente. Os sinais clínicos mais frequentes nesta espécie são neurológicos e respiratórios: cegueira, opistótono, convulsões, balido, espuma saindo pela boca e decúbito lateral com pedalagem previamente à morte. Diarréia e outras alterações intestinais acontecem ocasionalmente, e estas são limitadas à hiperemia da mucosa do intestino delgado, presença de fluidos intestinais avermelhados e colite. Hidropericárdio, hidroperitônio, hidrotórax, edema pulmonar e presença de petéquias na serosa deste órgão são frequentes. No encéfalo, herniação do cerebelo pode ocorrer nos cursos agudo e subagudo; e a EFS pode estar presente nos casos crônicos (Figura 5). Edema perivascular proteináceo é visto em cerca de 90% dos casos e é patognomônico da doença (Uzal e Songer, 2008; Uzal et al., 2010) (Figura 5).



**Figura 5** – Lesões encefálicas observadas em cordeiro causadas pela toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. **A.** Encefalomalácia focal simétrica, lesão sugestiva de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D. Seta: área da lesão. **B.** Edema perivascular proteináceo, lesão patognomônica da enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo D (Adaptado de Uzal e Songer, 2008).

### 2.3.2 Caprinos

Os caprinos são a segunda espécie mais acometida pela enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D, e a doença pode ser a causa mais comum de mortes súbitas na espécie em todo o mundo (VIII Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Média Mogiana, 2005).

A enfermidade nestes animais pode ter curso agudo, subagudo e crônico. A forma aguda ocorre mais frequentemente nos animais jovens, não vacinados, e os sinais clínicos e lesões observados são semelhantes àqueles dos ovinos: morte súbita, cegueira, opistótono, convulsões, balido, espuma saindo pela boca e decúbito lateral com pedalagem previamente à morte. Ademais, há hiperemia da mucosa do intestino, fluidos intestinais avermelhados, colite, hidropericárdio, hidroperitônio, edema pleural e pulmões edemaciados e com petéquias na serosa. No curso subagudo, comum nos caprinos adultos, as lesões observadas costumam ser uma combinação daquelas que ocorrem nos cursos agudo e crônico. Há diarreia hemorrágica, dor abdominal, choque, opistótono e convulsões, com a morte sendo frequente dentro de dois a quatro dias após o início dos sinais. Animais adultos, comumente vacinados, podem desenvolver a forma crônica, a qual

se estende por dias até semanas. Ela é caracterizada por diarreia aquosa profusa, com presença ou não de muco e sangue, dor abdominal, fraqueza, anorexia e agalaxia. Histologicamente, colite fibrino-hemorrágica ou fibrinonecrótica são observadas (Uzal e Songer, 2008; Uzal et al., 2010).

Anteriormente, acreditava-se que a EFS fosse uma lesão presente exclusivamente nos casos crônicos de enterotoxemia nos ovinos. Entretanto, recentemente, verificou-se que a EFS também pode ocorrer em caprinos acometidos pela doença, provavelmente nos quadros mais crônicos (Oliveira et al., 2010). Edema perivascular e degeneração da matéria branca, semelhante aos que ocorrem nos ovinos, também podem ser observados na enfermidade aguda e subaguda (Uzal e Songer, 2008; Uzal et al., 2010).

### 2.3.3 Bovinos

Diferentemente do que ocorre para os pequenos ruminantes, pouca importância têm se dado à enterotoxemia dos bovinos. Existem apenas dois relatos de casos da doença em condições naturais laboratorialmente confirmados, sendo um deles no Reino Unido (Watson e Scholes, 2009) e outro no Brasil (Lobato et al., 2006). Diversos outros trabalhos, listados por Uzal e colaboradores em 2010, descrevem a

ocorrência de animais acometidos por sinais clínicos e lesões sugestivos de enterotoxemia; no entanto, segundo estes autores, esses trabalhos falharam na confirmação da relação entre as lesões e sinais observados e o agente causal *C. perfringens* tipo D.

Baseado principalmente em estudos da enterotoxemia induzida experimentalmente em bovinos, os sinais clínicos e lesões observados são: dispnéia, letargia, redução da motilidade rumenal, ataxia, perda de consciência, hiperestesia, convulsões, opistótono, cegueira, perda de reflexo pupilar, estrabismo, bruxismo, tônus muscular diminuído, hipersalivação, decúbito, pedalagem, edema pulmonar, hidropericárdio, hidrotórax, hidroperitônio, hemorragia de mucosas, conteúdo aquoso no intestino delgado, edema perivascular proteináceo e EFS. (Filho et al., 2009; Uzal et al., 2010). A morte súbita de bovinos sem causa aparente também parece ser sugestiva de enterotoxemia nesta espécie (Lobato et al., 2006).

### 2.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da enterotoxemia nos ruminantes domésticos é complexo e deve ser baseado no maior número de informações possíveis. Essas informações devem ser reunidas a partir dos históricos do rebanho e dos animais acometidos, sinais clínicos e lesões observados, achados de necropsia, histopatologia, bacteriologia, mas principalmente a partir da detecção da toxina  $\epsilon$  no conteúdo intestinal (Lobato et al., 2007). O histórico, sinais clínicos, lesões, quantificação da glicose urinária, isolamento da bactéria (em níveis de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  UFC/g em ovinos) e detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) são úteis para o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo da enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D. Já a detecção da toxina no conteúdo intestinal fornece diagnóstico definitivo. Ademais, a evidenciação de

edema perivascular proteináceo no tecido cerebral pela histopatologia é de extrema relevância, já que tal lesão é patognomônica da doença (Uzal e Songer, 2008).

O teste padrão para a detecção da toxina  $\epsilon$  é a soroneutralização em camundongos. A espécime clínica utilizada é o conteúdo intestinal, preferencialmente ileal, de animais suspeitos, acondicionados em recipientes limpos e refrigerados ou congelados (Layana et al., 2006). Embora a soroneutralização em camundongos seja altamente sensível, ela possui alto custo, é dispendiosa, requer técnicos especializados e um grande número de animais. Estes fatores, em conjunto com as atuais discussões em bioética, culminaram com a necessidade do desenvolvimento de metodologias que possam substituir total ou parcialmente o teste *in vivo*, com destaque para os ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) e a soroneutralização celular (Uzal et al., 2003; Lobato et al., 2007; Uzal e Songer, 2008; Sobrinho et al., 2010; Souza Júnior et al., 2010).

### 2.3.5 Profilaxia e controle

O tratamento mais indicado contra a enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D é a administração de soro contendo anticorpos antitoxina  $\epsilon$ . Entretanto, com raras exceções, os tratamentos contra as doenças clostridiais quase sempre falham. Isto ocorre devido a estas enfermidades serem frequentemente agudas e altamente letais; além do fato de que quando os sinais clínicos nos animais acometidos são observados, já houve grandes danos teciduais e lesões (Lewis, 2011).

Considerando as características do *C. perfringens* tipo D, sua resistência, distribuição ambiental e presença no trato gastrointestinal dos animais, a erradicação do agente é inviável. Somado à ineficácia do tratamento, a profilaxia e o controle da enterotoxemia tornam-se prioridades nas

criações dos ruminantes domésticos. Ambos se apoiam em dois fundamentos: redução dos fatores predisponentes e vacinação (Lobato e Assis, 2000). Os fatores predisponentes a serem combatidos, eliminados ou reduzidos são: mudanças repentinas de dieta, principalmente para pastos luxuriantes, grãos e rações concentradas; superalimentação; infestação por parasitas; infestação por coccídeos; frio ou calor excessivos; e outros fatores que levem ao estresse (Uzal, 2004).

A vacinação é a principal medida para a profilaxia e controle da enterotoxemia por *C. perfringens* tipo D. As vacinas mais modernas disponíveis comercialmente são constituídas basicamente de toxóides. Embora imunógenos monovalentes possam ser utilizados em condições específicas, há uma crescente tendência em todo o mundo para a produção e utilização de vacinas polivalentes, contendo antígenos de outros agentes, principalmente clostridiais. Os ruminantes domésticos devem ser vacinados a partir dos três ou quatro meses de idade. Os protocolos de vacinação requerem basicamente duas doses, separadas no tempo de quatro a seis semanas, para o estabelecimento de concentrações de anticorpos circulantes protetoras (Lewis, 2011). Reforço anual é necessário para ovinos e bovinos, e acredita-se que este período deve ser reduzido para cerca de quatro meses para os caprinos (Uzal e Kelly, 1996).

A prevenção da enterotoxemia em animais recém-nascidos, principalmente cordeiros, pela transferência passiva de imunoglobulinas têm sido alvo de interesse (Bokori-Brown et al., 2011). A transferência passiva natural, por meio da colostragem, pode ser melhorada vacinando-se as ovelhas quatro a três semanas antes da temporada de parições (Lewis, 2011). Já a transferência passiva artificial pode ser realizada por meio da administração intravenosa de soro contendo anticorpos policlonais aos

cordeiros recém-nascidos (Bokori-Brown et al., 2011).

As vacinas de toxóides contra a toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* têm sido mundialmente utilizadas de forma extensiva nas últimas décadas. Somente no Brasil, mais de 150 milhões de doses de vacinas contendo esse toxóide são produzidas por ano, refletindo o impacto causado pela enterotoxemia nos atuais sistemas de criação, e a crescente necessidade de se proteger um grande número de animais frente à esta enfermidade e às outras clostridioses (Gonçalves et al., 2009).

Embora essas vacinas possam ser efetivas na prevenção da enterotoxemia, a qualidade das mesmas oscila enormemente entre os países e os fabricantes, ocorrendo grande variação das respostas imunes dos animais vacinados (Uzal e Songer, 2008; Titball, 2009). A produção de toxinas *in vitro* é o principal entrave para a fabricação de bons imunógenos. Ela requer a utilização de amostras toxigênicas, bem como meios de cultura específicos, pH, tempo, atmosfera de incubação adequados para o cultivo dos clostrídios e otimização da produção de toxinas (Gonçalves et al., 2009). Além disto, repiques sucessivos *in vitro* das amostras de *C. perfringens* tipo D podem levar à perda dos seus elementos extracromossomais que carregam o gene da toxina, levando as amostras a produzirem baixos títulos de toxinas, ou mesmo à perda total da toxigenicidade (Titball e Popoff, 2006). Por fim, outro problema é que não há atualmente vacinas especificamente para caprinos, sendo utilizadas nesta espécie aquelas produzidas para ovinos (Uzal e Kelly, 1996).

Em 1998, Azevedo et al. testaram a eficiência de sete vacinas comerciais que continham toxóides de *C. perfringens* tipo D. Os seis imunógenos produzidos no Brasil falharam em estimular níveis sorológicos adequados de anticorpos anti-épsilon; apenas um imunógeno importado apresentou

títulos de anticorpos séricos superiores aos níveis mínimos exigidos no país. Aparentemente, este perfil de qualidade das vacinas tem melhorado ao longo dos últimos anos. No entanto, mais pesquisas em vacinologia são necessárias visando o aperfeiçoamento e modernização das vacinas existentes, assim como a busca de novos imunógenos por meio de outras estratégias e tecnologias.

As vacinas recombinantes contra a toxina  $\epsilon$ , embora tenham sido estudadas em alguns trabalhos (Oyston et al., 1998; Chandran et al., 2010; Lobato et al., 2010; Mathur et al., 2010; Souza et al., 2010), têm recebido pouca atenção. Dentre os entraves inerentes a este tipo de vacina, destaca-se a dificuldade na obtenção de mutantes que sejam imunogênicas e seguras ao mesmo tempo (Titball, 2009). Outro trabalho utilizou anticorpos anti-idiotípicos para induzir proteção contra *C. perfringens* tipo D em camundongos e coelhos, obtendo sucesso (Percival et al., 1990). Porém, pesquisas subsequentes visando à continuação do trabalho, produção de uma vacina para animais de produção e seu aperfeiçoamento não foram realizadas. Até o presente momento, outras tecnologias em vacinologia, tais como vacinas de DNA e de subunidade, como as de peptídeos sintéticos, não foram alvo de estudos ou pesquisas em relação à toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D.

## 2.4 A Toxina Épsilon e o Homem

Diferentemente da enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, conhecido por ser um dos principais causadores de intoxicação alimentar nos humanos (Miyamoto et al., 2012), pouco se sabe sobre a importância da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D para a saúde humana. Existem apenas dois relatos de casos de enfermidades em humanos relacionados com a toxina  $\epsilon$ , ambos datados de 1955. Em um deles, um paciente com obstrução intestinal aguda desenvolveu uma infecção por *C. perfringens* tipo D com

consequente produção da toxina  $\epsilon$  em seu intestino (Gleeson-White e Bullen, 1955, citado por Popoff, 2011). No outro caso, uma pessoa internada para o tratamento de outra doença não relacionada desenvolveu dor abdominal e diarreia severa; *C. perfringens* tipo D foi isolado das fezes deste paciente, e anticorpos anti- $\epsilon$  foram detectados em seu soro (Kohn e Warrack, 1955, citado por Popoff, 2011).

Algumas linhagens celulares de origem humana tiveram suas sensibilidades avaliadas frente à toxina  $\epsilon$ . Dentre elas, as linhagens G402, HRTEC e ACHN foram sensíveis à toxina, reforçando uma provável nocividade da mesma ao organismo humano (Shortt et al., 2000; Fernandez-Miyakawa et al., 2010; Ivie et al., 2011). Extrapolando os dados de estudos com camundongos, estima-se que a  $DL_{50}$  da toxina  $\epsilon$  administrada via intravenosa em humanos seja de 100 ng/kg, sendo então altamente tóxica para a espécie (Mantis, 2005). Em outras palavras, uma dose parenteral de 7  $\mu$ g da toxina teria 50 % de chance de ser letal para uma pessoa com cerca de 70 kg.

Considerando o supradito, é praticamente inegável que o contato de pessoas com a toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, seja em condições naturais, como em doenças, seja ele induzido, pode acarretar riscos à saúde humana. De fato, a toxina é atualmente considerada um potencial agente de bioterrorismo ou para guerra biológica, atraindo a atenção de diversos órgãos de saúde pública internacionais (Bokori-Brown et al., 2011; Popoff, 2011). Acredita-se, inclusive, que o Iraque tinha grande interesse na utilização das toxinas de *C. perfringens* como armas biológicas (Butler, 1999). Como resultado, a toxina  $\epsilon$  está classificada como agente biológico da categoria B pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (CDC Strategic Planning Workgroup, 2000).

Como agente de bioterrorismo, a toxina  $\epsilon$  possui potencial para a disseminação em massa, primariamente via aerossol. A inalação desse agente por uma pessoa deve resultar em danos às células endoteliais dos vasos sanguíneos pulmonares, com consequente lesão primária nos pulmões, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e edema pulmonar. Em seguida, a toxina absorvida pode alcançar outros órgãos, causando lesões renais, cardíaca e do sistema nervoso central. Estima-se que a  $DL_{50}$  da toxina  $\epsilon$  em humanos, pela via respiratória, seja 10 vezes aquela pela via parenteral, isto é, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Assim sendo, doses suficientes da toxina podem, teoricamente, debilitar rapidamente grandes populações civil e militar, ou até mesmo causar a morte de um número considerável de pessoas (Greenfield et al., 2002).

Embora soros contendo anticorpos contra a toxina  $\epsilon$  possam teoricamente neutralizá-la, não há tratamento aprovado em humanos contra os efeitos dessa toxina. O rápido início dos sintomas e a alta letalidade podem tornar esse tratamento inviável. Desta forma, o possível uso da toxina como arma biológica em conjunto com a inexistência de um tratamento eficaz e viável ressaltam a necessidade de se desenvolver uma vacina segura e eficaz para humanos (Titball, 2009; Bokori-Brown et al., 2011). Todavia, não há relatos de testes de vacinas contra a toxina  $\epsilon$  em humanos ou outros primatas (Mantis, 2005). Grande parte dos imunógenos licenciados para o uso em veterinária são produzidos a partir do sobrenadante cru ou apenas parcialmente purificado das culturas de *C. perfringens* tipo D. Desta maneira, em situações normais, é improvável que estas vacinas licenciadas para uso veterinário, constituídas basicamente por toxóides, sejam aprovadas para uso humano (Titball, 2009).

Em contrapartida da necessidade de uma vacina, durante uma eventual guerra biológica ou ataque bioterrorista, é possível

que a efetividade da imunização seja comprometida caso uma grande quantidade de toxina  $\epsilon$  seja inalada. Há a possibilidade de que a concentração local pulmonar e circulante de imunoglobulinas não seja suficiente para combater a ação e os efeitos da toxina. Neste caso, o desenvolvimento e a disponibilidade de um tratamento auxiliar e profilático é de extrema importância. Anticorpos de origem humana ou animal, inteiros ou seus fragmentos (Fab`s), administrados por via intravenosa ou inalados via aerossol, poderiam ser utilizados como tratamento curativo rápido ou profilático contra a toxina  $\epsilon$  (Paddle, 2003). Outra opção é o desenvolvimento de terapias baseadas em drogas ou subunidades da toxina que compitam com a proteína nativa pela ligação aos receptores celulares, inibindo e/ou deslocando-a dos mesmos.

Finalmente, os efeitos potentes e únicos da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D também podem ser explorados por áreas nobres da ciência visando benefícios à sociedade. Uma das possibilidades está relacionada com a capacidade da toxina em agir no sistema nervoso central, e de certa forma romper ou ultrapassar a BHE (Finnie, 2004). A modulação desta ação pode, futuramente, permitir que medicamentos e quimioterápicos alcancem, penetrem com maior facilidade e se acumulem no sistema nervoso central (Hirschberg et al., 2009). O resultado disto pode ser uma maior eficácia e eficiência dos tratamentos contra neoplasias e diversas doenças infecciosas, inflamatórias e vasculares.

## 2.5 Vacinas de Peptídeos Sintéticos

De forma geral, as vacinas de peptídeo sintético são compostas de partes de antígenos proteicos, sintetizadas a partir de aminoácidos e agregadas em uma única molécula ou complexo supramolecular. Essa molécula ou complexo é, então, reconhecido(a) pelo sistema imune e incita uma resposta imune contra si próprio(a) e

indiretamente contra o antígeno da qual teve origem. As partes ou porções dos antígenos proteicos, os peptídeos, exibindo atividade de epitopos de células T e/ou células B são o principal componente dessas vacinas (Moisa e Kolesanova, 2010).

Sendo assim, para o desenvolvimento destes imunógenos constituídos de subunidades de proteínas, é necessário que se saiba quais partes delas são antigênicas e, possivelmente, imunogênicas. Para tal, o mapeamento dos epitopos ou determinantes antigênicos do antígeno alvo é uma etapa crucial. Esses epitopos representam as porções antigênicas de um antígeno, e são selecionados durante a construção das vacinas à base de peptídeos, enquanto as regiões não antigênicas não são utilizadas (Li Pira et al., 2010).

As vacinas de peptídeos sintéticos têm sido amplamente pesquisadas e desenvolvidas, abrangendo diversas doenças e afecções de humanos, principalmente, mas também de animais. Algumas destas enfermidades com imunógenos de peptídeos em desenvolvimento são: diversos tipos de câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), alergias, esclerose múltipla, hepatite tipo C, diabetes tipo I, herpes genital, malária, pneumonias, Alzheimer, botulismo, intoxicação por *C. perfringens* tipo A, febre aftosa, ofidismo, escorpionismo, dentre outras. Essas vacinas se encontram em diversas fases de desenvolvimento, desde o mapeamento de epitopos, seleção dos peptídeos antigênicos e construção do imunógeno até as fases finais de ensaio clínico (Mietzner et al., 1992; Purcell et al., 2007; Duarte et al., 2010; Moisa e Kolesanova, 2010; Perez et al., 2010; Machádo-de-Ávila et al., 2011).

Dentre as vantagens dos imunógenos de peptídeos sintéticos, podem ser citadas: a ausência de material infeccioso, o que exclui a necessidade de cultivar micro-organismos; possibilidade de exclusão de sequências

deletérias e patogênicas do antígeno, as quais possam vir a causar doenças ou danos à saúde humana e animal; lipídeos, carboidratos e grupos químicos podem ser adicionados aos peptídeos para modular sua imunogenicidade e estabilidade; a introdução de aminoácidos não naturais e outras moléculas permite a criação de compostos parecidos com medicamentos, aumentando a difusibilidade e distribuição dos peptídeos; facilidade da análise de pureza por cromatografia líquida e espectrometria de massas, facilitando o controle de qualidade das vacinas pela indústria e pelos organismos governamentais oficiais; a produção em larga escala é economicamente viável; o imunógeno pode ser armazenado liofilizado, eliminando a necessidade da "cadeia do frio" para o armazenamento, transporte e distribuição do produto; não há risco de reversão ou formação de recombinantes virulentos; não há risco de integração genética ou recombinação, o que pode acontecer em vacinas de DNA; e por fim, as vacinas de peptídeos podem incluir determinantes de vários patógenos, ou vários epitopos do mesmo patógeno (Purcell et al., 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Mapear os epitopos da toxina épsilon ( $\epsilon$ ) de *Clostridium perfringens* tipo D, e produzir imunógenos de peptídeos sintéticos.

#### 3.2 Específicos

- Produzir, concentrar e purificar a toxina nativa de *C. perfringens* tipo D, e utilizá-la para a produção do toxóide  $\epsilon$ ;
- Produzir soro hiperimune contra o toxóide  $\epsilon$ , em coelhos e ovino;
- Mapear os determinantes antigênicos da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D pela técnica de Spot;

- Sintetizar os peptídeos correspondentes aos epítopos imunodominantes da toxina  $\epsilon$ ;
- Produzir imunógenos a partir dos peptídeos sintetizados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma Geral do Trabalho

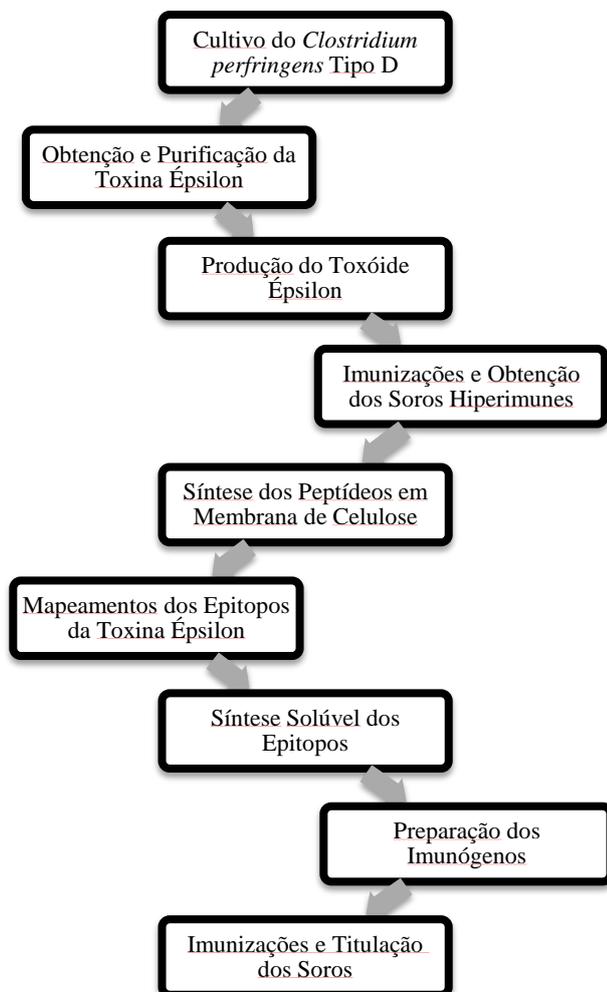


Figura 6 – Fluxograma geral do trabalho

### 4.2 Locais de Realização do Experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), no Laboratório de Imunologia e Bioprodutos da Fundação

Ezequiel Dias (FUNED) e na fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFMG.

### 4.3 Animais Utilizados no Experimento

Foram utilizados: camundongos da raça Swiss, de ambos os sexos, pesando entre 17 e 22g, mantidos no Biotério da EV-UFMG;

coelhas da raça Nova Zelândia, pesando entre 1,5 e 2,5 kg, mantidos no Biotério da EV-UFMG; ovelha, entre 4 e 8 meses de idade, mantida na fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA – 106/2012).

#### **4.4 Meios de Cultura**

Durante este trabalho foram utilizados os seguintes meios de cultura: caldos *Brain and Heart Infusion*-BHI, tioglicolato e sabouraud (Difco Laboratories, Detroit, EUA) e meio de produção de toxina-MPT (Azevedo et al., 1998).

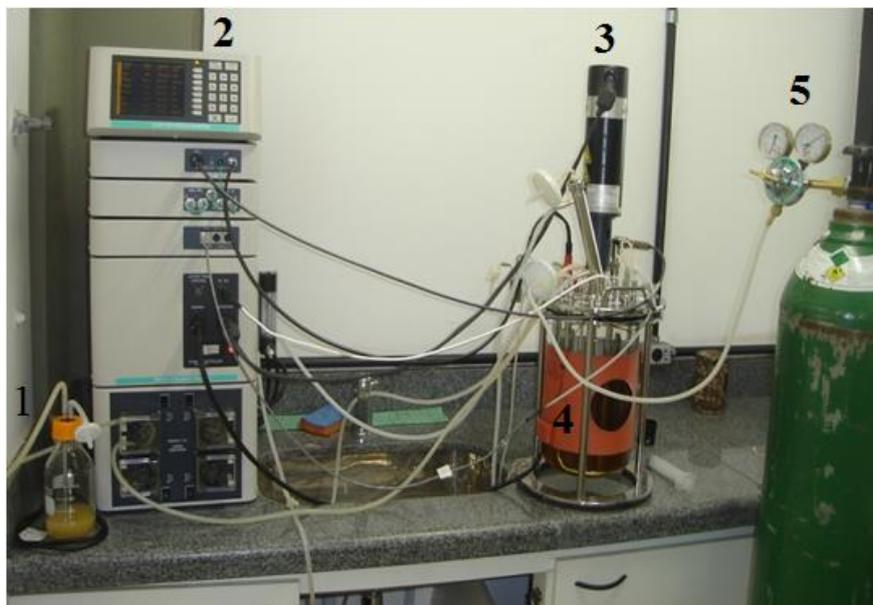
#### **4.5 Produção da Toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* Tipo D**

##### **4.5.1 Cultivo da amostra**

Foi utilizada a estirpe de *C. perfringens* tipo D (Uzal et al., 1997), pertencente à bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG, mantida liofilizada. Após a reconstituição com meio de cultura BHI, foram inoculados 100 µL da amostra em 10 mL de caldo tioglicolato (v/v); a incubação foi realizada a 37°C, em jarra de anaerobiose contendo mistura gasosa (80% N<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; e 10% H<sub>2</sub>), por 24 horas. Após esse período, a amostra foi avaliada quanto à pureza pela coloração de Gram.

##### **4.5.2 Produção e purificação da toxina épsilon**

Para a produção da toxina épsilon ( $\epsilon$ ) de *C. perfringens* tipo D, foi utilizado um biorreator de bancada (BioFlo 110, New Brunswick Scientific C.O., UK) com volume da dorna de 5,0L (Figura 7). O biorreator é provido de uma turbina do tipo *pitched-blade*, dispoñdo de controle de velocidade de agitação e fornecimento de gás nitrogênio, permitindo manter uma atmosfera anaeróbia durante o ensaio. O aparelho possui um sistema automático de controle de temperatura e pH, além de permitir a coleta de alíquotas para a determinação da concentração celular, a qual foi quantificada através da medida de densidade ótica (DO), em espectrofotômetro, lida a 600 nm, a cada hora. O meio utilizado para a produção desta toxina foi o MPT, suplementado com 0,05% de cisteína (p/v). O pré-inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) do volume da dorna. A fermentação foi mantida até que a DO indicasse duas medidas consecutivas de declínio da curva de crescimento bacteriano. Após a fermentação, as culturas foram centrifugadas a 16000 x g (Sorval, USA), por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e concentrado a 1/10 do volume inicial, a 4 °C, pelo sistema de filtração em Amicon (Amicon, Beverly, EUA), usando membrana de retenção de 10 kDa (Amicon, Beverly, EUA), para a retenção da toxina  $\epsilon$ . Os filtrados foram purificados por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose CL6B) conforme metodologia descrita por Parreiras et al. (2002), e fracionados em tubos do tipo eppendorf e mantidos a -80 °C até o momento do uso.



**Figura 7** – Foto do biorreator BioFlo 110 utilizado no cultivo de *Clostridium perfringens* tipo D. **1.** Inóculo; **2.** Painel de Controle **3.** Turbina Pitched-blade; **4.** Dorna de Cultivo; **5.** Bala de Nitrogênio. Fonte: arquivo do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG.

#### 4.5.3 Titulação, tipificação e dosagem da toxina épsilon

O sobrenadante filtrado foi ativado com solução de tripsina 1% (p/v), segundo metodologia descrita por Sebald e Petit (1997), durante 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após este período, a amostra foi colocada em banho de gelo e diluições duplas foram feitas em salina peptonada a 1% (p/v) para a determinação da dose mínima mortal – DMM (menor quantidade de toxina que mata 100% dos camundongos inoculados). Para cada diluição, foram inoculados dois camundongos pesando entre 17 e 22 gramas, com 0,2 ml por via endovenosa e os animais foram observados por 72 horas. Cada titulação foi repetida uma vez e os resultados dos dois testes foram acumulados para efeito do cálculo da DMM (Sebald e Petit, 1997). Para a tipificação da toxina, foi realizado o método de soroneutralização em camundongos de acordo com metodologia preconizada por Sterne e Batty (1975). Dez DMM/ml da toxina ativada foram incubadas com igual parte de antitoxina  $\epsilon$  padrão (NIBSC,

Webridge, UK), contendo 1 UI/ml, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, dois camundongos pesando entre 17 e 22 gramas foram inoculados por via endovenosa com 0,2 ml da mistura, e observados por 72 horas. Como controle positivo, dois camundongos foram inoculados com a toxina ativada incubada com salina peptonada 1% (p/v). A dosagem de proteína das toxinas presentes no filtrado do sobrenadante do cultivo bacteriano foi realizada utilizando o equipamento NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare, EUA), empregando 2  $\mu$ l da amostra; já a toxina purificada foi dosada pelo métodos de Lowry et al. (1951) e de coeficiente de extinção descrito por Worthington et al. (1973). Em seguida, a toxina purificada foi ajustada para 2,0 mg/ml, fracionada em tubos do tipo eppendorf e mantida a -80°C.

#### 4.6 Produção do Toxóide Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

##### 4.6.1 Inativação da toxina

A toxina  $\epsilon$  foi submetida à inativação através da adição de formalina a 40% (v/v) para concentração final de 0,5% (v/v), sob agitação, em temperatura ambiente. Alíquotas da mistura foram coletadas e inoculadas em dois camundongos em intervalos de 24 horas, até total inativação (Lobato et al., 2010).

#### 4.6.2 Adição de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$

Foi acrescentado ao toxóide  $\epsilon$ , gel de hidróxido de alumínio  $Al(OH)_3$  para uma concentração final de 2,83% de óxido de alumínio ( $Al_2O_3$ ) livre, sob agitação, à temperatura ambiente durante 24 horas (Fernelius et al., 1972).

#### 4.6.3 Teste de esterilidade

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

#### 4.6.4 Teste de inocuidade

Dois camundongos foram inoculados com o toxóide adsorvido em  $Al(OH)_3$ , com o dobro da dose teste em coelhos, por via subcutânea. Os camundongos foram observados por sete dias para evidenciar possíveis reações locais e sistêmicas consideradas anormais (European Pharmacopoeia, 1998).

#### 4.7 Produção do Soro Hiperimune Anti-Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

##### 4.7.1 Imunizações e obtenção dos soros

Foram utilizadas três coelhas, sendo realizadas cinco inoculações subcutâneas de 1 ml contendo 100  $\mu g$  do toxóide  $\epsilon$  com hidróxido de alumínio. As aplicações foram feitas nos dias 0, 28, 49, 70 e 91, sendo a sangria total realizada no dia 105, após eutanásia dos animais (Pires, 2011). Também foi utilizada uma ovelha, sendo realizadas quatro inoculações subcutâneas de 2 ml contendo 300  $\mu g$  do toxóide. As aplicações foram feitas nos dias 0, 21, 42 e 63, e a sangria realizada no dia 73 (Parreiras, 2001), por punção da veia jugular. O sangue obtido nas sangrias foi mantido em temperatura ambiente, por duas horas, para coagulação (Tabela 3). Para a retração do coágulo, os mesmos foram mantidos entre 2 e 8 °C durante a noite. Após este período, foram centrifugados a 1.500 x g durante 20 minutos, os soros foram separados e mantidos a -20 °C até sua utilização.

**Tabela 3** – Protocolo de Imunização dos coelhos e ovino com o toxóide épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D.

Coelhos			Ovino		
Imunização	Dia	Dose (massa / volume)	Imunização	Dia	Dose (massa / volume)
1 <sup>a</sup>	0	100 $\mu g$ / 1 ml	1 <sup>a</sup>	0	300 $\mu g$ / 2 ml
2 <sup>a</sup>	28	100 $\mu g$ / 1 ml	2 <sup>a</sup>	21	300 $\mu g$ / 2 ml
3 <sup>a</sup>	49	100 $\mu g$ / 1 ml	3 <sup>a</sup>	42	300 $\mu g$ / 2 ml
4 <sup>a</sup>	70	100 $\mu g$ / 1 ml	4 <sup>a</sup>	63	300 $\mu g$ / 2 ml
5 <sup>a</sup>	91	100 $\mu g$ / 1 ml	-	-	-
Sangria	105	-	Sangria	73	-

#### 4.7.2 Titulação dos soros

Os soros obtidos foram titulados através de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto seguindo o protocolo descrito a seguir. Microplacas de ELISA NUNC Maxisorp (Becton Dickinson France S. A.) de 96 wells foram sensibilizadas durante a noite, a 5 °C, com 100 µl/well de solução contendo 2 µg/ml da toxina ε recombinante previamente obtida (Souza et al., 2010) e dosada pelo método de Bradford (1976), diluída em tampão bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6. Após este período, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem (0,05% Tween-salina-SL) e bloqueada com a solução de bloqueio contendo caseína a 2% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M, 0,015M NaCl, pH 7,4, por uma hora. A placa foi novamente lavada, os soros a serem testados foram diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20), em duplicata, e a placa foi incubada em estufa a 37 °C, por 1 hora. Em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários respectivos, conjugados com a enzima peroxidase (Sigma), na diluição indicada pelo fabricante. A ligação do anticorpo secundário foi inferida pela atividade enzimática, utilizando-se ortofenilenodiamino (OPD) como substrato (0,33 mg/ml em tampão citrato pH 5,2 na presença de 0,04% de peróxido de hidrogênio). Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras da absorbância foram feitas a 492nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD 680). A titulação dos soros foi repetida uma vez.

### 4.8 Mapeamento dos Epitopos da Toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

#### 4.8.1 Síntese de peptídeos em membrana de celulose

A síntese paralela de peptídeos sobre membrana de celulose foi realizada através da técnica de Spot (Frank, 1992). Foram sintetizados peptídeos de 15 aminoácidos em sobreposição, alterando os três resíduos iniciais, cobrindo toda a estrutura primária da toxina ε. Utilizou-se um protocolo de síntese anteriormente descrito (Laune et al., 2002), porém com o auxílio de um sintetizador automático (ResPepSL/Automatic Spot Synthesizer, Intavis GmbH, Köln, Alemanha) (Figura 8). As membranas de celulose também foram obtidas da Intavis. Os aminoácidos-FMOC (fluorenil-metil-oxicarbonila), contendo grupamentos FMOC acoplados à sua função amina e grupos protetores em suas cadeias laterais, foram obtidos da Novabiochem. Os peptídeos foram montados utilizando a química FMOC em uma membrana de celulose, obtendo-se aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana (Frank, 1992).

O resíduo C-terminal de cada peptídeo foi acoplado a cada ponto da membrana. Em seguida, adicionou-se 4-metilpiperidina a 25% em dimetilformamida (DMF) para retirar o grupamento protetor FMOC, acoplado à função amina do aminoácido, permitindo que o próximo aminoácido fosse acoplado. Os aminoácidos a serem acoplados foram ativados pela mistura DIPC/Oxyrna em DMF (diisopropilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol, Novabiochem, Darmstadt, Alemanha) anteriormente ao seu depósito na membrana; estes ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. Foram realizados dois ciclos de acoplamento para cada aminoácido. Para evitar reações colaterais e acoplamentos de aminoácidos de forma errônea, as funções NH<sub>2</sub> que, porventura, permaneceram livres após o acoplamento foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF. O grupo FMOC do aminoácido recém-acoplado foi retirado em

meio básico pela 4-metilpiperidina a 25%, possibilitando a adição do próximo aminoácido. Os ciclos se repetiram desta forma até a síntese total dos peptídeos. Ao final da síntese, os grupos protetores de

cadeias laterais foram removidos por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA) a 95%, tri-isopropilsilano (TIPS) a 2,5% e água deionizada (2,5%), enquanto a ligação dos peptídeos com a membrana foi mantida.



**Figura 8** – Foto do sintetizador automático ResPep Automatic Spot Synthesizer, da Intavis, utilizado para a síntese de peptídeos em membrana de celulose e para a síntese solúvel de peptídeos.

Fonte: arquivo do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas do ICB-UFMG.

#### 4.8.2 Ensaios imunoquímicos

Para a realização de estudos acerca da ligação dos anticorpos aos peptídeos e mapeamento dos epitopos da toxina  $\epsilon$ , a membrana de celulose foi lavada em tampão Tris (TBS), três vezes, durante 10 minutos, e incubada durante a noite, sob agitação, em solução de bloqueio contendo soroalbumina bovina (BSA) a 3% (ID Bio, França) e sacarose 5% (Dinâmica, São Paulo, Brasil) em TBS 0,1%. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com o tampão TBS-Tween 0,1% e incubada sob agitação, por 2 horas com o soro hiperimune em teste diluído na solução de bloqueio. As diluições dos soros de coelho e ovino utilizadas foram aquelas para as quais as médias das leituras no ELISA indireto foram próximas de 1,0. Após a incubação, a membrana foi lavada

com TBS-Tween 0,01% por 10 minutos (Machado de Ávila et al., 2004).

A ligação dos anticorpos presentes no soro com os peptídeos foi detectada por meio da incubação da membrana com conjugado anti-IgG de coelho ou ovino, com fosfatase alcalina, na diluição indicada pelo fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), por uma hora, sob agitação. Após duas lavagens em TBS, Tween-20 0,05%, e outras duas lavagens em CBS pH 7 (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 2,1 g de ácido cítrico monoidratado; água q.s.p 1 L), por 10 minutos cada, à temperatura ambiente, foi adicionado substrato contendo MTT (Bromídeo de 3-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e  $MgCl_2$  (Sigma). Vinte minutos depois, a reação foi paralisada com água destilada.

O protocolo acima descrito foi repetido duas vezes para cada soro teste. Ou seja, foram realizados três ensaios imunológicos utilizando-se o soro anti-ε de coelho e outros três ensaios utilizando-se o soro anti-ε ovino.

Além dos soros hiperimunes, foram também realizados ensaios com os soros pré-ímmunes, para verificar se anticorpos que não fossem anti-ε reagem de forma cruzada com os peptídeos sintetizados na membrana de celulose. Por último, para evidencição de possíveis reações inespecíficas entre os conjugados anti-IgG-fosfatase de coelho e de ovino, os peptídeos sintetizados e a membrana, ensaios imunológicos foram realizados conforme o acima descrito, com exceção da etapa de adição dos soros-teste. Estes testes foram repetidos uma vez.

#### **4.8.3 Análise da reatividade dos spots**

Os spots foram detectados pelo método de colorimetria direta, quando três avaliadores quantificaram visualmente as intensidades das colorações dos spots e classificaram as mesmas em uma escala de 0 a 5. A partir dessas quantificações, as intensidades de coloração médias foram estabelecidas.

#### **4.8.4 Regeneração da membrana**

Após a realização de um ensaio imunológico, a membrana era submetida a um tratamento de regeneração. Efetuavam-se três lavagens de 10 minutos cada com DMF; três lavagens de 10 minutos cada com reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0,1% de 2-mercaptoetanol); e três lavagens de 10 minutos cada com reagente B (etanol, água, ácido acético nas proporções 50:40:10 v/v/v). Este procedimento possibilita que a mesma membrana seja utilizada de 30 a 40 vezes para testes com anticorpos policlonais e até 70 vezes com anticorpos monoclonais (Frank, 1992).

#### **4.8.5 Seleção dos epitopos**

Com base nos resultados dos ensaios imunológicos realizados, nas análises das reatividades dos spots e em dados da literatura, foi feita a seleção de seis prováveis epitopos imunodominantes para a síntese solúvel e produção dos imunógenos.

#### **4.9 Síntese Solúvel dos Epitopos Selecionados**

Os epitopos selecionados foram sintetizados pelo método desenvolvido por Merrifield, 1969, com a particularidade da utilização de um sintetizador automático (ResPepSL/Automatic Spot Synthesizer, Intavis GmbH, Koln, Alemanha) (Gausepohl et al., 1992) (Figura 8). O método consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel, uma resina, e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos. Os aminoácidos utilizados são protegidos pelo grupamento FMOC em sua função amina, bem como são protegidos em sua cadeia lateral para evitar reações indesejadas. Foi utilizada a resina Rink Amide (Sigma), protegida por grupos FMOC, como suporte sólido.

O tubo de síntese contendo a resina foi lavado três vezes com 1 ml de DMF e em seguida foi adicionada 4-metilpiperidina a 25%, deixando sob agitação por 20 minutos para eliminar os grupos FMOC da resina. Após três novas lavagens com DMF, iniciou-se o acoplamento: o primeiro aminoácido (40 µM) foi adicionado juntamente com os ativadores da função carboxila, Oxyma (100 µM) e DIPC (100 µM), e deixado sob agitação por 30 minutos. Após o acoplamento, três novas lavagens com DMF foram realizadas; e foi iniciada a etapa de desproteção, na qual o grupamento FMOC do aminoácido acoplado é removido pela 4-metilpiperidina a 25%, por 20 minutos. Posteriormente, três novas

lavagens com DMF são realizadas, e o protocolo de acoplamento do segundo aminoácido é reiniciado. Este ciclo de desproteção/acoplamento foi realizado até que todos os aminoácidos do peptídeo em síntese fossem acoplados.

Após o acoplamento do último aminoácido, o peptídeo foi removido da resina por uma etapa de clivagem. Nessa etapa também foram eliminados os grupamentos protetores das cadeias laterais. Para isto, o peptídeo foi incubado por três horas com uma solução de clivagem contendo 2,5% de EDT (etanoditiol - Fluka), 2,5% de água destilada, 2,5% de TES (trietilsilano - Fluka) em TFA. Em seguida, essa solução foi filtrada e precipitada com éter etílico resfriado, obtendo-se o peptídeo. Finalmente, o éter é eliminado após três ciclos de 20 minutos de centrifugação a 2000 g, o peptídeo é ressuspensionado em água mili-q e liofilizado. Os procedimentos descritos acima foram repetidos para a síntese de cada epitopo anteriormente selecionado.

#### **4.10 Espectrometria de Massa**

As análises por espectrometria de massa foram realizadas utilizando o equipamento Autoflex-III MALDI-TOF/TOF™ (Bruker Daltonics) no modo refletor/positivo controlado pelo software FlexControl™. A calibração foi feita utilizando o Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) como referência e o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. Um  $\mu$ l da mistura contendo a amostra a ser analisada e a matriz, na proporção de 1:1, foi depositada numa placa MTP AnchorChip™ 400/384 (Bruker Daltonics); após secagem completa da gota, a placa foi introduzida no aparelho para as análises.

#### **4.11 Preparação dos Imunógenos**

##### **4.11.1 Lipossomas**

Para o encapsulamento dos peptídeos em lipossomas, foi utilizado o protocolo desenvolvido por Chavez-Olortegui (1991). Foram dissolvidos 674 mg de fosfatidilcolina de soja (SPC) e 270 mg de colesterol em clorofórmio. A mistura foi colocada em balão de vidro de fundo redondo, previamente limpo com metanol e clorofórmio, e contendo pérolas de vidro em seu interior. O balão foi ligado a um rotavapor, a 30 °C, até que o clorofórmio fosse destilado e um filme lipídico fosse formado na parede do balão. Após a formação do filme, o balão ainda permaneceu no rotavapor por mais 60 minutos. O filme foi ressuspensionado em 7 ml de água e homogeneizado com vortex até a sua dissolução completa. O lipossoma em água foi transferido para um tubo falcon de 15 ml e sonificado (Vibra-Cell) em banho de gelo, por 10 minutos, a 31% de potência. Cada peptídeo (2,1 mg previamente dissolvidos em 470  $\mu$ l de PBS) foi adicionado a 1 ml do lipossoma formado e a mistura foi liofilizada (Liobras).

Do total de 2,1 mg de cada peptídeo encapsulados em lipossomas, utilizou-se 0,6 mg, por grupo, durante as imunizações. Imediatamente antes de cada imunização, cada lipossoma contendo peptídeos foi reidratado. Adicionou-se 540  $\mu$ l de água mili-q, e a mistura foi homogeneizada com vortex por 1 minuto e deixada em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, e repetiu-se este procedimento uma vez. Posteriormente, adicionou-se 540  $\mu$ l de PBS, e procederam-se novamente dois ciclos compreendendo homogeneização por 1 minuto e repouso por 10 minutos.

##### **4.11.2 Adição de hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub>**

Foi acrescentado a cada grupo de peptídeos encapsulados em lipossomas, gel de hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> para uma proporção final de 10% de gel de

Al(OH)<sub>3</sub>:90% de lipossomas previamente ressuspensos. Após homogeneização, os imunógenos estavam prontos para a inoculação nos animais.

#### 4.12 Protocolo de Imunização

O protocolo de imunização é apresentado na Tabela 4. Camundongos da raça Swiss, de ambos os sexos, com peso inicial entre 17 e 22 g, foram utilizados. Os grupos foram compostos por seis animais cada. Os grupos controle consistiram em: (1) animais inoculados apenas com o adjuvante hidróxido de alumínio; e (2) animais inoculados apenas com lipossomas vazios, ou seja, sem peptídeos em seu interior. Os demais grupos foram inoculados com os peptídeos sintetizados, encapsulados em lipossomas e com adição de hidróxido de

alumínio. As doses, por animal, eram compostas de 25 µg de peptídeo, em um volume de 200 µl. Foram realizadas quatro inoculações no dorso dos animais por via subcutânea, por grupo, nos dias 0, 10, 20 e 30. Os soros pré-ímmunes foram coletados sete dias antes do início do protocolo de imunização.

Sete dias após a última inoculação, foi feita a coleta de sangue dos camundongos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, por duas horas, para coagulação. Para a retração do coágulo, as mesmas foram mantidas entre 2 e 8 °C durante a noite. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g durante 20 minutos, os soros foram separados e mantidos a -20 °C até sua utilização.

**Tabela 4** – Protocolo de Imunização dos camundongos com os peptídeos sintetizados a partir dos epitopos da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D.

Imunização	Dia	Dose (massa / volume)	Sangria
-	-7	-	Pré-ímmune
1 <sup>a</sup>	0	25 µg / 200 µl	-
2 <sup>a</sup>	10	25 µg / 200 µl	-
3 <sup>a</sup>	20	25 µg / 200 µl	-
4 <sup>a</sup>	30	25 µg / 200 µl	-
-	37	-	Final

#### 4.13 Titulação dos Soros Anti-Peptídeos

Os soros obtidos foram titulados através do ELISA competitivo segundo protocolo modificado de Parreiras, 2001. Os detalhes desse protocolo não serão aqui descritos por esta metodologia estar sob processo de transferência de tecnologia conduzido pela Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG.

#### 4.14 Análises Computacionais

As análises das massas moleculares, hidropaticidade e ponto isoelétrico (pI) dos prováveis epitopos foram feitas utilizando ferramentas disponibilizadas no portal Expasy (<http://expasy.org/proteomics>). Para as massas moleculares e o pI foi utilizada a ferramenta “Compute pI/MW” e para a análise da hidropaticidade foi utilizado o algoritmo de Hopp & Woods disponível em “ProtParam” (Gasteiger et al., 2005). A geração de imagens da estrutura 3D da toxina ε foi realizada pelo programa “Swiss PDB Viewer 4.10” (Kaplan e Littlejohn, 2001), também disponível em (<http://expasy.org/proteomics>).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização do mapeamento dos epitopos da toxina épsilon ( $\epsilon$ ) de *Clostridium perfringens* tipo D, foi necessário, primeiramente, a obtenção de soro contendo anticorpos contra essa toxina. Neste caso, existem duas opções: a utilização de anticorpos monoclonais (McClain e Cover, 2007) ou de soro contendo anticorpos policlonais. Anticorpos monoclonais possuem afinidade monovalente, ou seja, eles se ligam sempre em um mesmo epitopo (Ritter e Ladyman, 1995). Portanto, a utilização de anticorpos monoclonais no mapeamento desses determinantes antigênicos geraria, em teoria, apenas um epitopo reconhecido. Neste trabalho, foram utilizados soros hiperimunes contendo anticorpos policlonais, visando a identificação de um maior número de epitopos presente em toda a extensão da toxina  $\epsilon$ . Foram, ainda, obtidos soros de duas espécies animais distintas, coelhos e ovino, para a pesquisa de possíveis diferenças no reconhecimento dos determinantes pelos respectivos anticorpos dessas espécies. Desta forma, a utilização de soros hiperimunes contendo anticorpos policlonais de duas espécies distintas forneceu um perfil antigênico mais completo e que representa de forma mais fidedigna a resposta imune natural contra a toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D (Atassi e Dolimbek, 2004).

Sendo assim, para a obtenção dos anticorpos policlonais, seguiram-se as etapas gerais: (1) cultivo de *C. perfringens* tipo D e produção da toxina  $\epsilon$ ; (2) purificação da toxina  $\epsilon$ ; (3) inativação da toxina e obtenção do toxóide  $\epsilon$ ; e (4) imunização dos animais e obtenção dos soros hiperimunes.

### 5.1 Produção da Toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* Tipo D

#### 5.1.1 Cultivo da amostra de *Clostridium perfringens* Tipo D

A produção da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D foi paralisada após 9 horas de fermentação, quando a segunda medida da densidade ótica (DO) indicou queda ou declínio da curva de crescimento bacteriano. *C. perfringens* produz e secreta suas principais toxinas primordialmente em sua fase de crescimento exponencial, durante a qual as medidas da DO aumentam progressivamente. Por esta razão, a fermentação deve ser paralisada após o término da fase de crescimento exponencial, quando a DO estabiliza e começa a declinar, visando obter o maior título possível de toxinas. Após a fermentação, a cultura foi centrifugada, e o sobrenadante foi concentrado a 1/10 do volume inicial, obtendo-se um volume final de 50 ml de filtrado do sobrenadante contendo a toxina  $\epsilon$ .

#### 5.1.2 Titulação, tipificação e dosagem da toxina épsilon

O filtrado do sobrenadante do cultivo bacteriano foi titulado segundo metodologia descrita por Sebald e Petit (1997), obtendo-se o título de toxina de 10.000 DMM/ml. Este resultado condiz com os de Souza Júnior (2005), o qual produziu a toxina  $\epsilon$  sob as mesmas condições do presente trabalho, e obteve títulos de 4.200 DMM/ml em uma partida e 25.600 DMM/ml em outra. Gonçalves (2004), utilizando condições semelhantes de fermentação, tais como meio de cultivo e tempo de incubação, obteve títulos variando de 500 a 3650 DMM/ml, ou seja, inferiores aos obtidos no presente trabalho.

A tipificação da toxina produzida foi realizada pelo método de soroneutralização em camundongos de acordo com metodologia preconizada por Sterne e Batty (1975). A toxina  $\epsilon$  foi confirmada como o agente tóxico presente no filtrado, visto que os camundongos inoculados com o mesmo, previamente incubado com antitoxina  $\epsilon$

padrão, sobreviveram; diferentemente daqueles inoculados apenas com o filtrado e salina, os quais vieram a óbito.

A dosagem de proteína presente no filtrado foi feita utilizando o equipamento NanoVue Spectrophotometer, e a concentração encontrada foi de 13,6 mg/ml (Tabela 5).

**Tabela 5** – Resultados das dosagens da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

Amostra	Dosagem (mg/ml)	Método	Referência
Toxina Bruta*	13,6	NanoVue	-
Toxina Purificada	10,6	Lowry	Lowry et al. (1951)
	8,29	Coefficiente de Extinção	Worthington et al. (1973)
Toxina Recombinante**	1,77	Bradford	Bradford (1976)

\* Toxina Bruta: sobrenadante filtrado do cultivo de *Clostridium perfringens* tipo D;

\*\* Toxina Recombinante: obtida por Souza et al., (2010).

### 5.1.3 Purificação da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

Os sobrenadantes do cultivo de *C. perfringens* tipo D, mesmo depois de filtrados, contêm não apenas a toxina  $\epsilon$ , mas também outras toxinas secundárias produzidas pelo agente e até mesmo proteínas sem atividade tóxica provenientes do metabolismo bacteriano. Desta forma, para a produção de um imunógeno de boa qualidade, se faz necessária a purificação dos filtrados. Deste modo, neste trabalho, os filtrados do cultivo bacteriano foram purificados por cromatografia de troca iônica, conforme metodologia descrita por Parreiras et al. (2002). Essa metodologia diferencia-se da utilizada por Uzal et al. (1997) por necessitar de apenas uma coluna de DEAE-Sephrose CL-6B, ao invés de duas colunas. Sendo assim, o protocolo utilizado neste trabalho propiciou a purificação da toxina  $\epsilon$  de forma mais simples e rápida quando comparado ao protocolo empregado por Uzal et al. (1997).

Após a purificação, a toxina  $\epsilon$  foi dosada pelos métodos de Lowry et al. (1951) e coeficiente de extinção, descrito por Worthington et al. (1973), e as concentrações de proteína obtidas foram de 10,6 mg/ml e 8,29 mg/ml, respectivamente (Tabela 5). A diferença de 2,31 mg/ml

observada entre os resultados ocorreu, provavelmente, devido às características intrínsecas de cada metodologia, sendo que o método de Lowry é mais sensível. As dosagens por ambas as técnicas foram realizadas concomitantemente e uma possível queda na concentração da toxina devido ao manuseio e/ou armazenamento está descartada. Desta maneira, a média entre as dosagens foi calculada, resultando em uma concentração de 9,44 mg/ml, valor este considerado para a realização dos procedimentos subsequentes.

### 5.2 Produção do Toxóide Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

Para produção do toxóide, a toxina  $\epsilon$  purificada foi submetida à inativação através da adição de formalina (Lobato et al., 2010), que se estendeu por 48 horas. Após a total inativação, ao toxóide  $\epsilon$  foi adicionado o hidróxido de alumínio  $Al(OH)_3$  (Fernelius et al., 1972). A utilização deste adjuvante se deve a sua ampla utilização em medicina humana e veterinária, tanto para fins de pesquisa, quanto nas vacinas comerciais, inclusive aquelas contra as doenças clostridiais. O mesmo é dotado de bom poder de estímulo à resposta imune humoral, sem causar grandes reações adversas locais ou sistêmicas (Moyle e Toth, 2008).

Durante o teste de esterilidade (Brasil, 2002), não foi verificado crescimento de nenhum micro-organismo nos meios inoculados com o toxóide produzido. No teste de inocuidade (European Pharmacopoeia, 1998), os camundongos inoculados com o toxóide, por via subcutânea, com o dobro da dose teste em coelhos, não apresentaram sinais de toxicidade ou reações locais e sistêmicas adversas durante os sete dias de observação.

### **5.3 Produção do Soro Hiperimune Anti-Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D**

#### **5.3.1 Imunizações**

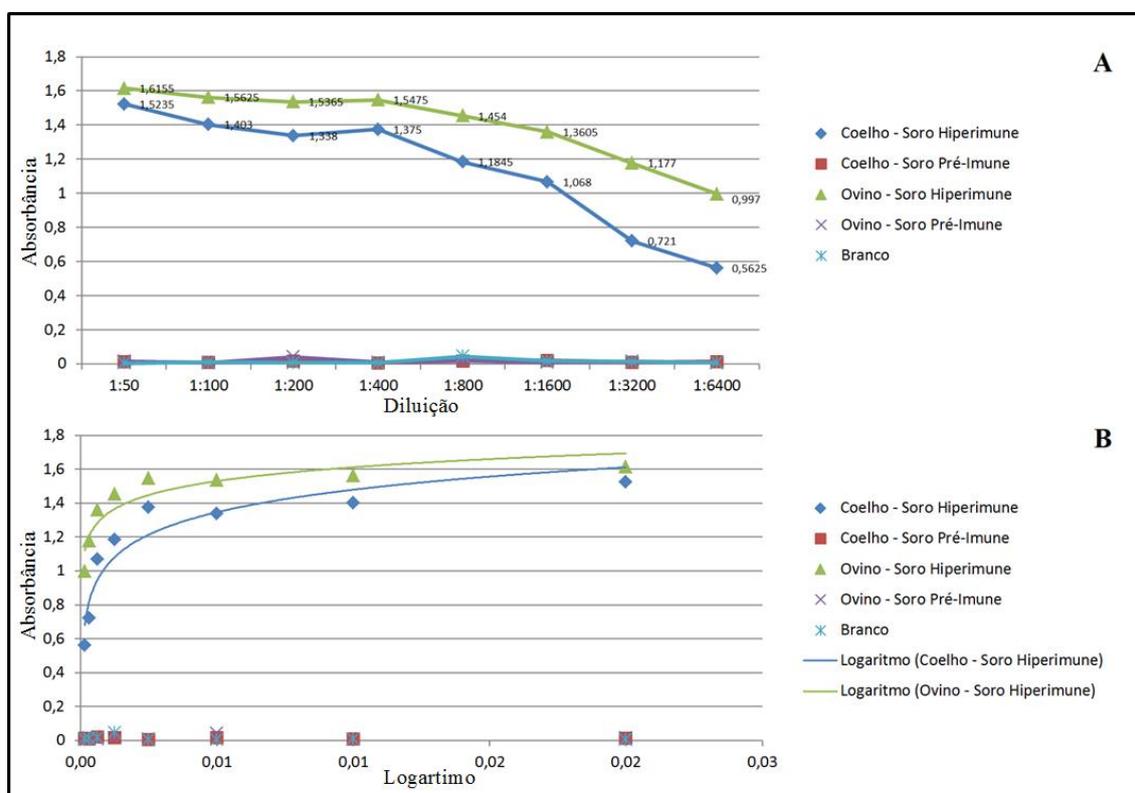
A produção do soro hiperimune anti- $\epsilon$  foi realizada pela imunização de três coelhas e uma ovelha. O objetivo disto era que, durante o mapeamento, mais epítomos fossem reconhecidos nos ensaios imunoquímicos, já que há a possibilidade de que diferentes espécies animais, ao entrarem em contato com a toxina  $\epsilon$ , produzam anticorpos contra diferentes porções da mesma. A escolha de coelhas para este fim se deveu ao fácil manejo desses animais, pela sua ampla utilização na produção de soro hiperimune, bem como em outros procedimentos em pesquisa. Já a escolha de também produzir soro em ovino se deve ao fato desta ser a principal espécie acometida pela doença produzida pela toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D; sendo assim, seria interessante verificar os epítomos reconhecidos pelos anticorpos anti- $\epsilon$  ovinos. Em cada espécie, foram feitas quatro inoculações com o objetivo de obter altos títulos de imunoglobulinas, assim como permitir que ocorresse a maturação de afinidade, gerando anticorpos capazes de se ligar com alta afinidade e avidéz aos seus antígenos (Danilova e Amemiya, 2009).

#### **5.3.2 Titulação dos soros**

A titulação dos soros hiperimunes obtidos foi feita por ELISA indireto. A execução deste ensaio enzimático foi importante, pois cumpriu com dois objetivos principais distintos: (1) avaliar a resposta imunológica humoral dos animais inoculados com o toxóide  $\epsilon$ , comparando-a ao *status* imunológico dos mesmos anteriormente às imunizações; e (2) estipular as diluições dos soros hiperimunes que foram, posteriormente, utilizadas durante os ensaios imunoquímicos objetivando o mapeamento dos determinantes antigênicos da toxina  $\epsilon$ .

Para a titulação dos soros hiperimunes obtidos, a sensibilização das microplacas de ELISA foi realizada com a toxina  $\epsilon$  recombinante obtida por Souza et al. (2010), padronizada por estes autores para 2  $\mu\text{g/ml}$  e armazenada a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Porém, está bem documentado que as toxinas produzidas por *C. perfringens* podem perder viabilidade durante sua estocagem por médios e longos períodos, mesmo quando armazenadas congeladas (Sakurai e Duncan, 1978; Uzal et al., 2003; Uzal, 2004; Souza Júnior, 2005; Uzal e Songer, 2008; Rioseco et al., 2012). Desta forma, para verificar a real concentração da toxina recombinante, e assegurar a sensibilidade e a confiabilidade dos ensaios enzimáticos e imunoquímicos subsequentes propostos, foi realizada a dosagem de proteína segundo a metodologia de Bradford (1976). O resultado encontrado foi de 1,77  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 5); como esperado, estava abaixo daquela concentração de 2  $\mu\text{g/ml}$ , estipulada quando a toxina foi armazenada. Portanto, houve um decréscimo de 0,23  $\mu\text{g/ml}$ , o que infere uma desnaturação ou queda da viabilidade de 11,5% da toxina  $\epsilon$  em cerca de dois anos de armazenamento a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Os resultados da titulação dos soros hiperimunes anti- $\epsilon$  de coelho e ovino frente ao toxóide  $\epsilon$ , pelo ELISA indireto, são apresentados na Figura 9.



**Figura 9** - Resultados da titulação dos soros hiperimunes anti-épsilon de coelho e ovino por ELISA indireto. **A.** Gráfico de linha da titulação dos soros anti-épsilon. **B.** Gráfico de dispersão da titulação dos soros anti-épsilon.

As leituras dos títulos de anticorpos do soro hiperimune de coelho variaram de 1,52 a 0,56 para as diluições de 1:50 a 1:6400; já para o soro ovino, as leituras variaram de 1,61 a 0,997 para as mesmas diluições. Observa-se também que não foram detectados títulos de imunoglobulinas nos soros pré-ímmunes de coelho e ovino. A partir destes resultados, conclui-se que o toxóide  $\epsilon$  produzido foi capaz de induzir bons títulos de anticorpos contra a toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D tanto no ovino, quanto nos coelhos imunizados. Percebe-se, também, que os títulos de anticorpos alcançaram níveis maiores no soro ovino. Isto poderia ter ocorrido caso o ovino utilizado nas inoculações tivesse sido vacinado anteriormente com vacina comercial contra as doenças clostridiais,

procedimento comum nas criações destes animais. Entretanto, o animal utilizado no presente estudo tinha de 4 a 8 meses de idade e não possuía histórico de vacinação algum. Além disto, seu soro pré-ímmune não apresentou títulos de anticorpos anti- $\epsilon$ , descartando, desta maneira, a hipótese de prévia vacinação ou de aquisição natural de imunoglobulinas anti- $\epsilon$ , como descrito por outros autores (Thomson e Batty, 1953; Griner, 1961, citados por Veschi et al., 2008). Pode-se explicar o evento em questão pela constatação das diferentes concentrações do toxóide utilizadas na imunização dos animais. Os coelhos foram inoculados com o toxóide  $\epsilon$  em uma concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ ; já o ovino foi inoculado com o toxóide em uma concentração de 150  $\mu\text{g/ml}$ . Por

consequente, o animal imunizado com maiores concentrações do imunógeno deve, teoricamente, produzir mais anticorpos contra o mesmo.

## 5.4 Mapeamento dos Epitopos da Toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D

### 5.4.1 Síntese de peptídeos em membrana de celulose

Para a realização do mapeamento dos epitopos da toxina  $\epsilon$ , foram sintetizados peptídeos de 15 aminoácidos sobrepostos em membrana de celulose (Figura 10). Os peptídeos sintetizados e suas respectivas sequências de aminoácidos estão listados na Tabela 6. No total, foram sintetizados 130 peptídeos cobrindo toda a estrutura primária da toxina  $\epsilon$ .



**Figura 10** – Membrana de celulose contendo 130 peptídeos sintetizados, cobrindo toda a estrutura primária da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D.

Os peptídeos do número 107 ao 130 não fazem parte da estrutura primária original da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D. Eles são derivados de peptídeos que fazem parte da estrutura original da toxina, porém aos quais foram feitas alterações de um ou dois aminoácidos (Tabela 7). Essas alterações foram realizadas com o objetivo de avaliar a importância de certos aminoácidos para a antigenicidade de alguns peptídeos candidatos a serem determinantes antigênicos. Em outras palavras, foi verificada se a retirada, ou a inclusão, de certos aminoácidos reduzia, ou aumentava, o reconhecimento dos epitopos pelos anticorpos durante os ensaios imunológicos.

### 5.4.2 Ensaios imunológicos

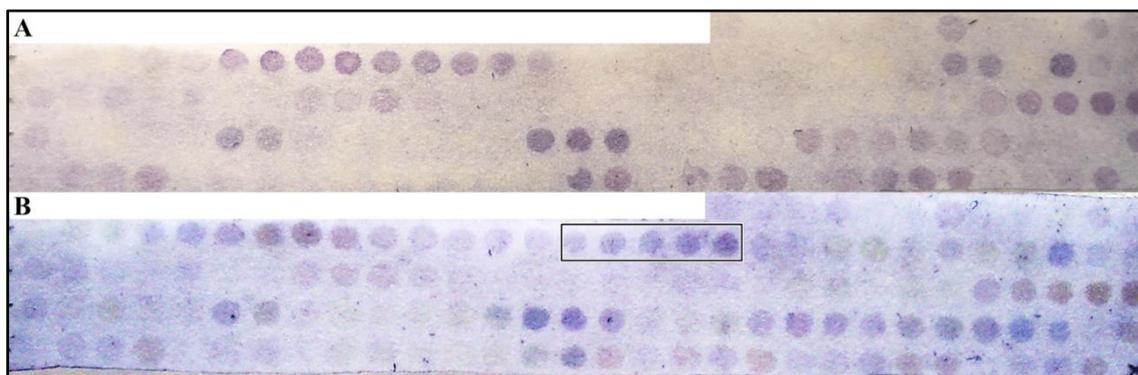
A ligação dos anticorpos presentes nos soros com os peptídeos sintetizados na membrana de celulose foi detectada por meio de uma série de ensaios imunológicos. Esses ensaios visam estudar e mensurar as interações proteína-peptídeo, ou melhor, anticorpo-peptídeo, caracterizando, então, os epitopos existentes (Katz et al., 2011). Ambos os soros contendo anticorpos anti- $\epsilon$  de coelho e ovino foram capazes de se ligar a alguns peptídeos e detectar determinantes antigênicos da toxina  $\epsilon$  (Figura 11).

**Tabela 6** – Lista dos peptídeos sintetizados em membrana de celulose, cobrindo toda a estrutura primária da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D.

1- MKKNLVKSLAIASAV	45- KSQSFTSKNTDVTVA	89- DGTININGKGNYSAV
2- NLVKSLAIASAVISI	46- SFTSKNTDVTATTT	90- ININGKGNYSAVMGD
3- KSLAIASAVISIYSI	47- SKNTDVTATTTHTV	91- NGKGNYSAVMGDELI
4- AIASAVISIYSIVNI	48- TDTVTATTTHTVGTS	92- GNYSAVMGDELIVKV
5- SAVISIYSIVNIVSP	49- VTATTTHTVGTSIQ	93- SAVMGDELIVKVRNL
6- ISIYSIVNIVSPTNV	50- TTHTTVGTSIQATAK	94- MGDELIVKVRNLNTN
7- YSIVNIVSPTNVIK	51- HTVGTSIQATAKFTV	95- ELIVKVRNLNTNINVQ
8- VNIVSPTNVIKAEIS	52- GTSIQATAKFTVPFN	96- VKVRNLNTNINVQYEV
9- VSPTNVIKAEISNTV	53- IQATAKFTVPFNETG	97- RNLNTNINVQYVPIPV
10- TNVIAKAEISNTVSNE	54- TAKFTVPFNETGVSL	98- NTNINVQYVPIPVDKK
11- IAKEISNTVSNEMSK	55- FTVPFNETGVSLTTS	99- NVQYVPIPVDKKEKS
12- EISNTVSNEMSKKAS	56- PFNETGVSLTTSYSF	100- EYVPIPVDKKEKSNDS
13- NTVSNEMSKKASYDN	57- ETGVSLTTSYSFANT	101- IPVDKKEKSNDSNIV
14- SNEMSKKASYDNVDT	58- VSLTTSYSFANTNTN	102- DKKEKSNDSNIVKYR
15- MSKKASYDNVDTLIE	59- TTSYSFANTNTNTNS	103- EKSNDNSNIVKYRSL
16- KASYDNVDTLIEKGR	60- YSFANTNTNTNSKEI	104- NDSNIVKYRSLSIKA
17- YDNVDTLIEKGRYNT	61- ANTNTNTNSKEITHN	105- NIVKYRSLSIKAPGI
18- VDTLIEKGRYNTKYN	62- NTNTNSKEITHNVPS	106- IVKYRSLSIKAPGIK
19- LIEKGRYNTKYNYLK	63- TNSKEITHNVPSQDI	107- YSFANTNTNTNSKEN
20- KGRYNTKYNYLKRME	64- KEITHNVPSQDILVP	108- ANTNTNTNSKENTHN
21- YNTKYNYLKRMEKYY	65- THNVPSQDILVPANT	109- NTNTNSKENTHNVPS
22- KYNLYLKRMEKYYPN	66- VPSQDILVPANTTVE	110- TNSKENTHNVPSQDI
23- YLKRMEKYYPNAMAY	67- QDILVPANTTVEVIA	111- KENTHNVPSQDILVP
24- RMEKYYPNAMAYFDK	68- LVPANTTVEVIAYLK	112- FPRDGYKFSLSDTV
25- KYYPNAMAYFDKVTI	69- ANTTVEVIAYLKKNV	113- DGYKFSLSDTVIKSD
26- PNAMAYFDKVTINPQ	70- TVEVIAYLKKNVVKG	114- KFSLSDTVIKSDLNE
27- MAYFDKVTINPQGN	71- VIAYLKKNVVKGNVK	115- LSDTVIKSDLNEDGT
28- FDKVTINPQGNDFYI	72- YLKKNVVKGNVKLVG	116- TVIKSDLNEDGTINI
29- VTINPQGNDFYINNP	73- KVNKGNVVKLVGQVS	117- DKKEKSNDSNIVKYW
30- NPQGNDFYINNPKVE	74- VKGNVVKLVGQVSGSE	118- EKSNDNSNIVKYWSLY
31- GNDFYINNPKVELD	75- NVKLVGQVSGSEWGE	119- NDSNIVKYWSLYIKA
32- FYINNPKVELDGEPS	76- LVGQVSGSEWGEIPS	120- NIVKYWSLYIKAPGI
33- NNPKVELDGEPSMNY	77- QVSGSEWGEIPSYLA	121- IVKYWSLYIKAPGIK
34- KVELDGEPSMNYLED	78- GSEWGEIPSYLAFPR	122- EKSNDNSNIVKYRSLY
35- LDGEPSMNYLEDVYV	79- WGEIPSYLAFPRDGY	123- NDSNIVKYRSLYIKA
36- EPSMNYLEDVYVGKA	80- IPSYLAFPRDGYKFS	124- NIVKYRSLYIKAPGI
37- MNYLEDVYVGKALLT	81- YLAFPRDGYKFSLS	125- IVKYRSLYIKAPGIK
38- LEDVYVGKALLTNDT	82- FPRDGYKFSLSDTVN	126- DKKEKSNDSNIVKYW
39- VYVGKALLTNDTQQE	83- DGYKFSLSDTVNKSD	127- EKSNDNSNIVKYWSLS
40- GKALLTNDTQQEQKL	84- KFSLSDTVNKSDLNE	128- NDSNIVKYWSLSIKA
41- LLTNDTQQEQKLKSQ	85- LSDTVNKSDDLNEDGT	129- NIVKYWSLSIKAPGI
42- NDTQQEQKLKSQSFT	86- TVNKSDDLNEDGTINI	130- IVKYWSLSIKAPGIK
43- QQEQKLKSQSFTSKN	87- KSDLNEDGTININGK	
44- QKLKSQSFTSKNTDT	88- LNEDGTININGKGN	

**Tabela 7** – Lista dos peptídeos com alteração em suas seqüências de aminoácidos e seus respectivos peptídeos de origem. Em destaque, os aminoácidos alterados.

Peptídeo Alterado	Peptídeo Original
107- YSFANTNTNTNSKE- <b>N</b>	60- YSFANTNTNTNSKE- <b>I</b>
108- ANTNTNTNSKE- <b>N</b> -THN	61- ANTNTNTNSKE- <b>I</b> -THN
109- NTNTNSKE- <b>N</b> -THNVPS	62- NTNTNSKE- <b>I</b> -THNVPS
110- TNSKE- <b>N</b> -THNVPSQDI	63- TNSKE- <b>I</b> -THNVPSQDI
111- KE- <b>N</b> -THNVPSQDILVP	64- KE- <b>I</b> -THNVPSQDILVP
112- FPRDGYKFSLSDTV- <b>I</b>	82- FPRDGYKFSLSDTV- <b>N</b>
113- DGYKFSLSDTV- <b>I</b> -KSD	83- DGYKFSLSDTV- <b>N</b> -KSD
114- KFSLSDTV- <b>I</b> -KSDLNE	84- KFSLSDTV- <b>N</b> -KSDLNE
115- LSDTV- <b>I</b> -KSDLNEDGT	85- LSDTV- <b>N</b> -KSDLNEDGT
116- TV- <b>I</b> -KSDLNEDGTINI	86- TV- <b>N</b> -KSDLNEDGTINI
117- DKKEKSNDNIVKY- <b>W</b>	102- DKKEKSNDNIVKY- <b>R</b>
118- EKSNDNIVKY- <b>W</b> -SL- <b>Y</b>	103- EKSNDNIVKY- <b>R</b> -SL- <b>S</b>
119- NDSNIVKY- <b>W</b> -SL- <b>Y</b> -IKA	104- NDSNIVKY- <b>R</b> -SL- <b>S</b> -IKA
120- NIVKY- <b>W</b> -SL- <b>Y</b> -IKAPGI	105- NIVKY- <b>R</b> -SL- <b>S</b> -IKAPGI
121- IVKY- <b>W</b> -SL- <b>Y</b> -IKAPGIK	106- IVKY- <b>R</b> -SL- <b>S</b> -IKAPGIK
122- EKSNDNIVKYRSL- <b>Y</b>	103- EKSNDNIVKYRSL- <b>S</b>
123- NDSNIVKYRSL- <b>Y</b> -IKA	104- NDSNIVKYRSL- <b>S</b> -IKA
124- NIVKYRSL- <b>Y</b> -IKAPGI	105- NIVKYRSL- <b>S</b> -IKAPGI
125- IVKYRSL- <b>Y</b> -IKAPGIK	106- IVKYRSL- <b>S</b> -IKAPGIK
126- DKKEKSNDNIVKY- <b>W</b>	102- DKKEKSNDNIVKY- <b>R</b>
127- EKSNDNIVKY- <b>W</b> -SLS	103- EKSNDNIVKY- <b>R</b> -SLS
128- NDSNIVKY- <b>W</b> -SLSIKA	104- NDSNIVKY- <b>R</b> -SLSIKA
129- NIVKY- <b>W</b> -SLSIKAPGI	105- NIVKY- <b>R</b> -SLSIKAPGI
130- IVKY- <b>W</b> -SLSIKAPGIK	106- IVKY- <b>R</b> -SLSIKAPGIK



**Figura 11** – Fotos das membranas de celulose após realização dos Ensaio Imunoquímicos. Os spots reativos, onde houve a detecção dos epitopos pelos anticorpos, adquirem coloração azulada. **A.** Ensaio Imunoquímico realizado com soro hiperimune de coelho. **B.** Ensaio Imunoquímico realizado com soro hiperimune de ovino. Em destaque, os spots com reatividade exclusiva frente ao soro ovino.

É possível observar que o reconhecimento dos peptídeos pelos anticorpos das duas espécies seguiu padrões bastante semelhantes. Ou seja, na quase totalidade

das vezes, os spots reativos quando testados frente aos anticorpos de coelho (Figura 11A) também foram reativos aos anticorpos de ovino (Figura 11B), com diferenças apenas

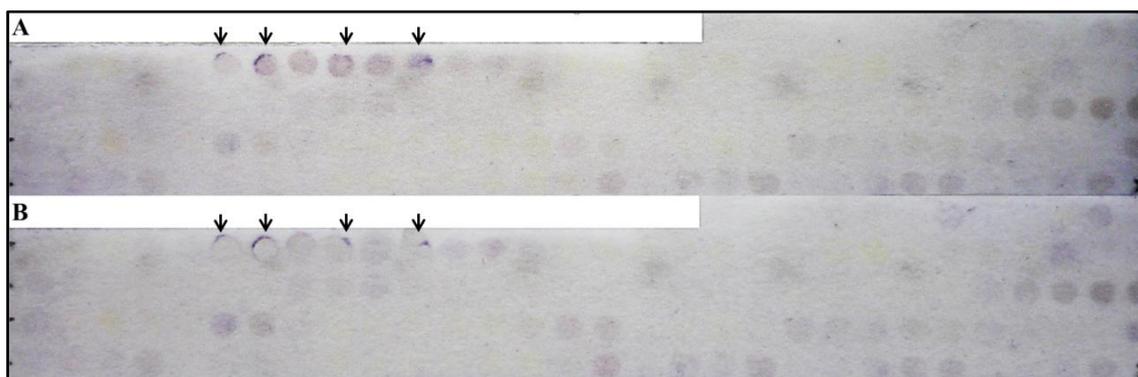
na intensidade das reações. Isto gera fortes indícios de que os peptídeos presentes nesses spots realmente foram reconhecidos pelas imunoglobulinas anti- $\epsilon$ , e que os mesmos possuem capacidade antigênica, sendo, portanto, epitopos da toxina  $\epsilon$ .

No entanto, os spots em destaque na Figura 11B foram reativos apenas aos anticorpos do soro ovino. A ocorrência de peptídeos reconhecidos pelas imunoglobulinas de apenas uma das espécies é algo totalmente normal e esperado. Há muito já se sabe que as respostas imunes aos antígenos estão sob controle genético, e que, para cada epitopo, essa resposta está sob controle genético separado. Em outras palavras, a resposta imune contra determinado antígeno depende da constituição genética de cada indivíduo, e, desta maneira, pode diferir entre espécies distintas ou até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (Atassi, 1984; Atassi e Dolimbek, 2004; Dolimbek et al., 2007).

Durante os ensaios realizados com os soros pré-imunes, não foi detectada reatividade de nenhum spot frente aos anticorpos presentes nos soros de animais não imunizados contra a toxina  $\epsilon$ . Este resultado sugere novamente

que aqueles peptídeos reativos nos ensaios com os soros hiperimunes realmente fazem parte de regiões epitópicas da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D.

Os conjugados anti-IgG de coelho e de ovino foram testados para verificar possíveis reações inespecíficas. Pequenas áreas de reatividade foram evidenciadas pelos testes de ambos os conjugados (Figura 12). Provavelmente, essas reações inespecíficas ocorreram entre os conjugados e aquelas áreas da membrana de celulose; isto pode ocorrer se houver algum defeito na membrana ou caso a mesma tenha sido alterada em sua estrutura física e/ou química durante a síntese dos peptídeos. Outra causa possível seria uma reação inespecífica entre os conjugados e a soroalbumina bovina (BSA) utilizada na etapa de bloqueio da membrana. É importante observar que caso a reatividade tivesse ocorrido entre os conjugados e os peptídeos ali presentes, toda a área daqueles spots apresentaria reatividade, o que não ocorreu. Portanto, as pequenas áreas de reatividade inespecífica não influenciaram, em momento algum, na execução, nos resultados ou interpretação dos testes.



**Figura 12** – Fotos das membranas de celulose após realização dos ensaios imunoquímicos para teste dos conjugados. **A.** Teste do conjugado anti-IgG de coelho. **B.** Teste do conjugado anti-IgG de ovino. **Setas:** áreas com reatividade.

### 5.4.3 Análise da reatividade dos spots

A Tabela 8 lista todos os spots reativos aos Ensaio Imunoquímicos realizados. Os spots

contendo peptídeos reativos do número 7 a 106 fazem parte da estrutura primária original da toxina  $\epsilon$ , enquanto aqueles do 116 a 130 contêm peptídeos com

aminoácidos alterados. Estas alterações não resultaram em mudanças substanciais no padrão de ligação dos anticorpos aos peptídeos; a retirada ou a inserção de certos aminoácidos não reduziu ou ampliou significativamente o reconhecimento pelos anticorpos anti- $\epsilon$ . Deste modo, pode-se

inferir que os aminoácidos modificados (Tabela 7) não são essenciais para a antigenicidade das suas respectivas regiões da toxina  $\epsilon$ . Com base nestes resultados, as análises subsequentes se detiveram àqueles peptídeos que compõem a sequência original da toxina  $\epsilon$ .

**Tabela 8** – Lista dos spots positivos nos ensaios imunológicos, com a sequência de aminoácidos dos respectivos peptídeos e as intensidades de reatividade médias, em escala de 1 a 5.

Spot	Sequência	Intensidade	Spot	Sequência	Intensidade
7	YSIVNIVSPTNVIK	1,5	72	YLKKNVNVKGNVCLVG	3,5
11	IAKEISNTVSNEMSK	1,5	73	KVNVKGNVCLVGVQS	1,0
16	KASYDNVDTLIEKGR	1,0	78	GSEWGEIPSYLAFPR	2,0
17	YDNVDTLIEKGRYNT	1,5	79	WGEIPSYLAFPRDGY	1,5
18	VDTLIEKGRYNTKYN	3,0	86	TVNKSDLNEDGTINI	5,0
19	LIEKGRYNTKYNLYK	4,0	87	KSDLNEDGTININGK	5,0
20	KGRYNTKYNLYKRME	4,0	88	LNEDGTININGKGNV	5,0
21	YNTKYNLYKRMEKYY	4,0	93	SAVMGDELIVKVRNL	2,5
22	KYNLYKRMEKYYPNA	3,0	94	MGDELIVKVRNLNTN	2,5
23	YLKRMEKYYPNAMAY	3,0	95	ELIVKVRNLNTNNVQ	3,0
24	RMEKYYPNAMAYFDK	3,0	96	VKVRNLNTNNVQYEV	2,5
25	KYYPNAMAYFDKVTI	3,0	97	RNLNTNNVQYEVIPV	2,0
26	PNAMAYFDKVTINPQ	1,5	98	NTNNVQYEVIPVDDK	1,0
37	MNYLEDVYVVGKALLT	2,5	102	DKKEKSNDSNIVKYR	3,0
38	LEDVYVVGKALLTNDT	2,5	104	NDSNIVKYRSLSIKA	1,0
40	GKALLTNDTQQEQKL	4,0	105	NIVKYRSLSIKAPGI	1,0
43	QQEQKLKSQSFTSKN	1,0	106	IVKYRSLSIKAPGIK	1,5
45	KSQSFTSKNTDTVTA	1,0	116	TVIKSDLNEDGTINI	5,0
47	SKNTDTVTATTTHTV	1,0	117	DKKEKSNDSNIVKYW	2,0
50	TTTHTVGTISIQATAK	1,5	119	NDSNIVKYWSLYIKA	1,0
51	HTVGTISIQATAKFTV	1,5	120	NIVKYWSLYIKAPGI	1,0
52	GTSIQATAKFTVPFN	2,0	121	IVKYWSLYIKAPGIK	2,5
68	LVPANTTVEVIAYLK	1,5	125	IVKYRSLYIKAPGIK	2,0
69	ANTTVEVIAYLKKVN	2,0	126	DKKEKSNDSNIVKYW	2,0
70	TVEVIAYLKKVNVKG	3,0	130	IVKYWSLSIKAPGIK	2,5
71	VIAYLKKVNVKGNVK	3,5			

Os spots reativos apenas aos anticorpos do soro ovino (Figura 11B) foram analisados separadamente para evitar um viés de informação, fazendo com que esses spots

tivessem suas reatividades classificadas muito abaixo das intensidades reais. Os resultados estão na Tabela 9.

**Tabela 9** – Lista dos spots positivos exclusivamente frente ao soro ovino nos ensaios imunológicos, com a sequência de aminoácidos dos respectivos peptídeos e as intensidades de reatividade médias, em escala de 1 a 5.

Spot	Sequência	Intensidade
28	FDKVTINPQGNDFYI	2,0
29	VTINPQGNDFYINNP	2,0
30	NPQGNDFYINNPKE	3,0
31	GNDFYINNPKEVDG	4,0

Com base na análise da reatividade dos spots e agregando os peptídeos adjacentes que foram reconhecidos pelos anticorpos dos

soros hiperimunes anti-ε, 16 regiões epitópicas foram identificadas na toxina ε de *C. perfringens* tipo D (Tabela 10).

**Tabela 10** – Peptídeos reativos na toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D, suas respectivas sequências de aminoácidos, número de aminoácidos, massas moleculares, pI\* e índice GRAVY\*\*.

Epitopo	Sequência	Número de aa	Massa (Da)	pI*	GRAVY**
1	YSIVNIVSPTNVIK	15	1617,9	8,59	0,787
2	IAKEISNTVSNEMSK	15	1650,8	6,14	-0,533
3	KASYDNVDTLIEKGR YNTKYNLKRMEKYY PNAMAYFDKVTINPQ	45	5459,1	9,26	-1,100
4	FDKVTINPQGNDFYI NNPKVELDG	24	2738,0	4,23	-0,771
5	MNYLEDVYVGKALLT NDT	18	2059,3	4,03	-0,128
6	GKALLTNDTQQEQKL	15	1686,8	6,07	-1,160
7	QQEQKLKSQSFTSKN	15	1780,9	9,70	-1,947
8	KSQSFTSKNTDTVTA	15	1614,7	8,59	-0,980
9	SKNTDTVTATTTHTV	15	1576,6	6,46	-0,640
10	TTTHTVGTSIQATAK FTVFPN	21	2222,4	8,44	0,014
11	LVPANTTVEVIAYLK KVNKGNVCLVGQVS	30	3181,8	9,83	0,470
12	GSEWGEIPSYLAFPR DGY	18	2044,2	4,14	-0,644
13	TVNKSDLNEDGTINI NGKGNV	21	2266,4	4,56	-1,119
14	SAVMGDELIVKVRNL NTNNVQYVPIPVDDK	30	3386,9	5,94	-0,233
15	DKKEKSNDSNIVKYR	15	1824,0	9,40	-2,120
16	NDSNIVKYRSLSIKA PGIK	19	2103,4	10,00	-0,479

\* pI: ponto isoelétrico;

\*\* GRAVY (*Grand average of hydropathicity*): índice de hidropaticidade média.

Durante a resposta imune frente a uma proteína estranha ao organismo, as células apresentadoras de antígenos, como células

dendríticas, macrófagos e linfócitos B, capturam este antígeno, o internalizam e processam. Esta etapa de processamento é

realizada pela clivagem do antígeno em peptídeos por proteases vesiculares. Posteriormente, esses peptídeos, agora chamados de epitopos, se ligam às moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) com diferentes afinidades, e são transportados e apresentados na superfície celular aos linfócitos T auxiliares. Estes, por sua vez, irão guiar a resposta imunológica humoral. Sendo assim, a partir de uma proteína estranha, vários determinantes são gerados e apresentados. Alguns se ligam às moléculas do MHC com baixa afinidade, e outros com maior afinidade; estes últimos são chamados de imunodominantes, e incitam uma maior produção de anticorpos (Ramachandra et al., 2009). De fato, toda superfície acessível das proteínas é potencialmente antigênica, e estas são formadas por um mosaico de epitopos. Isto é essencial para a eficácia da resposta imune humoral que levará à neutralização ou destruição de certo antígeno (Revillard et al., 1998).

Os resultados do presente trabalho condizem com o acima descrito, dado que foram mapeados, ao todo, 16 prováveis epitopos abrangendo grande parte da estrutura primária da toxina  $\epsilon$ , porém com diferentes escalas de imunodominância.

Atassi e colaboradores em 1975 e 1984, em seus estudos das estruturas antigênicas das proteínas, principalmente a mioglobina, descreveram uma característica da ligação antígeno-anticorpo chamada por eles de *antibody boundary shift*. Segundo os autores, anticorpos que se ligam a determinado epitopo de uma proteína podem se deslocar periféricamente por alguns aminoácidos e mesmo assim continuar se ligando a este epitopo, porém com menor afinidade. No presente trabalho, padrão semelhante de reconhecimento dos peptídeos pelos anticorpos pôde ser observado (Tabelas 8 e 9 e Figura 13). Alguns determinantes antigênicos possuem regiões centrais onde a afinidade da ligação

antígeno-anticorpo (ou peptídeo-anticorpo) é máxima; há medida que há um deslocamento lateral dos anticorpos por alguns aminoácidos, a ligação continua ocorrendo, porém com afinidades decrescentes até que não haja mais interação entre as imunoglobulinas e os determinantes.

Os epitopos detectados possuem tamanhos e massas moleculares diversos, variando entre 15 e 45 aminoácidos de comprimento, e 1576,6 e 5459,1 Da, respectivamente. Já o ponto isoelétrico (pI) dos determinantes variou de 4,03 a 10,00. Machado de Ávila (2011), estudando a predição de epitopos de quatro proteínas por meio de bioinformática, observou que 69 dos 76 peptídeos reconhecidos por anticorpos possuía pI acima de 7. Segundo o autor, o caráter básico desses peptídeos e a presença de cargas positivas nos aminoácidos que os compõem facilitaria a formação de ligações de hidrogênio e a interação com as regiões carregadas negativamente dos anticorpos. Entretanto, os resultados do presente trabalho não se assemelham aos daquele autor, sendo que oito epitopos mapeados possuem pI abaixo de 7 e oito acima. Desta forma, baseado nos resultados deste estudo, não se pôde tirar maiores conclusões sobre a capacidade dos valores de pI em predizer ou confirmar a presença de epitopos na toxina  $\epsilon$ .

Pela observação do índice de hidropaticidade média (GRAVY), constatou-se que os determinantes antigênicos de número 1, 10 e 11 são os únicos classificados como hidrofóbicos, e os demais como hidrofílicos. O índice GRAVY possui certa capacidade de predizer a localização de certa sequência de aminoácidos em relação à proteína de onde é originada. Deste modo, peptídeos classificados como hidrofóbicos estão, em teoria, albergados no interior ou em regiões pouco expostas da proteína de origem; enquanto aqueles tidos como hidrofílicos estão em regiões mais expostas da mesma

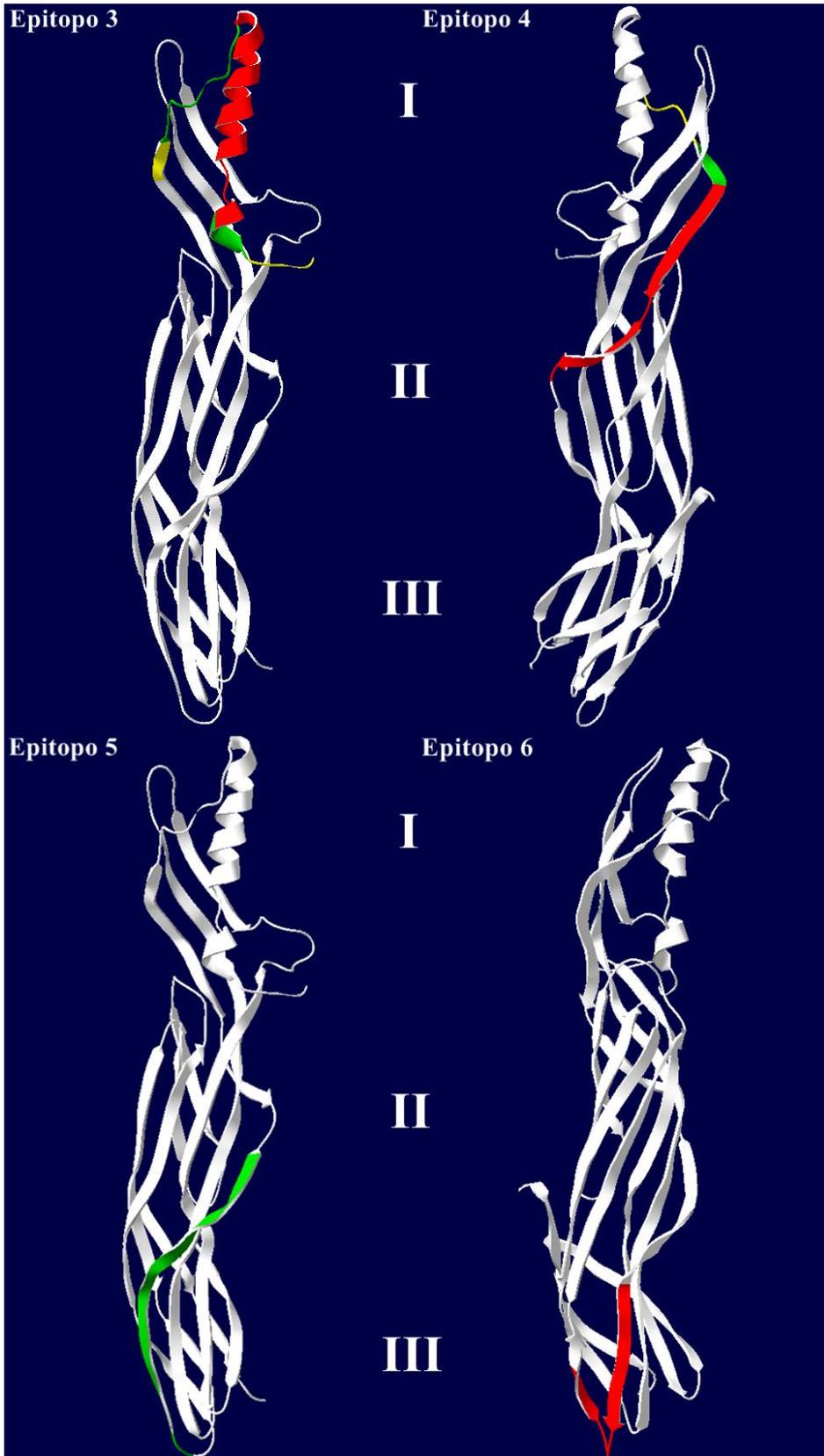
(Kyte e Doolittle, 1982). Com base no supracitado, 13 dos 16 determinantes identificados estariam em regiões expostas e com maior acessibilidade da toxina  $\epsilon$ , o que facilitaria o reconhecimento antigênico dessas regiões pelo sistema imune durante uma resposta contra a toxina. De fato, hidrofobicidade e acessibilidade são duas características de grande importância para os determinantes antigênicos, sendo, inclusive, amplamente utilizadas nos algoritmos de predição de epitopos (Chen et al., 2011). Entretanto, é importante destacar que o índice GRAVY calculou a hidropaticidade das moléculas com base em sua estrutura primária; no entanto, no contexto da proteína, onde há a presença de outros resíduos de aminoácidos espacialmente justapostos, a hidropaticidade das regiões epitópicas pode ser diferente.

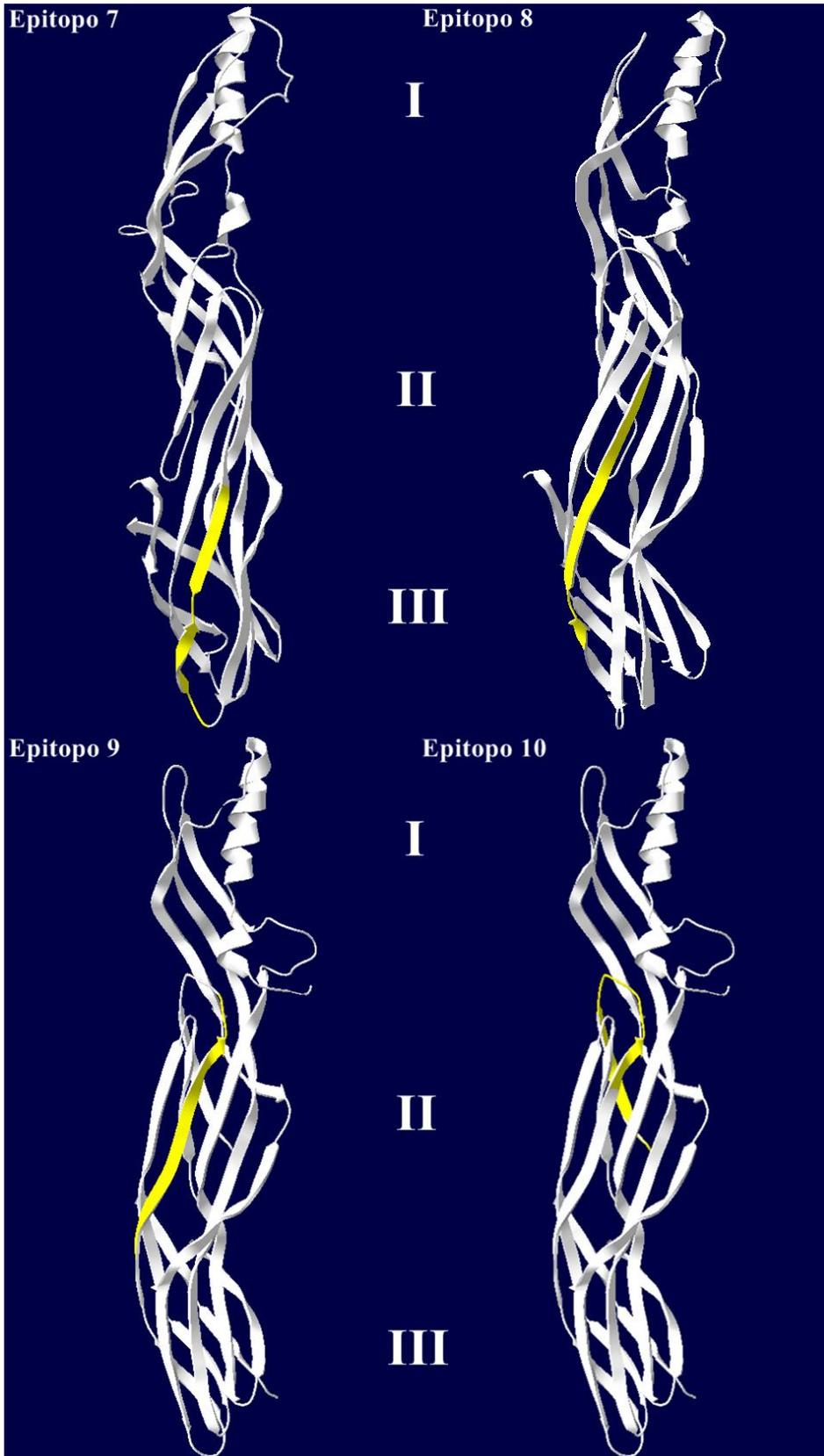
A Figura 13 apresenta os determinantes antigênicos que foram reconhecidos, por

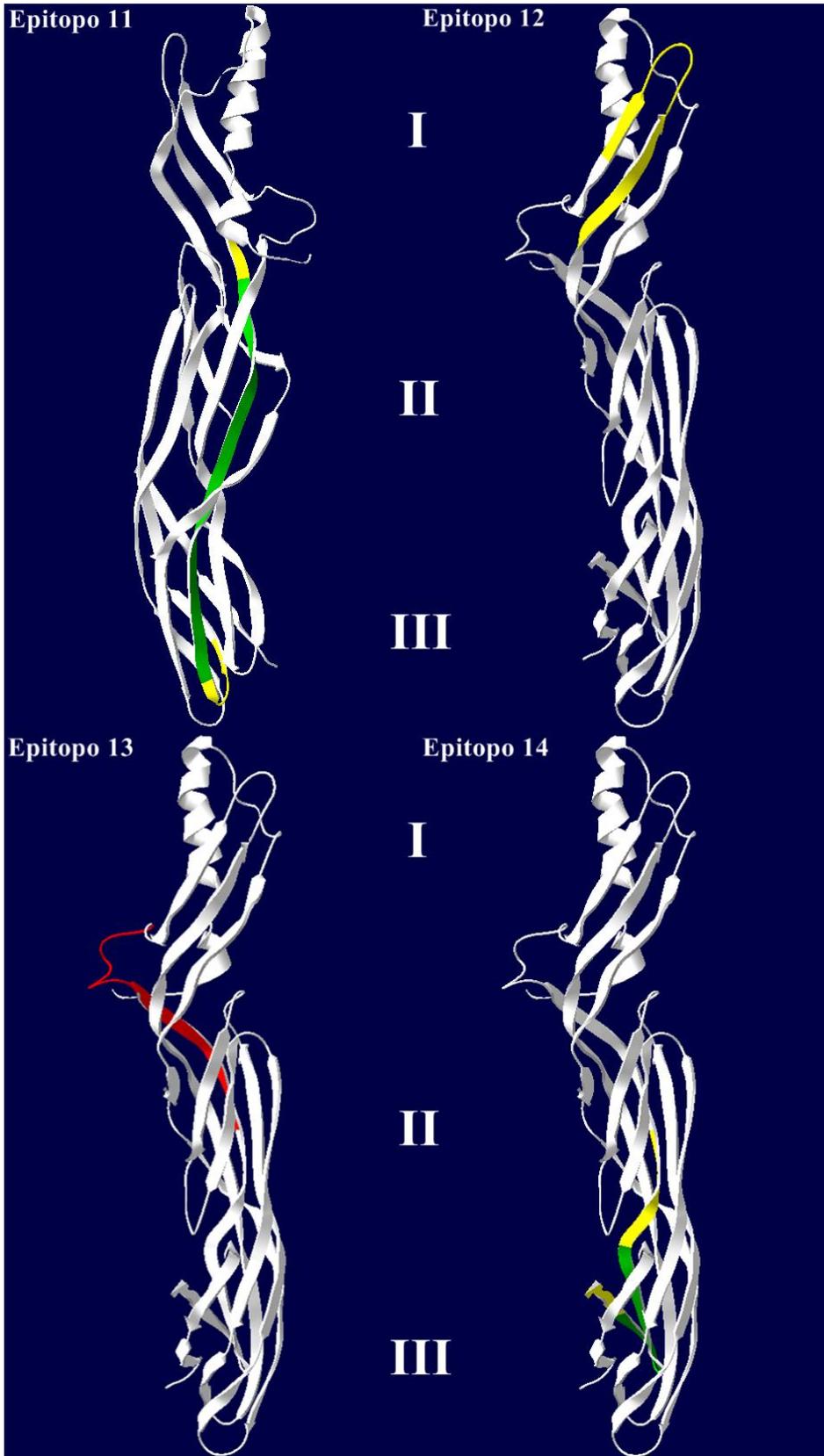
meio da visualização dos mesmos na estrutura 3D da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D. No entanto, alguns epitopos, resíduos ou sequências de aminoácidos não puderam ser visualizados nas imagens 3D e estão listados na Tabela 11. Estas regiões não estão presentes na estrutura 3D da toxina  $\epsilon$  cristalizada por Cole et al. (2004). Todos os aminoácidos do determinante 1 e os resíduos Ile e Ala do determinante 2 fazem parte de um peptídeo sinal da toxina; os 13 demais resíduos do determinante 2 constituem a região amino-terminal da protoxina  $\epsilon$ , a qual está ausente na toxina ativa (Langroudi et al., 2012). Provavelmente, por estas razões, esses resíduos e regiões não foram contemplados durante a cristalografia da proteína. Já os resíduos dos epitopos 14, 15 e 16 não aparecem na estrutura 3D da toxina devido à falta de densidade nítida da região durante a cristalografia (Cole et al., 2004).

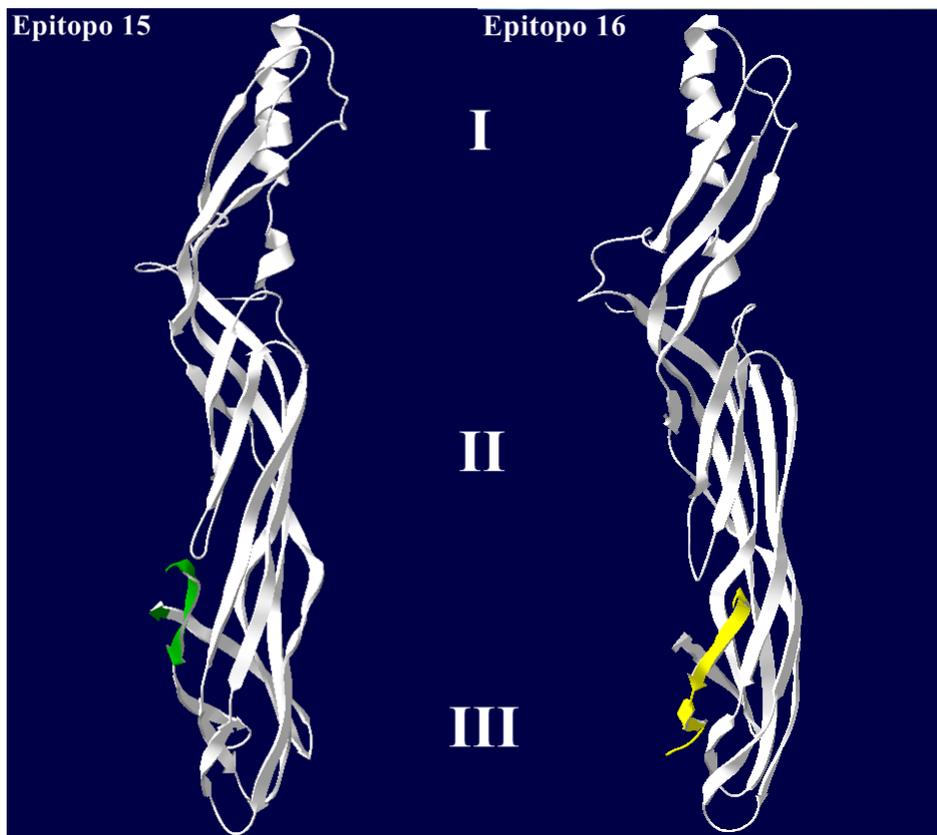
**Tabela 11** – Epitopos, resíduos e sequências de aminoácidos não visualizados na estrutura 3D da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. Os números sobrescritos referem-se aos locais onde os respectivos resíduos estão inseridos na estrutura primária da toxina.

Epitopo	Resíduos
1	YSIVNIVSPTNVIK
2	IA <sup>1</sup> KEISNTVSNEMSK <sup>13</sup>
3	<sup>14</sup> KA <sup>15</sup>
14	<sup>273</sup> KK <sup>274</sup>
15	<sup>273</sup> KKEKSND <sup>279</sup>
16	<sup>278</sup> ND <sup>279</sup>









**Figura 13** – Visualização dos epitopos mapeados na estrutura 3D da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. **I**, **II** e **III**: regiões da toxina épsilon segundo Cole et al. (2004). As cores amarelo, verde e vermelho representam as reatividades baixa, média e alta das regiões, respectivamente. Os epitopos 1 e 2, bem como alguns resíduos dos epitopos 3, 14, 15 e 16, não são apresentados.

A partir da visualização dos determinantes antigênicos na estrutura 3D da toxina  $\epsilon$  (Figura 13) percebe-se que todos eles possuem regiões de alta acessibilidade. O próprio formato da toxina, alongado e estreito, contribui para uma maior presença de áreas expostas. Já o determinante 11 aparenta ser o de menor acessibilidade de acordo com sua visualização, o que é corroborado pelo seu índice GRAVY positivo; como discutido anteriormente, um índice positivo classifica o peptídeo como hidrofóbico, o que, por sua vez, prediz que o mesmo tende a estar em regiões menos expostas da proteína de origem.

### 5.5 Seleção dos Epitopos para a Síntese Solúvel

Após o mapeamento dos epitopos da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, seis dos 16 determinantes identificados foram sintetizados em fase solúvel, e posteriormente utilizados na elaboração de imunógenos para a imunização de camundongos (Tabela 12). O número de aminoácidos dos peptídeos sintetizados variou entre 15 a 24 por duas razões principais: (1) proporcionar que a síntese solúvel fosse bem sucedida, visto que quanto maior o número de aminoácidos maior a susceptibilidade a erros; e (2) assemelhar os peptídeos sintetizados com aqueles que naturalmente se ligam ao MHC de classe 2 (peptídeos com cerca de 10 a 30 resíduos) durante a resposta imune frente a um antígeno (Abbas et al., 2011). Dos epitopos 3, 11 e 16, os quais não foram inteiramente

sintetizados, as regiões de maior reatividade nos ensaios imunoquímicos foram selecionadas e sintetizadas. Além do já descrito, outros critérios foram levados em

consideração durante a escolha dos epitopos para a produção dos imunógenos, e são discutidos a seguir.

**Tabela 12** – Peptídeos sintetizados em fase solúvel, suas respectivas sequências de aminoácidos, massas moleculares, pI\* e índice GRAVY\*\*.

Epitopo	Peptídeo Sintetizado	Número De aa	Massa (Da)	pI*	GRAVY**
3	<sup>23</sup> LIEKGRYNTKYNYLK RMEKYY <sup>43</sup>	21	2774,2	9,70	-1,533
4	<sup>50</sup> FDKVTINPQGNDFYI NNPKVELDG <sup>73</sup>	24	2738,0	4,23	-0,771
10	<sup>116</sup> TTTHTVGTISIQATAK FTVPFN <sup>136</sup>	21	2222,4	8,44	0,014
11	<sup>176</sup> TVEVIAYLKKVNVKG NVKLVG <sup>196</sup>	21	2271,7	9,82	0,486
13	<sup>224</sup> TVNKSDLNEDGTININ GKGN <sup>244</sup>	21	2266,4	4,56	-1,119
16	<sup>282</sup> IVKYRSLSIKAPGIK <sup>296</sup>	15	1673,0	10,46	0,147

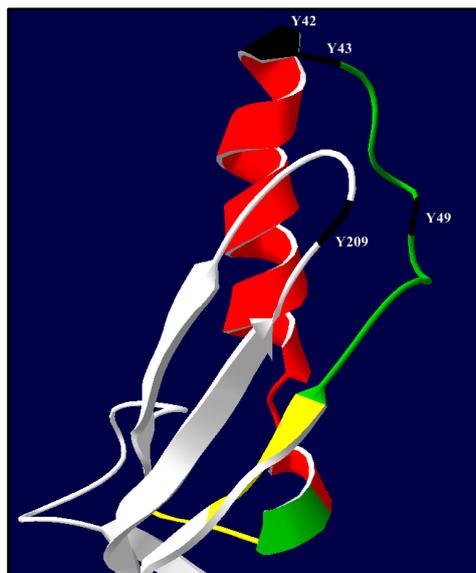
Os números sobrescritos referem-se aos locais onde os respectivos resíduos estão inseridos na estrutura primária da toxina épsilon. \* pI: ponto isoelétrico; \*\* GRAVY (Grand average of hydropathicity): índice de hidropaticidade média.

### 5.5.1 Epitopo 3

O epitopo 3 foi selecionado por uma série de fatores. Primeiramente, porque foi o segundo mais reativo aos testes imunoquímicos (Tabela 8), o que indica haver grande quantidade de anticorpos presentes nos soros anti-ε contra o mesmo, sugerindo que este seria um epitopo imunodominante. Além disto, o epitopo 3 está alocado na região ou domínio I da toxina ε de *C. perfringens* tipo D, que por sua vez está na região amino-terminal da mesma. Acredita-se que essa região, composta em grande parte por uma alfa-hélice longa, contenha o sítio de interação da toxina com receptores presentes em células-alvo (Cole et al., 2004; Popoff, 2011). Desta forma, há a possibilidade de que os anticorpos neutralizantes produzidos contra a toxina ε se liguem primordialmente a essa

região, e impeçam a ancoragem da toxina aos receptores celulares.

Ivie e McClain (2012) introduziram mutações na toxina ε por substituição de sete aminoácidos aromáticos acessíveis na superfície da toxina. Posteriormente, avaliaram a capacidade destes mutantes em interagir com as células e causar morte celular. Como resultado, os autores observaram que mutações dos aminoácidos Y<sup>42</sup>, Y<sup>43</sup>, Y<sup>49</sup> e Y<sup>209</sup> reduziam drasticamente a ligação da proteína às células-alvo, sendo esses resíduos importantes para a citotoxicidade da toxina. Três deles estão presentes na estrutura primária do epitopo 3 (Y<sup>42</sup>, Y<sup>43</sup>, Y<sup>49</sup>), enquanto o último (Y<sup>209</sup>) está espacialmente próximo ao epitopo (Figura 14). Tendo em vista o supracitado, o determinante 3 foi um dos escolhidos para elaboração de um imunógeno.



**Figura 14** – Visualização do epitopo 3 na estrutura 3D da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. Os resíduos importantes para a interação da toxina com seus receptores celulares, segundo Ivie e McClain (2012), estão marcados em preto. As cores amarelo, verde e vermelho representam as reatividades baixa, média e alta das regiões, respectivamente.

### 5.5.2 Epitopo 4

O epitopo 4, assim como o 3, foi bastante reativo aos ensaios imunquímicos realizados (Tabela 9), sugerindo que ele poderia também ser um determinante imunodominante. Grande parte deste epitopo também está alocado no domínio I, envolvido nas interações proteína-receptor (Cole et al., 2004; Popoff, 2011). Ademais, esse determinante foi reconhecido apenas pelas imunoglobulinas anti- $\epsilon$  de ovino, e não pelas de coelhos. Isto despertou a curiosidade em saber se esta região da toxina  $\epsilon$ , reconhecida neste trabalho apenas pelo sistema imune ovino, seria capaz gerar anticorpos em outra espécie, como camundongos.

### 5.5.3 Epitopo 10

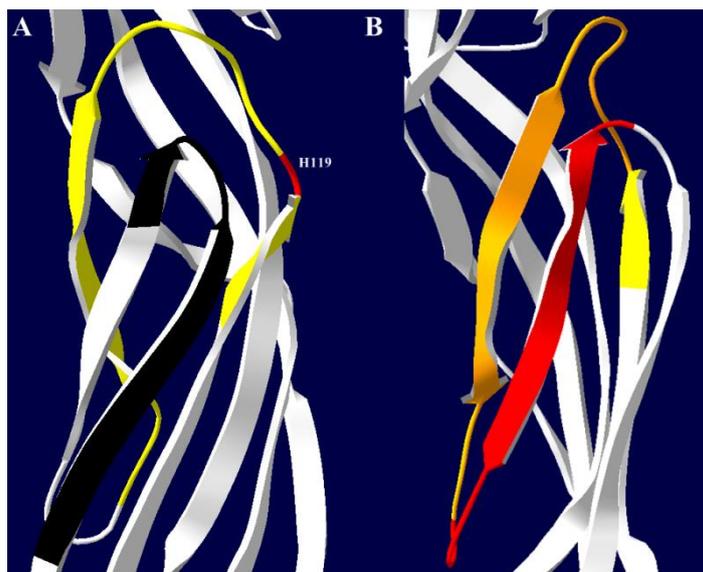
Apesar do epitopo 10 não ter alcançado grande intensidade de ligação aos anticorpos anti- $\epsilon$  durante os ensaios imunquímicos (Tabela 8), o mesmo aloja o aminoácido His, na posição 119 da estrutura primária da toxina  $\epsilon$  (Figura 15). Segundo Oyston et al.

(1998), a substituição deste resíduo por uma Pro inativa a toxina. Deste modo, a His<sup>119</sup> e a região que a contém são essenciais para atividade tóxica da proteína, e anticorpos anti- $\epsilon$  contra este epitopo devem neutralizar a toxina  $\epsilon$ .

De fato, McClain e Cover (2007), utilizando dois anticorpos monoclonais neutralizantes anti- $\epsilon$ , mapearam um determinante antigênico próximo ao epitopo 10; esta proximidade se dá tanto linearmente quanto espacialmente, como mostra a Figura 15A. Segundo os autores, os anticorpos monoclonais empregados, ao se ligarem ao determinante identificado por eles, neutralizariam a toxina  $\epsilon$  por um mecanismo alostérico, impedindo estericamente que o *loop* contendo a His<sup>119</sup> executasse sua função. Ainda segundo esses autores, a região entre os aminoácidos 119 e 158 é importante para a atividade da toxina, provavelmente por ser a região de inserção da proteína na membrana plasmática e participar na formação do poro transmembranar.

Knapp et al. (2009) também relataram a importância de um domínio da toxina  $\epsilon$  que se estende desde a His<sup>119</sup> à Ala<sup>149</sup>. O epítipo 10 sobrepõe esse domínio em 18 aminoácidos, desde a His<sup>119</sup> a Asn<sup>136</sup> (Figura 15B). Segundo os autores, e corroborando com o discutido anteriormente, esta região por eles estudada está envolvida na inserção

da toxina na membrana e formação do poro celular; e mutações em alguns aminoácidos resultam em mudanças na citotoxicidade da proteína e nas características dos poros formados. Por estas razões, o epítipo 10 poderia ser imunodominante, e foi incluído nas imunizações.



**Figura 15** – Visualização do epítipo 10 na estrutura 3D da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. **A.** Em amarelo, o epítipo 13; em vermelho, a His<sup>119</sup>, essencial para a atividade da toxina, segundo Oyston et al. (1998); em preto, o determinante antigênico mapeado por McClain e Cover (2007). **B.** Em amarelo, o epítipo 13; em vermelho, o domínio essencial para a atividade da toxina, segundo Knapp et al. (2009); em laranja, a região de sobreposição entre o epítipo 13 e o domínio de Knapp et al. (2009).

#### 5.5.4 Epítipo 11

Nos ensaios imunoquímicos realizados, o determinante 11 foi reconhecido pelas imunoglobulinas presentes nos soros anti- $\epsilon$  com boa intensidade (Tabela 8). Mesmo sendo hidrofóbico e estando relativamente menos acessível na estrutura terciária da toxina  $\epsilon$ , o epítipo 11 foi capaz de se ligar com boa afinidade aos anticorpos contra a toxina, o que o fez ser selecionado para testar sua imunogenicidade.

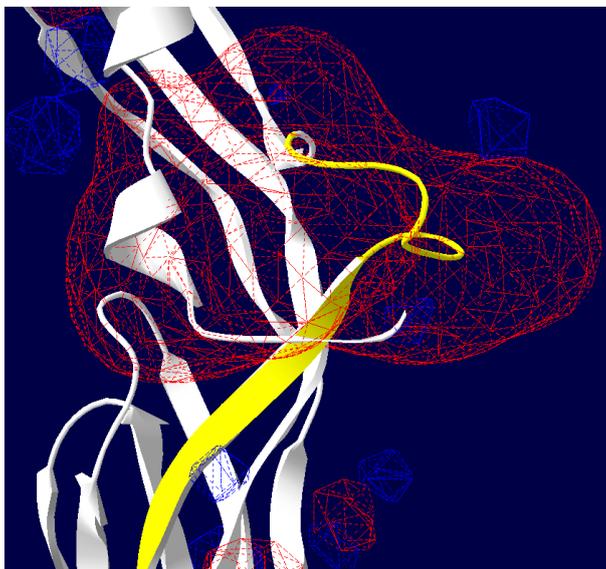
#### 5.5.5 Epítipo 13

Dentre os spots positivos para os ensaios imunoquímicos, aqueles correspondentes ao

epítipo 13 foram sempre os de maior reatividade em todos os testes (Tabela 8), o que sugere que nos soros anti- $\epsilon$  havia grande quantidade de imunoglobulinas contra este domínio antigênico. Seu índice GRAVY de -1,119 indica alta hidrofobicidade que, por sua vez, prediz que este determinante está excepcionalmente acessível na toxina  $\epsilon$ . Isto é confirmado pela visualização do epítipo 13 na estrutura 3D da proteína (Figuras 13 e 16). Ademais, ao calcular o potencial eletrostático da toxina  $\epsilon$ , observa-se uma ampla área com elevado potencial circundando grande parte do determinante antigênico 13 (Figura 16). Regiões com potencial eletrostático podem formar interações eletrostáticas entre si do tipo

proteína-proteína e/ou proteína-ligante (Kukić e Nielsen, 2010). Na verdade, essas interações estão entre as principais que se fazem presentes durante a ligação de um anticorpo a um antígeno proteico (Sinha et

al., 2002). Desta maneira, o epitopo 13 possui grandes chances de ser imunodominante, tendo sido selecionado para a confecção de um imunógeno.



**Figura 16** – Visualização do epitopo 13 na estrutura 3D da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. Em amarelo, o determinante 13; em vermelho, a representação do potencial eletrostático negativo; em azul, a representação do potencial eletrostático positivo.

### 5.5.6 Epitopo 16

Os peptídeos que compõem o epitopo 16, inclusive aqueles que sofreram alterações de aminoácidos em suas estruturas primárias, foram reconhecidos pelas imunoglobulinas anti- $\epsilon$  em todos os ensaios imunológicos (Tabelas 7 e 8). O determinante 16 faz parte do domínio III, porção carboxi-terminal da toxina  $\epsilon$  (Figura 13), e acredita-se que esse domínio esteja envolvido na interação das cadeias da toxina durante a oligomerização para formação do poro celular heptamérico. Na proteína nativa, o peptídeo carboxi-terminal parece bloquear a oligomerização dos monômeros e prevenir a ativação da protoxina (Miyata et al., 2001). Anticorpos que se liguem a esta região podem inibir competitivamente sua clivagem pelas enzimas e então impedir a ativação da toxina. Portanto, seria interessante testar um epitopo alocado nesta região. Somado a isto,

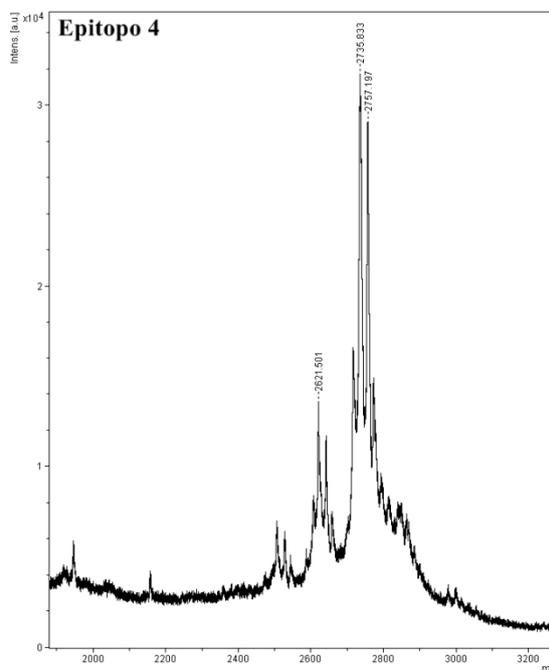
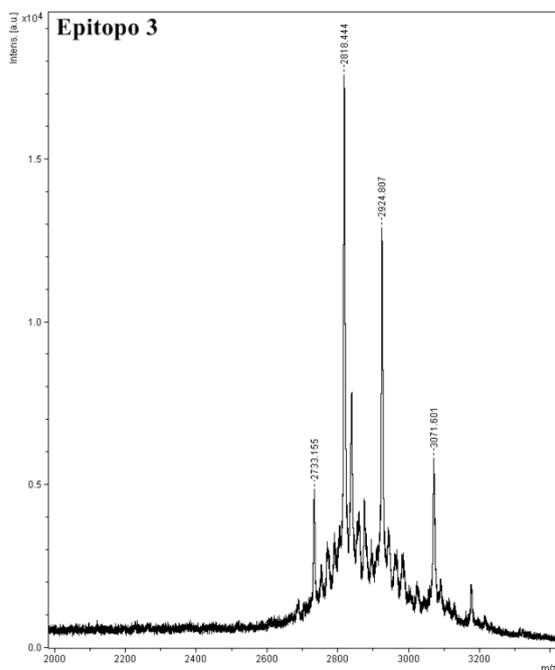
há vários exemplos descritos de antígenos que possuem determinantes em suas porções carboxi-terminais (Taouji et al., 2002; Seah e Kwang, 2004; Chen et al., 2006; Abboud et al., 2009; Grande et al., 2009); incluindo a toxina A de *C. botulinum* (Levy et al., 2007); e a toxina alfa de *C. perfringens* tipo A, a qual pertence à mesma família da toxina  $\epsilon$ , chamada de família das toxinas formadoras de poros beta, semelhantes à aerolisina (*aerolysin like,  $\beta$ -pore-forming toxin family*) (Williamson e Titball, 1993; Stevens et al., 2004; Bokori-Brown et al., 2011).

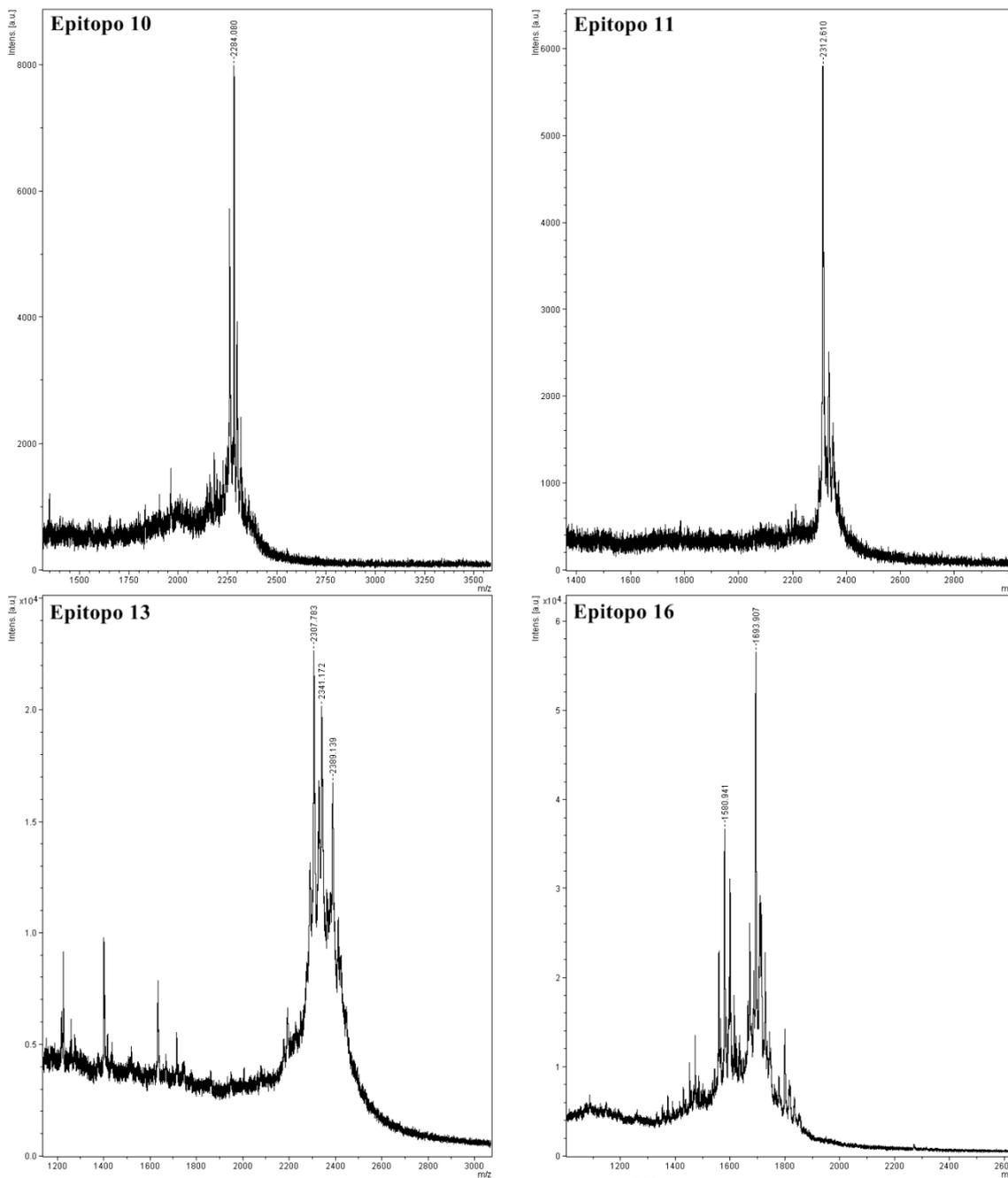
### 5.6 Espectrometria de Massa

Após a síntese solúvel dos epitopos selecionados para imunização, a presença dos peptídeos sintetizados foi averiguada, assim como suas massas foram confirmadas por meio da espectrometria de massas. Após

o acoplamento do último aminoácido, os peptídeos foram acetilados para proteger suas regiões amino-terminais; suas respectivas massas foram acrescidas de 41 Da correspondentes aos grupamentos acetil. Os resultados estão apresentados na Figura 17. Pequenas diferenças entre massas detectadas e as esperadas podem ter duas causas prováveis: diferenças relacionadas à calibração do aparelho; e/ou a presença de impurezas no solvente, como íons sódio, cloreto, potássio, entre outros, os quais se ligam aos peptídeos e são conjuntamente

detectados pelo espectrofotômetro. A presença de picos com diferenças maiores entre as massas detectadas e as esperadas também podem ter duas causas prováveis: falha no acoplamento de um ou mais aminoácidos; ou falha na clivagem de grupos protetores das cadeias laterais. É importante salientar que as diferenças de leitura observadas neste trabalho não se caracterizaram em erros importantes da síntese solúvel dos peptídeos, bem como não influenciaram durante as metodologias subsequentes realizadas.





**Figura 17** – Espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF<sup>TM</sup> dos peptídeos sintetizados em fase solúvel.

### 5.7 Imunizações e Titulação dos Soros Anti-Peptídeos

Os epitopos sintetizados foram encapsulados separadamente em lipossomas de fosfatidilcolina de soja e colesterol e

conjugados em gel de hidróxido de alumínio. Após as imunizações, os soros coletados foram titulados por ELISA competitivo. Dos seis determinantes antigênicos testados, três falharam totalmente em competir com o soro-padrão utilizado no ELISA, e apresentaram títulos

semelhantes aos controles negativos. Os outros três foram capazes de inibir fracamente a ligação das imunoglobulinas

presentes no soro padrão com a toxina  $\epsilon$  de *Clostridium perfringens* tipo D (Tabela 13).

**Tabela 13** – Resultado da titulação dos soros anti-peptídeos pelo ELISA competitivo.

Epítipo	Peptídeo Sintetizado	Inibição (%)
3	<sup>23</sup> LIEKGRYNTKYNLYK RMEKYY <sup>43</sup>	4,35196
4	<sup>50</sup> FDKVTINPQGNDFYI NNPKVELDG <sup>73</sup>	9,95035
10	<sup>116</sup> TTTHTVGTISIQATAK FTVPFN <sup>136</sup>	0,00000
11	<sup>176</sup> TVEVIAYLKKVNVKG NVKLVG <sup>196</sup>	0,00000
13	<sup>224</sup> TVNKSDLNEDGTININ GKGY <sup>244</sup>	0,00000
16	<sup>282</sup> IVKYRSLSIKAPGIK <sup>296</sup>	7,67931
Lipossoma Vazio	-	0,00000
Hidróxido de Alumínio	-	0,00000

A ausência ou fraca capacidade dos anticorpos anti-peptídeos em competir com as imunoglobulinas do soro-padrão pela ligação à toxina  $\epsilon$  pode ter diferentes causas. Primeiramente, os determinantes antigênicos sintetizados podem não ser epítipos imunodominantes, possuindo baixa imunogenicidade. Contudo, baseado nos ensaios e análises realizados neste trabalho, é improvável que nenhum dos determinantes antigênicos utilizados nas imunizações não seja imunodominante, principalmente os determinantes 3, 4 e 16, os quais conseguiram algum grau de inibição no ELISA competitivo.

Outra hipótese está relacionada às características intrínsecas dos peptídeos, os quais são sabidamente menos imunogênicos quando comparados a proteínas inteiras. Isto ocorre basicamente por duas razões. Como exemplo, uma molécula de toxina detém em sua estrutura múltiplos determinantes antigênicos capazes de incitar resposta imunológica contra esta proteína. Diferentemente, uma molécula de peptídeo sintetizada a partir de um epítipo

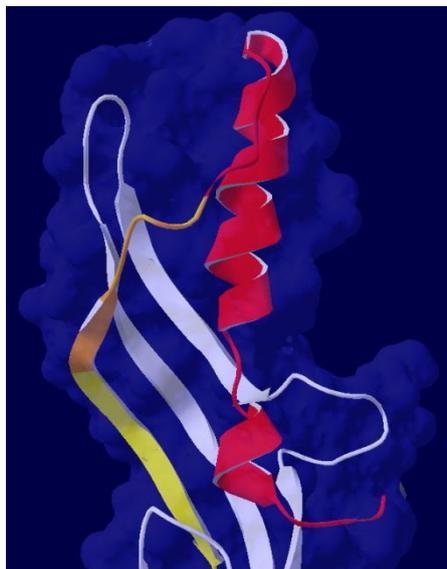
identificado possui, obviamente, apenas um determinante. Como consequência, aquela toxina será muito mais imunogênica do que o peptídeo caso ambos entrem em contato com o sistema imune de um organismo. Além disto, embora todos os antígenos sejam reconhecidos por células do sistema imune e imunoglobulinas, apenas as macromoléculas são capazes por si só de estimular a resposta imune humoral pelos linfócitos B (Abbas et al., 2011). Desta maneira, as características imunogênicas intrínsecas dos peptídeos podem ter sido a causa dos baixos títulos de anticorpos no ELISA competitivo. Uma das estratégias utilizadas para aumentar a imunogenicidade dos peptídeos é encapsulá-los em lipossomas (Jiang e Koganty, 2003; Underwood e van Eps, 2012). Todavia, a utilização deste adjuvante no presente trabalho parece não ter melhorado os imunógenos.

Finalmente, os baixos títulos de anticorpos contra os epítipos detectados no ELISA competitivo podem ter relação com a metodologia utilizada. As imunoglobulinas presentes no soro-padrão reconhecem

múltiplos determinantes da toxina  $\epsilon$ ; enquanto aquelas presentes nos soros anti-peptídeos são específicas para apenas um determinante, e são capazes de competir apenas por um único sítio antigênico. Como resultado, apesar de haver anticorpos nos soros-teste, e mesmo que se liguem à toxina, eles não inibem totalmente a ligação das imunoglobulinas do soro-padrão com a mesma, e não são detectados no teste. Esta situação pode ter ocorrido durante a titulação de todos os soros em teste. Possivelmente, os anticorpos dos soros que apresentaram títulos foram capazes de competir por seus respectivos epitopos, bem como inibiram estericamente a ligação das imunoglobulinas do soro-padrão em outros determinantes da toxina  $\epsilon$ .

Em contrapartida do descrito acima, os peptídeos sintetizados que compõem os epitopos 3, 4 e 16 foram capazes de incitar a

produção de anticorpos, os quais foram detectados pela titulação (Tabela 13). Os três possuem em comum o caráter hidrofílico (Tabela 10); os determinantes 3 e 16 estão localizados nas porções amino-terminal e carboxi-terminal, respectivamente (Figura 13); e os determinantes 3 e 4 obtiveram reatividades fortes nos ensaios imunoquímicos (Tabelas 8 e 9). Também é digno de nota o fato de boa parte dos resíduos dos epitopos 3 e 4 estarem sobrepostos e linearmente ou espacialmente próximos (Figura 18); além disto, eles fazem parte do domínio I da toxina, envolvido na interação proteína-receptor (Cole et al., 2004; Popoff, 2011). Sendo assim, baseado nos resultados deste trabalho e nos achados dos autores Ivie e McClain, (2012), é possível que esta região faça parte de um epitopo conformacional, alojado em um sítio de interação entre a toxina  $\epsilon$  e receptores de membrana celular.



**Figura 18** – Visualização dos epitopos 3 e 4 na estrutura 3D da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D. Em vermelho, o determinante 3; em amarelo, o determinante 4; em laranja, a região de sobreposição entre os epitopos 3 e 4.

Os resultados do presente trabalho fornecem informações essenciais para o entendimento das características estruturais, patogênicas e imunológicas da toxina  $\epsilon$ , e podem auxiliar no desenvolvimento de métodos

diagnósticos alternativos, novas terapias e vacinas contra os efeitos da toxina em animais e humanos.

## 6. CONCLUSÕES

A metodologia empregada neste trabalho foi eficiente na produção, concentração e purificação da toxina épsilon ( $\epsilon$ ) de *Clostridium perfringens* tipo D, bem como na produção do toxóide  $\epsilon$ .

O toxóide  $\epsilon$  foi imunogênico e capaz de incitar a produção de anticorpos em coelhos e ovino, suficientes para o mapeamento dos epitopos da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D.

Por meio da metodologia utilizada neste trabalho, foram mapeados 16 prováveis epitopos abrangendo grande parte da estrutura primária da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D, porém com diferentes escalas de imunodominância.

Três epitopos da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D incitaram a produção de imunoglobulinas em camundongos detectáveis por ELISA competitivo.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Elaboração de imunógenos contendo os epitopos da toxina épsilon ( $\epsilon$ ) de *Clostridium perfringens* tipo D testados e não testados neste trabalho, empregando combinações entre os peptídeos, outros adjuvantes, carregamento por macromoléculas, outras doses, protocolos de imunização, assim como outras espécies de animais.

Predição de epitopos conformacionais presentes na toxina épsilon ( $\epsilon$ ) de *Clostridium perfringens* tipo D, síntese química e utilização dos mesmos para imunização de animais.

Avaliação da capacidade dos epitopos imunodominantes mapeados em competir com a toxina nativa pelos receptores de membrana em linhagens de células sensíveis à toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D.

Utilização de um ou mais epitopos imunodominantes em métodos diagnósticos, tal como na etapa de sensibilização de ensaios imunoenzimáticos para detecção e titulação da toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* tipo D.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p.

ABBOUD, N.; JESUS, M.; NAKOUZI, A. Identification of Linear Epitopes in *Bacillus anthracis* Protective Antigen Bound by Neutralizing Antibodies. *J. Biol. Chem.*, v. 284, n. 37, p. 25077-25086, 2009.

ATASSI, M. Z. Antigenic structure of myoglobin: The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. *Immunochemistry*, v. 12, p. 423-438, 1975.

ATASSI, M. Z. Antigenic structures of proteins: Their determination has revealed important aspects of immune recognition and generated strategies for synthetic mimicking of protein binding sites. *Eur. J. Biochem.*, v. 145, p. 1-20, 1984.

ATASSI, M. Z.; DOLIMBEK, B. Z. Mapping of the Antibody-Binding Regions on the H<sub>N</sub>-Domain (Residues 449-859) of Botulinum Neurotoxin A with Antitoxin Antibodies from Four Host Species. Full Profile of the Continuous Antigenic Regions of the H-Chain of Botulinum Neurotoxin A. *Prot. J.*, v. 23, n. 1, p. 39-52, 2004.

AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V. et al. Evaluation of vaccines against *Clostridium perfringens* type C and D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 50, n. 3, p. 239-242, 1998.

- BOKORI-BROWN, M.; SAVVA, C. G.; COSTA, S. P. F. et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.*, p. 1-13, 2011.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento. Instrução Normativa n. 03 de 22 de março de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 23 de Março de 2002. Seção 1.
- BUTLER, R. UNSCOM'S Comprehensive Review. CNS. Monterey, EUA, 1999. Disponível em <<http://cns.miiis.edu/iraq/ucreport/>>. Acesso em: 12 Jan. 2013.
- BUXTON, D. *In-Vitro* Effects of *Clostridium welchii* Type-D Epsilon Toxin on Guinea-Pig, Mouse, Rabbit and Sheep Cells. *J. Med. Microbiol.*, v. 11, p. 299-302, 1978a.
- BUXTON, D. The Use of an Immunoperoxidase Technique to Investigate by Light and Electron Microscopy the Sites of Binding of *Clostridium welchii* Type-D Epsilon Toxin in Mice. *J. Med. Microbiol.*, v. 11, p. 289-292, 1978b.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. *MMWR Recomm. Rep.*, v. 9, p. 1-14, 2000.
- CHANDRAN, D.; NAIDU, S. S.; SUGUMAR, P. et al. Development of a Recombinant Epsilon Toxoid Vaccine against Enterotoxemia and Its Use as a Combination Vaccine with Live Attenuated Sheep Pox Virus against Enterotoxemia and Sheep Pox. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 17, n. 6., p. 1013-1016, 2010.
- CHASSIN, C.; BENS, M.; BARRY, J. et al. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 293, n. 3, p. F927-F937, 2007.
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARA, D. A.; ROCHAT, H. et al. *In vivo* protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*, v. 9, n. 12, p. 907-910, 1991.
- CHEN, Z.; MOAYERI, M.; ZHOU, Y. et al. Efficient Neutralization of Anthrax Toxin by Chimpanzee Monoclonal Antibodies against Protective Antigen. *J. Infect. Dis.*, v. 193, n. 5, p. 625-633, 2006.
- CHEN, P.; RAYNER, S.; HU, K. Advances of Bioinformatics Tools Applied in Virus Epitopes Prediction. *Virol. Sin.*, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2011.
- COLE, A. R.; GIBERT, M.; POPOFF, M. et al. *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struc. Mol. Biol.*, v. 11, n. 8, p. 797-798, 2004.
- DANILOVA, N.; AMEMIYA, C. T. Going Adaptive: The Saga of Antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1168, p. 130-155, 2009.
- DOLIMBEK, B. Z.; AOKI, K. R.; STEWARD, L. E. et al. Mapping of the regions on the heavy chain of botulinum neurotoxin A (BoNT/A) recognized by antibodies of cervical dystonia patients with immunoresistance to BoNT/A. *Mol. Immunol.*, v. 44, p. 1029-1041, 2007.
- DORCA-ARÉVALO, J.; MARTÍN-SATUÉ, M.; BLASI, J. Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from

- Clostridium perfringens* to the renal system. *Vet. Microbiol.*, v. 157, p. 179-189, 2012.
- DUARTE, C. G.; ALVARENGA, L. M.; DIAS-LOPES, C. et al. *In vivo* protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine*, v. 28, p. 1168-1176, 2010.
- ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA, VIII, 2005, Espírito Santo do Pinhal. *Enterotoxemia*. Espírito Santo do Pinhal: 2005. 23p.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 2 ed. Sainte Ruffine: Maisonneuve S. A. 1998.
- FENNESSEY, C. M.; IVIE, S. E.; MCCLAIN, M. S. Coenzyme depletion by members of the aerolysin family of pore-forming toxins leads to diminished ATP levels and cell death. *Mol. BioSyst.*, v. 8, p. 2097-2105, 2012a.
- FENNESSEY, C. M.; SHENG, J.; RUBIN, D. H. et al. Oligomerization of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Is Dependent upon Caveolins 1 and 2. *PLoS One*, v. 7, n. 10, p. e46866, 2012b.
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J. et al. Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Vet. Microbiol.*, v. 127, p. 379-385, 2008.
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; ZABAL, O.; SILBERSTEIN, C. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is cytotoxic for human renal tubular epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 30, n. 4, p. 275-282, 2010.
- FERNELIUS, A. L.; CLASSICK, L. G.; SMITH, R. L. Evolution of  $\beta$ -propiolactone-inactivated and chloroform-treated-virus vaccines against bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 33, n. 7, p. 1421-31, 1972.
- FILHO, E. J. F.; CARVALHO, A. U.; ASSIS, R. A.; et al. Clinicopathologic Features of Experimental *Clostridium perfringens* Type D Enterotoxemia in Cattle. *Vet. Pathol.*, v. 46, p. 1213-1220, 2009.
- FINNIE, J. W. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe*, v. 10, p. 145-150, 2004.
- FRANK, R. Spot-Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, v. 48, p. 9217-9232, 1992.
- GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C. GATTIKER, A. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. In: WALKER, J. M. *The Proteomics Protocols Handbook*. ed. New York: Humana Press, 2005. p. 571-607.
- GAUSEPOHL, H.; BOULIN, C.; KRAFT, M. et al. Automated multiple peptide synthesis. *Peptide Research*, v. 5, p. 315-320, 1992.
- GOLDSTEIN, J.; MORRIS, W. E.; LOIDL, C. S.; *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Increases the Small Intestinal Permeability in Mice and Rats. *PLoS One*, v. 4, n. 9, p. e7065, 2009.
- GONÇALVES, L. A. *Seleção de colônias de Clostridium perfringens tipo D produtoras de toxina épsilon por "DOT BLOT"*. 2004. 31p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GONÇALVES, L. A.; LOBATO, Z. I. P.; SILVA, R. O. S.; et al. Selection of a

- Clostridium perfringens* type D epsilon toxin producer via dot-blot test. *Arch. Microbiol.*, v. 191, p. 847-851, 2009.
- GRANDE, K. K.; MEYSICK, K. C.; RASMUSSEN, S. B. et al. Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1-Neutralizing Monoclonal Antibody NG8 Recognizes Three Amino Acids in a C-Terminal Region of the Toxin and Reduces Toxin Binding to HEp-2 Cells. *Infect. Immun.*, v. 77, n. 1, p. 170-179, 2009.
- GREENFIELD, R. A.; BROWN, B. R.; HUTCHINS, J. B. et al. Microbiological, Biological, and Chemical Weapons of Warfare and Terrorism. *Am. J. Med. Sci.*, v. 323, n. 6, p. 326-340, 2002.
- GRINER, L. A. Enterotoxemia of sheep. III. *Clostridium perfringens* type D antitoxin titers of normal, nonvaccinated lambs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 22, p. 447-448, 1961.
- HARKNESS, J. M.; LI, J.; MCCLANE, B. A. Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. *Anaerobe*, v. 18, p. 546-552, 2012.
- HATHEWAY, C. L. Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.
- HIRSCHBERG, H.; ZHANG, M. J.; GACH, H. M. et al. Targeted delivery of bleomycin to the brain using photo-chemical internalization of *Clostridium perfringens* epsilon prototoxin. *J. Neurooncol.*, v. 95, p. 317-329, 2009.
- HUGHES, M. L.; POON, R.; ADAMS, V. et al. Epsilon-Toxin Plasmids of *Clostridium perfringens* Type D Are Conjugative. *J. Bacteriol.*, v. 189, n. 21, p. 7531-7538, 2007.
- IVIE, S. E.; FENNESSEY, C. M.; SHENG, J. et al. Gene-Trap Mutagenesis Identifies Mammalian Genes Contributing to Intoxication by *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -Toxin. *PLoS One*, v. 6, n. 3, p. e17787, 2011.
- IVIE, S. E.; MCCLAIN, M. S. Identification of Amino Acids Important for Binding of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin to Host Cells and to HAVCR1. *Biochemistry*, 2012.
- JIANG, Z.; KOGANTY, R. R. Synthetic Vaccines: The Role of Adjuvants in Immune Targeting. *Curr. Med. Chem.*, v. 10, n. 15, p. 1423-1439, 2003.
- KAPLAN, W. LITTLEJOHN, T. G. Swiss-PDB Viewer (Deep View). *Brief. Bioinform.*, v. 2, n. 2, p. 195-197, 2001.
- KATZ, C.; LEVY-BELADEV, L.; ROTEM-BAMBERGER, S. et al. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. *Chem. Soc. Rev.*, v. 40, p. 2131-2145, 2011.
- KNAPP, O.; MAIER, E.; BENZ, R. et al. Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* Epsilon-toxin (ETX). *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1788, p. 2584-2593, 2009.
- KRAJEWSKA, W. M.; MASLOWSKA, I. Caveolins: Structure and Function in Signal Transduction. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, v. 9, n. 2, p. 195-220, 2004.
- KUKIĆ, P.; NIELSEN, J. E. Electrostatics in proteins and protein-ligand complexes. *Future Med. Chem.*, v. 2, n. 4, p. 647-666, 2010.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A Simple Method Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.*, v. 157, p. 105-132.

- LANGROUDI, R. P.; AGHAIYPOUR, K.; SHAMSARA, M. et al. In silico fusion of epsilon and beta toxin genes of *Clostridium perfringens* types D and B. *Iran. J. Biotechnol.*, v. 10, n. 1, p. 54-60, 2012.
- LAUNE, D.; MOLINA, F.; FERRIERES, G. et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunol. Methods*, v. 267, n. 1, p. 53-70, 2002.
- LAYANA, J. E.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; UZAL, F. A. Evaluation of different fluids for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia. *Anaerobe*, v. 12, p. 204-206, 2006.
- LEVY, R.; FORSYTH, C. M.; LAPORTE, S. L. et al. Fine and Domain-level Epitope Mapping of Botulinum Neurotoxin Type A Neutralizing Antibodies by Yeast Surface Display. *J. Mol. Biol.*, v. 365, p. 196-210, 2007.
- LEWIS, C. J. Control of Important Clostridial Diseases of Sheep. *Vet. Clin. Food Anim.*, v. 27, p. 121-126, 2011.
- LI, J.; SAYEED, S.; ROBERTSON, S. et al. Sialidases Affect the Host Cell Adherence and Epsilon Toxin-Induced Cytotoxicity of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718. *PLoS Pathog.*, v. 7, n. 12, p. e1002429, 2011.
- LI PIRA, G.; IVALDI, F.; MORETTI, P. et al. High Throughput T Epitope Mapping and Vaccine Development. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2010, p. 1-12, 2010.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A. Controle e profilaxia das clostridioses. *Hora Vet.*, v. 19, p. 29-33, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; ABREU, V. L. V.; et al. Bovine enterotoxaemia. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 5, p. 952-954, 2006.
- LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A. Clostridiosis of small ruminants. *Ver. Port. Cien. Vet.*, v. 102, p. 23-34, 2007.
- LOBATO, F. C. F.; LIMA, C. G. R. D.; ASSIS, R. A. et al. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, v. 28, p. 6125-6127, 2010.
- LONCHAMP, E.; DUPONT, J.; WIOLAND, L. et al. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Targets Granule Cells in the Mouse Cerebellum and Stimulates Glutamate Release. *PLoS One*, v. 5, n. 9, p. e13046, 2010.
- LOSADA-EATON, D. M.; UZAL, F. A.; FERNÁNDEZ MIYAKAWA, M. E. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is absorbed from different intestinal segments of mice. *Toxicon*, v. 51, p. 1207-1213, 2008.
- LOSADA-EATON, D. M.; FERNANDEZ-MIYAKAWA. *Clostridium perfringens* epsilon toxin inhibits the gastrointestinal transit in mice. *Res. Vet. Sci.*, v. 89, p. 404-408, 2010.
- 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.
- MACHADO-DE-AVILA, R. A.; ALVARENGA, L. M.; TAVARES, C. A. P. et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, v. 44, p. 233-241, 2004.
- MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; STRANSKY, S.; VELLOSO, M. et al.

- Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. *Peptides*, v. 32, p. 1640-1646, 2011.
- MANTIS, N. J. Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 57, p. 1424-1439, 2005.
- MATHUR, D. D.; DESHMUKH, S.; KAUSHIK, H.; et al. Functional and structural characterization of soluble recombinant epsilon toxin of *Clostridium perfringens* D, causative of enterotoxaemia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 88, p. 877-884, 2010.
- MCCLAIN, M. S.; COVER, T. L. Functional Analysis of Neutralizing Antibodies against *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 4, p. 1785-1793, 2007.
- MIETZNER, T. A.; KOKAI-KUN, J. F.; HANNA, P. C. et al. A conjugated synthetic peptide corresponding to the C-terminal region of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin elicits an enterotoxin-neutralizing antibody response in mice. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 9, p. 3947-3951, 1992.
- MILLER, C.; FLORMAN, S.; KIM-SCHLUGER, L. et al. Fulminant and Fatal Gas Gangrene of the Stomach in a Healthy Live Liver Donor. *Liver Transp.*, v. 10, n. 10, p. 1315-1319, 2004.
- MINAMI J.; KATAYAMA, S.; MATSUSHITA, O. et al. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol. Immunol.*, v. 41, n. 7, p. 527-535, 1997.
- MIYAMOTO, K.; SUMITANI, K.; NAKAMURA, T. et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 189, n. 1, p. 109-113, 2000.
- MIYAMOTO, K.; LI, J.; SAYEED, S.; et al. Sequencing and Diversity Analyses Reveal Extensive Similarities between Some Epsilon-Toxin-Encoding Plasmids and the pCPF5603 *Clostridium perfringens* Enterotoxin Plasmid. *J. Bacteriol.*, v. 190, n. 21, p. 7178-7188, 2008.
- MIYAMOTO, K.; LI, J.; MCCLAIN, B. A. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Detection and Identification. *Microbes Environ.*, v. 27, n. 4, p. 343-349, 2012.
- MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J. et al. Cleavage of a C-terminal Peptide Is Essential for Heptamerization of *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -Toxin in the Synaptosomal Membrane. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 17, p. 13778-13783, 2001.
- MIYATA, S.; MINAMI, J.; TAMAI, E. et al. *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -Toxin Forms a Heptameric Pore within the Detergent-insoluble Microdomains of Madin-Darby Canine Kidney Cells and Rat Synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 42, p. 39463-39468, 2002.
- MOISA, A. A.; KOLESANOVA, E. F. Synthetic Peptide Vaccines. *Biochem. (Moscow)*, v. 4, n. 4, p. 321-332, 2010.
- MORINAGA, G.; NAKAMURA, T.; YOSHIZAWA, J. et al. Isolation of *Clostridium perfringens* Type D from a Case of Gas Gangrene. *J. Bacteriol.*, v. 90, n. 3, p. 826, 1965.
- MORRIS, W. E.; DUNLEAVY, M. V.; DIODATI, J. et al. Effects of *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in the bovine gut. *Anaerobe*, v. 18, n. 1, p. 143-147, 2012.

- MOYLE, P. M.; TOTH, I. Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines. *Curr. Med. Chem.*, v. 15, n. 5, p. 506-516, 2008.
- NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J. High-Affinity Binding of *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin to Rat Brain. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 3, p. 1237-1240, 1992.
- NAGAHAMA, M.; ITOHAYASHI, Y.; HARA, H. et al. Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *FEBS J.*, v. 278, p. 3395-3407, 2011.
- NESTOROVICH, E. M.; KARGINOV, V. A.; BEZRUKOV, S. M. Polymer Partitioning and Ion Selectivity Suggest Asymmetrical Shape for the Membrane Pore Formed by Epsilon Toxin. *Biophys. J.*, v. 99, p. 782-789, 2010.
- OLIVEIRA, D. M.; PIMENTEL, L. A.; PESSOA, A. F.; et al. Focal symmetrical encephalomalacia in a goat. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 22, p. 793-796, 2010.
- OYSTON, P. C. F.; PAYNE, D. W.; HAVARD, H. L. et al. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiology*, v. 144, p. 333-341, 1998.
- PADDLE, B. M. Therapy and Prophylaxis of Inhaled Biological Toxins. *J. Appl. Toxicol.*, v. 23, p. 139-170, 2003.
- PARREIRAS, P. M. *ELISA competitiva para detecção de imunoglobulina antiprototoxina épsilon produzida pelo Clostridium perfringens* tipo D. 2001. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PARREIRAS, P. M.; LOBATO, F. C. F.; HENEINE, L. G. D. et al. Production and purification of épsilon protoxin produced by *Clostridium perfringens* type D. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, n. 3, p. 328-330, 2002.
- 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, n. 2, p. 161-167, 1994.
- PERCIVAL, D. A.; SHUTTLEWORTH, A. D.; WILLIAMSON, E. D.; et al. Anti-Idiotypic Antibody-Induced Protection against *Clostridium perfringens* Type D. *Infect. Immun.*, v. 58, n. 8, p. 2487-2492, 1990.
- PEREZ, S. A.; HOFER, E.; KALLINTERIS, N. L. et al. A New Era in Anticancer Peptide Vaccines. *Cancer*, p. 2071-2080, 2010.
- 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. 6480-6487, 1997.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.
- PIRES, P. S. *Estudo patológico, padronização e uso da imuno-histoquímica em animais experimentalmente e naturalmente infectados com clostrídios histotóxicos*. 2011. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- POPOFF, M.; TITBALL, R. W. Toxintyping by Phenotypic and Genetic Assays. In: MAINIL, J., editor. *Genus Clostridium - Clostridia in medical, veterinary and food microbiology: Diagnosis and typing*. Luxembourg: European Commission/EU Concerted Action, 2006. p. 142-186.

- POPOFF, M. R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.*, 2011.
- PURCELL, A. W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat. Rev Drug Discov.*, v. 6, p. 404-414, 2007.
- RAMACHANDRA, L.; SIMMONS, D.; HARDING, C. V. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 21, p. 98-104, 2009.
- REVILLARD, J. P.; ADORINI, L.; GOLDMAN, M.; et al. Apoptosis: potential for disease therapies. *Immunol. Today.*, v. 19, n. 7, p. 291-293, 1998.
- RIOSECO, M. M.; BEINGESSER, J.; UZAL, F. A. Freezing or adding trypsin inhibitor to equine intestinal contents extends the lifespan of *Clostridium perfringens* beta toxin for diagnostic purposes. *Anaerobe*, v. 18, p. 357-360, 2012.
- RITTER, M. A.; LADYMAN, H. M. *Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application.* ed. London: Cambridge University Press, 1995. 480p.
- ROBERTSON, S. L.; LI, J.; UZAL, F. A.; et al. Evidence for a Prepore Stage in the Action of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22053, 2011.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L. Some Properties of Beta-Toxin Produced by *Clostridium perfringens* Type C. *Infect. Immun.*, v. 21, n. 2, p. 678-680, 1978.
- SAYEED, S.; LI, J.; MCCLANE, B. A. Virulence Plasmid Diversity in *Clostridium perfringens* Type D Isolates. *Infect. Immun.*, v. 75, n. 5, p. 2391-2398, 2007.
- SCHOLES, S. F.; WELCHMAN, D. B.; HUTCHINSON, J. P. et al. *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in neonatal lambs. *Vet. Rec.*, v. 160, n. 23, p. 811-812, 2007.
- SEAH, J. N.; KWANG, J. Localization of linear cytotoxic and pro-apoptotic epitopes in RTX toxin ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine*, v. 22, p. 1494-1497, 2004.
- SEBALD, M.; PETIT, J. C. *Laboratory methods anaerobic bacteria and their identification.* 2. ed. Paris: Institut Pasteur, 1997. p. 189-197.
- SHORTT, S. J.; TITBALL, R. W.; LINDSAY, C. D. An assessment of the *in vitro* toxicology of *Clostridium perfringens* type D  $\epsilon$ -toxin in human and animal cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 19, p. 108-116, 2000.
- SINHA, N.; MOHAN, S.; LIPSCHULTZ, C. A. et al. Differences in Electrostatic Properties at Antibody-Antigen Binding Sites: Implications for Specificity and Cross-Reactivity. *Biophys. J.*, v. 83, p. 2946-2968, 2002.
- SOBRINHO, E. M.; CANGUSSU, A. S. R.; BRANDI, I. V. et al. Modified toxin-binding inhibition (ToBI) test for epsilon antitoxin determination in serum of immunized rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 138, p. 129-133, 2010.
- SONGER, J. G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, n. 2, p. 216-234, 1996.
- SOUZA, A. M.; REIS, J. K. P.; ASSIS, R. A. et al. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genet. Mol. Res.*, v. 9, n. 1, p. 266-276, 2010.

- SOUZA JÚNIOR, M. F. *Teste de neutralização para toxina épsilon e titulação de toxinas beta e épsilon de Clostridium perfringens tipos C e D em cultura de células*. 2005. 31p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SOUZA JÚNIOR, M. F.; LOBATO, Z. I. P.; PIRES, P. S.; et al. Standardization of the titration of the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D in cell line as an alternative to animal bioassay. *Cienc. Rural*, v. 40, n. 3, p. 600-603, 2010.
- STERNE, M.; BATTY, I. *Pathogenic clostridia*. London: Butterworth & Co., 1975. 143p.
- STEVENS, D. L.; TITBALL, R. W.; JEPSON, M. et al. Immunization with the C-Domain of  $\alpha$ -Toxin Prevents Lethal Infection, Localizes Tissue Injury, and Promotes Host Response to Challenge with *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.*, v. 190, p. 767-773, 2004.
- TAMAI, E.; ISHIDA, T.; MIYATA, S. et al. Accumulation of *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin in the Mouse Kidney and Its Possible Biological Significance. *Infect. Immun.*, v. 71, n. 9, p. 5371-5375, 2003.
- TAOUJI, S.; BRÉARD, E.; PEYRET-LACOMBE, A. et al. Serum and mucosal antibodies of infected foals recognized two distinct epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*. *FEMS Immunol. Med. Mic.*, v. 24, p. 299-306, 2002.
- THOMSON, R. O.; BATTY, I. The antigenic efficiency of pulpy kidney disease vaccines. *Vet. Rec.*, n. 65, p. 659- 663, 1953.
- TITBALL, R. W. *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine*, v. 27, p. D44-D47, 2009.
- TÜRKCAN, S.; MASSON, J. B.; CASANOVA, D. et al. Observing the confinement potential of bacterial pore-forming toxin receptors inside rafts with nonblinking Eu(3+)-doped oxide nanoparticles. *Biophys. J.*, v. 102, n. 10, p. 2299-2308, 2012.
- UNDERWOOD, C.; VAN EPS, A. W. Nanomedicine and veterinary medicine: The reality and the practicality. *Vet. J.*, v. 193, p. 12-23, 2012.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R. Enterotoxaemia in goats. *Vet. Res. Commun.*, v. 20, n. 6, p. 481-492, 1996.
- UZAL, F. A.; NIELSEN, K.; KELLY, W. L. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Vet. Microbiol.*, v. 51, p. 223-231, 1997.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; THOMAS, R. et al. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 15, p. 94-99, 2003.
- UZAL, F. A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe*, v. 10, p. 135-143, 2004.
- UZAL, F. A. Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* type D. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 20, p. 668-672, 2008.
- UZAL, F. A.; SONGER, J. G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.20, p.253-265, 2008.
- UZAL, F. A.; VIDAL, J. E.; MCCLANE, B. A.; et al. *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary

Diseases. *Open Toxinol. J.*, v. 3, p. 24-42, 2010.

VESCHI, J. L. A.; BRUZZONE, O. A.; LOSADA-EATON, D. M. et al. Naturally acquired antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin in goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 125, p. 198-202, 2008.

WATSON, P. J.; SCHOLE, S. F. E. *Clostridium perfringens* type D epsilon intoxication in one-day-old calves. *Vet. Rec.*, v. 164, p. 816-817, 2009.

WILLIAMSON, E. D.; TITBALL, R. W. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*, v. 11, n. 12, p. 1253-1258, 1993.

WORTHINGTON, R. W.; MÜLDERS, M. S. G.; VAN RENSBURG, J. J. *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin. Some chemical immunological and biological properties of a highly purified prototoxin. *Onderst. J. Vet. Res.*, v. 40, n. 4, p. 143-152, 1973.

WORTHINGTON, R. W.; MÜLDERS, M. S. G. Physical Changes in the Epsilon Prototoxin Molecule of *Clostridium perfringens* During Enzymatic Activation. *Infect. Immun.*, v. 18, n. 2, p. 549-551, 1977.