

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Clonagem e expressão do gene da toxina
beta de *Clostridium perfringens* tipo B e sua
aplicação na imunização de animais**

Marcelle Oliveira de Almeida

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE

Setembro - 2010

Marcelle Oliveira de Almeida

Clonagem e expressão do gene da toxina beta de
Clostridium perfringens tipo B e sua aplicação na
imunização de animais

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof.Dr. Evanguedes
Kalapothakis

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Setembro - 2010

Almeida, Marcelle Oliveira

Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B e sua aplicação na imunização de animais.

[manuscrito] / Marcelle Oliveira de Almeida. – 2010

97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Evanguedes Kalapothakis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Biologia Geral.

1. *Clostridium perfringens* - Teses. 2. *Clostridium perfringens* –
Toxinas – Teses. 3. Vacinas – Teses. 4. Clonagem molecular – Teses.
5. Genética - expressão – Teses. 6. Genética bacteriana – Teses. 7.
Enterotoxemia. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. III. Título.

CDU: 576.85.095.5

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus avós, Nazareno, Amair e Angelita, e aos meus pais, Mauro e Regina, - por todos os esforços e sacrifícios que me permitiram chegar até aqui. Dedico, também, ao grande amor de minha vida Eldrin, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, por todas as oportunidades que me proporcionou nos últimos anos.

À coordenação, professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e do departamento de Biologia Geral do ICB-UFMG por todos os ensinamentos fundamentais para o meu desenvolvimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela ajuda indispensável.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis, por ter me aceitado no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares. Agradeço imensamente pela orientação, por todos os ensinamentos, pelos conselhos e críticas oferecidos com muita serenidade, paciência e, principalmente, com muito profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Francisco Lobato e aos outros membros do Laboratório de Bacterioses e Pesquisa pela colaboração dispendida para a realização desse trabalho.

À Prof. Dra Andréa Amaral, à Dra Cristiane Contigli e à Prof. Dra Mônica Bucciarelli por aceitarem participar da banca examinadora dessa dissertação.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares que ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho: Arthur Estanislau, Caio Ambrósio, Bárbara de Freitas, Camila Aguiar, Erika Alvarenga, Flávia Siqueira, Flávia Ladeira, Isabella Pena, Kelly Cristina, Luiz Felipe, Patrícia Saldanha, Susanne Facchin, Tatiana Barroca, Thaís Melo, Valéria Rosalina, Willian Castro, e especialmente Carol Campolina e Anderson do Carmo pela grande ajuda nos experimentos. Muito obrigada a todos vocês por proporcionarem um ambiente extremamente agradável e harmonioso de trabalho, amizade e cooperação com grande profissionalismo.

À Prof. Dra Marisa Bianco Bonjardim e à Prof. Dra Adlane Vilas Boas pelos ensinamentos e conselhos tão importantes oferecidos no início da minha formação acadêmica, através de estágio em iniciação científica no Laboratório de Genética de Neoplasias, chefiado pela Prof. Dra Marisa, e na monitoria em Genética, sob coordenação e orientação da Prof. Dra Adlane.

Aos Prof. Dr. Vasco Azevedo e Prof. Dr. Anderson Miyoshi pelos conhecimentos proporcionados através da oportunidade de estágio em iniciação científica no Laboratório de Genética Celular e Molecular.

Aos queridos amigos do Laboratório de Genética Celular e Molecular: Clarissa Rocha, Fernanda Lima, Kátia Morais, Luis Pacheco, Marcela Azevedo, Núbia Seyffert, Pablo

Moraes, Siomar Soares, Thiago Castro e, especialmente, Vivian D'Afonseca. Obrigada pelo apoio profissional e pelos momentos de descontração durante minha iniciação científica.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por sempre fornecerem todos os recursos necessários para a minha formação. À minha irmã Danielle e ao meu irmão Guilherme por me mostrarem como que a família é essencial para a formação de uma pessoa. Ao grande amor da minha vida Eldrin pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão. À minha sogra Cássia, minha "avó" Conchita (*in memoriam*), minha cunhada Ederly e minha "prima" Rafaela pelo carinho e apoio.

À minha melhor amiga Jihrane e à grande amiga da graduação em biologia Cristiane. Obrigada pela amizade e por todo o incentivo!

Muito obrigada a todos vocês!

“Descobrimos o Segredo da Vida!”

Francis Crick, co-autor da elucidação da estrutura do DNA (1953)

"Hoje, o estudo da Biologia é algo tão impensável sem a manipulação do DNA como o é a navegação sem a bússola."

Charles Weissmann, criador da empresa Biogen/Suíça (1981)

“Somos uma temível mistura de ácidos nucleicos e lembranças, de desejos e de proteínas. O século que termina ocupou-se muito de ácidos nucleicos e de proteínas. O seguinte vai concentrar-se sobre as lembranças e os desejos. Saberá ele resolver essas questões?”

François Jacob, co-autor de estudos sobre regulação gênica (1997)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE QUADROS	VI
LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
I. APRESENTAÇÃO	1
I.1. Agências financiadoras e colaboradores.....	2
I.2. Introdução Geral	2
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
II.1. <i>Clostridium</i> sp	5
II.1.1. Clostridioses	5
II.2. Enterotoxemias	9
II.2.1. Diagnóstico	9
II.2.2. Patologia e imunologia da doença.....	11
II.2.3. Tratamento e controle.....	12
II.2.4. Vacinas	12
II.3. <i>Clostridium perfringens</i>	15
II.3.1. Características morfológicas e físico-químicas	15
II.3.2. Genótipo e Toxiotipo.....	15
II.3.3. <i>Clostridium perfringens</i> tipo B e C – perfil das enterotoxemias causadas pela toxina beta 21	
II.3.3.1. Toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i>	22
II.4. Expressão heteróloga de proteínas em <i>Escherichia coli</i>	24

II.4.1. Vetores série pET	25
II.4.2. Corpos de inclusão	26
II.5. Relevância do projeto	26
III. OBJETIVOS	28
III.1. Objetivos gerais	29
III.2. Objetivos específicos	29
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	30
REAGENTES, MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	31
LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS	34
MANIPULAÇÃO DO DNA	35
ANIMAIS UTILIZADOS	35
PREPARO DO ESTOQUE DE BACTÉRIAS	36
METODOLOGIA	36
IV.1. Propagação <i>in vivo</i> do plasmídeo pTP: β tox.....	36
IV.1.1. Confeção de bactérias <i>E. coli</i> XL1-Blue eletrocompetentes	36
IV.1.2. Transformação do plasmídeo pTP: β tox em <i>E. coli</i> XL1-Blue eletrocompetente e seleção dos transformantes	37
IV.2. Subclonagem do fragmento β tox no vetor pET11a (Novagen)	38
IV.2.1. Extração do DNA plasmídico pTP: β tox de <i>E. coli</i> XL1-Blue em pequena escala	38
IV.2.2. Resolução eletroforética da extração do DNA plasmídico pTP: β tox de <i>E. coli</i> XL1-Blue	39
IV.2.3. Digestão enzimática do plasmídeo pTP: β tox para liberação do inserto	39
IV.2.4. Purificação do fragmento de DNA β tox	39
IV.2.5. Digestão enzimática para linearização do vetor pET11a	40
IV.2.6. Purificação do fragmento de DNA pET11a	42
IV.2.7. Ligação do fragmento de DNA β tox no vetor pET11a	42

IV.2.8. Transformação do produto da ligação do fragmento de DNA β tox e vetor pET11a em <i>E. coli</i> XL1-Blue eletrocompetente e seleção de transformantes	43
IV.3. Confirmação da subclonagem do fragmento de DNA β tox no vetor pET11a.....	43
IV.3.1. Extração do DNA plasmidiano pET11a: β tox de <i>E. coli</i> XL1-Blue em pequena escala	44
IV.3.2. Verificação da presença e tamanho do inserto β tox no vetor pET11a	45
IV.3.3. Digestão com a enzima <i>Bam</i> HI (New England Biolabs) da extração em baixa escala de plasmídeo dos possíveis clones obtidos	46
IV.3.4. Reação de sequenciamento e análises <i>in silico</i>	46
IV.4. Expressão da toxina beta recombinante.....	48
IV.4.1. Confeção de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> BL21 DE3.....	48
IV.4.2. Transformação de <i>E. coli</i> BL21DE3 com o plasmídeo pET11a: β tox e seleção dos transformantes	48
IV.4.3. Expressão piloto da toxina beta recombinante	48
IV.4.4. SDS-PAGE da expressão piloto da toxina beta recombinante.....	49
IV.4.5. Expressão em larga escala da toxina beta recombinante e lise celular	49
IV.4.6. SDS-PAGE da expressão em larga escala da toxina beta recombinante	50
IV.5. Análise da produção e das propriedades farmacológicas da toxina beta recombinante.....	50
IV.5.1. Quantificação protéica da expressão da toxina beta recombinante	50
IV.5.2. Ensaio de letalidade da toxina beta recombinante	51
IV.6. Caracterização imunológica da toxina beta recombinante	51
IV.6.1 Western blotting para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa	51
IV.6.2. ELISA para verificação da imunogenicidade da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa.....	52
IV.6.2.1 Produção de soro antitoxina beta recombinante.....	52
IV.6.2.2. Análise da reatividade dos anticorpos anti-beta recombinante contra a toxina nativa e titulação dos soros dos animais.....	53

V.1. Considerações iniciais.....	55
V.2. Propagação <i>in vivo</i> do plasmídeo pTP: β tox.....	57
V.3. Subclonagem do fragmento β tox no vetor pET11a	58
V.4. Confirmação da subclonagem do fragmento de DNA β tox no vetor pET11a	61
V.5. Expressão e purificação da toxina beta recombinante	64
V.5.1. Expressão piloto da toxina beta recombinante	64
V.5.2. Expressão em larga escala e purificação da toxina beta recombinante	65
V.6. Análise da produção e das propriedades farmacológicas da toxina beta recombinante	68
V.6.1. Quantificação da toxina beta recombinante	68
V.6.2. Ensaio de letalidade da toxina beta recombinante	69
V.7. Caracterização imunológica da toxina beta recombinante	73
IV.7.1 Western blotting para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa	73
IV.7.2. ELISA para verificação da imunogenicidade da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa	75
IV.7.2.1 Produção de soro antitoxina beta recombinante.....	75
IV.7.2.2. Análise da reatividade dos anticorpos anti-beta recombinante contra a toxina nativa e titulação dos soros dos animais.....	75
V.8. Considerações finais	80
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	81
VI.1. Conclusões.....	82
VI.2. Perspectivas	82
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

β tox	fragmento de DNA correspondente a parte da ORF do gene <i>cpb</i> codificante da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (soro albumina bovina)
°C	Graus Celsius
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DL ₅₀	Dose letal de 50%
DNA	Ácido dexossirribonucléico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotritol
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
<i>g</i>	Gravidade (aceleração da gravidade na superfície da terra)
G+C	Guanina e Citosina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IPTG	Isopropil-tio- β -D-1-galactopiranosídeo
Kb	Quilobase
KDa	Quilo Dalton
LacZ	Gene que codifica a β -galactosidase
Lb	Luria-Bertani
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Mili-grama
mL	Mililitro
mM	Mili-Molar

μF	microFaraday
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrometro
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
OPD	Ortofenilenodiamino
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (matriz aberta de leitura)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	Tampão salina fosfato Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pM	Picomoles
PSA	Persulfato de Amônia
PV	Peso por Volume
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease A
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
T4 ligase	DNA ligase do bacteriófago T4
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Taq DNA pol	DNA polimerase termoestável de <i>Thermus aquaticus</i>

TE	Tampão Tris e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA transportador
U	Unidade de enzima
UFC	unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	unidade internacional
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Mapa circular do cromossomo de <i>Clostridium perfringens</i> .	16
Figura 2	Representação esquemática dos alvos e modos de ação das toxinas e enzimas hidrolíticas de <i>Clostridium perfringens</i> .	20
Figura 3	Representação esquemática do vetor pET 11a.	41
Figura 4	Representação esquemática do sistema de expressão pET	42
Figura 5	Iniciadores do vetor e do inserto.	45
Figura 6	Iniciadores T7 do vetor pET11a	47
Figura 7	Extração de plasmídeos pTP: β tox de <i>E. coli</i> XL1-Blue em pequena escala.	59
Figura 8	Digestão enzimática dos plasmídeos pTP: β tox e pET11a	60
Figura 9	Extração em pequena escala dos plasmídeos de <i>E. coli</i> XL1-Blue que foram submetidas a transformação com o produto da ligação do vetor pET11a com o inserto β tox.	61
Figura 10	Amplificação por PCR do fragmento β tox a partir do DNA plasmidiano extraído de diferentes colônias de <i>E. coli</i> que foram submetidas a transformação com o produto da ligação do vetor pET11a com o fragmento β tox.	62

Figura 11	Digestão enzimática de plasmídeos pET11a: β tox para confirmação da subclonagem.	62
Figura 12	Seqüência nucleotídica obtida através do seqüenciamento do plasmídeo pET11a: β tox.	64
Figura 13	Expressão em larga escala e purificação da toxina beta recombinante.	67
Figura 14	Modelagem da estrutura tridimensional da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> .	72
Figura 15	Western blotting para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa.	74
Figura 16	Análise da reatividade dos anticorpos anti-beta recombinante frente à toxina beta nativa.	77
Figura 17	Titulação dos soros dos animais imunizados com a toxina beta recombinante fração insolúvel (corpos de inclusão).	79

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Principais doenças causadas pelos clostrídios	8
Quadro 2	Classificação dos toxiotipos de <i>Clostridium perfringens</i>	17
Quadro 3	Linhagens bacterianas utilizadas.	34
Quadro 4	Plasmídeos utilizados.	35

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Componentes das reações de ligação do inserto β tox no vetor pET11a.	43
Tabela 2	Componentes da PCR para verificação da clonagem.	45
Tabela 3	Programa de PCR para verificação da clonagem do inserto β tox.	46
Tabela 4	Programa de PCR para seqüenciamento do inserto β tox.	47

RESUMO

A toxina beta produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e C está relacionada com enterotoxemia que acomete animais e humanos, principalmente caprinos, bovinos, eqüinos, suínos e aves domésticas. Essa enfermidade apresenta caráter agudo ou super agudo, causando morte súbita e grandes perdas econômicas para a pecuária. Devido à rápida evolução da doença, medidas terapêuticas são ineficientes. O controle e a profilaxia devem basear-se em medidas adequadas de manejo e vacinações sistemáticas eficientes de todo o rebanho. Dentro desse contexto, é necessário desenvolver novas vacinas contra enterotoxemias. Para tanto, parte da ORF codificante da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B, obtida a partir do gene *cpb*, foi clonada no vetor pCR2.1-TOPO e subclonada no vetor de expressão pET-11a. A linhagem *Escherichia coli* BL21 DE3 foi utilizada para a expressão em larga escala. Após a etapa de purificação, a quantificação protéica através do método de Bradford permitiu a estimativa de sua concentração em aproximadamente 0,3 mg/mL na fração solúvel e 5 mg/mL na fração insolúvel (corpos de inclusão). O teste de letalidade demonstrou que a toxina recombinante foi expressa na forma de toxóide, o que dispensa etapas adicionais de inativação da toxina para imunização de animais. Análises por Western Blotting com anticorpos anti-beta nativa e o ELISA com anticorpos anti-beta recombinante, ambos produzidos em coelhos, demonstraram que o toxóide possui similaridade antigênica e imunogênica em relação à toxina nativa. Esses dados mostram a utilização de corpos de inclusão para a produção eficiente de anticorpos. Diante de várias vacinas clostridiais nacionais ineficientes disponíveis no mercado, os resultados apresentados nesse trabalho mostram que a toxina beta recombinante é uma forte candidata para a produção de uma vacina recombinante polivalente contra enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens*.

Palavras chaves: *Clostridium perfringens*; toxina beta; gene *cpb*; enterotoxemia; expressão em *E.coli*; corpos de inclusão; vacina

ABSTRACT

The beta toxin produced by *Clostridium perfringens* types B and C is linked to enterotoxemia that affect humans and animals, mainly goats, cattle, horses, pigs and domestic poultry. The illness has acute or superacute profile causing sudden death and great economic losses to livestock. Due to rapid disease progression, treatment measures are ineffective. The control and prevention must be based on appropriate measures for handling and efficient systematic vaccination of the entire herd. Within this context, it is necessary to develop new vaccines against this enterotoxemia. To do so, part of the ORF encodes the beta toxin of *Clostridium perfringens* type B, obtained from the *cpb* gene, was cloned into the pCR2.1-TOPO vector and subcloned into the pET-11a expression vector. The *Escherichia coli* strain BL21 DE3 was used for expression in a large scale. After the purification step, the protein quantification by Bradford method allowed the estimation of its concentration of approximately 0.3 mg/mL in the soluble fraction and 5 mg/mL in the insoluble fraction (inclusion bodies). The lethality test in mice showed that the recombinant toxin was expressed in the form of toxoid, it release additional steps of inactivation of the toxin to immunize animals. Analysis by Western blotting with anti-beta native antibodies and ELISA with anti-beta recombinant antibodies - both produced in rabbits - showed that the toxoid has antigenic and immunogenic similarity in comparasion to the native toxin. These data demonstrate the use of inclusion bodies for the efficient production of antibodies. Faced with various inefficient national clostridial vaccines available in Brazil, the results presented in this study show that the recombinant beta toxin is a strong candidate for the production of a recombinant polyvalent vaccine against enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens*.

Keywords: *Clostridium perfringens*; beta toxin; *cpb* gene; enterotoxemia; expression in *Escherichia coli*; inclusion bodies; vaccine

I
APRESENTAÇÃO

I.1. Agências financiadoras e colaboradores

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), chefiado pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis e teve o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)

O mesmo contou com a colaboração do Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), chefiado pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato.

I.2. Introdução Geral

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos que são ubíquos, anaeróbios, Gram-positivos e formadores de esporos. As bactérias desse gênero apresentam uma ampla distribuição geográfica, tendo sido encontradas nos mais diversos ambientes. Algumas espécies são patogênicas, causando doenças chamadas de clostridioses, que são infecções e intoxicações que acometem animais e humanos devido à produção de toxinas (Hatheway, 1990). As clostridioses, muitas vezes, possuem evolução rápida, impossibilitando medidas de tratamento, levando o doente a morte em poucos dias.

Historicamente, essas doenças vêm causando muitas preocupações devido ao grande número de mortes que provocam. Dentre as clostridioses mais conhecidas popularmente estão o tétano, o botulismo e as enterotoxemias, devido ao maior número de casos descritos em humanos. O primeiro registro de ocorrência de tétano é de autoria de Hipócrates, que fez descrições clínicas da doença em humanos no século V a.C.. Contudo, a sua etiologia foi descoberta somente em 1.884 e a primeira vacina para humanos foi desenvolvida em 1.924. Com os intensivos programas de vacinação mundial, os números de casos de tétano reduziram bastante, demonstrando a importância da vacinação para a profilaxia e controle das clostridioses (Blencowe *et al.*, 2010).

Clostridium perfringens é o principal agente responsável por quadros de enterotoxemias provocadas por clostrídios. Esse grupo de bactérias difere em sua patogenicidade e nas doenças que causam, devido aos diferentes tipos de genótipos e toxiotipos que apresentam, causando grandes perdas econômicas na pecuária (Petit *et al.*, 1999). A toxina beta é uma das principais toxinas produzida por essa espécie, sendo

produzida pelo *C. perfringens* tipo B e C. Essa toxina está associada com disenteria em cordeiros neonatos; enterite hemorrágica em bezerros, caprinos e eqüinos; enterite necrótica em aves domésticas, bovinos, cães, equinos, ovinos, suínos e humanos. Alguns trabalhos demonstraram que muitas vacinas clostridiais brasileiras confeccionadas de acordo com metodologias tradicionais são ineficientes para a imunização de animais (Azevedo *et al.*, 1998; Lobato *et al.*, 2000; Balsamão *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2008). A alta taxa de mortalidade provocada pelas enterotoxemias ressaltam a necessidade da confecção de novas vacinas que sejam eficientes contra essas enfermidades.

II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. *Clostridium* sp

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microorganismos formadores de endósporos com espécies, em sua maioria, anaeróbias estritas, embora existam espécies aerotolerantes. As células possuem, geralmente, flagelos peritríquios (*Clostridium perfringens* é uma exceção, não possuindo flagelos). A morfologia é de bastonetes, medindo 0,3-2,0 X 1,5-20,0 mm e apresentam pleomorfismo. Bioquimicamente, são classificados como catalase negativos. O gênero apresenta bactérias Gram-positivas, embora existam espécies que se corem negativamente no momento da esporulação (*Clostridium tetani*) ou em culturas muito jovens (*Clostridium ramosum* e *Clostridium clostridiiforme*). São microrganismos ubíquos. Vivem sobre substratos variados, apresentando uma ampla distribuição geográfica em solos, em água doce, em água salgada, alimentos de origem animal e vegetal; outras vivem como comensais fazendo parte da microbiota residente do trato gastrointestinal e, às vezes, respiratório do homem e de animais (Hatheway, 1990).

A maioria das espécies é quimiorganotrófica e saprófita. Algumas são quimioautotróficas e quimiolitotróficas. Alguns microorganismos podem ser sacarolíticos, proteolíticos, nenhum ou ambos. Metabolicamente possuem muitas diferenças, com temperatura ótima variando entre 10°C a 65°C (Sterne e Batty, 1975).

Existem cerca de 100 espécies de clostrídios. Muitas delas produzem potentes exotoxinas sendo patogênicas para os animais tanto pela infecção de ferimentos quanto pela absorção intestinal das toxinas. Essas infecções e intoxicações são chamadas de clostridioses e apresentam grande interesse médico e veterinário, pois afetam a saúde humana e, principalmente, a pecuária, o que causa grandes prejuízos econômicos para os produtores (Lobato e Assis, 2000).

As principais espécies causadoras de doenças são o *Clostridium botulinum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordelii* e *Clostridium tetani*.

II.1.1. Clostridioses

As clostridioses são doenças que aparecem endemicamente, frequentemente fatais, causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium*. A desproporção existente entre a ampla presença dos clostrídios em vários ambientes e as poucas infecções que provocam é explicada pela pouca capacidade de invasão que esses agentes exibem. As enfermidades são ocasionadas devido à invasão dos tecidos pelo microorganismo e/ou pela presença das toxinas produzidas por ele (Lobato e Assis, 2001). Mas, somente a presença dos

microorganismos não leva ao início da doença. Normalmente, eles estão presentes no solo, cadáveres, pastagens e como comensais no tubo digestivo dos animais sadios sem causar maiores prejuízos à saúde. O início das doenças depende da presença dos microorganismos aliado à diminuição do potencial de redução local na porta de entrada da bactéria ou no ambiente em que ela vive. Assim, a falta de oxigênio em fermentos e nos tubos digestivos de animais propicia a invasão dos tecidos pela bactéria anaeróbia e sua maior proliferação (Rood *et al.*, 1997).

Os clostrídios têm a habilidade de passar por uma forma de resistência chamada esporo e podem se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos, o que representa um risco significativo para a população animal e humana (Titball *et al.*, 2006). A formação de esporos propicia a presença desses microorganismos em vários ambientes, inclusive em ambientes oxigenados. Diante de condições favoráveis, como ambientes anaeróbios, os esporos desenvolvem-se em bactérias metabolicamente ativas. Esses endósporos apresentam grande resistência, sendo destruídos apenas quando são submetidos a temperaturas maiores que 121°C por 3 minutos ou quando são expostos a determinadas concentrações de cloro ou outros desinfetantes (Venczel *et al.*, 1997).

Todos os clostrídios patogênicos responsáveis pelas clostridioses produzem toxinas que são as causadoras dos principais sintomas e lesões nos animais afetados. Cada espécie é caracterizada por possuir um determinado espectro de tipo de toxinas com propriedades letais, necrosantes, hemolíticas, neurotóxicas, entre outras.

Dentre as doenças bacterianas causadas por anaeróbios, essa doença está entre as que mais preocupam os criadores, devido às perdas econômicas que determinam (Baldassi *et al.*, 1985). Infecções clostridiais tomam muitas formas e permanecem como um problema comum para produtores, veterinários de campo e pesquisadores (Songer, 1997; Lobato e Assis, 2001).

As clostridioses podem ser classificadas, conforme revisado por Lobato e colaboradores em 2007, em grupos distintos:

a) Mionecroses: Essas infecções são representadas pelo carbúnculo sintomático e gangrena gasosa, chamada também de edema maligno. O carbúnculo sintomático pode ser causado por *Clostridium chauvoei* ou *Clostridium septicum*. A gangrena gasosa pode ser causada por *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium novyi* tipo A ou *Clostridium sordellii*. As bactérias multiplicam-se na musculatura e tecido subcutâneo, resultando em um quadro de toxemia (Sterne e Batty, 1975). As enfermidades são de aparecimento brusco e podem estar relacionadas a contaminações de

feridas e práticas de manejo, tais como: tosquia, castrações, parto e vacinação em condições não assépticas (Roberts e McEwen, 1931; Morris *et al.*, 2002).

b) Enterotoxemias: Essas afecções são causadas pelos agentes *Clostridium perfringens* tipos A, B, C, D, e provavelmente o tipo E (Songer, 1996) e, ocasionalmente, *Clostridium sordellii* e *Clostridium septicum*. Esses microrganismos multiplicam no trato intestinal dos animais e produzem exotoxinas responsáveis pelo quadro nosológico. Apresentam-se como doenças dos animais jovens e, às vezes, também de animais de mais idade, freqüentemente, com caráter epidêmico ou são originadas sob a influência de fatores alimentares específicos. Ocorre uma súbita multiplicação e formação de toxina por parte do agente no conteúdo intestinal, com subsequente aumento da permeabilidade intestinal e penetração das toxinas na corrente sangüínea. Pouco antes da morte é instaurada, muitas vezes, uma septicemia (Songer, 1996; Songer, 1997; Niilo, 1980).

c) Doenças hepáticas: hepatite necrótica e hemoglobinúria bacilar são causadas pelo *Clostridium novyi* tipo B e *Clostridium haemolyticum*, respectivamente. Essas doenças estão associadas ao trematódeo *Fasciola hepatica*, porém existem descrições sem o envolvimento do parasito na hepatite necrótica (Uzal *et al.*, 1996a). A passagem de larvas da *Fasciola hepatica* pelo tecido hepático determina danos que permitem a multiplicação das bactérias e conseqüente produção de toxinas, levando à destruição de eritrócitos com liberação da hemoglobina (Valent e Cuteri, 1997).

d) Doenças neurotrópicas: são afecções em que o sistema nervoso é primariamente acometido. Os agentes envolvidos nesse grupo são *Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani* que causam o botulismo e o tétano, respectivamente. Este grupo de doenças compreende intoxicações provocadas por agentes com formação intensa de neurotoxina e pouca infecciosidade. No botulismo, muitas vezes a ingestão da toxina botulínica promove a doença, sem a presença da bactéria no animal acometido (Titball *et al.*, 2006). O tétano é uma doença causada pela potente neurotoxina tetanospasmina. O início da infecção ocorre, geralmente, através de feridas acidentais ou cirúrgicas em contato com esporos do agente presente em esterco ou nos solos (Bizzini, 1993).

As principais doenças causadas pelos clostrídios e o tipo de animal acometido estão listados no Quadro 1.

Quadro 1: Principais doenças causadas pelos clostrídios.

Espécie de clostrídio / Tipo	Doença / Animal acometido
<i>Clostridium botulinum</i> tipo C e D	Botulismo em ovinos, bovinos, martas, cães, macacos, furões e diversas espécies de aves tais como ave doméstica e patos.
<i>Clostridium chauvoei</i>	Carbúnculo sintomático dos ovinos, bovinos e, ocasionalmente nos suínos.
<i>Clostridium colinum</i>	Enterite ulcerativa “Quail disease” em codornas, perus e galinhas.
<i>Clostridium difficile</i>	Enterocolite induzida por antimicrobianos no hamster, coelhos e cobaias. Causa também enterocolite natural em suínos e potros.
<i>Clostridium novyi</i> tipo A	Gangrena gasosa dos bovinos, ovinos, “Big head “ dos carneiros e no homem.
<i>Clostridium novyi</i> tipo B	“Black disease” (hepatite necrótica infecciosa dos ovinos e bovinos) e morte súbita em bovinos e suínos.
<i>Clostridium novyi</i> tipo C	Osteomielite em búfalos (Indonésia).
<i>Clostridium novyi</i> tipo D	Hemoglobinúria bacilar dos bovinos e doença do fígado necrótico dos ovinos.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Infecções de ferimentos, mastite gangrenosa, enterotoxemia dos cordeiro, “yellow lamb”. Seu papel em outras enterotoxemias é controverso e seu isolamento não é prova evidente de doença.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo B	Enterotoxemia dos cordeiros, bezerros, ovinos, caprinos e potros.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	Enterotoxemia dos ovinos, bezerros, cordeiros e leitões.
<i>Clostridium perfringens</i> tipo D	Enterotoxemia em ovinos, cordeiros e caprinos.
<i>Clostridium septicum</i>	Edema maligno nos eqüinos, bovinos, ovinos e suínos. Gangrena gasosa, “braxy” nos ovinos, “navel-ill” dos cordeiros, carbúnculo sintomático nos suínos e dermatite gangrenosa nas aves.
<i>Clostridium spiroforme</i>	Enterotoxemia espontânea ou induzida por antimicrobianos em coelhos.
<i>Clostridium tetani</i>	Tétano em todas as espécies animais.
<i>Clostridium villosum</i>	Abscessos espontâneos em gatos.

Fonte: Gomes, 2007.

II.2. Enterotoxemias

Enterotoxemias são doenças causadas por toxinas produzidas no trato gastrointestinal, principalmente pelo *C. perfringens* e com menor frequência por *C. septicum* (Songer, 1996) e *C. sordellii* (Al-Mashat e Taylor, 1983 a, b). Os diferentes tipos de *C. perfringens* são classificados como A, B, C, D e E em relação à produção de suas quatro diferentes exotoxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota (Niilo, 1980). Entretanto, o agente produz várias outras exotoxinas chamadas de secundárias (McDonel, 1986).

Clostridium perfringens é naturalmente encontrado nas pastagens e no trato gastrointestinal de animais sadios e o controle de sua proliferação excessiva é realizado por outros microorganismos que também estão presentes normalmente no tubo digestivo dos animais. Além disso, o próprio movimento dos alimentos ao longo do trato gastrointestinal ajuda a eliminar as toxinas produzidas por essas bactérias. No entanto, se ocorrer uma estase intestinal ou uma alteração na microbiota digestiva, os clostrídeos podem multiplicar-se excessivamente até provocar uma enterotoxemia. Essa multiplicação excessiva possui fatores ligados tanto ao animal quanto ao meio ambiente, relacionando-se, principalmente, ao manejo e à alimentação oferecidos pelos criadores. Mudanças bruscas do tipo de alimentação, sobrecarga alimentar, dietas ricas em grãos, ingestão de grande quantidade de leite, consumo de forragens imaturas, rações ricas em proteína e carboidratos podem levar a grandes níveis de fermentação, o que é um grande fator de risco associado aos surtos dessa doença em animais confinados (Jensen e Mackey, 1974).

Como, muitas vezes, todos os animais de uma criação são submetidos aos mesmos fatores de risco, as enterotoxemias podem provocar a morte simultânea de vários indivíduos em um mesmo lote. É impossível eliminar os clostrídios presentes no solo e no tubo digestivo dos animais e, por outro lado, no dia-a-dia de uma fazenda, é difícil controlar todas as mudanças de alimentação e manejo do rebanho que podem levar a um quadro de enterotoxemia. Diante disso, a melhor prevenção baseia-se na aplicação de vacinas (Lobato e Assis, 2000).

II.2.1. Diagnóstico

Diagnosticar ou reconhecer qual ou quais clostridioses ocorrem na propriedade é o primeiro passo para controlar efetivamente a doença. Dentre as clostridioses, as enterotoxemias são, sem dúvida, as que mais chamam a atenção de produtores e veterinários. Até o presente momento, existe uma baixa frequência de diagnóstico laboratorial de enterotoxemia bovina no Brasil (Uzal e Songer, 2008). Como o *Clostridium*

perfringens é um comensal do trato gastrointestinal, somente o isolamento do microrganismo não é suficiente para o diagnóstico, já que a doença ocorre apenas quando há proliferação excessiva da bactéria. Nos casos de endemias, o exame “*post-mortem*” é muito importante para evitar maiores perdas. Nesse exame, o conteúdo do intestino delgado corado pelo método de Gram, com frequência, contém elevado número de bacilos Gram positivos, semelhantes aos *C. perfringens*. Esta prova possui um valor limitado devido à rápida multiplicação bacteriana que ocorre após a morte em todas as porções intestinais. O diagnóstico confirmatório está na dependência direta da detecção das toxinas produzidas pelo agente e, isto, geralmente, ocorre apenas em condições não-fisiológicas (Lobato e Assis, 2001). Assim, um fator de grande discussão no campo diz respeito ao diagnóstico da enterotoxemia bovina.

Diante do exposto, a detecção de toxinas em conteúdo intestinal é o critério mais aceito atualmente. O método convencional para detecção destas toxinas é o teste de soroneutralização em camundongos. Essa metodologia, por apresentar grande especificidade e mesmo sensibilidade é considerada a técnica de referência para o diagnóstico sorológico das infecções (Uzal e Songer, 2008). Entretanto, devido a discussões éticas sobre o uso de animais, essa metodologia está sendo gradualmente substituída por metodologias *in vitro* de grande eficácia, como, por exemplo, a técnica de ELISA (Weddell e Worthington, 1984; Nagahama *et al.*, 1991; El idrissi e Ward, 1992 a,b; Uzal *et al.*, 2003 a), emprego de linhagens celulares (Knight *et al.*, 1990; Lindsay *et al.*, 1995; Souza, 2005), aglutinação em látex (Songer, 1997) e contraímuno-elektroforese (Uzal *et al.*, 2003). Também existem diferentes técnicas de PCR que, apesar de não detectarem diretamente a(s) toxina(s) produzida(s) pelos *C. perfringens* dos tipos A-E, e sim os genes que codificam a produção das mesmas, permitem a tipificação do *C. perfringens* envolvido em um determinado caso ou surto (Uzal *et al.*, 1996b; Uzal *et al.*, 1997; Meer e Songer, 1997; Vieira, 2006; Lobato *et al.*, 2007)

Clostridium perfringens tipo B produz as toxinas beta e épsilon, enquanto que o tipo C não produz a épsilon e o tipo D não produz a beta. Essas diferenças ajudam na identificação do toxiotipo, o que é de grande importância para o correto diagnóstico, mas devem estar associadas com outros achados clínicos. No caso da enterotoxemia caprina e ovina, por exemplo, além da pesquisa de toxina(s) nos fluidos intestinais, outros sinais clínicos podem corroborar e auxiliar no diagnóstico definitivo da enfermidade. Em caprinos, a enterotoxemia é principalmente caracterizada pela ocorrência de enterocolites (Uzal e Kelly, 1998) e os cordeiros afetados podem apresentar glicose na urina. Nos ovinos, a toxina épsilon produz alterações nas células endoteliais do cérebro que levam ao aumento da permeabilidade vascular, produzindo edema cerebral. A alteração histológica mais

precocemente observada como conseqüência a esse processo é o edema proteináceo perivascular. Nos animais que sobrevivem por mais que 24 horas, pode-se observar malácia, que, em casos extremos, pode ser observada macroscopicamente, caracterizando a encefalomalacia simétrica focal (Uzal e Kelly, 1997).

O isolamento e tipificação da toxina podem proporcionar uma prova confirmatória, visto que raramente são decisivas. A presença das toxinas beta e épsilon no conteúdo intestinal é o diagnóstico de grande relevância das enterotoxemias. Entretanto, é recomendável associar o(s) tipo(s) de toxina(s) encontrado(s) com o histórico dos sinais clínicos e outros achados de necropsia para melhor controle de epidemias e endemias (Lobato e Assis, 2001).

II.2.2. Patologia e imunologia da doença

O papel patológico das toxinas de *C. perfringens* ainda não é bem conhecido. Muito do conhecimento sobre a patogênese das infecções foi resultado de descrições da evolução das doenças observadas em animais de campo. No caso de *C. perfringens* tipo B, principal toxiotipo alvo do presente trabalho, as observações foram realizadas especialmente em ovelhas e carneiros. A toxina beta é a principal fração tóxica responsável pela disenteria dos cordeiros neonatos (Buxton e Donachie, 1991) e pela enterite hemorrágica em bezerros, caprinos e equinos (Frank, 1956; Songer, 1996; Sterne e Batty, 1975). A doença ocorre primariamente em animais recém-nascidos devido ao excesso de colostragem e também por ser o colostro fonte de fatores anti-tripsínicos.

A bactéria ou os esporos são adquiridos da mãe ou do meio ambiente multiplicando-se no intestino, favorecidos pela fermentação provocada pela ingestão abundante de leite. Esses fatores favorecem tanto a proliferação do agente, devido à anaerobiose, como a disponibilização da toxina beta, resultado da diminuição da sua degradação (Barker *et al.*, 1993). O curso da doença é super-agudo. Em geral, em poucas horas os animais apresentam sintomas como dores abdominais, redução na sucção do colostro e leite, fezes semi-fluidas e coradas de vermelho. Esses sintomas são decorrentes da enterotoxemia acompanhada de hemorragia e ulceração do intestino delgado (Songer, 1997). A morte súbita é comum nos casos hiperagudos. Nos quadros agudos, os animais param de se alimentar e passam a apresentar fortes dores abdominais acompanhadas por diarreia sanguinolenta. Segue-se decúbito, coma e morte geralmente em menos de 24 horas após o início dos sintomas.

Os animais que sobrevivem por mais dias podem desenvolver no sistema nervoso central (SNC) uma lesão conhecida por encefalomalacia focal simétrica (EFS) causada pela ação da toxina épsilon (Buxton e Donachie, 1991).

Nesse tipo de enterotoxemia não há produção de anticorpos neutralizantes nos animais acometidos que controlem a infecção em tempo ábil, devido à rápida evolução da doença.

II.2.3. Tratamento e controle

O tratamento das enterotoxemias, geralmente, não é realizado em função do rápido curso da doença. O soro contendo a(s) antitoxina(s), quando disponível, pode ter algum sucesso quando administrado nos períodos iniciais ou nos casos crônicos da enfermidade, combinada com a aplicação de antibióticos (penicilinas ou sulfas). Em alguns casos, o soro é administrado antes de cirurgias realizadas nos animais e em animais que possuem grande valor no mercado, como animais de exposição e leilão. Como essa doença pode ter caráter endêmico ou epidêmico, a prevenção e o controle, para que não haja acometimento de mais indivíduos, são as medidas mais efetivas contra a enfermidade.

O controle da enterotoxemia pode ser obtido através da redução da quantidade de grãos e o aumento do consumo de fibras. Jensen e Mackey (1974) recomendam em casos de epidemia, como método alternativo, a medicação do rebanho com clortetraciclina ou oxitetraciclina (2,2 mg/kg PV/7-10 dias) ou amônia quartenária (2 g/animal/dia), ressaltando que, no caso de alta incidência de timpanismo, o uso do antibiótico deverá ser interrompido. O melhor controle e prevenção baseiam-se na administração de vacinas polivalentes.

II.2.4. Vacinas

A profilaxia das clostridioses deve basear-se em medidas adequadas de manejo e vacinações sistemáticas de todo o rebanho, já que os animais estão em permanente contato com as bactérias e seus esporos em todas as fases da criação, além do contato com os outros fatores adicionais que podem desencadear as doenças. A prevenção através de vacinação apropriada é a melhor maneira de evitar os enormes prejuízos econômicos decorrentes da morte súbita que pode acometer os animais doentes. No Brasil, não existem vacinas específicas apenas para a enterotoxemia. A proteção é obtida pela vacinação contra a clostridiose de modo geral, na qual inclui o *Clostridium perfringens* na sua formulação (Merial Saúde Animal, 2010: <http://www.merial.com.br/>).

As vacinas clostridiais são, na sua maioria, polivalentes e possuem toxóides em sua formulação. Os toxóides são toxinas inativadas através de métodos químicos ou físicos, em que é destruída a sua ação tóxica permanecendo somente a ação imunizante específica. As vacinas clostridiais contêm múltiplos antígenos para serem utilizadas como estratégia frente a uma grande variedade de agentes e suas toxinas (Smith, 1977). Uma boa vacina polivalente contra clostridiose deve cobrir o espectro de todos os tipos de clostrídios responsáveis por doenças nos ruminantes; no Brasil, devem ser incluídos o *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* (B ou C e D), *C. sordellii*, *C. novyi* e *C. tetani*. Nas regiões onde a hemoglobinúria bacilar é enzoótica, a vacina polivalente deve incluir também o *Clostridium haemolyticum* (Lobato e Assis, 2000).

A confecção de vacinas toxóides tradicionais é bastante dispendiosa e trabalhosa, pois necessita de processos complexos de purificação. Elas devem ser elaboradas com cepas de clostrídios altamente toxinogênicas, isto é, que produzam grandes quantidades de toxinas. Essa capacidade de produção, na maioria das espécies patogênicas deste gênero, está relacionada com plasmídeos e infecção das células bacterianas por bacteriófagos, em que os genes podem estar localizados tanto em regiões variáveis do cromossomo ou nos próprios plasmídeos (Petit *et al.*, 1999). Assim, é frequente observar em laboratório que repiques sucessivos destas amostras *in vitro* podem levar à perda destes mediadores de produção toxinogênica, acarretando baixos títulos ou mesmo a perda total da toxigenicidade das amostras utilizadas para a confecção das vacinas (Hatheway, 1990). A produção de toxinas clostridiais para atender aos interesses comerciais e industriais é um processo ainda mais laborioso. É necessária a utilização de fermentadores que permitem o monitoramento de grande parte das variantes do processo, sendo que muitos fatores relacionados à cultura desses microorganismos e a produção de cada toxina são críticos e dificultam o processo. Além disso, as toxinas devem ser inativadas de tal forma que não percam suas qualidades imunogênicas (Jansen, 1961; Pivinick *et al.*, 1964; Pivinick *et al.*, 1965; Smith, 1977; Sakurai e Duncan, 1979; Rood e Cobe, 1991).

Todos os lotes de toxóides devem ser titulados segundo normas de controle internacionais, como a Farmacopéia Européia ou o CFR – Code of Federal Regulations (EUA, 1991). Para alguns clostrídios, esta titulação é expressa em UI (unidades internacionais), comparando o soro dos animais de laboratório vacinados com o título dos soros de referência fornecidos por organizações internacionais. O objetivo é assegurar que os toxóides presentes na vacina realmente protejam efetivamente contra todas as doenças causadas pelas toxinas dos clostrídios que entram em sua composição. No Brasil, as vacinas clostridiais não possuem um controle oficial que ateste a qualidade quanto à inocuidade, esterilidade e potência de todos os antígenos. Apesar da existência de uma

portaria para o controle oficial de todos os antígenos das vacinas clostridiais (Brasil, 1997), atualmente, apenas *C. chauvoei* e o toxóide botulínico tipos C e D são avaliados sistematicamente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), sendo, portanto, a qualidade dos produtos deixados a cargo das indústrias produtoras (Lobato e Assis, 2000).

Diante disso, existem muitos trabalhos que demonstram a baixa qualidade e ineficiência de muitas vacinas clostridiais comercializados no país. Balsamão e col. (2000) avaliaram a potência de cinco vacinas comerciais para *Clostridium sordellii* e verificaram que apenas duas atendiam as exigências das normas de controle internacionais. Lobato e col. (2008) avaliaram a eficiência de 12 vacinas comerciais contra clostridioses que continham em sua composição *C. septicum* e constataram que 7 delas, ou seja, a maioria, não induziu a formação de anticorpos conforme os parâmetros de referência. Para atestar a eficiência de algumas vacinas contra enterotoxemias, Azevedo e col. (1998) testaram a resposta de antitoxinas beta e épsilon de *C. perfringens* induzida em coelhos por sete vacinas comercializadas no Brasil, sendo que seis de produção brasileira e uma importada. Foi constatado que somente a vacina importada induziu respostas de anticorpos neutralizantes. Em 2000, Lobato e col. também avaliaram a resposta dessas antitoxinas induzidas em coelhos e bovinos por seis vacinas comerciais disponíveis no país. Foi verificado que apenas duas delas atendiam as exigências das normas de controle internacionais. Dessa maneira, observa-se que muitas das vacinas clostridiais comercializadas são ineficientes para estimular resposta imune compatível com os níveis de teste recomendados para controle destes produtos. Está havendo um grande incremento na produção de vacinas indicadas para clostridioses no Brasil, devido ao surgimento de novas enfermidades e agravamento de outras, que são resultantes das modificações ocorridas nos sistemas criatórios do País (Lobato e Assis, 2001). Assim, é necessário um maior controle da qualidade dessas vacinas e desenvolvimento de novas metodologias com resultados mais homogêneos e confiáveis.

A partir dos anos 70, as evoluções no campo da biologia molecular abriram as portas para novas tecnologias de produção de vacinas, as vacinas recombinantes. Essas tecnologias exigem um conhecimento muito maior dos patógenos e dos antígenos de interesse, mas apresentam-se com resultados mais precisos, puros e homogêneos do que as tecnologias anteriores. Desde a formulação da primeira vacina recombinante e sua licencição em 1986 – a vacina contra hepatite B -, várias outras vacinas com essa metodologia vem sendo formuladas e comercializadas com grande sucesso, demonstrando que essa tecnologia é a melhor escolha para a confecção de novas vacinas (Homma *et al.*, 2003).

II.3. *Clostridium perfringens*

II.3.1. Características morfológicas e físico-químicas

Clostridium perfringens é um bacilo Gram positivo, formador de esporo oval-subterminal, apresenta cápsula, é imóvel e tem intensa atividade metabólica em alimentos. Uma das características mais importantes dessa espécie é sua capacidade de multiplicação em temperatura alta, estando ótima entre 37°C e 45°C. O pH ideal para sua multiplicação está entre 5,0 e 8,0, necessitam de 13 aminoácidos essenciais para crescer e não são muito tolerantes a pouca quantidade de água (Cato *et al.*, 1986; Franco e Landgraf, 1996). Como algumas outras espécies de clostrídios, apesar de ser classificado como microorganismo anaeróbio, o *Clostridium perfringens* pode sobreviver e crescer na presença de oxigênio (McClane *et al.*, 2006).

Esse microorganismo pode sobreviver em condições físico-químicas adversas, como variações de temperatura, dissecação e acidez do meio através da formação de esporos resistentes por diferenciação da célula bacteriana vegetativa que exige maior resistência e baixo metabolismo da bactéria (Cato *et al.*, 1986). A temperatura para o seu cultivo pode variar entre 12-50°C, com o crescimento lento na temperatura a 20°C. Em temperatura ótima de crescimento (37-45) as colônias crescem rapidamente, atingindo tempo de geração de 8 a 10 min, apresentando vigorosa produção de gás (Adams e Moss, 1995). Em ágar sangue, as UFC's formam colônias arredondadas, umbilicadas e brilhantes. Pode ser visualizada zona externa de hemólise completa nas colônias, causada pela toxina alfa, e elas podem ser circundadas por um halo interno de hemólise incompleta causada pela toxina theta (Quinn *et al.*, 2005).

II.3.2. Genótipo e Toxiotipo

A primeira seqüência genômica completa de *C. perfringens* foi publicada por Shimizu e colaboradores em 2002 como a primeira bactéria anaeróbia patogênica a ser totalmente seqüenciada. O cromossomo da linhagem 13 de *Clostridium perfringens* tipo A (figura 1) foi seqüenciado apresentando 3.031.430 bp, que compreendem 2.660 regiões codificadoras de proteínas, 10 genes de rRNA e 96 tipos de genes para tRNA. Foi encontrado um baixo conteúdo de G+C de 28,6% (Shimizu *et al.*; 2002).

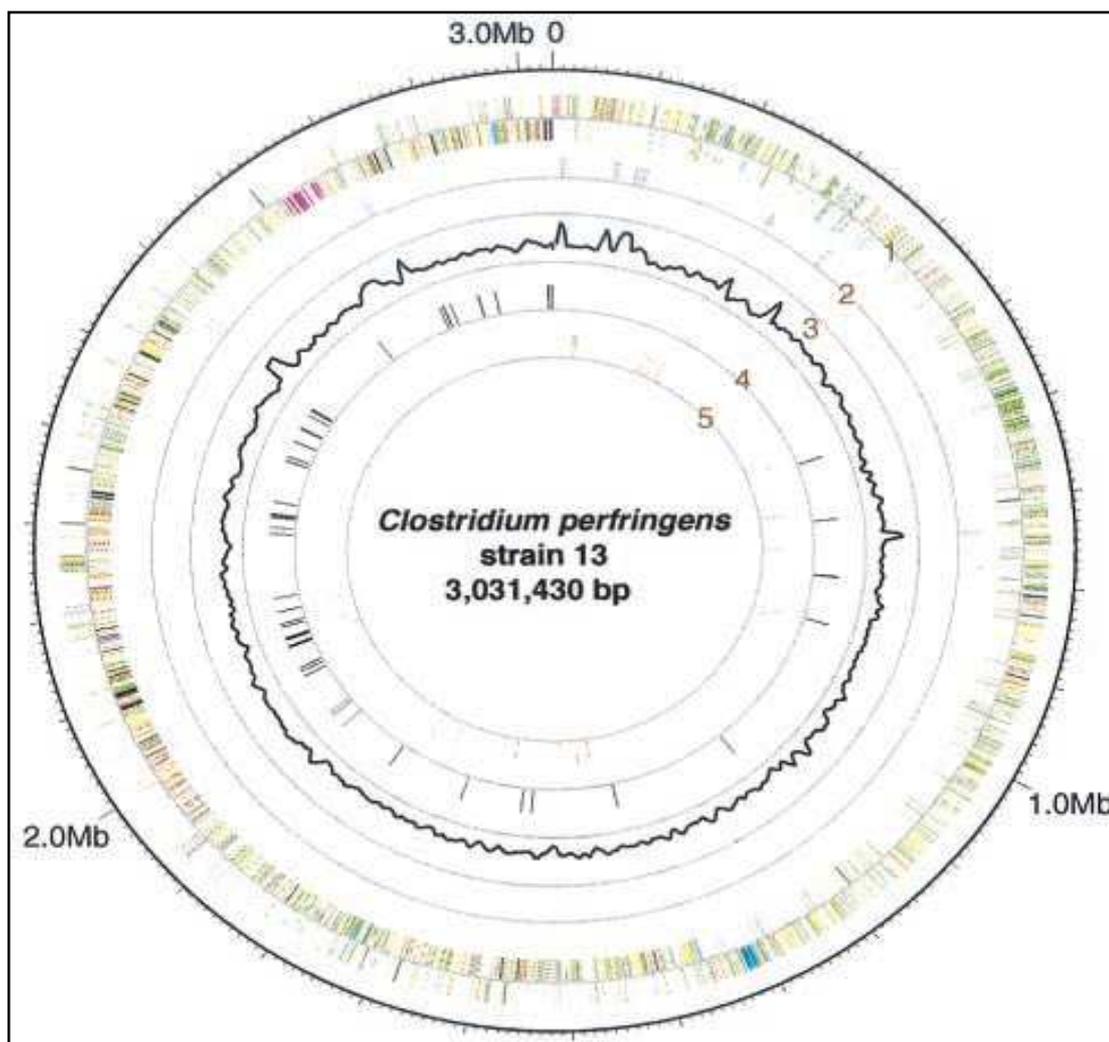


Figura 1 - Mapa circular do cromossomo de *Clostridium perfringens*. O círculo exterior mostra a escala. O anel 1 mostra a seqüência de codificação por fita de DNA (sentido horário e sentido anti-horário); o anel 2 mostra as posições dos genes de rRNA; o anel 3 mostra o conteúdo GC; o anel 4 mostra as posições dos genes de germinação e esporulação e o anel 5 mostra as posições dos genes relacionados com virulência. Utilizou-se a seguinte categoria funcional no anel 1: metabolismo intermediário e fermentação (amarelo), caminhos da informação (rosa), proteínas reguladoras (azul céu), proteínas hipotéticas conservadas (laranja), proteínas de função desconhecida (azul claro), seqüências de inserção e funções relacionadas com fagos (azul), RNAs estáveis (roxo), parede celular e processos celulares (verde escuro), virulência (vermelho), desintoxicação e adaptação (branco), esporulação e germinação (preto). (Adaptado de Shimizu, *et al.*, 2002)

Estudos da biologia molecular demonstraram que *C. perfringens* apresenta homologia genotípica com as demais espécies do gênero *Clostridium* (Shimizu, *et al.*; 2002). Porém, Rood (1998) relatou diferenças fenotípicas marcantes em relação a outras bactérias do mesmo gênero. Dentre elas, são citadas a elevada taxa de crescimento bacteriano, tolerância moderada ao oxigênio e facilidade de manipulação gênica do *Clostridium perfringens*. O genoma do *Clostridium perfringens*, quando comparado ao do *Clostridium acetobutylicum* - bactéria não patogênica -, apresenta como diferença mais marcante a presença de genes de virulência. Nos cromossomos, foram detectados dois tipos de genes codificadores de proteína ligadora à matriz extracelular e cinco genes para hemolisina, todos relacionados à virulência e também descritos em outras espécies de bactérias. O seqüenciamento do genoma também revelou que os genes de virulência não estão agrupados em único *locus*. Apesar de *Clostridium perfringens* apresentar regiões altamente conservadas do seu material genético, os genes de uma bactéria podem ser perdidos e transmitidos horizontalmente para outra. Os genes codificadores da produção de toxina e dos fatores de virulência estão espalhados em várias regiões do cromossomo e nos elementos móveis da bactéria (Shimizu *et al.*, 2002).

As cepas de *Clostridium perfringens* podem produzir pelo menos 16 fatores de virulência conhecidos: as toxinas alfa (α), beta (β), beta-2 (β -2), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), eta (η), teta (θ), iota (ι), kapa (κ), lambda (λ), mu (μ) e nu (ν); neuraminidase; sialidase; enterotoxina; hemolisina não alfa-delta-teta (Smith, 1979). A espécie é classificada de A a E, de acordo com a produção das quatro toxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota. (Quadro 2).

Quadro 2: Classificação dos toxiotipos de *Clostridium perfringens*.

Tipo	Alfa	Beta	Beta-2	Épsilon	Iota	Enterotoxina
A	+		+			+
B	+	+		+		+
C	+	+	+			+
D	+			+		+
E	+				+	+

Fonte: Petit *et al.*, 1999; Lobato *et al.*, 2007.

Abaixo, devido a importância das principais toxinas como determinantes da patogenicidade dos diferentes tipos de *C. perfringens*, segue-se uma breve descrição delas e sua atuação no hospedeiro. A figura 2 ilustra como elas atuam na células.

Toxina alfa. Essa toxina é codificada pelo gene *plc* que possui origem cromossomal. A proteína apresenta peso molecular de 43 KDa e é uma fosfolipase C que hidrolisa a fosfatidilcolina e, em menor proporção, a esfingomiéline, na dependência de íons cálcio. Ela apresenta uma significativa homologia com as enzimas fosfolipases C de *Bacillus cereus*, *Clostridium bifermentans*, e *Listeria monocytogenes*. A ação da toxina alfa caracteriza-se por hemólise intravascular, danos capilares, processos inflamatórios, agregação plaquetária e alterações do metabolismo culminando com a morte celular. Foi a primeira toxina bacteriana a demonstrar atividade enzimática (Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2004; Titbal *et al.*, 2006; Lobato *et al.*, 2007).

Toxina beta. É a toxina codificada pelo gene *cpb* que possui origem plasmidial. A proteína apresenta peso molecular de aproximadamente 40 KDa e seu mecanismo de ação ainda não é bem elucidado. Até o momento, devido a sua similaridade com outras toxinas formadoras de poros nas membranas celulares, acredita-se que sua ação é caracterizada pelo efeito citotóxico através da formação de poros, atuando nos canais seletivos para sódio e potássio, causando despolarização das membranas celulares excitáveis e alterações na permeabilidade vascular do sistema nervoso. Mas, é desconhecida a biologia molecular e todos os alvos celulares desse efeito citotóxico (Hatheway, 1990; Shatursky *et al.*, 2000; Tweten, 2001; Lobato *et al.*, 2007).

Toxina beta-2. Essa toxina é codificada pelo gene *cpb-2* que possui origem plasmidial. A proteína apresenta peso molecular de 28 KDa e não apresenta homologia significativa com a toxina beta. Ela foi descoberta recentemente e seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que envolve a lise celular através da formação de poros na membrana celular (Petit *et al.*, 1999). Investigações epidemiológicas demonstraram a maior ocorrência do gene *cpb-2* entre os animais doentes. Manteca e colaboradores em 2002 sugerem um sinergismo na ação da toxina alfa e a toxina beta-2 que provoca o aumento da necrose e a hemorragia de lesões causadas por *C.perfringens* tipo A portadores do gene da toxina beta-2 (Manteca *et al.*, 2002). Esses achados sugerem que a toxina codificada por este gene tem função relevante no processo patogênico, como possível fator de virulência (Gibert *et al.*, 1997; Klaasen *et al.*, 1999; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Bueschel *et al.*, 2003; Lobato *et al.*, 2007)

Toxina épsilon. É a toxina codificada pelo gene *etx* que possui origem plasmidial. A proteína é secretada na forma de protoxina, com peso molecular de 32,7 KDa e, pela ação da tripsina intestinal é convertida na forma ativa, com peso molecular de 31,2 KDa.

(Hatheway, 1990; Petit *et al* 1999). Apresenta ação dermonecrótica e letal, produzindo edema no fígado, rins e sistema nervoso central (Buxton e Donachie, 1991; Barker *et al.*, 1993; Lewis, 2000; Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007). Seu mecanismo de ação envolve a ligação específica a receptores na superfície das células endoteliais promovendo a desestabilização da membrana com alteração da permeabilidade vascular com resultante escape de líquidos e destruição celular. Na enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo D, essa toxina é quase que exclusivamente responsável pela patologia e morte do hospedeiro (Nilo, 1980; Songer, 1996; Lobato *et al.*, 2007).

Toxina iota. Essa toxina é formada por duas subunidades protéicas imunologicamente distintas. Uma das subunidades é denominada de iota A, codificada pelo gene *iap*, que possui origem plasmidial, com o polipeptídeo apresentando peso molecular de 47,5 kDa e atua como um componente enzimático. A outra subunidade é denominada de iota B, codificada pelo gene *ibp*, também de origem plasmidial, com o polipeptídeo apresentando peso molecular de 105 kD e atua como componente de ligação (Stiles e Wilkins, 1986a; Stiles e Wilkins, 1986b; Petit *et al.*, 1999). A toxina iota é produzida na forma de protoxina, sendo ativada na presença de enzimas proteolíticas. Seu mecanismo de ação envolve desorganização do citoesqueleto das células através da despolimerização dos filamentos de actina e a inibição das funções celulares que são dependentes do citoesqueleto, com consequente morte celular (Stiles e Wilkins, 1986b; Perelle *et al.*, 1993; Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999; Marvaud *et al.*, 2002; Lobato *et al.*, 2007).

Enterotoxina. A toxina é codificada pelo gene *cpe* que possui origem cromossomal e/ou plasmidial. A proteína apresenta peso molecular de 35 kDa. Seu mecanismo de ação envolve a ligação com receptores específicos na superfície das células epiteliais do intestino dos animais, levando a formação de poros e desequilíbrio osmótico da célula com consequente lise celular (Li e McClane, 2006; Lobato *et al.*, 2007).

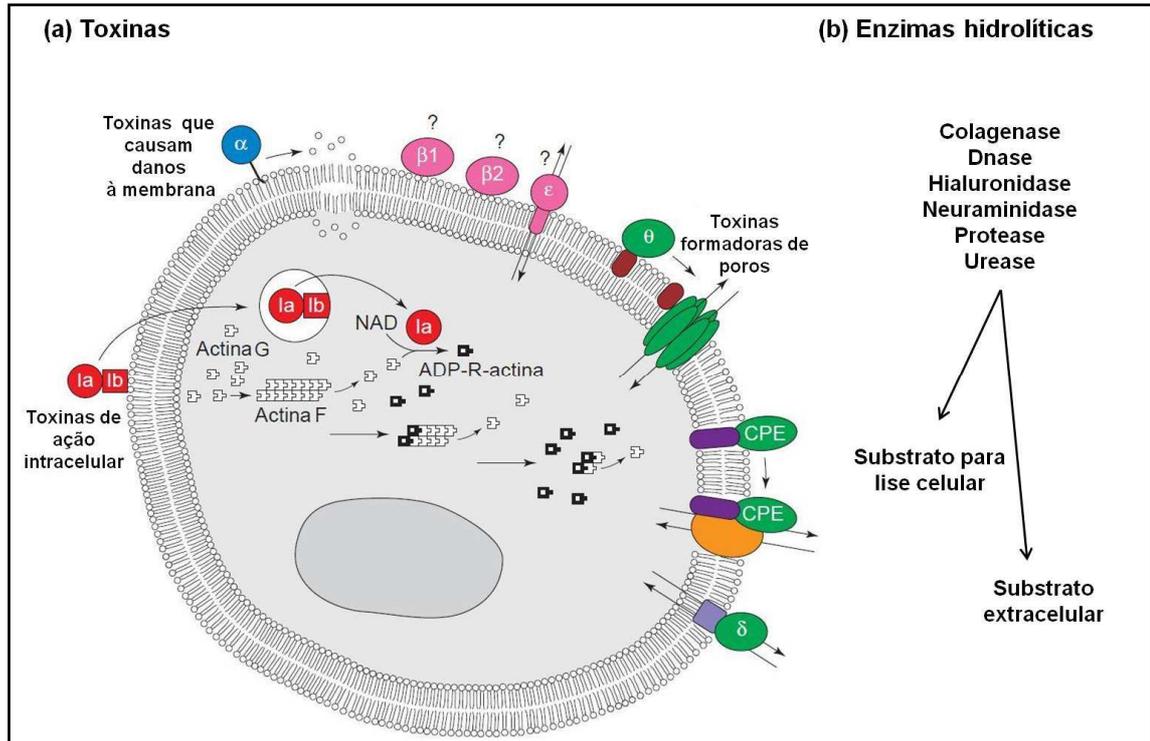


Figura 2 - Representação esquemática dos alvos e modos de ação das toxinas e enzimas hidrolíticas de *Clostridium perfringens*. (a) A maioria das toxinas de *C. perfringens* atua na membrana celular. A toxina α é prejudicial à membrana (azul escuro), pois possui atividade de fosfolipase C e esfingomielinase. As toxinas formadoras de poros (verde) reconhecem receptores específicos de membrana: colesterol (marrom) para a toxina θ (PfoA), Gangliosídeo GM2 (lilás) para toxina δ , e um receptor de proteína (roxo) para enterotoxina (CPE), que se associa com outra proteína de membrana (laranja) para formar um grande complexo. As toxinas β_1 e β_2 podem ser prejudiciais à membrana, já que a toxina β_1 mostra significativa homologia com as toxinas α e γ de *Staphylococcus aureus*, que formam poros na membrana celular. A toxina ϵ forma um grande complexo com uma proteína de membrana e altera a permeabilidade celular. Em contrapartida, a toxina i , que é uma toxina binária (vermelha), atua dentro da célula. O componente obrigatório (Ib) medeia a interiorização do componente enzimático (Ia) que catalisa a ADP ribosilação de monômeros de actina, levando à despolimerização do citoesqueleto. (b) *C. perfringens* também produz diversas enzimas hidrolíticas, que atuam como fatores de virulência adicionais nas lesões gangrenosas, favorecendo a degradação dos substratos extracelulares e células lisadas, fornecendo, assim, nutrientes para o crescimento de *C. perfringens*. (Adaptado de Petit, *et al.*, 1999)

Para muitas bactérias patogênicas, o sequenciamento completo do genoma proporciona a investigação de fatores de virulência relacionados à invasão de células, mecanismos de defesa contra o sistema imune do hospedeiro e outras proteínas que podem ser utilizadas como alvos para a elaboração de vacinas. No gênero *Clostridium*, as bactérias apresentam pouca invasividade dos tecidos, com sua patogenicidade baseando-se na produção de toxinas. Dessa forma, a melhor estratégia vacinal contra *C.perfringens* é baseada na confecção de vacinas polivalentes de toxóides.

II.3.3. *Clostridium perfringens* tipo B e C – perfil das enterotoxemias causadas pela toxina beta

O *Clostridium perfringens* tipo B produz, pelo menos, as toxinas alfa, beta e épsilon (Petit, *et al.*, 1999) e pode causar enterotoxemias em animais e humanos. As toxinas beta e épsilon causam os sintomas de disenteria em cordeiros neonatos (Buxton e Donachie, 1991) e estão associadas à enterite hemorrágica em bezerros, caprinos e equinos (Frank, 1956; Sterne e Batty, 1975; Songer, 1996). O *Clostridium perfringens* tipo C produz, pelo menos as toxinas alfa, beta e beta-2 e é responsável por casos de enterotoxemias do tipo enterite necrótica em seres humanos, aves domésticas, bovinos, cães, equinos, ovinos e suínos (Sterne e Batty, 1975; Mackinnon, 1989; Buogo *et al.*, 1995). A enterite necrótica em humanos causada pelo tipo C é chamada de “Pigbel” e foi descrita ocorrendo também em pacientes diabéticos (Petrillo *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2007). Por razões ainda não totalmente elucidadas, as enterotoxemias causadas pelo tipo B e C são relatadas somente em certas regiões do mundo, mas apresentam-se presentes nos diferentes continentes (Barker *et al.*, 1993; Songer, 1996; Lewis, 2000).

Os leitões são os animais domésticos mais afetados pelo *C. perfringens* tipo C e apresentam maior suscetibilidade à infecção na primeira semana de vida (Fitzgerald *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1992; Buogo *et al.*, 1995). Nos ovinos jovens, o curso da infecção por esse toxiotipo lembra o descrito para a desinteria dos cordeiros. Nos animais adultos, porém, pode surgir um quadro de enterotoxemia hiperaguda denominado “struck”. Essa denominação deriva da morte extremamente rápida associada a essa condição, que geralmente deixa a impressão de que o animal foi atingido por um raio – “struck by lightning” (Timoney *et al.*, 1988; Songer, 1996). O gene da toxina beta-2, o *cpb-2*, já foi encontrado em 4 toxiotipos de *C. perfringens* - A, C, D e E (Gibert *et al.*, 1997). Investigações epidemiológicas demonstraram a maior ocorrência do gene *cpb-2* entre os animais doentes. Muitas infecções causadas por diferentes *C. perfringens* contendo a toxina beta-2 foram atribuídas a *C. perfringens* tipo C (Klaasen *et al.*, 1999), demonstrando a dificuldade da

elucidação do papel patológico das diferentes toxinas de *C.perfringens* e suas interações no curso das enterotoxemias.

O papel patológico e a atuação das toxinas do toxiotipo B durante a evolução das doenças também é pouco conhecido. Sabe-se que a beta toxina é responsável por doenças produzidas pelo toxiotipo C e a toxina épsilon é responsável por infecções causadas pelos toxiotipo D (Songer, 1996). Mas, pouco é conhecido sobre o papel dessas toxinas durante a evolução das infecções causadas pelo toxiotipo B. Observa-se que os animais acometidos por infecções causadas por esse toxiotipo podem apresentar sinais clínicos e lesões similares às infecções causadas pelo toxiotipo C – enterite necrótica - ou similares as causadas pelo toxiotipo D – alterações neurológicas (Barker *et al.*, 1993; Lewis, 2000; McClane *et al.*, 2006; Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007).

A toxina beta é descrita como sendo bastante sensível a digestão por tripsina. Animais com baixa taxa de tripsina intestinal, como os recém-nascidos, são mais susceptíveis a infecções por isolados de *C. perfringens* que produzem a beta toxina (Songer, 1996). Em contraste, a toxina épsilon requer proteólise por tripsina ou por outra protease intestinal ou bacteriana para torna-se uma toxina totalmente ativa (Miyata *et al.*, 2001). Esses efeitos opostos da tripsina na atividade dessas duas toxinas podem indicar que, quando elas estão presentes no intestino devido a infecções causadas por *C. perfringens* tipo B, diferentes condições intestinais poderiam selecionar a atividade predominante da toxina beta sobre a toxina épsilon ou vice-versa. Outra possibilidade seria a variação das características toxinogênicas de diferentes linhagens como determinantes da variação de sinais clínicos e lesões das infecções causadas pelo toxiotipo B (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007).

Devido à grande relevância da toxina beta para o presente trabalho, ela será abordada com maiores detalhes.

II.3.3.1. Toxina beta de *Clostridium perfringens*

A toxina beta é codificada pelo gene *cpb* que possui 1524 pb e está localizado em um grande plasmídeo presente em *Clostridium perfringens* tipo B e C (Hunter *et al.*, 1993; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999). Ela é sintetizada como uma proteína de 336 aminoácidos, sendo que os primeiros 27 resíduos constituem o peptídeo sinal para sua secreção. A proteína secretada possui uma massa molecular predita de 34,861 KDa (Hunter *et al.*, 1993) e apresenta alta sensibilidade à ação da tripsina, diferente de outras proteínas que precisam da tripsina para serem ativadas (Mcdonel, 1980; Sakurai e Duncan, 1977; Songer, 1996). Acredita-se que essa toxina apresenta ação citolítica, dermonecrotica e letal, sendo a

possível responsável pelo processo de necrose hemorrágica das mucosas e pelas alterações relacionadas com o sistema nervoso central de animais e humanos induzidas pelo *C. perfringens* (Petit *et al.*, 1999; Songer, 1996). O mecanismo de ação da toxina ainda não foi bem elucidado. Ela é mais sensível à ação de enzimas proteolíticas, temperaturas elevadas e outros fatores ambientais do que as demais toxinas principais do *C. perfringens*, o que dificulta maiores estudos sobre sua ação (Niilo, 1980).

Essa toxina foi primeiramente purificada e parcialmente caracterizada por Sakurai e Duncam (1977 e 1978). Em 1993, Hunter e colaboradores, usando uma sonda de oligonucleotídeos concebidos com base na seqüência N-terminal da toxina purificada, isolaram o gene da toxina beta de *C. perfringens* tipo B e realizaram a clonagem e o sequenciamento desse gene. Eles observaram uma significativa homologia com a estrutura da hemolisina alfa (28% de similaridade), com os componentes A e B da hemolisina gama (22 e 28% de similaridade, respectivamente) e componentes S e F da leucocidina (17 e 28% de similaridade, respectivamente) de *Staphylococcus aureus*, que são toxinas formadoras de poros na membrana celular (Manich *et al.*, 2008). Além disso, ela apresenta significativa homologia de aminoácidos com a toxina delta (43% de identidade e 63% de similaridade) e com a toxina alfa de *C. perfringens* que também formam poros na membrana celular eucariótica, sendo esses mais indícios da sua possível ação (Petit *et al.*, 1999; Nagahama *et al.*, 2003; Manich *et al.*, 2008). Ela não apresenta homologia de aminoácidos significativa (15% de homologia) em relação à toxina beta-2 e, também, elas são fracamente correlacionadas imunologicamente (Gibert *et al.*, 1997; Schotte *et al.*, 2004).

Os mecanismos moleculares da ação da toxina beta ainda não são bem elucidados, mas, diante do exposto, acredita-se que ela é uma toxina formadora de poros na membrana celular. A importância dessa toxina em doenças que acometem animais e humanos tem sido demonstrada através de estudos de imunização usando o toxóide da toxina beta. Quando imunizados com esse toxóide, os povos das tribos de Papuá-Nova Guiné obtiveram uma redução em cinco vezes na incidência de enterite necrótica (Lawrence, 1990). Também foi observado diminuição de aproximadamente 30% de mortalidade em leitões nos quais foi administrado o toxóide durante a manifestação de enterocolite necrotizante (Springer, 1999).

Estudos mais aprofundados sobre sua atividade são dificultados pela ausência de linhagens celulares que sejam susceptíveis à toxina beta para investigações *in vitro* de sua atividade. Steinhorsdotti e colaboradores (2000) demonstraram que essa toxina pode formar complexos multiméricos em células endoteliais de veias de cordão umbilical humano, o que sugere que ela pode oligomerizar, uma característica comum de muitas toxinas formadoras de poros. Além disso, foi demonstrado que a toxina pode causar a liberação do ácido aracdônico e o escapamento de inositol dessas células endoteliais, mas não está

elucidado se isso é um efeito direto da formação de canais transmembrana ou um efeito celular indireto, ainda não elucidado, da toxina (Steinthorsdotti *et al.*, 2000). Em 2000, Shatursky e colaboradores demonstraram que a toxina beta recombinante provoca um aumento na condutância de membranas lipídicas por indução da atividade de canais de cátion. Esses dados confirmam as hipóteses anteriores de que a toxina beta possui sua ação letal baseada na formação de poros na membrana celular e esses poros seriam seletivos em relação a cátions. Em 2003, Nagahama e colaboradores testaram 10 linhagens celulares (células Vero, células CHO, células MDCK, células CHO-K1, células COS-7, células P-815, células PC12, células HeLa, células de intestino 407 e células HL 60) na tentativa de encontrar qual poderia ser susceptível à toxina beta. Foi verificada a atuação da toxina somente nas células HL 60 por ligação a complexos lipídicos da membrana ("lipid rafts"), formando uma oligômero funcional com 228 kDa. Miclard e colaboradores (2009) realizaram investigações imunohistoquímicas de tecidos de um diabético adulto que morreu de enterite necrótica e sugeriram que a necrose vascular possui relação com a interação direta da toxina beta e células endoteliais.

Embora evidências demonstrem que a toxina beta forma poros na membrana celular, os alvos celulares e o seu papel nas infecções causadas por *Clostridium perfringens* tipo B e C não estão bem elucidados. As descobertas de Shatursky e colaboradores (2000), Nagahama e colaboradores (2003) e Miclard e colaboradores (2009) podem ajudar na elucidação dos mecanismos moleculares de letalidade dessa toxina e evolução dessas infecções. Os estudos de imunização sugerem que a anti-toxina beta provoca diminuição da incidência de enterotoxemias e de mortalidade causadas por *C.perfringens* tipo B e C em animais e humanos (Lawrence, 1990; Springer, 1999; Tweten, 2001). Esses achados demonstram a importância dessa toxina em doenças e ressalta a necessidade de maiores pesquisas para a confecção de vacinas com o seu toxóide.

II.4. Expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli*

Em biotecnologia é grande a demanda por proteínas puras e funcionais mas, a maioria é produzida em pequenas quantidades quando são utilizados métodos tradicionais de obtenção e purificação de proteínas. Com o advento da engenharia genética e a tecnologia do DNA recombinante, a introdução de genes codificantes em células hospedeiras facilmente cultiváveis permitiu a produção de proteínas puras e funcionais a custos mais baixos, com maior grau de purificação e em menor tempo. Os genes são introduzidos após promotores reguláveis presentes em elementos genéticos independentes, os plasmídeos

(Yokohama, 2003). Essas construções genéticas apresentam, assim, características que são de grande interesse para os pesquisadores e para as indústrias.

Escherichia coli é, ainda, o veículo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes, devido ao seu genoma ser bem caracterizado e ao intenso aperfeiçoamento das inúmeras ferramentas disponíveis para a sua manipulação genética (Chou, 2007). Além do acúmulo de informações sobre sua genética, existe um grande conhecimento sobre sua fisiologia, bioquímica e biologia molecular, o que a coloca como primeiro sistema de escolha para a expressão de muitas proteínas heterólogas (Makrides, 1996). Os vários sistemas de expressão gênica utilizados nessa bactéria apresentam muitas características atrativas, como controle da expressão gênica e estratégias que facilitam a purificação de proteínas (Terpe, 2006). Esses sistemas proporcionam uma alta produção de proteínas recombinantes e o seu endereçamento para os compartimentos intra-celulares, incluindo o citoplasma, membrana interna, periplasma e membrana externa (Cornelis, 2000; Lee *et al.*, 2003) ou sua secreção para o meio extra-celular (Choi e Lee, 2004; Georgiou e Segatori, 2005).

Apesar da literatura científica descrever o sucesso de vários sistemas de expressão heteróloga com diferentes genes clonados, cada gene apresenta suas particularidades. Muitas vezes, o sucesso de uma clonagem e expressão heteróloga é realizada de forma empírica, com sistemas funcionando bem para alguns genes enquanto que, para outros, isso não ocorre. Existem muitas publicações com excelentes técnicas e protocolos de manipulação genética, bioquímica e fisiológica em *E.coli* que podem ajudar os pesquisadores na obtenção de altos níveis de expressão gênica, mesmo em condições adversas (Baneyx, 1999; Baneyx e Mujacic, 2004; Hartley, 2006; Makrides, 1996; Sorensen e Mortensen, 2005a,b; Swartz, 2001; Weickert *et al.*, 1996).

II.4.1. Vetores série pET

Vários vetores comerciais encontram-se disponíveis para a expressão de proteínas em *Escherichia coli*. Um dos mais poderosos sistemas de expressão são aqueles pertencentes à série pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*, Novagen) que promove grandes níveis de expressão através da RNA polimerase do bacteriófago T7, apresentando grande estabilidade e versatilidade com diferentes estratégias para a purificação protéica. Os genes alvos são clonados no plasmídeo pET sob o forte controle transcricional do promotor T7. A expressão ocorre através da indução da produção da RNA polimerase T7 que, então, se liga ao promotor T7 e promove a transcrição do gene alvo. Essa RNA polimerase é tão ativa e seletiva que quase toda a maquinaria da bactéria é convertida para a expressão do gene de interesse. O produto desejado pode corresponder a

mais de 50% das proteínas bacterianas, após poucas horas de indução. Outro importante benefício desse sistema é sua habilidade de manter genes transcricionalmente silenciados no período antes da indução, o que permite o crescimento bacteriano, já que, muitas vezes, a proteína de interesse é tóxica para a célula dificultando ou impedindo o metabolismo celular normal (Jonasson *et al.*, 2002).

Proteínas recombinantes produzidas na forma intracelular podem ser acumuladas na forma solúvel, na forma insolúvel formando corpos de inclusão ou podem ser acumuladas com uma parte solúvel e uma parte como corpos de inclusão. É impossível prever se o produto de um gene será solúvel ou insolúvel dentro da célula hospedeira, para tanto, são necessárias investigações empíricas (Jonasson *et al.*, 2002).

II.4.2. Corpos de inclusão

Os corpos de inclusão são depósitos protéicos, amorfos e densos, que podem ser encontrados tanto no citoplasma quanto no espaço periplasmático da bactéria (Georgiou e Valax, 1999). Apesar de serem partículas densas, eles são altamente hidratados e mostram uma arquitetura porosa (Carrió *et al.*, 2000). Entre os mais importantes fatores que influenciam a formação desses depósitos protéicos estão a taxa de expressão protéica e a presença de pontes dissulfetos, mas a hidrofobicidade e o tipo de fusão também possuem um impacto significativo (Swartz, 2001).

Para tentar minimizar a formação de corpos de inclusão, alguns pesquisadores têm propostos métodos que podem evitar a formação desses agregados através do controle de parâmetros como crescimento das culturas em temperaturas mais baixas (Chalmers *et al.*, 1990), redução da taxa de expressão do gene de interesse (Galloway *et al.*, 2003), co-expressão das proteínas de interesse com chaperonas (Wall e Plückthun, 1995), engenharia de proteínas (Murby *et al.*, 1995; Forrer e Jaussi, 1998), entre outras.

Um grande desafio é tirar vantagem dos altos níveis de expressão de proteínas na forma de corpos de inclusão, sendo capaz de convertê-los em produtos bioativos solúveis (Sorensen e Mortensen, 2005b) ou utilizá-los na forma insolúvel (Clark, 2001; Middelberg, 2002). Essa expressão de proteínas na forma de agregados intracelulares pode ser vantajosa, pois, além da grande quantidade de proteínas produzidas, grande parte delas esta protegida da degradação proteolítica. Quando a proteína de interesse é tóxica ou letal para a célula hospedeira, sua obtenção na forma insolúvel pode ser o método mais viável para sua produção (Misawa e Kumagai, 1999).

II.5. Relevância do Projeto

O Brasil situa-se, no contexto atual, como celeiro mundial em termos de agronegócio. Esse setor corresponde a aproximadamente 26,4% do PIB nacional, sendo que, dessa porcentagem, a pecuária corresponde a 28,9% (MAPA, 2008). O país possui um dos maiores rebanhos de aves, bovinos, ovinos e caprinos do mundo, conforme últimos dados de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia (IBGE, 2010). Atualmente, as carnes são o sexto produto mais exportado (MDIC, 2010) e o país é o maior exportador de carnes de aves e de bovinos do mundo (USDA, 2010). Assim, a pecuária apresenta importância econômica bastante expressiva, tanto para o consumo interno quanto para a exportação.

Diante desse contexto, o tratamento, controle e profilaxia das doenças de animais confinados apresentam grande interesse por parte dos produtores e do governo. Dentre as principais doenças, as clostridioses estão entre as mais fatais e estão distribuídas por todo o Brasil e, muitas vezes, possuem evolução rápida, impossibilitando medidas de tratamento. Dessa maneira, a melhor maneira de conter essas doenças é através de vacinações sistemáticas de todo o rebanho com vacinas de eficiência comprovada (Lobato e Assis, 2000). Nosso grupo de pesquisa realiza projetos que possuem como objetivo principal o desenvolvimento de uma vacina recombinante polivalente contra enterotoxemias provocadas por *Clostridium perfringens*. O primeiro trabalho realizado com essa proposta, uma tese de doutorado, teve como objetivo a “Clonagem e expressão do gene da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D e sua aplicação na imunização de animais”. Os bons resultados alcançados nesse trabalho propiciaram duas publicações em periódicos: Souza *et al.*, 2010 e Lobato *et al.*, 2010. Continuando nessa linha de pesquisa, o presente trabalho contribui expressivamente para o desenvolvimento de uma nova vacina polivalente contra enterotoxemias provocadas por *Clostridium perfringens*.

III

OBJETIVOS

III.1. Objetivos gerais

Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B e caracterização molecular da toxina recombinante.

III.2. Objetivos específicos

- Subclonagem de parte da ORF do gene *cpb*, codificante da toxina beta, no vetor de expressão pET11a (Novagen).
- Expressão em larga escala da toxina beta recombinante em *E. coli* BL21 DE3.
- Análise quantitativa da expressão da toxina beta recombinante.
- Análise das propriedades farmacológicas da toxina beta recombinante.
- Análise de similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa.
- Análise da imunogenicidade da toxina beta recombinante.
- Análise da reatividade de anticorpos anti-beta recombinante contra a toxina beta nativa
- Titulação dos anticorpos anti-beta recombinante.

IV
MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES, MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Antibióticos

- **Ampicilina:** A ampicilina foi dissolvida em água ultra-pura na concentração de 100 mg/mL, filtrada (filtro de 0,22 µm) e estocada a -20°C. A solução foi utilizada na concentração final de 100 µg/mL.

Meios de cultura

- **2XYT-caldo:** 5 g de NaCl, 16 g de bactotripton e 10 g de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e o volume para 1 litro. O meio foi autoclavado.

- **LB-ágar:** 10 g de NaCl, 10 g de bactotripton e 5 g de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e o volume para 1 litro. Ágar (1,5%) foi acrescentado e o meio foi autoclavado.

- **LB-caldo:** 10 g de NaCl, 10 g de bactotripton e 5 g de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e o volume para 1 litro. O meio foi autoclavado.

Soluções para produzir Bactérias eletrocompetentes

- **Glicerol 10%:** Foi Diluído 100 mL de glicerol em água destilada para volume final de 1 L. A solução foi Autoclavada.

Soluções para extração de plasmídeo em baixa escala (Mini-Prep)

- **Solução I:** 50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0.

- **Solução II:** 0,2 N de NaOH e 1% de SDS.

- **Solução III:** 60 mL de uma solução de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água destilada.

Soluções para Gel de Agarose

- **Brometo de etídio:** Brometo de etídio foi dissolvido em água ultra-pura na concentração de 10 mg/mL, sendo a solução estocada em um recipiente escuro. Importante: usar luvas e máscara – substância mutagênica e teratogênica.

- **Gel de agarose:** A agarose foi dissolvida por aquecimento, em TAE 1x de acordo com a concentração a ser utilizada.
- **Tampão TAE:** Tampão Tris-acetato-EDTA (solução estoque 50x): 242 g de Tris base, 57,1 mL de ácido acético e 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0. Usar o tampão 1x.

Soluções para Expressão e Lise Bacteriana

- **IPTG (Isopropil-tio- β -D-1-galactopiranosídeo):** O IPTG foi dissolvido em água ultra-pura na concentração de 600 mM, filtrado (filtro de 0,22 μ m) e estocado a -20°C .
- **Tampão de lise:** 50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol e 1 L de água destilada. O pH foi ajustado com NaOH para 8,0
- **Lisozima:** Pesar 4 mg de lisozima para 1 mL de tampão de lise. Fazer a solução na hora do uso.

Soluções para Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford

- **BSA:** Pesar 1 mg de albumina sérica bovina e diluir em água ultra-pura para volume final de 1 mL. Estocar a -20°C .
- **Reagente de Bradford:** Foi utilizado o reagente de Bradford da SIGMA.

Soluções para Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

- **Tampão de amostra 2x:** 2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1,6 mL de glicerol; 3,2 mL de SDS 10%; 0,8 mL de β -mercaptoetanol; 500 mg de bromofenol blue e ajustar o volume para 8 mL com água destilada e o pH foi acertado para 8,3.
- **Solução A de gel:** 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida, água destilada para volume final de 100 mL.
- **Solução B de gel:** 18,15 g de Tris, acertar o pH com HCl para 8,8 e água destilada para volume final de 100 mL.
- **Solução C de gel:** 6,0 g de Tris, água destilada para volume final de 100 mL, acertar o pH com HCl para 6,8.
- **Solução D de gel:** SDS 10% (10 g de SDS para 100 mL de solução).
- **SDS (10%):** 10g de Dodecil sulfato de sódio em 100 mL de água destilada.
- **PSA 10%:** 10 g de persulfato de amônio para 100 mL de água destilada.
- **Tampão de corrida 5x:** 1,5% de Tris-Base, 7,2% de glicina e 0,5% de SDS.

- **Solução corante:** 1,25 g de Comassie blue, 225 mL de metanol, 45 mL de ácido acético glacial e 225 mL de água destilada.
- **Solução descorante:** 45 mL de etanol, 90 mL de ácido acético glacial e 850 mL de água destilada.
- **Solução para secar gel de poliacrilamida:** 25% de etanol e 1,5% de glicerol.

Soluções para ELISA

- **PBS 10x – Tampão fosfato salina (pH 7.4):** Foi Preparado 500 mL de uma solução 0,5 M de Na_2HPO_4 e 200 mL de uma solução 0,5 M de NaH_2PO_4 . O pH da solução de Na_2HPO_4 foi acertado para 7,4 usando a solução de NaH_2PO_4 . O volume final foi medido e foi acrescentado 9 g de NaCl para cada 100 mL de solução. A solução foi filtrada e estocada a 4°C.
- **Tampão Carbonato:** 15 mM de Na_2CO_3 , 35 mM de NaHCO_3 , pH da solução 9,6.
- **Tampão Citrato:** 50 mM de Na_2HPO_4 , 24 mM de ácido cítrico, pH da solução 5,0.
- **Tampão de Bloqueio:** 2% caseína em PBS 1x.
- **Tampão de Incubação:** 0,2% de caseína em PBS 1x e 0,05% de Tween 20.
- **Solução de Lavagem:** 0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20.
- **Solução reveladora de ELISA:** 10 mL de tampão citrato, 2 mg de OPD, 2 μl de água oxigenada 30%.

Soluções para Western Blot

- **Tampão de transferência para Western blot:** 14,42 g/L de glicina, 3,03 g/L de Tris e 200 mL/L de metanol. O pH deve estar em torno de 8,3.
- **PBS 10x – Tampão fosfato salina (pH 7.4):** Foi preparado 500 mL de uma solução 0,5 M de Na_2HPO_4 e 200 mL de uma solução 0,5 M de NaH_2PO_4 . O pH da solução de Na_2HPO_4 foi acertado para 7,4 usando a solução de NaH_2PO_4 . O volume final foi medido e foi acrescentado 9 g de NaCl para cada 100 mL de solução. A solução foi filtrada e estocada a 4°C.
- **Solução de PBST 0,3% para Western blot:** PBS 1x, 0,3% de Tween 20.
- **Solução de PBST 0,05% para Western blot:** PBS 1x, 0,05% de Tween 20.
- **Solução reveladora para Western blot:** 10 mg de DAB dissolvido em 10 mL PBST 0,05%, 5 mg de cloronaftol, 1,7 mL de metanol, 8,3 mL de PBST 0,05% e 10 μl de H_2O_2 .

Outras Soluções

- **Acetato de Sódio (3M)**: 246g de acetato de sódio em 1L de água destilada.

LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

As linhagens bacterianas e os plasmídeos empregados neste trabalho estão listados no Quadro 3 e 4, respectivamente. Os meios de cultivo utilizados foram o Luria-Bertani (LB) e o 2XYT. As bactérias foram crescidas a 37°C sob agitação. Além dos meios de cultivo, as diferentes linhagens foram crescidas em presença de ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios supracitados.

Quadro 3: Linhagens bacterianas utilizadas.

Espécie	Linhagem/Genótipo	Fonte
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]	Phoneutria
<i>Escherichia coli</i>	BL21 DE3 F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Phoneutria

Quadro 4: Plasmídeos utilizados.

Plasmídeos	Características relevantes	Fonte
pCR2.1-TOPO	Vetor de clonagem; seleção azul e branca; promotor T7; pUC e f1 origem; Ap ^r ; Km ^r ;	Invitrogen
pTP: β tox	Plasmídeo pCR2.1-TOPO contendo a <i>orf</i> codificadora da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo B	LBMM
pET11a	Vetor de clonagem e expressão; pBR322 origem; promotor T7; repressor <i>lac</i>	Novagen
pET11a: β tox	Plasmídeo pET11a contendo a <i>orf</i> codificadora da toxina beta de <i>Clostridium perfringens</i> tipo B	Este trabalho

Ap^r: resistência à ampicilina; Km^r: resistência à canamicina

MANIPULAÇÃO DO DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação de DNA plasmidiano foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook *et al.*, 1989), com algumas modificações (especificadas junto aos métodos). Quando necessário, os plasmídeos foram isolados através do método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). A qualidade do material obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada após leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, e também através da resolução eletroforética em gel de agarose. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos fabricantes.

ANIMAIS UTILIZADOS

Camundongos Swiss linhagem Webster pesando entre 18 e 22 g foram obtidos no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais. Coelhos da raça Himalaia pesando aproximadamente 2 Kg foram obtidos na Fazenda da Escola de Medicina Veterinária/UFMG. Os coelhos e camundongos foram mantidos no biotério da Escola de Medicina Veterinária. Todos os animais receberam água e alimentação em condições controladas.

PREPARO DO ESTOQUE DE BACTÉRIAS

Todos os clones obtidos neste trabalho foram preparados para serem estocados e guardados a -70 °C. Células de bactérias *Escherichia coli* BL21DE3 e XL1-Blue foram transformadas com os plasmídeos de interesse e plaqueadas em meio sólido LB-ágar com 100 µl/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por 16 horas. Foi, então, retirada uma colônia da placa e adicionada ao meio líquido LB-ampicilina. Essa mistura foi crescida a 37°C sob agitação. Após atingir a fase log tardia, foi feita uma mistura de igual volume de glicerol 80% e as culturas de bactérias. Alíquotas foram armazenadas em tubos estéreis a -70°C.

METODOLOGIA

IV.1. Propagação *in vivo* do plasmídeo pTP: β tox

IV.1.1. Confeção de bactérias *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes

O plasmídeo pTP: β tox (inserto correspondente a parte da ORF do gene *cpb*, codificante da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B, clonado no vetor pCR2.1-TOPO da Invitrogen) foi previamente construído pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis e encontrava-se ressuspenso em água ultra-pura. Foi realizada a transformação do plasmídeo em *Escherichia coli* XL1-Blue para a multiplicação *in vivo* dessa construção genética para realização de experimentos posteriores.

Para tanto, foram inoculados 10 µL de uma alíquota de células de *E. coli* XL1-Blue (Tabela 3) congeladas em glicerol 80% em um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB líquido. O tubo foi incubado a 37°C durante 18 horas sob agitação de 200 rpm. Uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em erlenmeyer contendo 300 mL de meio LB líquido e essa cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir absorbância (DO_{600nm}) entre 0,5 e 0,7. Uma vez alcançado o crescimento desejado, a cultura foi centrifugada a 6.000xg durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 300 mL de solução de glicerol 10% estéril e, logo em seguida, foram novamente centrifugados a 6.000xg durante 20 minutos a 4°C. Esse processo de lavagem com glicerol 10% e posterior centrifugação foi repetido 3 vezes, concentrando as células através da utilização de volumes decrescentes de glicerol 10%: 200 mL, 100 mL e 50 mL.

Após a última lavagem, as bactérias foram ressuspensas em 1 mL de solução de glicerol 10% estéril. Esse 1 mL foi dividido em alíquotas de 50 µL que foram estocadas à -70°C.

Para análise da eficiência de transformação dessas células, utilizou-se o plasmídeo pUC18 como controle de qualidade devido a sua pureza e alta eficiência de transformação. Para isso, uma alíquota das células eletrocompetentes, congelada à -70°C, foi colocada no gelo durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 10 ng do plasmídeo pUC18 em um microtubo e a mistura foi transferida para 1 cubeta de eletroporação estéril previamente resfriada. Uma outra alíquota de células eletrocompetentes foi utilizada como controle negativo da eletroporação e para verificar a ausência de contaminação das células eletrocompetentes. Foi adicionado 1 µL de água ultra-pura às células no lugar do volume de plasmídeos. As duas cubetas foram submetidas a um pulso de 2.5 Volts, capacitância 25 µFD e resistência de 200 OHMS utilizando um eletroporador *CelljetcUno* (*Thermo Electro Corporation*).

Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido para a ressuspensão das células. As células ressuspensas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e incubadas à 37° C por uma hora. Diluições dessa cultura de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C durante 16 horas.

IV.1.2. Transformação do plasmídeo pTP: β tox em *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente e seleção dos transformantes

O plasmídeo pTP: β tox foi utilizado para transformar as células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue preparadas conforme descrito no item anterior (IV.1.1).

A transformação foi conduzida por eletroporação seguindo os mesmos parâmetros descritos no item IV.1.1. Para tanto, aproximadamente 10 ng de plasmídeo foram misturados a uma alíquota de 50 µL de células eletrocompetentes e incubados no gelo por 10 minutos. Foi feito o mesmo procedimento para a realização do controle negativo da eletroporação com outra alíquota de 50 µL de células eletrocompetentes. Foi adicionado volume correspondente de água ultra-pura às células no lugar do volume de plasmídeos. Imediatamente após o pulso, foi adicionado a cada cubeta 1 mL de meio LB líquido para ressuspensão das células e estas foram incubadas à 37°C por uma hora.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir alíquotas de 100 µL da cultura de 1 mL de meio LB líquido, que foi incubada à 37° C por uma hora, para placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As

culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 16 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias recombinantes.

A etapa seguinte consistiu na seleção de colônias das placas para proceder com a extração de plasmídeos para a posterior subclonagem.

IV.2. Subclonagem do fragmento β tox no vetor pET11a (Novagen)

IV.2.1. Extração do DNA plasmidiano pTP: β tox de *E. coli* XL1-Blue em pequena escala

Duas colônias selecionadas foram transferidas isoladamente para tubos de 50 mL contendo 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina. As culturas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas sob agitação de 200 rpm. Após a incubação, foi feita uma cultura estoque em glicerol (500 μ L da cultura + 500 μ L de glicerol 80%) sendo estas armazenadas à -70° C. Seguiu-se com a extração de plasmídeos em pequena escala através de lise alcalina, de acordo com Sambrook *et al.*, 1989, com algumas modificações.

O restante da cultura foi centrifugada por 10 minutos a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado ressuspense em 300 μ L de solução I gelada (item IV.A), sendo homogeneizado e transferido para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, 300 μ L de solução II (item IV.A) foram adicionados ao microtubo, sendo a mistura homogeneizada e incubada por 5 minutos no gelo. Logo após, 300 μ L de solução III gelada (item IV.A) foram acrescentados à mistura, que foi homogeneizada novamente e incubada por 5 minutos no gelo.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000xg e o sobrenadante resultante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 500 μ L de isopropanol ao sobrenadante e os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente para que ocorresse a precipitação dos plasmídeos. Após este período, seguiu-se com a centrifugação por 15 min a 12.000xg. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados com 1 mL de etanol 70%. O precipitado resultante, contendo os plasmídeos, foi deixado em repouso para evaporação de qualquer resíduo de álcool 70% e, em seguida, ressuspense em 30 μ L de água ultra-pura. Por fim, o mesmo foi tratado com RNase A (100 μ g/mL) em banho-maria a 37°C por uma hora.

A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese, em que também foi realizada a quantificação desses plasmídeos, de acordo com parâmetros detalhados no próximo item.

IV.2.2. Resolução eletroforética da extração do DNA plasmídico pTP: β tox de *E. coli* XL1-Blue

Aplicou-se 1 μ L do material obtido no item anterior, acrescido de 1:10 do volume de tampão de amostra *Phoneutria*, em gel de agarose 1% em TAE 1X (IV.A) para verificação da qualidade da extração do plasmídeo. Para a quantificação desse plasmídeo, foi aplicado o padrão de peso molecular 1Kb DNA plus (Invitrogen).

A eletroforese foi realizada a 60 Volts durante aproximadamente 1 hora. Em seguida, o gel foi colocado em solução de brometo de etídeo 0,5 μ g/mL sob agitação por aproximadamente 30 minutos, sendo posteriormente observado em presença de luz UV. O gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320 nm) através do sistema de documentação fotográfica “Kodak Digital Science™ DC40 Camera” (Kodak) e a foto processada pelo programa “Eletrophoresis Documentation and Analysis System” (Kodak). A dosagem da extração do plasmídeo foi realizada por comparação com o padrão de peso molecular.

IV.2.3. Digestão enzimática do plasmídeo pTP: β tox para liberação do inserto

O plasmídeo pTP: β tox (Tabela 4) extraído das colônias transformantes de *E. coli* XL1-Blue, obtidas conforme foi descrito no item IV.1.2, foi submetido à reação de digestão enzimática com a enzima *Bam*HI (New England Biolabs), de acordo com especificações do fabricante, com um volume final de 100 μ L.

IV.2.4. Purificação do fragmento de DNA β tox

A reação de digestão descrita no item anterior (item IV.2.3) foi precipitada com a adição de dois volumes de etanol absoluto e 10% de Acetato de Sódio. O microtubo foi então incubado por meia hora à -70° C e, após esse período, foi centrifugado a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. O precipitado ficou em repouso para evaporação de resíduos do etanol 70% e, em seguida, foi ressuspensão em 10 μ L de água ultra-pura.

Todo esse volume foi aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética foi realizada sob as mesmas condições descritas no item IV.2.2. O fragmento β tox foi purificado do gel de agarose utilizando-se o kit “Wizard PCR Preps DNA purification System” da Promega de acordo com as especificações do fabricante.

A concentração e a pureza dos produtos purificados foram estimados através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.2.2.

IV.2.5. Digestão enzimática para linearização do vetor pET11a (Novagen)

Em busca de um sistema que permitisse alcançar altos níveis de produção de proteína recombinante, usou-se o sistema de expressão pET11a da Novagen (Figura 3), que possui *E. coli* como hospedeira. A expressão de proteínas heterólogas em células procariontas oferece grande simplicidade e, principalmente, altos níveis de expressão com baixo custo, o que é de grande interesse para as indústrias produtoras de vacinas.

O vetor de expressão pET é derivado do plasmídeo pBR322 e foi desenvolvido com a característica do gene 10 do bacteriófago T7, que promove altos níveis de transcrição e tradução. Assim, o sistema pET é um dos mais eficientes já desenvolvidos para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Os altos níveis de expressão ocorrem devido à alta seletividade da RNA polimerase do bacteriófago T7 em reconhecer a seqüência do promotor T7, ao alto nível de atividade da T7 polimerase e à eficiente tradução mediada pelos sinais de iniciação da tradução do gene 10.

O plasmídeo pET deve ser transformado na linhagem para expressão que possui cromossomicamente integrada uma cópia do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7 sob controle do promotor *lacUV5*. *E. coli* e o vetor pET possuem o gene que codifica o repressor que se liga ao promotor *lacUV5* impedindo a transcrição da RNA polimerase do bacteriófago T7. O IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) é um análogo de lactose que se liga ao repressor *lac* provocando uma modificação alostérica que determina o desligamento do repressor no promotor *lacUV5*. Assim, a T7 RNA polimerase será transcrita e promoverá a transcrição dos genes alvos que são clonados sob controle do promotor T7 (Figura 4).

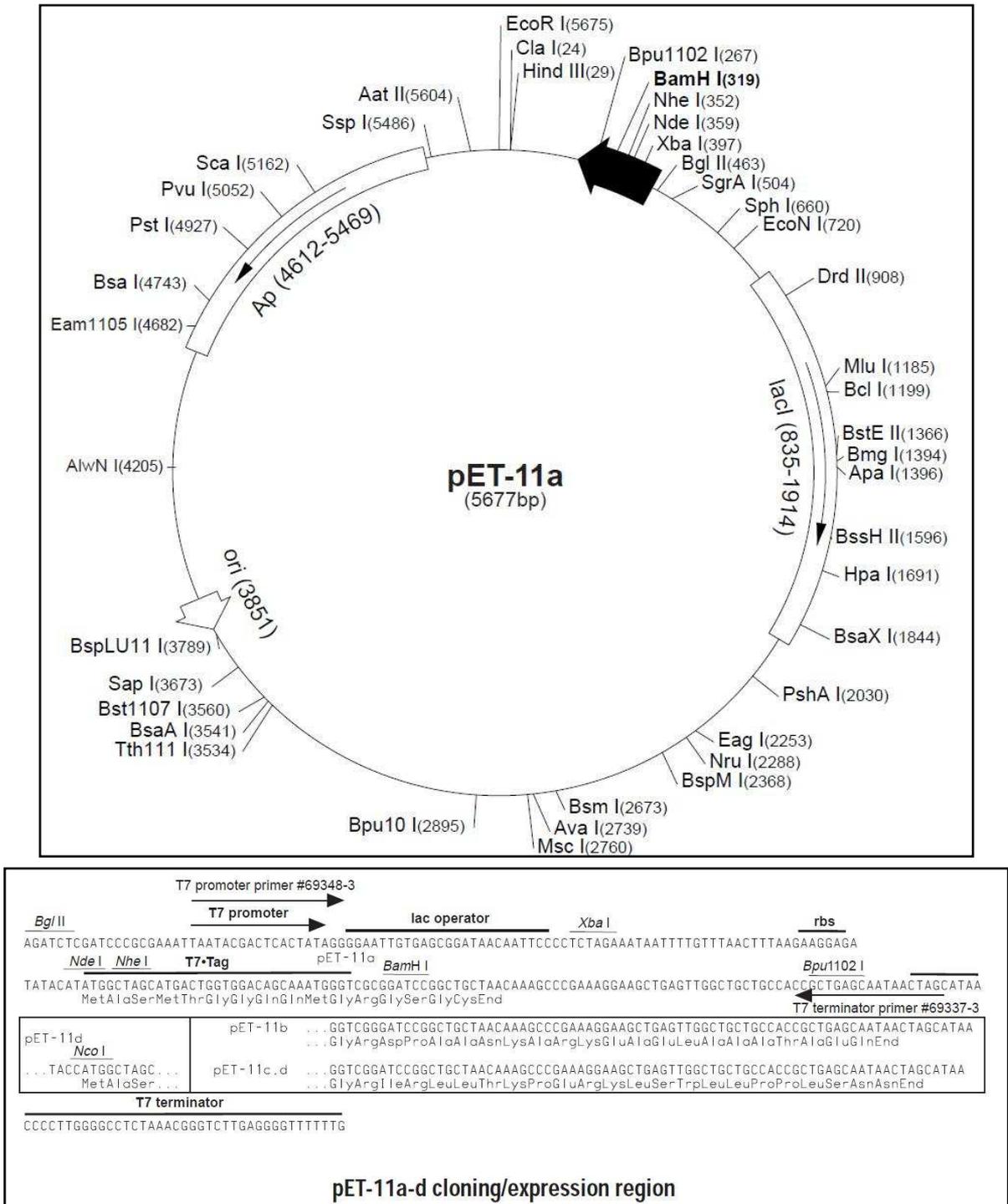


Figura 3 - Representação esquemática do vetor pET 11a. Mapa de restrição e principais regiões para clonagem e expressão no vetor pET11a (Novagen).

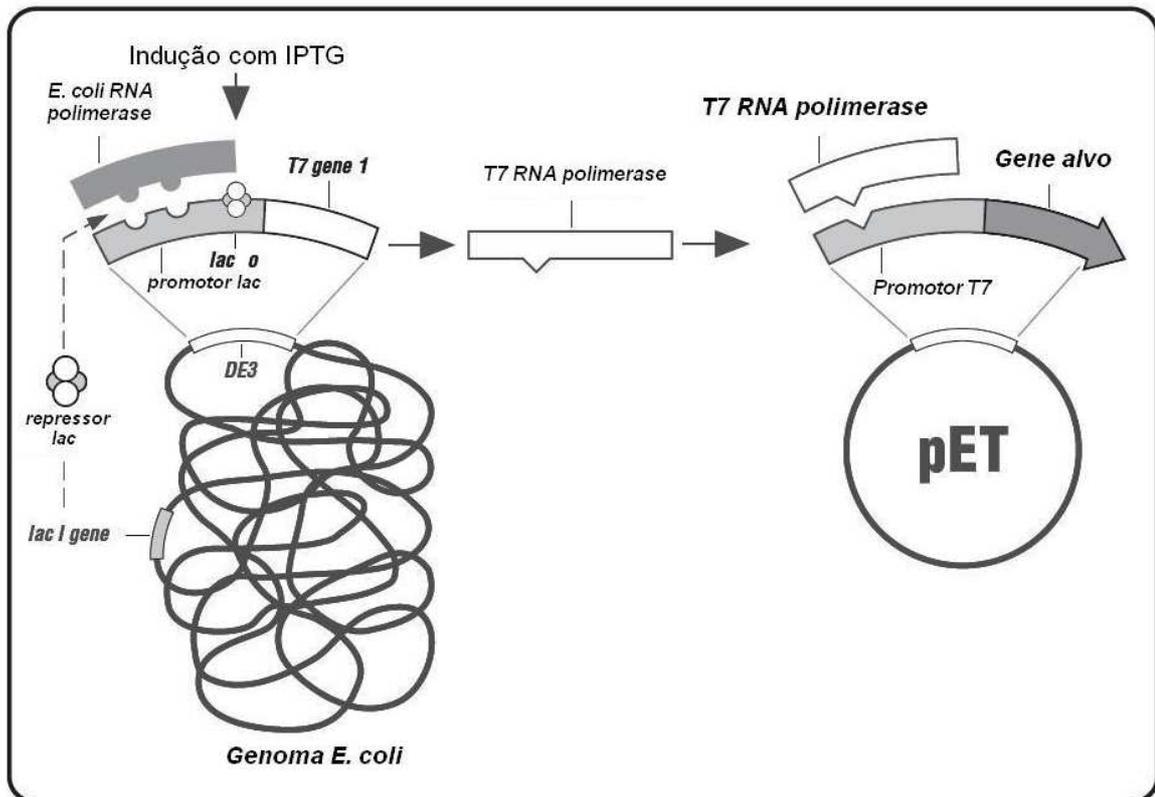


Figura 4 - Representação esquemática do sistema de expressão pET. A figura mostra a indução da transcrição do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7, que está sob controle do promotor *lacUV5*, após adição de IPTG ao meio de cultura. A partir desse momento, o gene alvo presente no plasmídeo pET11a, regulado pelo promotor T7, será expresso na célula hospedeira. (Adaptado de *pET System Manual* 11ª Edição - Novagen)

O plasmídeo pET11a (Novagen) foi digerido com a enzima *BamHI* (New England Biolabs) para sua linearização e posterior ligação do fragmento de DNA *βtox*. A digestão foi realizada de acordo com especificações do fabricante, com um volume final de 100 μL.

IV.2.6. Purificação do fragmento de DNA pET11a

A reação de digestão descrita no item anterior (IV.2.5) foi precipitada conforme protocolo descrito no item IV.2.4. Em seguida, foi realizada a purificação do fragmento correspondente ao vetor pET11a linearizado sob as mesmas condições descritas no item IV.2.4. A concentração e a pureza do produto purificado foi estimada através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.2.2.

IV.2.7. Ligação do fragmento de DNA *βtox* no vetor pET11a

Os produtos digeridos e purificados correspondentes ao inserto *βtox*, e ao vetor pET11a linearizado foram submetidos a reação de ligação. Foram realizadas 4 reações em que foi variada a quantidade de inserto. A enzima T4 DNA polimerase (Invitrogen) foi utilizada nessas reações que estão especificadas na tabela abaixo.

Tabela 1: Componentes das reações de ligação do inserto *βtox* no vetor pET11a

Material	Quantidade
Vetor pET11a (1µg/µL)	0,1 µl
Inserto <i>orf βtox</i> (1µg/µL)	0,3/0,5/0,8/1,0 µl
T4 DNA Ligase (10 U/µl)	1 µl
Tampão de ligação 2x	5 µl
Água ultra-pura estéril	3,6/3,4/3,1/2,9 µl
Volume final	10 µl

As reações foram deixadas à temperatura de 4°C durante 16 horas.

IV.2.8. Transformação do produto da ligação do fragmento de DNA *βtox* e vetor pET11a em *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente e seleção de transformantes

As reações de ligação descritas no item anterior (IV.2.7) foram colocadas em um microtubo de 0,6 mL e foram precipitadas com a adição de dois volumes de etanol absoluto e 10% de Acetato de Sódio. O microtubo foi então incubado por meia hora à -20° C e, após esse período, foi centrifugado a 4°C a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. O precipitado ficou em repouso para evaporação de resíduos do etanol 70% e, em seguida, foi ressuspenso em 10 µL de água ultra-pura estéril.

Os 10 µL de produto de ligação foram utilizados para transformar 100 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue, que foram confeccionadas conforme descrito no item IV.1.1. As células foram eletroporadas de acordo com o protocolo descrito no item IV.1.2 e foi realizado um controle negativo como especificado nesse mesmo item.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir alíquotas de 100 µL da cultura de 1 mL de meio LB líquido, incubada à 37° C por uma hora, para placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de clones recombinantes.

IV.3. Confirmação da subclonagem do fragmento de DNA *βtox* no vetor pET11a

IV.3.1. Extração do DNA plasmidiano pET11a: β tox de *E. coli* XL1-Blue em pequena escala

Para a confirmação da clonagem de parte da ORF codificante da toxina beta no vetor pET11a foi feita a extração de plasmídeos para a realização dos experimentos posteriores. Em microplacas de crescimento de cultura novas, foram adicionados 1,2 mL de meio LB caldo suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina em cada poço. Noventa e seis colônias selecionadas aleatoriamente foram inoculadas separadamente em cada poço e foram mantidas a 37° C por aproximadamente 18 horas sob agitação de 200 rpm. Após este período, foi feita uma placa de estoque com 100 μ L da cultura + 100 μ L de glicerol 50% por poço, sendo estas seladas com um adesivo e armazenadas a -80° C. Com o restante da cultura (1,1 mL) foi realizada a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina como descrito por Sambrook *et al* (1989) com algumas modificações.

As microplacas contendo as culturas foram centrifugadas por 6 minutos a 6.000xg. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 240 μ L de solução 1 (item IV.A). Os passos acima foram repetidos e foi adicionado 80 μ L de solução GET e a mistura foi homogenizada no vortex por 2 minutos. Toda a suspensão de células foi transferida para uma nova placa de polipropileno contendo 2,5 μ L de RNase A (10 mg/mL). Foi adicionado a cada poço 80 μ L de NaOH 0,2 N /SDS 1% (1 mL de NaOH 4M + 17 mL H₂O mili-Q + 2 mL de SDS 10%). A solução foi misturada por inversão 30 vezes e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos.

Após esse período, foram adicionados 80 μ L de acetato de potássio 3M, previamente resfriado, com mistura por inversão e, logo em seguida, foram feitas três incubações: à temperatura ambiente por 10 minutos, na estufa à 90°C por 30 minutos e no gelo por 10 minutos. Depois, a placa foi centrifugada por 9 minutos a 6.000xg e a fase aquosa foi transferida para placas milipore com filtro anexado a placas com fundo em V. As duas placas anexadas foram centrifugada por mais 6 minutos a 6.000xg. A placa milipore foi descartada e 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados ao filtrado contido na placa com fundo em V. Seguiu-se com centrifugação por 45 minutos a 6.000xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 200 μ L de álcool etílico 70% previamente resfriado e centrifugado por 15 minutos a 6.000xg. Foi adicionado a cada poço 60 μ L de água ultra pura estéril e o DNA plasmidiano ficou ressuspendendo durante 18 horas em temperatura ambiente.

A presença e qualidade dos plasmídeos foi verificada através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item IV.2.2.

IV.3.2. Verificação da presença e tamanho do inserto *βtox* no vetor pET11a

Os plasmídeos extraídos (item IV.3.1) foram submetidos à PCR em placa com os iniciadores T7 direto, que corresponde ao vetor, e o R1 TxB, que corresponde ao iniciador reverso do inserto (Figura 5). Os outros componentes necessários à reação (Tabela 2) foram adicionados para um volume final de 10 µL e foi realizado um controle negativo em que foi adicionado volume de água ultra-pura correspondente ao DNA molde.

INICIADOR T7 direto: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
INICIADOR R1 TxB: 5' GGA TCC AAT AGC TGT TAC TTT GTG A 3'

Figura 5 - Iniciadores do vetor e do inserto. Seqüência dos iniciadores utilizados na reação de PCR para confirmação da clonagem do inserto *βtox* no vetor pET11a.

Tabela 2: Componentes da PCR para verificação da clonagem

Componentes	Concentração	Volume
DNA molde	10 ng/ µL	1 µL
Iniciador direto	20 pmol/µL	0,2 µL
Iniciador reverso	20 pmol/µL	0,2 µL
Taq DNA polimerase (Phoneutria)	1 µL/5U	0,1 µL
Tampão Taq (Phoneutria)	10x	1 µL
dATP, dCTP, dGTP e dTTP	1mM	1 µL
H ₂ O miliQ	-	6,5 µL
	Volume final	10 µL

Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão da PCR foram realizados no termociclador *Mastercycle Gradient Eppendorf*. O programa utilizado está descrito na Tabela 3. Após a PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% em TAE e submetidas a eletroforese conforme descrito no item IV.2.2.

Tabela 3: Programa de PCR para verificação da clonagem do inserto *βtox*

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C (desnaturação)	3 minutos
2	94°C (desnaturação)	30 segundos
3	55°C (anelamento)	1 minuto
4	72°C (extensão)	1 minuto
5	Repetir o ciclo 5 vezes a partir do passo 2	
6	94°C (desnaturação)	30 segundos
7	50°C (anelamento)	1 minuto
8	72°C (extensão)	1 minuto
9	Repetir o ciclo 30 vezes a partir do passo 6	
10	72°C (extensão final)	5 minutos
11	4°C	∞

IV.3.3. Digestão com a enzima *BamHI* (New England Biolabs) da extração em baixa escala de plasmídeo dos possíveis clones obtidos

As colônias que apresentaram amplificação na reação de PCR descrita no item anterior foram submetidas à digestão com a enzima *BamHI* (New England Biolabs), conforme especificações do fabricante, para verificar se os transformantes possuíam o inserto clonado em correta matriz de leitura para a expressão protéica. Alguns dos possíveis clones que liberaram o inserto foram submetidos ao seqüenciamento para verificar a integridade da seqüência nucleotídica do inserto *βtox*.

IV.3.4. Reação de seqüenciamento e análises *in silico*

A integridade da seqüência nucleotídica do inserto *βtox* clonado no vetor pET11a foi confirmada através de seqüenciamento automático (Sanger *et al.*, 1977). Neste sistema de seqüenciamento há uma marcação fluorescente na extremidade 3' do nucleotídeo de terminação, com cada cor correspondendo a um dideoxinucleotídeo específico (ddGTP, ddATP, ddTTP e ddCTP). O sistema de seqüenciamento utiliza 4 fluoró cromos diferentes, ou seja, com emissões em diferentes comprimentos de onda correspondendo às cores: azul, vermelho, amarelo, verde. No seqüenciador automático é realizada a eletroforese capilar e leitura das fluorescências emitidas.

Para a realização da reação de seqüenciamento utilizou-se 200 ng de plasmídeo pET11a: β tox; 0,3 μ L de BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems); 1,6 pmol de um iniciador do plasmídeo pET11a - T7 direto ou T7 reverso (Figura 6); 1,77 μ L de tampão de seqüenciamento BigDye Terminator v1.1, v3.1 (Applied Biosystems) e água ultra-pura estéril suficiente para completar 10 μ L de reação. Essa reação foi então levada para o termociclador *Mastercycle Gradient Eppendorf* onde foi utilizado o programa padronizado para o seqüenciador 3130 *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystem* (Tabela 4).

INICIADOR T7 direto: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

INICIADOR T7 reverso: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

Figura 6 - Iniciadores T7 do vetor pET11a. Seqüência dos iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento do inserto β tox.

Tabela 4: Programa de PCR para seqüenciamento do inserto β tox

Passo	Temperatura	Tempo
1	96°C	2 minutos
2	96°C	30 segundos
3	Rampa	1°C/seg.
4	50°C	15 segundos
5	Rampa	1°C/seg.
6	60°C	4 minutos
7	Repetir o ciclo 44 vezes a partir do passo 1	
8	4°C	∞

O produto de amplificação foi então precipitado com 40 μ L de isopropanol 65%, deixado 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 16.000xg por 25 minutos a 25°C. O isopropanol foi então removido e lavou-se o pellet com 300 μ L de etanol 60%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16.000xg por 5 minutos e deixados secar a temperatura ambiente para a eliminação de qualquer resíduo de etanol 60%. Os microtubos foram guardados no freezer a -20°C. Esse precipitado foi, então, encaminhado para o seqüenciamento no *ABI 3130 Genetic Analyzer*.

As seqüências de DNA obtidas através do sequenciamento foram então analisadas utilizando-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no NCBI (National Center for Bio**te**chnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a comparação

entre seqüências de ácidos nucleicos utilizou-se o programa “BLASTn” e para a comparação entre proteínas o “BLASTx”.

As etapas posteriores consistiram em expressão do fragmento βtox . Para tanto, é necessário a transformação do plasmídeo pET11a: βtox em bactéria para expressão.

IV.4. Expressão da toxina beta recombinante

IV.4.1. Confeção de células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 DE3

Foi realizada a confecção de células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 DE3 de acordo com o protocolo descrito no item IV.1.1. A análise da eficiência de transformação foi realizada conforme descrito nesse mesmo item. Foram obtidas $9,3 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA.

IV.4.2. Transformação de *E. coli* BL21 DE3 com o plasmídeo pET11a: βtox e seleção dos transformantes

Uma alíquota contendo 100 ng do plasmídeo pET11a: βtox , que foi confirmado como portador da ORF βtox através do sequenciamento (item IV.3.4), foi utilizada para transformar as células de *E. coli* BL21DE3. O processo de transformação foi realizado de acordo com os parâmetros descritos no item IV.1.2, assim como a seleção dos transformantes.

IV.4.3. Expressão piloto da toxina beta recombinante

Uma colônia dos clones obtidos conforme descrito no item anterior (item IV.4.2), foi inoculada em 1 mL de meio LB-caldo suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e a cultura foi incubada 16 horas à 37°C sob agitação de 200 rpm. Cem microlitros dessa cultura foram adicionado a 10 mL de LB-caldo suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Essa cultura foi incubada à 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir $\text{DO}_{600} = 0,5$. Nesse momento foi feita a indução da expressão com IPTG na concentração final de 0,6 mM. Uma alíquota de 500 μL foi retirada após 4 horas de indução. Após ser centrifugada a 16.000xg, essa alíquota foi ressuspensa em 50 μL de tampão de amostra para SDS-PAGE (vide item IV.A) e foi fervida por 5 minutos. Paralelamente, foi realizado um controle negativo da expressão que consistia na expressão do plasmídeo pET11a sem inserto em *E. coli* BL21 DE3. As expressões dos transformantes portadores da ORF βtox foram submetidas à eletroforese

em gel SDS-PAGE 12% e comparados com o padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas e com o controle negativo da expressão.

IV.4.4. SDS-PAGE da expressão piloto da toxina beta recombinante

A expressão piloto da toxina beta recombinante foi verificada e comparada com o controle negativo da expressão e com o padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970).

O gel de separação possui a seguinte composição: 4,0 mL solução A (vide item IV.A) para gel SDS-PAGE, 2,5 mL solução B (vide item IV.A) para gel SDS-PAGE, 3,35 mL H₂O destilada, 100 µL SDS 10%, 70 µL PSA 10% e 7 µL de TEMED (N'-N'-N'-N'-tetra metilenodiamina). O gel de concentração possui a seguinte composição: 1,3 mL solução A (vide item IV.A) para gel SDS-PAGE, 2,5 mL solução C (vide item IV.A) para gel SDS-PAGE, 6,1 mL H₂O destilada, 100 µL SDS 10%, 70 µL PSA 10% e 14 µL de TEMED. A eletroforese foi desenvolvida verticalmente em tampão Tris-glicina (vide item IV.A), em placas de dimensão 10,0 x 8,0 x 0,8cm, à 100V, 24 mA, durante 2,5 horas.

Após eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Comassie Blue por 45 minutos e lavados em solução descorante (vide item IV.A) até o desaparecimento da coloração de fundo.

IV.4.5. Expressão em larga escala da toxina beta recombinante e lise celular

Uma colônia do clone positivo, cuja eficiência de expressão foi verificada na expressão-piloto, foi inoculada em 20 mL de meio LB caldo suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubada à 37°C, durante 18 horas sob agitação. Essa cultura foi adicionada a 1.000 mL de LB-caldo suplementado com ampicilina na mesma concentração. Esse inóculo foi incubado à 37°C sob agitação até atingir DO₆₀₀= 0,5. Nesse momento, foi feita a indução do sistema de expressão com a adição do IPTG com concentração final de 0,6 mM.

Após 4 horas de indução da expressão, a cultura foi acondicionada em gelo para resfriamento. Logo após, a cultura foi centrifugada à 4°C, 6.000xg por 20 minutos, e o precipitado ressuspenso em 40 mL de tampão de lise (vide item IV.A) para lavagem das células. Após nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, o precipitado foi ressuspenso em 30 mL do mesmo tampão e acrescentou-se lisozima na concentração final de 4 mg/mL. As células foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e foram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento em gelo seco para lise das

células. O lisado celular foi sonicado usando seis pulsos de 10 segundos a 40% de amplitude. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 6.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado à -20°C. O precipitado foi ressuspensão em 5 mL de tampão de lise e foi novamente sonicado de acordo com os parâmetros citados anteriormente. Seguiu-se com a centrifugação 6.000xg por 15 minutos a 4°C. Repetiu-se esse processo de ressuspensão, sonicação, centrifugação e congelamento do sobrenadante por mais três vezes. Por fim, o precipitado final foi ressuspensão em 1 mL de tampão de lise.

50 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE foi adicionado a 50 µL de cada sobrenadante obtido após a centrifugação e a 50 µL do precipitado final para visualização da qualidade da expressão e da purificação através de SDS-PAGE.

IV.4.6. SDS-PAGE da expressão em larga escala da toxina beta recombinante

Os sobrenadantes obtidos e o precipitado final foram submetidos à SDS-PAGE, conforme parâmetros descritos no item IV.4.4, juntamente com os sobrenadantes e o precipitado final do controle negativo da expressão - pET 11a sem inserto em *E. coli* BL21DE3 - e com o padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas. O gel de concentração tinha a concentração de 4% e o gel de separação 18%.

IV.5. Análise da produção e das propriedades farmacológicas da toxina beta recombinante

IV.5.1. Quantificação protéica da expressão da toxina beta recombinante

As quantificações da toxina beta recombinante (fração solúvel e insolúvel), da toxina beta nativa e do precipitado resultante da expressão do plasmídeo pET11a sem inserto (controle negativo da expressão) foram realizadas através do método de Bradford (1976).

Foi utilizada uma microplaca de 96 poços. A primeira coluna é o branco (sem proteínas) e a segunda é o padrão (albumina sérica bovina – BSA). Na primeira coluna, foi adicionado em todos os poços 20 µl de tampão de lise (vide item IV.A), no qual as outras amostras que foram dosadas estavam diluídas. Na segunda coluna, foi adicionado o padrão em duplicata, que é a solução de BSA 1 mg/mL diluída 1:10, de acordo com o seguinte protocolo:

- 5 µl de padrão + 15 µl de tampão de lise (0,5 µg)
- 10 µl de padrão + 10 µl de tampão de lise (1,0 µg)
- 15 µl de padrão + 5 µl de tampão de lise (1,5 µg)

- 20 µl de padrão (2,0 µg)

O mesmo procedimento foi realizado com as amostras de interesse, em que foram feitas diluições seriadas em duplicata das quatro amostras nas quatro colunas subseqüentes, sempre mantendo o volume final de amostra de 20 µl. Foi acrescentado a todos os poços 180 µl de Reagente de Bradford (Sigma). O valor de absorbância foi obtido através do leitor de microplacas "Titertek Multiscan plate spectrophotometer" utilizando o comprimento de onda de 600 nm.

Com os valores obtidos do padrão, foi feita uma curva no Excel usando regressão linear. Com a equação da reta obtida, foi calculada a quantidade de proteína de cada amostra e sua concentração. Foram usadas somente as absorbâncias das diluições que se encontravam dentro do limite mínimo e máximo imposto pela curva padrão. Como a equação da reta é dada por $y = Bx + A$, então, $x = (y - A)/B$. O valor correspondente a y é a absorbância e a x é a quantidade de proteína.

IV.5.2. Ensaio de letalidade da toxina beta recombinante

Para a análise das propriedades farmacológicas da toxina beta recombinante foi realizado teste de letalidade em camundongos. Foram utilizados camundongos da raça Swiss, linhagem Webster, pesando entre 17 a 20 gramas cada um. Dezesesseis camundongos foram separados em quatro grupos. Um grupo era o controle negativo em que foi administrada apenas salina; um grupo era o controle positivo em que foi administrada toxina épsilon recombinante obtida com igual metodologia utilizada para a toxina beta recombinante para o controle da manipulação; um grupo teste em que foi verificada a funcionalidade da toxina beta recombinante da fração solúvel da expressão e um grupo teste em que foi verificada a funcionalidade da toxina beta recombinante da fração insolúvel da expressão.

Nos grupos testes e no controle positivo foram administradas doses de 160 µg/Kg de toxina recombinante por via subcutânea. Essa é a dose máxima descrita como DL_{50} para toxinas beta recombinantes (Shatursky *et al.*, 2000; Sakurai e Fujii, 1987). Os resultados foram observados até 72 horas após a inoculação das toxinas.

IV.6. Caracterização imunológica da toxina beta recombinante

IV.6.1. Western blotting para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa

A toxina beta recombinante foi submetida a procedimentos de imunodeteção por Western blotting para verificar se há similaridade antigênica em relação à toxina nativa. Esse experimento almejava demonstrar se os anticorpos produzidos a partir da toxina nativa reconheciam a toxina recombinante. Foi feito um controle negativo em que se utilizou o precipitado resultante da expressão do vetor pET 11a sem inserto e um controle positivo com a toxina nativa. Comparou-se tanto a fração solúvel quanto a fração insolúvel da toxina beta recombinante em relação aos controles.

As quatro amostras de proteínas citadas foram fracionadas por SDS-PAGE, conforme parâmetros descritos no item IV.4.4. As membranas de PVDF (Invitrogen) foram re-hidratadas em metanol 100% e, posteriormente, juntamente com os géis e os papéis de filtro, foram mergulhados na solução de transferência (vide item IV.A). As amostras foram transferidas do gel de SDS-PAGE para a membrana de PVDF em cuba de transferência sob voltagem constante de 100 V, 350 mA por 1 hora mantendo-se a cuba à 4°C.

As ligações a sítios não específicos foram bloqueadas por 1h em PBS contendo 0,3% de Tween 20 (PBST 0,3%). As membranas de PVDF foram lavadas três vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST 0,05%) e incubadas por uma hora e meia em temperatura ambiente sob agitação com o soro imune contendo anticorpos anti-beta nativa de coelho. Três lavagens com PBST 0,05% foram feitas e então o conjugado foi acrescentado na diluição adequada em PBS 1x. A membrana foi incubada por uma hora a temperatura ambiente sob agitação.

Após três lavagens com PBST 0,05% e duas lavagens com PBS 1x a reação foi revelada pela adição do substrato da peroxidase contendo 0,5 mg/mL de diaminobenzidine, 0,25 mg/mL de 4-cloronaftol, 8% de metanol e 0,042% de H₂O₂ 30% ou 0,3 mg/mL de 4-cloronaftol, 20% de metanol e 75 µl de H₂O₂ 30% em PBS 1x.

IV.6.2. ELISA para verificação da imunogenicidade da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa

V.6.2.1 Produção de soro antitoxina beta recombinante

Para verificar se a toxina beta recombinante era imunogênica foi realizado ensaio de imunização de coelhos. Neste experimento, foram utilizados coelhos machos da raça Nova Zelândia pesando aproximadamente 2 Kg e com cerca de 4 meses. Antes da primeira dose de imunógeno, foi feita uma sangria para obtenção do soro controle pré-imune. Após a coleta do soro, cada coelho recebeu uma dose de 150 µg de toxina beta recombinante fração insolúvel ressuspensa em adjuvante completo de Freund's (Sigma). A mistura foi

homogeneizada até apresentar uma grande consistência. As injeções foram aplicadas por via subcutânea em 4 pontos diferentes em uma área depilada do dorso dos animais.

O primeiro reforço foi realizado 15 dias após a primeira imunização seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da substituição do adjuvante completo de Freund's pelo incompleto. O segundo reforço e os subseqüentes foram realizados em intervalos de 7 dias, totalizando 4 reforços e 5 doses. Foram realizadas sangrias após o 2º, 3º e 4º reforços (3º, 4º e 5º doses) para caracterização dos soros por ELISA. Paralelamente, foi realizada na Escola de Veterinária da UFMG a produção de anticorpos contra a fração solúvel da toxina beta recombinante e o soro também foi caracterizado por ELISA.

V.6.2.2. Análise da reatividade dos anticorpos anti-beta recombinante contra a toxina nativa e titulação dos soros dos animais

Os soros imunes obtidos com a imunização de coelhos foram submetidos ao ELISA para verificar se a toxina beta recombinante é imunogênica e se os anticorpos produzidos apresentavam reatividade contra a toxina nativa com boa titulação. Todas as amostras foram feitas em duplicata. Foi feito um controle negativo em que se utilizou o soro pré-imune e um controle positivo em que a microplaca foi sensibilizada com a toxina recombinante.

A microplaca foi sensibilizada por 16 horas a 4°C com 0,5 µg por poço de toxina beta nativa ou toxina beta recombinante (no caso do controle positivo) diluídas em tampão carbonato. A placa foi então lavada 2 vezes com solução de lavagem (vide item IV.A). Em seguida, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora com solução de bloqueio (vide item IV.A). Após lavar a placa 2 vezes com solução de lavagem, ela foi incubada com diluições (1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1.600; 1:3.200; 1:6.400; 1:12.800) de soro imune e soro pré-imune (no caso do controle negativo) dos coelhos por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada 6 vezes com solução de lavagem e incubada por 1 hora a 37°C com o conjugado anti-IgG de coelho peroxidase diluído 1:10.000 em tampão de incubação.

Ao final, a placa foi novamente lavada 6 vezes e foram adicionados 100 µl em cada poço de solução substrato composta de 2 mg de OPD, 2 µl de H₂O₂ e 10 mL de tampão citrato (vide item IV.A). A placa foi deixada 15-20 minutos no escuro e a reação foi interrompida com 20 µl/poço de H₂SO₄ diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 492 nm no aparelho "Titertek Multiscan plate spectrophotometer".

V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. Considerações iniciais

As doenças causadas por bactérias do gênero *Clostridium* levam a perdas consideráveis no rebanho, uma vez que o tratamento, na maioria dos casos, é impraticável devido à rápida evolução das doenças. Além disso, a erradicação das clostridioses é praticamente impossível. As características ecológicas do agente e a sua forma esporulada de resistência, aliado aos outros fatores que levam as doenças, são impossíveis de serem totalmente controlados e eliminados (Lobato e Assis, 2000).

No Brasil, a pecuária apresenta grande importância econômica para o consumo interno e para exportação (IBGE, 2010; MDIC, 2010; USDA, 2010). Portanto, o país é um dos principais mercados consumidores de vacinas contra clostridioses do mundo. O Instituto Biológico publicou em 1995 uma pesquisa sobre o índice de bactérias presentes nos quadros de clostridioses do país em que o *Clostridium perfringens* aparece com uma frequência maior que 66,1% (Baldassi *et al.*, 1995). A utilização de antibióticos na ração animal proporcionou uma diminuição dos surtos de clostridioses em todo o mundo, mas o seu uso indiscriminado como promotores de crescimento foi relacionado com o aumento de surtos provocados por linhagens resistentes, incluindo linhagens de *C. perfringens* (Johansson *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2004). Como essa espécie é a principal responsável por quadros de enterotoxemias causadas por clostrídios que acometem animais e humanos, a vacina contra essa enfermidade é indispensável para a pecuária brasileira.

A partir da década de 1980, a produção intensiva de conhecimentos científicos mundiais na área da biotecnologia e os vultosos investimentos realizados pelos governos dos países desenvolvidos - incrementados pela crescente intervenção de laboratórios transnacionais - vêm propiciando a produção de novas vacinas mais complexas tecnologicamente, que apresentam, assim, alto valor agregado. Essas vacinas apresentam custos mais elevados devido à pesquisa e desenvolvimento necessários, mas são mais eficazes e menos reatogênicas, atendendo a normas de controle internacionais de qualidade (Davis *et al.*, 2002). Esses novos produtos, com alto valor agregado, propiciam preços elevados e, em consequência, lucros também ampliados, despertando a atenção de grandes transnacionais que estão se organizando em poucos conglomerados, o que torna o mercado de vacinas altamente oligopolizado (Homma *et al.*, 2003).

O Brasil possui longa tradição de produção pública de vacinas, mas, ao longo dos anos, por vários motivos, as instituições produtoras entraram em decadência e tiveram seu processo de desenvolvimento tecnológico estagnado. Assim, essas instituições perderam a competitividade tecnológica e ficaram praticamente inoperantes permitindo que houvesse a intervenção de multinacionais nesse setor. Em meados da década de 1980, o Ministério da

Saúde, preocupado com a qualidade das vacinas humanas nacionais, solicitou o fortalecimento das atividades de controle de qualidade dessas vacinas. Então, um grande laboratório multinacional, que detinha 80% do mercado nacional de soros e vacinas, abandonou de forma repentina essa linha de produção, o que sugere que a maior qualidade implicava em maiores custos e investimentos que, muitas vezes, não correspondem aos interesses desse laboratório. Diante disso, o governo federal resolveu intervir na área, devido à grande importância e especificidade dos soros e vacinas requeridos no país (Homma *et al.*, 2003).

A iniciativa privada não realiza desenvolvimento tecnológico e inovação no setor de vacinas, devido ao longo período requerido e aos altos investimentos de risco dispendidos na pesquisa e produção desse setor. Por isso, é necessário que o governo apóie financeiramente, de forma total ou parcial, para que haja desenvolvimento nessa área (Gregersen, 1997). Por questões de necessidade, são os laboratórios produtores que vêm liderando as atividades de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação Tecnológica em vacinas no Brasil. Nesse caso, em que se procura incorporar a tecnologia rapidamente, a solução tem sido buscar transferência tecnológica. Dessa forma, a Bio-Manguinhos incorporou de transnacionais a tecnologia de produção de várias vacinas humanas através de acordos firmados para a transferência de tecnologia (Homma *et al.*, 2003).

Nos países desenvolvidos o governo apóia de forma direta e sistemática os projetos de desenvolvimento tecnológico, tanto nos institutos governamentais de pesquisa como em universidades e laboratórios privados (Foulkes *et al.*, 2002). Além disso, nesses países existem milhares de empresas de biotecnologia voltadas para a saúde humana e animal e que investigam novas moléculas, fazem clonagem e expressão de antígenos de interesse, estudam novos adjuvantes, formulações, formas de aplicação e desenhos de vacinas (Homma *et al.*, 2003). Esses laboratórios são a sustentação tecnológica das grandes multinacionais, incrementando o setor terciário desses países. Assim, o cenário internacional mostra-se susceptível ao desenvolvimento de novas vacinas, tanto para substituir as atuais que apresentam problemas de reatogenicidade ou eficácia reduzida, como de outras inexistentes (Homma, 1999).

Como o governo brasileiro possui outras prioridades para aplicação dos seus recursos financeiros, observa-se que a produção de vacinas de interesse para a pecuária é dominada por transnacionais. Essas empresas, que produzem as mesmas vacinas para países desenvolvidos dentro de rigorosas normas internacionais de controle de qualidade, paradoxalmente, produzem vacinas no Brasil de qualidade duvidosa. Atualmente, como não há controle oficial que ateste a qualidade das vacinas clostridiais nacionais quanto à sua inocuidade, sua esterilidade e potência de todos os seus antígenos, vários trabalhos

constataram a baixa qualidade dessas vacinas (Lobato *et al.*, 1994; Azevedo *et al.*, 1998; Balsamão *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2004; Lobato *et al.*, 2008). Azevedo e colaboradores em 1998 e Lobato e colaboradores em 2000 demonstraram a ineficiência das vacinas nacionais disponíveis no mercado contra enterotoxemias. Além disso, de acordo com a literatura, nenhuma vacina é produzida especificamente para prevenir enterotoxemia em caprinos, sendo as desenvolvidas para ovinos utilizadas em caprinos (Uzal e Kelly, 1996). De acordo com Uzal e colaboradores (1998), os caprinos apresentam títulos de anticorpos menores e menos persistentes.

Todos esses dados ressaltam a importância e urgência de mais pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas nacionais contra enterotoxemias para aves, bovinos, caprinos e ovinos. A produção de vacinas com métodos tradicionais é bastante dispendiosa e trabalhosa. Os processos complexos de purificação e cultivo dos microorganismos envolvem uma metodologia demorada e que podem não gerar resultados homogêneos. As vacinas recombinantes representam uma nova geração de vacinas em que há uma melhor relação custo/benefício em que a qualidade é priorizada. Elas apresentam resultados mais precisos, puros e homogêneos do que as tecnologias empregadas tradicionalmente. Atualmente, no mercado veterinário já estão disponíveis vacinas recombinantes para cães, gatos, cavalos, bovinos e animais silvestres, protegendo-os contra as principais doenças infecciosas (<http://www.merial.com.br/>).

Diante desse contexto, nosso grupo de pesquisa realiza projetos que possuem como objetivo principal o desenvolvimento de uma vacina recombinante polivalente contra enterotoxemias provocadas por *Clostridium perfringens*. O primeiro trabalho realizado com essa proposta teve como objetivo a “Clonagem e expressão do gene da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D e sua aplicação na imunização de animais”. Continuando nessa linha de pesquisa, o presente trabalho teve como objetivo a “Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B e sua aplicação na imunização de animais”. Para tanto, o primeiro passo consistiu em clonagem de parte da ORF codificante da toxina beta, isolada e amplificada através da técnica de PCR, no vetor pCR2.1-TOPO da Invitrogen. Esse fragmento correspondente à parte da ORF de interesse foi nomeado de β tox, assim, o plasmídeo construído recebeu a denominação de pTP: β tox.

V.2. Propagação *in vivo* do plasmídeo pTP: β tox

O plasmídeo pTP: β tox foi previamente construído pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis e encontrava-se ressuspenso em água ultra-pura estéril. Esse plasmídeo é o inserto correspondente a parte da ORF codificante da toxina beta de *Clostridium perfringens*

tipo B clonado no vetor pCR2.1-TOPO da Invitrogen. A clonagem do inserto no sistema TOPO almejou inserir adaptadores flanqueando a seqüência nucleotídica de interesse para a subclonagem no vetor de expressão. Esses adaptadores foram inseridos através dos iniciadores desenhados para a PCR, utilizada para isolamento e amplificação de parte da ORF codificante da toxina beta, e correspondem a seqüências que são reconhecidas pela endonuclease de restrição *BamH* I. Os fragmentos de DNA obtidos como produtos da PCR, denominados de β tox, foram clonados no sistema pCR2.1-TOPO gerando, assim, o plasmídeo intermediário pTP: β tox. A digestão enzimática do plasmídeo pTP: β tox e do vetor de expressão pET11a com a enzima de restrição *BamH* I expõe pontas coesivas complementares que aumentam a taxa de eficiência da clonagem quando comparado com as pontas cegas.

Para a propagação *in vivo* do plasmídeo pTP: β tox, foi realizada a transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL1-Blue com essa construção genética. A alta taxa de eficiência de eletrotransformação dessas bactérias eletrocompetentes foi calculada através de teste com o plasmídeo pUC18, utilizado como referência. Obteve-se $7,8 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA plasmidiano. Várias colônias de transformantes pTP: β tox foram obtidas como resultado dessa boa taxa de eficiência. Duas dessas colônias de transformantes foram submetidas à extração em baixa escala de plasmídeo por lise alcalina para a realização dos experimentos posteriores.

V.3. Subclonagem do fragmento β tox no vetor pET11a (Novagen)

A escolha pelo sistema de expressão pET baseou-se nas várias características vantajosas apresentadas por ele. Entre elas, destaca-se o veículo bacteriano de clonagem e expressão. *Escherichia coli* é uma bactéria intensamente utilizada com sucesso para expressão heteróloga de proteínas, apresentando um grande número de ferramentas genéticas disponíveis, além da grande facilidade de manipulação genética e microbiológica a baixos custos (Makrides, 1996; Villaverde e Currió, 2003; Chou, 2007). A linhagem BL21DE3 foi escolhida devido à sua deficiência em dois genes de proteases citoplasmáticas e por ser amplamente utilizada apresentando ótimos resultados em diferentes trabalhos (Liu e Pan, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Para maximizar a produção de proteínas, foi utilizada a linhagem mutante BL21 C41 (DE3). Esse mutante, juntamente com o BL21 C43 (DE3), apresentam alta taxa de transformação diante de diferentes plasmídeos. Além disso, durante o cultivo bacteriano, esses mutantes alcançam alta taxa de densidade de saturação celular com produção de proteínas em níveis elevados

e sem efeitos tóxicos para a bactéria, apresentando-se, assim, mais eficientes para expressão heteróloga de diferentes proteínas (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004).

Além disso, os vetores da série pET são bastante utilizados devido à sua grande versatilidade ao proporcionar diferentes estratégias de produção de proteínas (Villaverde e Currió, 2003; Sorensen e Mortensen, 2005a). Muitas publicações descrevem o sucesso da utilização desses sistemas de expressão, inclusive, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa também apresentaram bons resultados utilizando o vetor pET11a (Araújo, 2005; Dornelas, 2007; Mendes, 2007). Em um dos mais recentes trabalhos do nosso grupo de pesquisa, Souza e colaboradores em 2010 publicaram a clonagem e expressão da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D utilizando o sistema de expressão pET11a em *E.coli* BL21 DE3. Diante dos bons resultados alcançados, a clonagem de parte da ORF da toxina beta utilizando esse sistema de expressão apresentou-se como uma alternativa promissora para a obtenção da toxina beta recombinante, já que essas toxinas são produzidas pela mesma espécie de microorganismo.

Após a verificação do bom rendimento da extração em baixa escala do plasmídeo pTP: β tox, conforme pode ser observado na figura 7, seguiu-se com a reação de digestão enzimática com a enzima *BamH* I para liberação do fragmento β tox e para linearização do vetor pET11a. A figura 8 mostra a foto do resultado da eletroforese em gel de agarose que contém alíquotas dos produtos de digestão enzimática dos dois vetores. Após a constatação da completa digestão enzimática, foi realizada com sucesso a purificação dos fragmentos de DNA de interesse (dados não mostrados). O vetor linearizado e o inserto purificados, ambos com pontas coesivas complementares, foram, então, submetidos a reações de ligação. Foram realizadas 4 reações em que foi variada a quantidade de inserto para aumentar a probabilidade de ligação dos dois fragmentos de interesse.

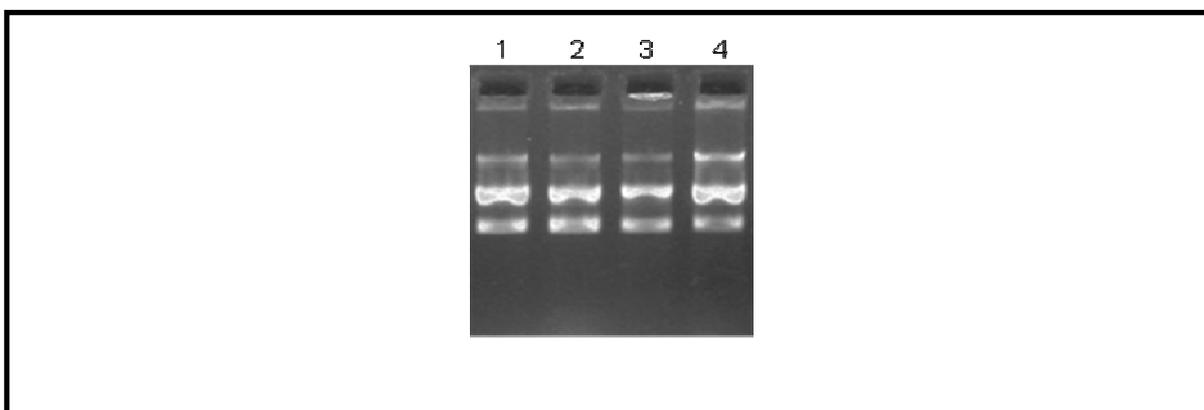


Figura 7 - Extração de plasmídeos pTP: β tox de *E. coli* XL1-Blue em pequena escala. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaletas 1 e 2: clone 1. Canaletas 3 e 4: clone 2.

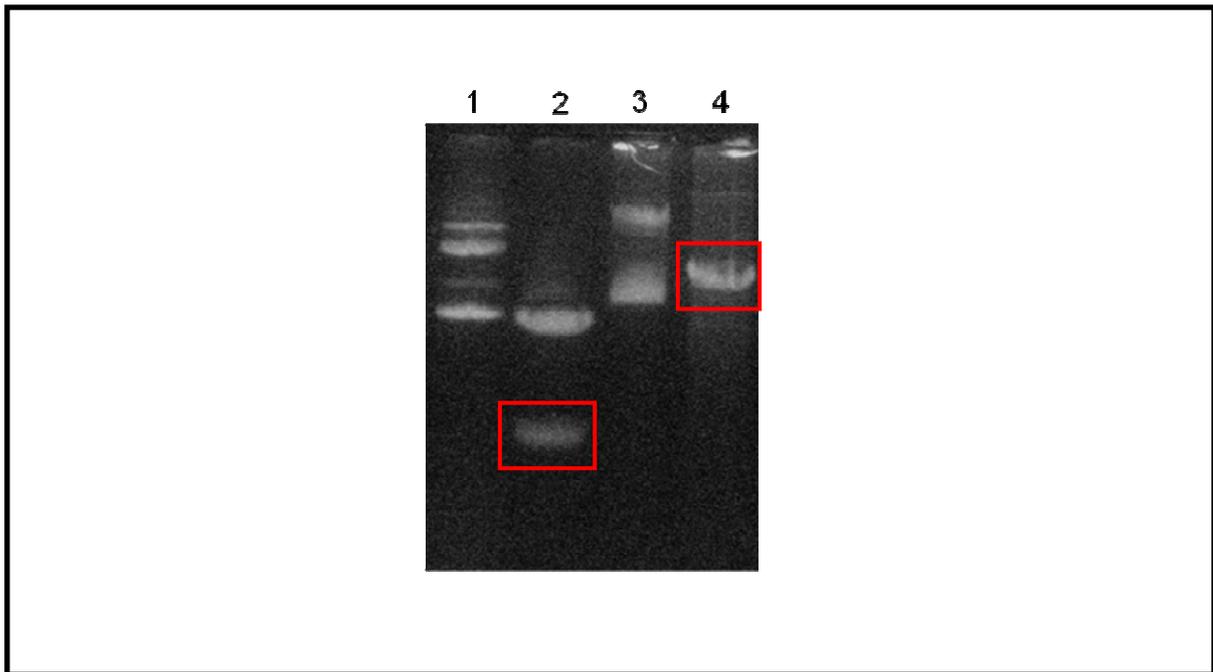


Figura 8 - Digestão enzimática dos plasmídeos pTP: β tox e pET11a. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: plasmídeo pTP: β tox não digerido. Canaleta 2: produto da reação de digestão do plasmídeo pTP: β tox. Canaleta 3: vetor pET11a não digerido. Canaleta 4: produto da reação de digestão do plasmídeo pET11a. Em vermelho, estão os fragmentos de interesse para a subclonagem: provável inserto β tox na canaleta 2 e vetor pET11a linearizado na canaleta 4.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue para seleção e propagação *in vivo* da construção de interesse pET11a: β tox. Foram obtidas várias colônias de transformantes e nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, que foi realizado para controle de contaminação do processo de eletroporação e seleção de transformantes. Dessa maneira, foi verificado que houve uma boa taxa de transformação sem contaminações.

Dessas colônias obtidas, 96 foram escolhidas aleatoriamente e foram submetidas à extração de plasmídeos em pequena escala por lise alcalina para a busca de transformantes que apresentassem parte da ORF codificante da toxina beta (fragmento β tox) clonada em correta matriz de leitura e com integridade da seqüência nucleotídica. Foi utilizado o protocolo de extração de plasmídeos em microplaca para maior rapidez do processo, pois ele permite a análise de vários plasmídeos concomitantemente. Alíquotas das culturas bacterianas crescidas para a extração de plasmídeos foram estocadas em glicerol a -70°C , garantindo a preservação de cada possível clone. Amostras da extração dos plasmídeos foram escolhidas aleatoriamente para verificação da qualidade da extração através de

eletroforese. A Figura 9 mostra a foto dessa eletroforese demonstrando que a qualidade da extração foi satisfatória.

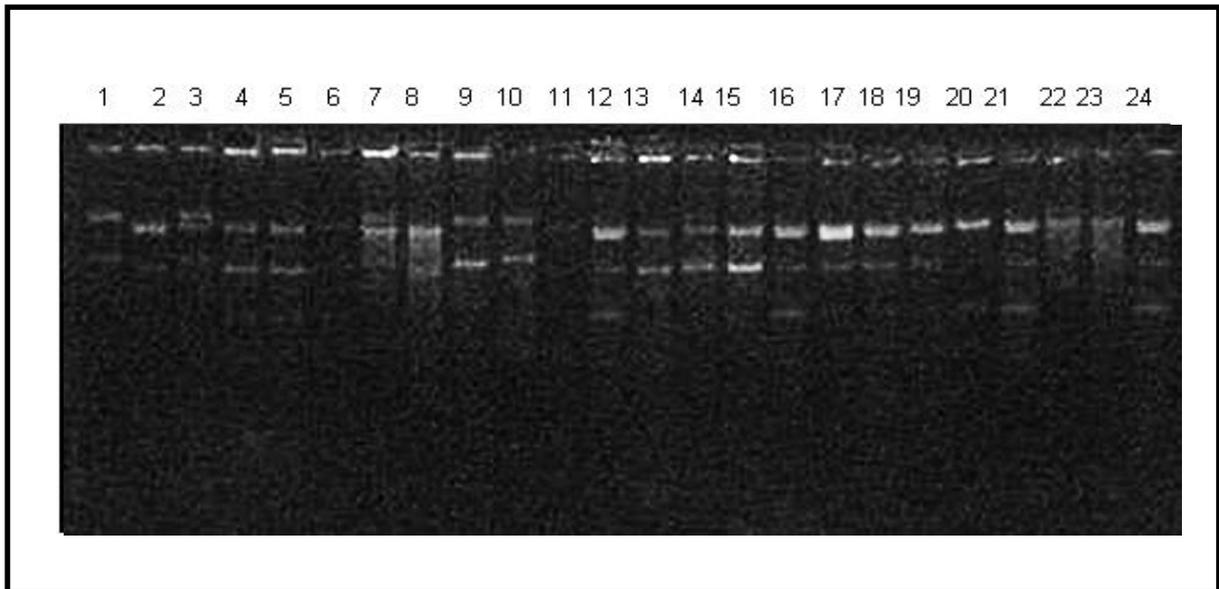


Figura 9 - Extração em pequena escala dos plasmídeos de *E. coli* XL1-Blue que foram submetidas a transformação com o produto da ligação do vetor pET11a com o inserto β tox. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaletas 1 a 24: alíquotas dos plasmídeos de 24 diferentes colônias de transformantes escolhidos aleatoriamente entre as 96 extrações de plasmídeos realizadas em microplaca.

V.4. Confirmação da subclonagem do fragmento de DNA β tox no vetor pET11a

Uma alíquota dos plasmídeos extraídos de cada colônia foi submetida a PCR em microplaca para a análise dos transformantes com o objetivo de buscar a construção genética de interesse. A eletroforese em agarose mostrou que das 96 reações, 25 apresentaram amplificação. A figura 10 mostra a amplificação de alguns dos transformantes. As reações que não apresentaram amplificação podem ser explicadas por alguns fatores como à falta de qualidade da extração de plasmídeo do transformante, problemas de manipulação na realização da PCR, presença de inibidores na reação, plasmídeo sem inserto ou insertos inseridos em sentido contrário (anti-senso). Esses 25 possíveis clones foram submetidos à reação de digestão enzimática e 8 liberaram o inserto, o que sugere que eles realmente apresentam o inserto clonado em correta matriz de leitura. A figura 11 mostra dois desses possíveis clones que liberaram o inserto.

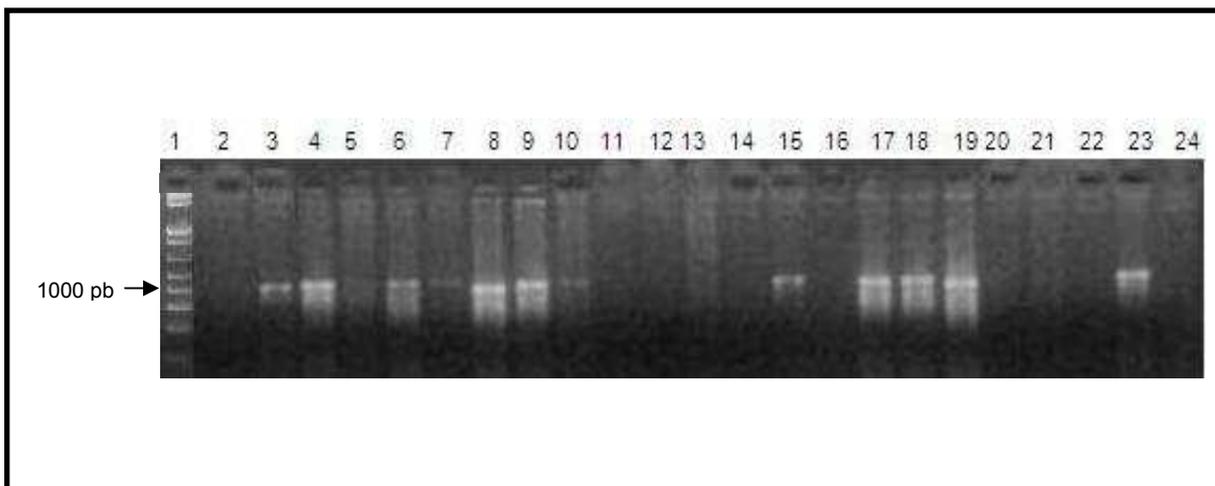


Figura 10 - Amplificação por PCR do fragmento β tox a partir do DNA plasmidiano extraído de diferentes colônias de *E. coli* que foram submetidas a transformação com o produto da ligação do vetor pET11a com o fragmento β tox. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega). Canaleta 2: controle negativo da reação. Canaletas 3 a 24: produto das reações de PCR realizadas a partir do DNA plasmidiano extraído de 22 diferentes transformantes utilizando os iniciadores direto do vetor e reverso do inserto (T7 F e R1 TxB, respectivamente).

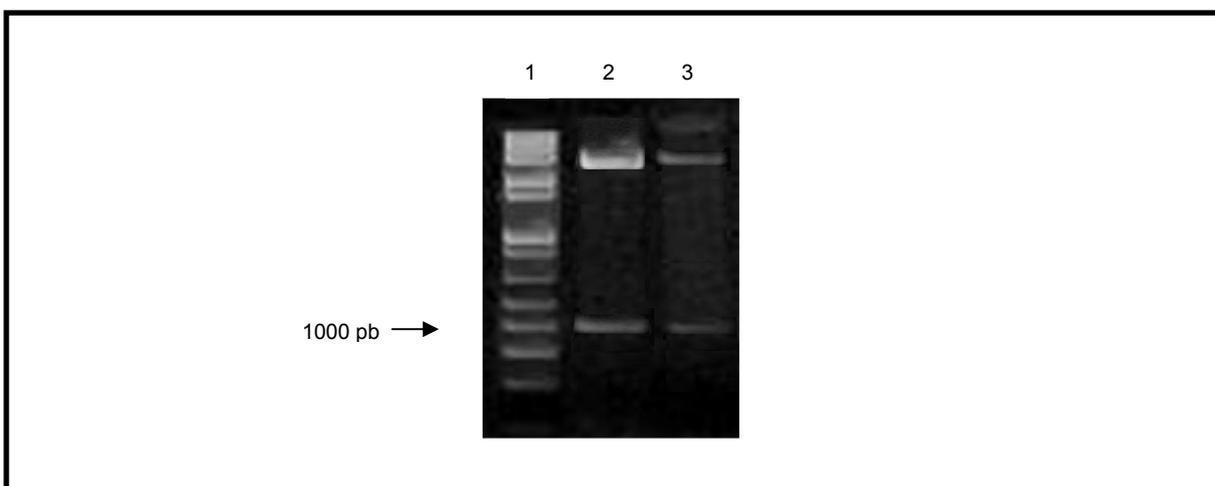


Figura 11 - Digestão enzimática de plasmídeos pET11a: β tox para confirmação da subclonagem. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega). Canaletas 2 e 3: produto da reação de digestão do plasmídeo pET11a: β tox de duas colônias de transformantes que apresentaram amplificação do inserto β tox na reação de PCR para confirmação da subclonagem.

Seguiu-se com a reação de seqüenciamento e análises *in silico* para verificar a integridade da seqüência nucleotídica de alguns possíveis clones. Dos 8 plasmídeos que apresentaram amplificação na PCR e liberaram o inserto na reação de digestão, 4 foram submetidos ao seqüenciamento. Foram realizadas 2 reações para cada plasmídeo, em que apenas o iniciador foi modificado. Os iniciadores T7 direto e reverso que anelam no vetor foram utilizados para garantir uma boa cobertura de toda a seqüência.

As seqüências nucleotídicas obtidas demonstraram que os insertos correspondiam à seqüência do gene *cpb* que codifica a toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B (Escore “e-value” = 0.0) e estavam clonados em fase de leitura correta com o promotor T7. A seqüência nucleotídica obtida com o seqüenciamento do clone A6 (localização na microplaca) está ilustrado na Figura 12.

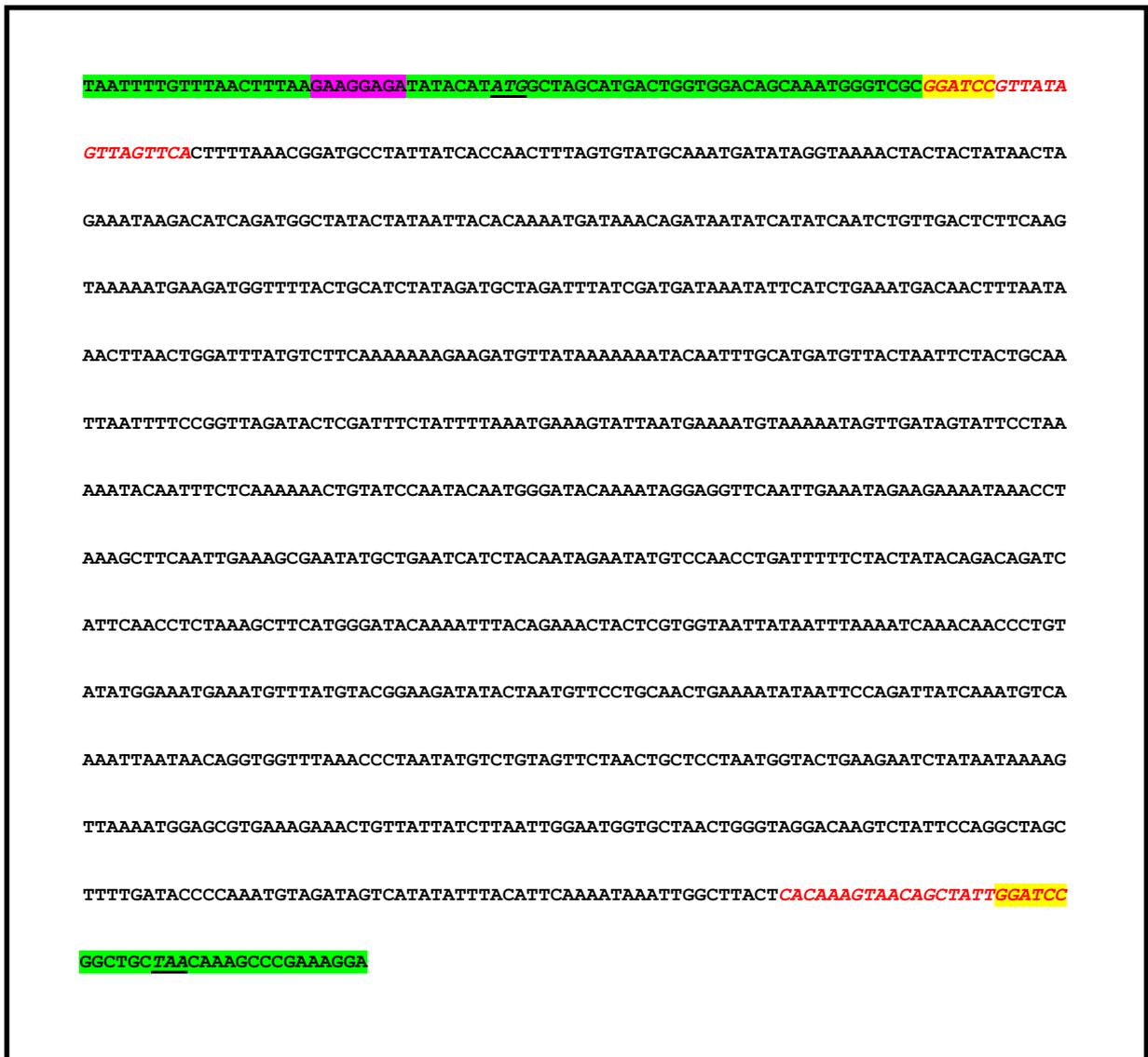


Figura 12 - Seqüência nucleotídica obtida através do seqüenciamento do plasmídeo pET11a:βtox. Nessa figura está representada a fita de DNA codificadora obtida através do seqüenciamento da região do plasmídeo pET11a:βtox que é flanqueada pelos iniciadores T7F e T7R que anelam no vetor. Em verde, a seqüência do vetor; em lilás, o sítio de ligação do ribosso; em vermelho itálico, os iniciadores F1 TxB e R1 TxB utilizados para amplificação do fragmento βtox; em amarelo, os adaptadores correspondentes a seqüência reconhecida pela endonuclease de restrição *BamH* I; sublinhado em itálico, o códon de início e de fim da tradução.

V.5. Expressão e purificação da toxina beta recombinante

V.5.1. Expressão piloto da toxina beta recombinante

Para maximizar a obtenção da toxina beta recombinante em grande quantidade e com alto grau de concentração, foram realizadas expressões piloto para a escolha de um recombinante que apresentasse grande capacidade de expressão da proteína de interesse. Para isso, após a transformação bacteriana da linhagem de expressão *E. coli* BL21 DE3 eletrocompetente, dez transformantes, entre os vários obtidos, foram submetidos à expressão piloto. Alíquotas do produto da indução da expressão dos transformantes foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% juntamente com o padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas e com o controle negativo da expressão. Foi observado que alguns transformantes apresentam uma grande produção de proteína que é visualizada através de uma banda proeminente com o peso molecular esperado para a proteína recombinante de aproximadamente 36,8 kDa, que não é observada no controle negativo (dados não mostrados). Um dos clones foi submetido à expressão em larga escala para a realização dos testes de letalidade e imunogenicidade.

V.5.2. Expressão em larga escala e purificação da toxina beta recombinante

A eficiente expressão de proteínas recombinantes é um processo que pode envolver várias tentativas empíricas. Frequentemente, o principal objetivo associado a esse processo consiste na obtenção de altos níveis de produto solúvel, como discutido por Sorensen e Mortensen (2005b) em uma revisão sobre a expressão de proteínas em *E. coli*. Entretanto, utilizando o sistema de expressão pET é frequentemente descrito que uma quantidade significativa de proteína recombinante é produzida na forma insolúvel através da formação de corpos de inclusão no citoplasma bacteriano. O aproveitamento das proteínas obtidas nessa forma é um grande desafio e pode apresentar muitas vantagens, como a grande quantidade de proteínas produzidas que está protegida da degradação proteolítica - o que é um fator limitante essencial para o sucesso da produção de proteínas heterólogas - e o rápido processo de purificação proteica a baixos custos. Esses agregados de proteínas contidos nos corpos de inclusão podem ser convertidos em produtos bioativos solúveis (Sorensen e Mortensen, 2005b) ou podem ser utilizados na forma insolúvel (Clark, 2001; Middelberg, 2002).

A purificação da toxina beta a partir do sobrenadante de culturas de *C. perfringens* tipo B ou C mostra-se bastante difícil devido a várias razões como: (i) a toxina é extremamente termolábil e sensível a proteinases, (ii) a toxina é inativada pelo grupo sulfidrílica ou agentes oxidantes e (iii) a toxina se polimeriza com grande facilidade, sendo que essa forma não apresenta atividade e é difícil dissociá-la para a forma monomérica ou forma

ativa (Sakurai, 1995; Sakurai *et al.*, 1997). Diante disso, a expressão e purificação da toxina beta recombinante apresenta grandes vantagens.

Após a expressão em larga escala da toxina recombinante (500 mL de cultura) e sua purificação por lavagens e sonicações do precipitado (*pellet*), os resultados obtidos foram visualizados no gel de SDS-PAGE 18%. Foi observado que aproximadamente 10% da proteína apresentou-se na forma solúvel e uma grande quantidade, 90%, ficou retida no precipitado resultante sob a forma de corpos de inclusão insolúveis. A figura 13 mostra esses resultados observados no gel de SDS-PAGE que contém o rendimento desse processo de expressão e purificação da toxina recombinante juntamente com o padrão de peso molecular e o controle negativo da expressão. Foram aplicadas amostras dos sobrenadantes - que podem conter a fração solúvel - e do precipitado final da toxina obtida - que contém a fração insolúvel. Para comparação, foram aplicadas também amostras dos sobrenadantes e do precipitado final do controle negativo da expressão que foi realizado paralelamente - expressão do plasmídeo pET11a sem inserto em *E. coli* BL21 DE3 - e o padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas. O gel mostra uma banda proeminente de proteínas, de aproximadamente 36,8 KDa nos sobrenadantes e no precipitado final, que não está presente no controle negativo. Essa banda possui peso molecular correspondente a toxina beta recombinante. Uma banda de peso molecular semelhante foi também observada no sobrenadante do controle negativo quando as amostras foram submetidas a eletroforese com gel de SDS-PAGE 12%. No gel da figura 13, com concentração de 18%, é possível garantir que essa banda corresponde à outra proteína de *E. coli*, já que essa banda é visualizada apenas nos primeiros sobrenadantes e não é visualizada no precipitado final.

O sistema de expressão pET11a em *E. coli* BL21 DE3 mostrou-se bastante eficiente, pois permitiu a produção de grandes quantidades de proteína com alto grau de purificação e baixa taxa de degradação. A metodologia utilizada apresenta-se mais simples, mais rápida e menos dispendiosa do que outras tecnologias, como cromatografias e purificação em resinas. Os resultados obtidos mostram que altos níveis de proteína purificada foram alcançados através da utilização da formação de corpos de inclusão.

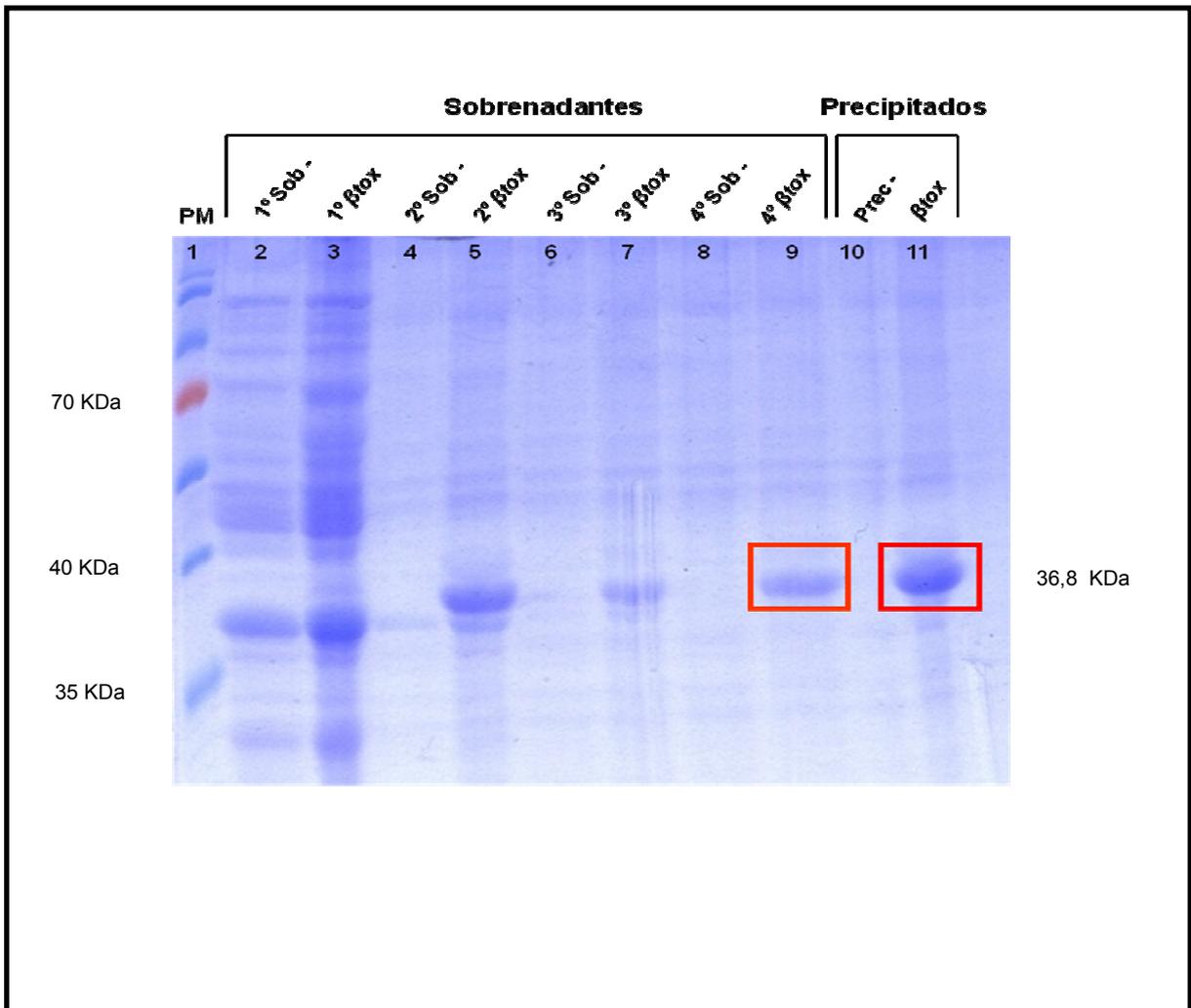


Figura 13 - Expressão em larga escala e purificação da toxina beta recombinante. SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 18%, sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie, de alíquotas da expressão em larga escala e purificação da toxina beta recombinante obtida através do clone *E. coli* BL21 DE3 pET11a: β tox. Canaleta 1: padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas. Canaletas 2, 4, 6 e 8: 1°, 2°, 3° e 4° sobrenadantes da expressão e purificação do controle negativo (expressão do plasmídeo pET11a sem inserto em *E. coli* BL21 DE3). Canaletas 3, 5, 7 e 9: 1°, 2°, 3° e 4° sobrenadantes da expressão e purificação da toxina beta recombinante. Canaleta 10: precipitado final da expressão e purificação do controle negativo. Canaleta 11: precipitado final da expressão e purificação da toxina beta recombinante. Destacado em vermelho, estão as bandas correspondentes a toxina beta recombinante purificada com peso molecular de aproximadamente 36,8 KDa na fração solúvel (Canaleta 9) e na fração insolúvel (Canaleta 11).

Muitos trabalhos demonstram que a obtenção de proteínas solúveis e funcionais através de processos desnaturantes deve ser seguida por processos de reenovelamento *in vitro* (Hrmova *et al.*, 2010; Fradkin *et al.*, 2010; Jürgen *et al.*, 2010). Esse processo pode exigir um empenho em metodologia muito grande para sua otimização, pode afetar a integridade da proteína recombinante obtida, pode apresentar resultados irregulares que comprometem o fluxo conveniente de produção de grandes quantidades de proteína recombinante, além de ser um processo de alto custo (Villaverde e Carrió, 2003; Sorensen e Mortensen, 2005b; Afzal, 2007; Medynski *et al.*, 2007). Harlow e Lane em 1988 demonstraram que é possível a utilização de corpos de inclusão para a produção de anticorpos e, posteriormente, Vuillard e Freeman em 1995 confirmaram este resultado. As proteínas presentes nesses agregados estão protegidas de degradação mantendo, assim, as características de antigenicidade e imunogenicidade, já que os epítomos são preservados. A metodologia de purificação de corpos de inclusão pode ser facilmente incorporada em escala industrial devido aos baixos custos e a rapidez do processo. Além disso, trabalhos anteriores do nosso grupo também demonstraram a produção de anticorpos através da utilização de corpos de inclusão (Araújo, 2004; Mendes, 2007; Dornelas, 2007). Em um dos trabalhos mais recentes do nosso grupo de pesquisa, Souza e colaboradores publicaram em 2010 o sucesso da produção de anticorpos a partir de corpos de inclusão da toxina épsilon recombinante de *Clostridium perfringens* tipo D e, em seguida, Lobato e colaboradores (2010) realizaram ensaios de imunização em coelho, cabra, ovelha, e gado, e verificaram que essa toxina recombinante gerou títulos de anticorpos compatíveis com a exigência de órgãos internacionais de controle de qualidade de vacinas.

Diante do exposto, decidiu-se utilizar também a forma insolúvel da toxina beta recombinante nos experimentos de imunização. Para tanto, a toxina recombinante foi primeiramente caracterizada farmacologicamente.

V.6. Análise da produção e das propriedades farmacológicas da toxina beta recombinante

V.6.1. Quantificação da toxina beta recombinante

A expressão da toxina beta recombinante de *Clostridium perfringens* tipo B foi avaliada quantitativamente através do método de Bradford utilizando-se BSA como padrão. A dosagem de proteínas foi estimada em, aproximadamente, 0,3 mg/mL na fração solúvel e 5 mg/mL na fração insolúvel, o que demonstra alta eficiência de expressão, conforme pode ser verificado na literatura (Nijland *et al.*, 2007). Essas dosagens confirmam a análise feita

em gel de SDS-PAGE em que aproximadamente 10% da proteína recombinante encontrava-se na fração solúvel enquanto que aproximadamente 90% ficou retida na fração insolúvel. Proteínas obtidas na forma solúvel apresentam maior probabilidade de estarem funcionais. Para caracterizar farmacologicamente a toxina recombinante da fração solúvel e insolúvel, seguiu-se com teste de letalidade em camundongos.

V.6.2. Ensaio de letalidade da toxina beta recombinante

Após a expressão e purificação da toxina beta recombinante, foi realizado teste de letalidade em modelo animal para análise das características farmacológicas da toxina produzida comparando-a com a toxina nativa. Propriedades farmacológicas iguais ou semelhantes à toxina beta nativa seria um bom indício de maior probabilidade de produção de anticorpos efetivamente neutralizantes contra essa toxina. Essa maior probabilidade é justificada pelas características semelhantes da estrutura terciária da toxina recombinante em relação à toxina nativa, o que poderia auxiliar na exposição dos epítomos que geram a produção de anticorpos efetivamente neutralizantes.

O animal modelo para esse experimento é o camundongo. A DL₅₀ para a toxina beta nativa foi descrita por Sakurai e Fujii em 1987 como sendo de 4,5 µg/kg por administração intra peritoneal e 310 ng/kg para administração intra venosa. Em 2000, Shatursky e colaboradores produziram um tipo de toxina beta recombinante que apresentou DL₅₀ de 25 µg/kg por administração intra peritoneal, que é semelhante a doses letais descritas para algumas toxinas beta isoladas de *Clostridium perfringens*. Nijland e colaboradores (2007) observaram uma diminuição em três ordens de magnitude na letalidade do toxóide produzido por eles em relação à toxina selvagem. Shatursky e colaboradores (2000) utilizaram uma dose máxima de 160 µg/Kg de toxina beta recombinante para a caracterização da toxina através de visualização de letalidade em animais. Essa dose foi adotada como parâmetro para o presente trabalho como dose máxima a ser testada em animais.

Foi observado que dos quatro grupos de camundongos utilizados, apenas os animais do grupo controle positivo, em que foi administrada toxina épsilon recombinante obtida com igual metodologia utilizada para a toxina beta recombinante, vieram a óbito. O grupo controle negativo e os grupos testes não apresentaram mortalidade. Dessa maneira, foi constatado que tanto a fração solúvel e a insolúvel da toxina beta recombinante não apresentam letalidade.

Para tentar explicar a não letalidade da toxina beta recombinante, algumas inferências podem ser feitas. Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, foi

realizada a clonagem e expressão de parte da ORF codificante da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D com metodologia muito semelhante à realizada para a toxina beta. A toxina épsilon recombinante, diferentemente da toxina beta recombinante obtida nesse trabalho, apresentou letalidade, confirmando a recorrente observação de que cada clonagem e expressão de proteínas apresentam suas particularidades (Jonasson *et al.*, 2002; Chou, 2007). Uma comparação entre as estruturas tridimensionais das toxinas épsilon e beta em suas formas nativas podem oferecer algum indício que poderia ajudar a explicar a não funcionalidade da toxina beta recombinante.

A funcionalidade de uma proteína depende de sua estrutura primária, que determina sua estrutura secundária e, finalmente, determinam sua estrutura terciária. As interações hidrofóbicas entre os aminoácidos e a água provocam a coalescência e o empacotamento dos elementos da estrutura secundária. Assim, o arranjo tridimensional dos aminoácidos na proteína determina sua estrutura terciária. Como a estrutura primária da toxina beta recombinante foi mantida em relação à nativa, conforme constatado através do seqüenciamento de nucleotídeos do fragmento β tox (item IV.3.4), a estrutura terciária da toxina deve ter sido comprometida provocando a não letalidade. Muitas vezes, a não funcionalidade de proteínas recombinantes está associada à incapacidade de formação de pontes dissulfeto, que estão presentes na proteína nativa devido à interação entre resíduos de cisteínas da molécula, durante o enovelamento da molécula recombinante (Swartz, 2001; Jonasson *et al.*, 2002). Esse fator não poderia justificar a não letalidade da toxina beta recombinante, pois, assim como a toxina épsilon, a toxina apresenta somente um resíduo de cisteína em sua molécula.

A estrutura tridimensional da toxina beta ainda não foi determinada, assim como sua função biológica que ainda não foi totalmente elucidada, o que dificulta a análise sobre a não letalidade da toxina beta recombinante obtida nesse trabalho. Na literatura, são descritas algumas características de toxinas beta expressas de forma heteróloga e algumas evidências sobre a estrutura tridimensional da toxina nativa. Hunter e colaboradores (1993), quando descreveram a clonagem e seqüenciamento da toxina beta de *C. perfringens* tipo B, relataram que a expressão do gene clonado em *E.coli* gerava a forma polimérica da toxina que não era ativa. Além disso, muitos trabalhos demonstram a importância do resíduo Cys-265 e da região que o flanqueia na toxina beta e em outras toxinas que são ativadas por grupo tiol (Saunders *et al.*, 1989; Pinkney *et al.*, 1989; Michel *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1991; Steinhorsdottir *et al.*, 1995). Essas toxinas possuem um motivo característico que contém um resíduo de cisteína. Na toxina beta, esse resíduo encontra-se em uma região que possui outros resíduos de aminoácidos em posição semelhante ao motivo das toxinas ativadas por grupo tiol, embora a toxina beta apresente fraca homologia de sequência em relação a essas

outras proteínas. Em 1999, Nagahama e colaboradores demonstraram a base da hidrofobicidade dessa toxina e sugeriram indícios sobre a conformação tridimensional da proteína. O resíduo de cisteína na posição 265 está na fronteira entre a região hidrofílica, que está na posição 256-264, e a região hidrofóbica que está na posição 265-280. O resíduo Trp-275 parece ser importante para a formação de um eficiente oligômero e os resíduos Tyr-266 e Leu-268 podem ser necessários para a ligação a um receptor específico ou contribuem para a formação do oligômero, sugerindo, assim, que a região adjacente ao resíduo de cisteína contribui para uma funcionalidade estrutural importante e que o local essencial para a atividade da toxina beta está presente na região hidrofóbica. Regiões hidrofílicas são geralmente expostas em direção à parte externa da molécula e regiões hidrofóbicas são geralmente escondidas dentro da molécula. Provavelmente, o resíduo de cisteína na posição 265 esteja localizado na entrada da região hidrofóbica ou na cavidade da molécula. A introdução de grupos funcionais por agentes modificadores de aminoácidos, tais como N-ethylmaleimide que levam a formação de cisteína em substituição a outros resíduos de aminoácidos, possivelmente causam impedimento estérico para a formação de poros provocados pela toxina beta ou causam impedimento do acesso da toxina ao seu receptor específico. O N-ethylmaleimide leva a formação de cisteína - que possui um tamanho maior de cadeia lateral - em substituição a outros resíduos de aminoácidos como tirosina e histidina - que apresentam cadeias laterais menores. Todos esses achados poderiam ser melhor compreendidos através de um modelo de citotoxicidade *in vitro* com células cultivadas que poderia ajudar a esclarecer toda a funcionalidade estrutural da molécula nativa (Nagahama *et al.*, 1999).

Diante do exposto, a possível causa da falta de atividade da toxina são as trocas de posição de resíduos de aminoácidos em regiões do sítio ativo ou ausência da arquitetura do sítio ativo da proteína devido ao seu enovelamento errado ou parcial, confirmando que certas regiões essenciais dessa proteína devem ser conservadas para que haja a atividade da toxina. O enovelamento errado poderia ter exposto parte das regiões hidrofóbicas e direcionado para a parte interna da molécula parte das regiões hidrofílicas. Os 18 aminoácidos inseridos na toxina recombinante, devido à sequência nucleotídica do vetor de expressão podem ter contribuído para a alteração da conformação tridimensional da toxina levando à sua total perda de letalidade. No caso da fração insolúvel, é importante ressaltar que a formação de corpos de inclusão ocorre por deposição de polipeptídeos com enovelamento errado, parcial ou ausente, o que expõe regiões hidrofóbicas e permite interações intermoleculares entre as proteínas heterólogas expressas ou entre outras proteínas bacterianas (Villaverde e Carrió, 2003). Isso pode ter contribuído para a falta da estrutura típica do sítio ativo da proteína. Essas inferências poderiam ser confirmadas

apenas através de experimentos de cristalografia para elucidação da estrutura tridimensional da proteína recombinante, o que não é objetivo desse trabalho.

Para um esboço da complexidade estrutural da toxina beta, uma predição da estrutura tridimensional dessa toxina foi obtida através de modelagem da proteína utilizando o servidor Modweb: <https://modbase.compbio.ucsf.edu/scqi/modweb.cgi> (Pieper *et al.*, 2006). Esse servidor realiza predições da estrutura tridimensional protéica através de comparação por similaridades de sequências contidas no seu banco de dados. Nesse caso, outras toxinas formadoras de poros na membrana celular foram utilizadas como parâmetro. A estrutura tridimensional obtida foi visualizada através do *software* Rasmol: <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>. As modelagens fornecidas por esse servidor possuem grande semelhança com as estruturas reais das proteínas. A figura 14 mostra a modelagem obtida da toxina beta.



Figura 14 - Modelagem da estrutura tridimensional da toxina beta de *Clostridium perfringens*. A predição da estrutura tridimensional da toxina beta foi realizada através do servidor Modweb, disponível em <https://modbase.compbio.ucsf.edu/scqi/modweb.cgi> (Pieper *et al.*, 2008). Esse servidor realiza a predição da estrutura tridimensional de proteínas através de comparação por similaridades de sequências contidas no seu banco de dados. A estrutura obtida foi visualizada através do *software* Rasmol, disponível em <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>

A não letalidade da toxina recombinante elimina etapas adicionais de destoxificação da toxina para a imunização de animais. Dessa maneira, o presente trabalho obteve a toxina beta recombinante na forma de toxóide. Para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa, foi realizado o experimento de Western blotting.

V.7. Caracterização imunológica da toxina beta recombinante

V.7.1. Western blotting para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa

Após a verificação da não letalidade da toxina beta recombinante, foi realizada a caracterização imunológica utilizando a técnica de Western blotting (Figura 15). Esse ensaio almejava verificar se a toxina beta recombinante (toxóide beta) apresentava similaridade antigênica com a toxina beta nativa, ou seja, se os anticorpos anti-beta nativa reagem contra a toxina beta recombinante. Os anticorpos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária/UFMG, chefiado pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato. Esses anticorpos foram produzidos através da inoculação em coelho do secretado bacteriano de um toxiotipo de *Clostridium perfringens* que produz a toxina beta.

Para esse experimento, foi utilizado um controle positivo, que correspondia ao secretado bacteriano utilizado para a produção dos anticorpos, e um controle negativo, que era o precipitado final da expressão do plasmídeo pET11a sem inserto, para a comparação com as bandas de expressão da parte solúvel e da parte insolúvel do toxóide beta, que estão contidas no sobrenadante e no precipitado final, respectivamente. O precipitado final da expressão do plasmídeo pET11a sem inserto contém proteínas contaminantes de *Escherichia coli* que estão presentes também na fração solúvel e insolúvel da expressão da toxina beta recombinante, pois é impossível obtê-la totalmente purificada. Dessa maneira, caso ocorram reações inespecíficas, elas serão observadas, também, no controle negativo. Esperava-se que poderia ocorrer reações cruzadas entre o soro policlonal - produzido a partir do secretado bacteriano de clostrídio que possui vários anticorpos contra proteínas bacterianas - e as frações purificadas da toxina beta recombinante - que apresentam, tanto na forma solúvel como na insolúvel, proteínas contaminantes de *Escherichia coli*. Como pode ser verificado na Figura 15, os anticorpos reconheceram a banda proeminente de aproximadamente 36,8 kDa, presente na fração solúvel e na fração insolúvel, com alta

afinidade e houve pouca reação cruzada com outras proteínas, como pode ser constatado através de comparação com o controle negativo. Dessa maneira, foi constatada a similaridade antigênica entre a toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa frente aos anticorpos anti-beta nativa. Para verificar se os anticorpos produzidos a partir da toxóide beta neutralizam a toxina beta nativa, seguiu-se com a imunização de coelhos para a produção de anticorpos anti-beta recombinante.

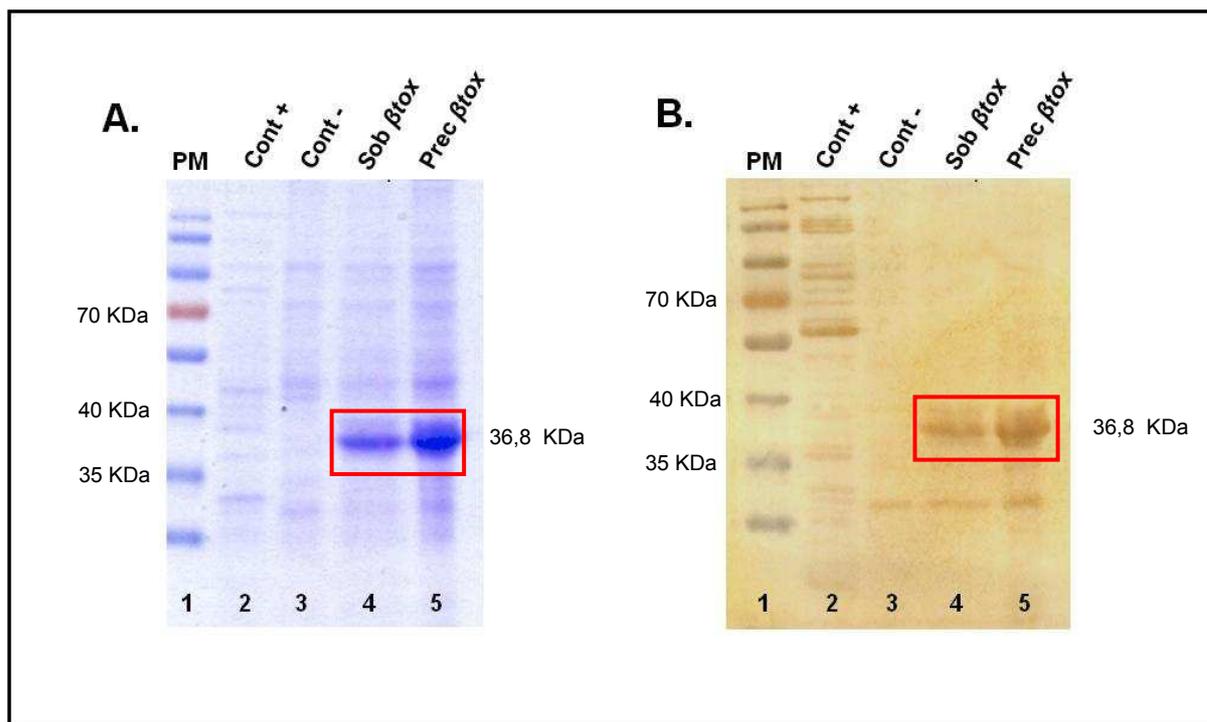


Figura 15 - Western blotting para verificação da similaridade antigênica da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa. A) SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie correspondente ao utilizado para a realização do Western Blotting. B) Western Blotting da fração solúvel e insolúvel da toxina beta recombinante. Canaleta 1: padrão de peso molecular *Prestained Protein Ladder* da Fermentas. Canaleta 2: controle positivo que corresponde ao secretado bacteriano de um toxiotipo de *Clostridium perfringens* que produz a toxina beta. Canaleta 3: controle negativo que corresponde ao precipitado final da expressão do plasmídeo pET11a sem inserto. Canaleta 4: 4^o sobrenadante da expressão e purificação da toxina beta recombinante. Canaleta 5: precipitado final da expressão e purificação da toxina beta recombinante. Em vermelho, está destacado a banda proeminente de aproximadamente 36,8 KDa corresponde à toxina beta recombinante solúvel (Canaleta 4) e insolúvel (Canaleta 5).

V.7.2. ELISA para verificação da imunogenicidade da toxina beta recombinante em relação à toxina beta nativa

V.7.2.1 Produção de soro antitoxina beta recombinante

O próximo passo para a caracterização imunológica da toxina recombinante foi a análise da sua imunogenicidade. Para tanto, foi realizada a produção de anticorpos anti-beta recombinante através da imunização de coelhos com a toxóide beta solúvel (Escola de Veterinária) e insolúvel. Os soros policlonais obtidos foram analisados através de ELISA em que foi verificada a produção de anticorpos e a capacidade de reatividade deles contra a toxina nativa.

V.7.2.2. Análise da reatividade dos anticorpos anti-beta recombinante contra a toxina nativa e titulação dos soros dos animais

A fração solúvel e insolúvel da toxina recombinante foi caracterizada imunologicamente quanto à sua imunogenicidade por comparação entre a reatividade dos anticorpos anti-beta recombinantes contra a toxina recombinante e contra a toxina nativa. O soro anti-beta insolúvel utilizado para o ensaio de reatividade corresponde ao soro obtido através da sangria no 42º dia a partir do início das imunizações, após a 5ª dose do toxóide (4º reforço). Os anticorpos foram utilizados na diluição 1:100. A figura 16 demonstra que houve uma boa produção de anticorpos com grande reatividade contra a toxina nativa com os dois soros produzidos, com a fração solúvel em A e a insolúvel em B. Os soros obtidos e utilizados nos experimentos de ELISA são policlonais e as reações inespecíficas foram deduzidas através da reatividade obtida com o soro pré-imune.

Os anticorpos produzidos a partir da fração solúvel apresentaram menor reconhecimento da toxina nativa comparando-se com o a reatividade dos anticorpos produzidos a partir da fração insolúvel do toxóide. Esses resultados podem ser explicados pelo tipo de imunização realizada com hidróxido de alumínio como adjuvante na inoculação da fração solúvel. A imunização com esse adjuvante induz uma menor produção de anticorpos comparando-se com o adjuvante de Freud's, o que justifica os menores valores de absorvância obtidos como resultado do reconhecimento da toxina nativa pelos anticorpos anti-beta recombinante produzidos a partir da fração solúvel em comparação aos produzidos a partir da fração insolúvel. É importante ressaltar que a fração utilizada como "toxina beta nativa" é um secretado celular bacteriano de um toxiotipo de *Clostridium perfringens* que produz a toxina beta. Esse secretado contém todas as proteínas secretadas pela bactéria,

inclusive outras toxinas. Diante disso, pode-se inferir que a reatividade observada para a “toxina nativa” pode estar subestimada, pois os poços da microplaca foram sensibilizados com iguais quantidades de toxina recombinante e secretado bacteriano contendo toxina nativa. Assim, a utilização da toxina beta nativa purificada apresentaria reatividade ainda maior com os anticorpos anti-beta recombinante nos dois casos. Além disso, as proteínas utilizadas para as imunizações não estão completamente puras, sendo assim, anticorpos contra as proteínas bacterianas contaminantes de *E.coli* também serão produzidos. Portanto, o soro tem uma proporção ainda menor de anticorpos anti-beta recombinante, o que demonstra que a reatividade observada para a “toxina nativa” está ainda mais subestimada.

Em contrapartida, os anticorpos produzidos a partir da fração solúvel apresentaram um maior reconhecimento do toxóide recombinante solúvel comparando-se com a reatividade dos anticorpos produzidos a partir da fração insolúvel que apresentaram menor reatividade contra o toxóide insolúvel. Esses resultados podem ser explicados pela menor interação entre os anticorpos anti-beta insolúvel e o toxóide contido nos corpos de inclusão. A deposição de polipeptídeos com enovelamento errado, parcial ou ausente, nos corpos de inclusão expõe regiões hidrofóbicas e permite interações intermoleculares entre as moleculares do próprio toxóide e entre outras proteínas bacterianas (Villaverde e Carrió, 2003). Assim, mesmo utilizando substâncias desnaturantes, a superfície de contato disponível para a interação entre as moléculas contidas nos corpos de inclusão e os anticorpos é menor e, ainda, existe uma maior dificuldade de sensibilizar as microplacas com essas estruturas. Para confirmar essa hipótese, foi realizado ELISA em que o soro contendo os anticorpos anti-beta recombinante solúvel foi utilizado para reagir contra a fração insolúvel da toxina (figura 16, em A) e o soro anti-beta recombinante insolúvel contra a fração solúvel da toxina (figura 16, em B). Nos dois casos, a reação contra a fração insolúvel foi significante menor, o que corrobora com as hipóteses formuladas.

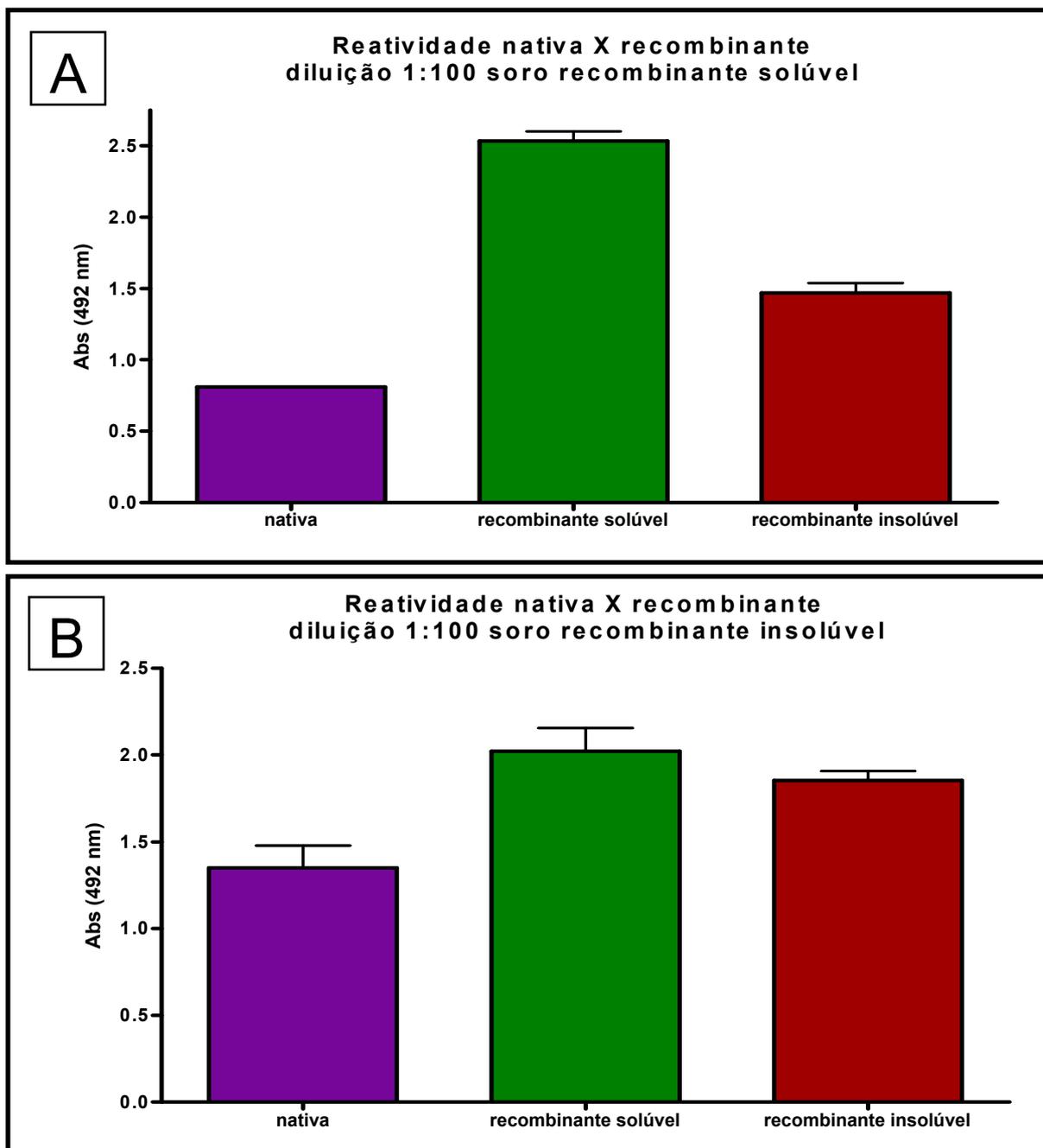


Figura 16 – Análise da reatividade dos anticorpos anti-beta recombinante frente à toxina beta nativa. Os gráficos mostram as absorbâncias obtidas no ELISA com leitura a 492 nm. Os soros imunes analisados foram obtidos a partir da imunização de coelhos com a toxina beta recombinante: em A, estão os resultados da fração solúvel e em B, da fração insolúvel. Os soros foram utilizados na diluição 1:100. Os valores de reações inespecíficas foram deduzidos dos valores absolutos de absorbância obtidos com o soro pré-imune. As placas foram sensibilizadas com 0,5 µg por poço de três diferentes tipos de antígeno para comparação: toxina nativa, ou toxina recombinante fração solúvel, ou toxina recombinante fração insolúvel (corpos de inclusão). A barra acima das colunas é o desvio padrão.

Devido aos melhores resultados obtidos com a toxina recombinante na sua forma insolúvel, foi realizada a titulação do soro anti-beta insolúvel. Os anticorpos obtidos através das sangrias realizadas após o 2º, 3º e 4º reforços (3º, 4º e 5º doses) da imunização com o toxóide insolúvel foram submetidos ao ELISA deduzindo-se os valores das reações inespecíficas através da reatividade obtida com o soro pré-imune. A titulação dos anticorpos anti-beta insolúvel está demonstrado na figura 17. Foi realizada a titulação com a toxina nativa e a recombinante insolúvel para comparação.

Os resultados mostram que a toxina beta recombinante foi eficiente em produzir uma boa resposta imunológica em coelhos. Na literatura, não existem muitos trabalhos sobre a imunização de animais com toxina beta recombinante de *C.perfringens*. Brane Krt e Ebert e colaboradores publicaram em 1999, separadamente, a padronização de ensaios de imunodeteção de anticorpos anti-beta de *Clostridium perfringens* para avaliação de vacinas. Os títulos dos anticorpos obtidos no presente trabalho e comparados com esses ensaios sinalizam bons resultados para o teste de soroneutralização em camundongos que serão imunizados com o toxóide beta recombinante. Bai e colaboradores em 2006 publicaram a clonagem e expressão da fusão dos genes das toxinas alfa e beta de *Clostridium perfringens*. As proteínas fusionadas, quando submetidas ao ELISA, foram reconhecidas pelos anticorpos anti-beta e anti-alfa. O reconhecimento observado no ELISA foi menor do que o apresentado nesse trabalho e os camundongos imunizados apresentaram sobrevivência após o desafio com até duas doses letais de toxina beta nativa.

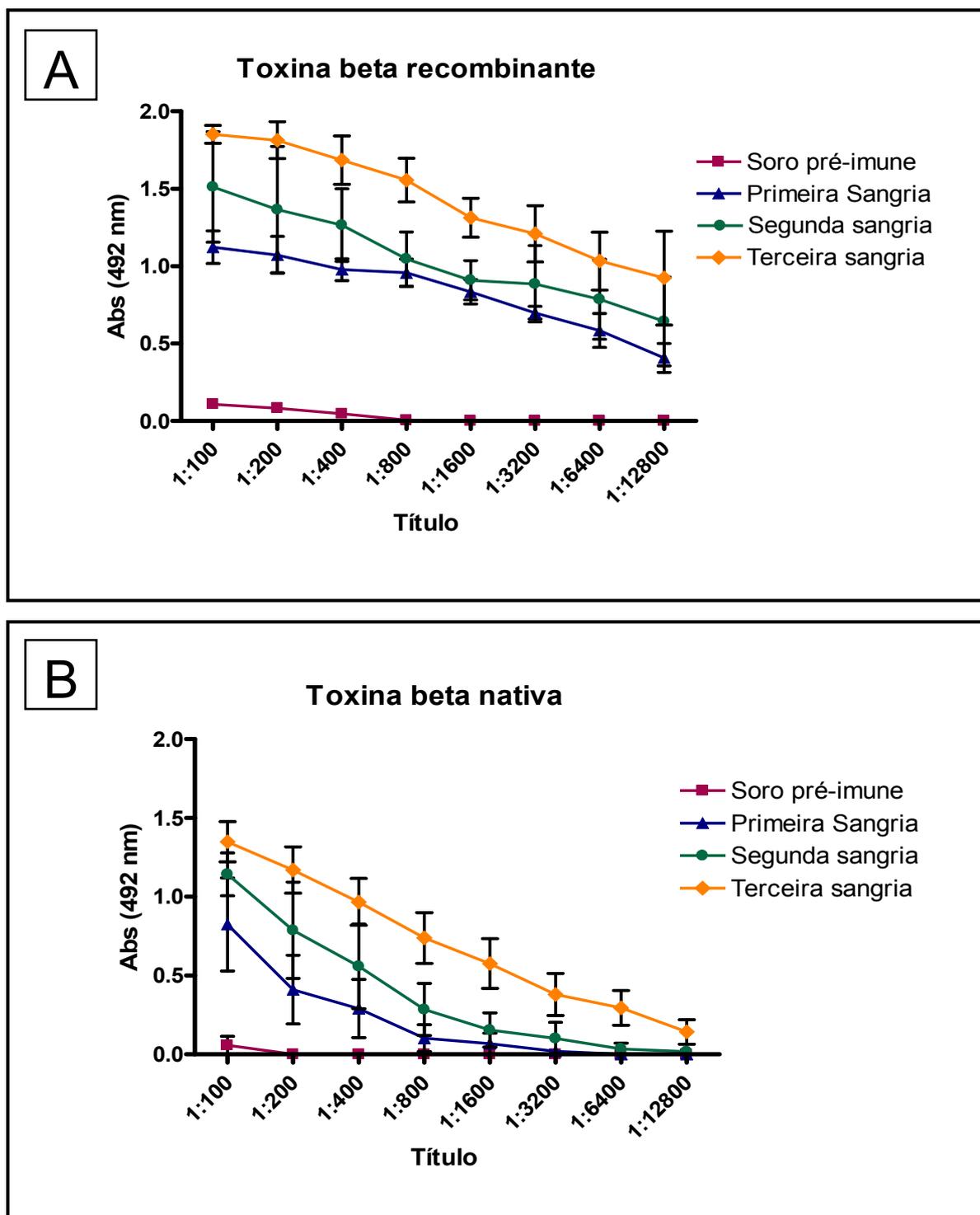


Figura 17 – Titulação dos soros dos animais imunizados com a toxina beta recombinante fração insolúvel (corpos de inclusão). Em A, a microplaca foi sensibilizada com 0,5 µg por poço da toxina recombinante fração insolúvel na forma de corpos de inclusão. Em B, a microplaca foi sensibilizada com 0,5 µg por poço da toxina nativa. Os valores de reações inespecíficas foram deduzidos dos valores absolutos de absorbância obtidos com o soro pré-imune coletado antes da imunização dos animais.

V.8. Considerações finais

A toxina recombinante produzida no presente trabalho apresentou-se como uma forte candidata para a produção de uma vacina recombinante contra enterotoxemia causada pela toxina beta de *C. perfringens* tipo B e C. A metodologia empregada permite trabalhar em condições aeróbicas e com a utilização direta da fração insolúvel da toxina recombinante, o que significa a diminuição dos custos de produção, devido à simplificação dos processos de purificação e concentração da proteína, além de serem desnecessárias as etapas de inativação da toxina, que é produzida na célula bacteriana na forma de toxóide. Esse toxóide mostrou-se eficiente na estimulação de bons níveis sorológicos de antitoxina que apresenta reatividade contra a toxina nativa. A determinação da estrutura tridimensional da proteína recombinante obtida neste trabalho seria fundamental para entender melhor esta capacidade de gerar anticorpos contra a toxina nativa.

Muitos trabalhos vêm demonstrando que a obtenção de proteínas na forma de corpos de inclusão permite a obtenção de grande imunogenicidade. O primeiro trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa com a proposta de confecção de uma nova vacina contra enterotoxemias utilizando, para isso, toxinas recombinantes demonstrou que a toxina épsilon recombinante na forma de corpos de inclusão apresentou grande produção de anticorpos que permitiram grande proteção contra a toxina nativa. O presente trabalho também demonstrou o sucesso da produção de anticorpos contra a toxina beta recombinante a partir de corpos de inclusão. Diferentemente do trabalho realizado com a toxina épsilon, conseguiu-se obter uma boa quantidade de toxina beta recombinante na forma solúvel. Dessa maneira, foi possível observar que há uma maior produção de anticorpos a partir da fração com estruturas insolúveis através da comparação com a imunogenicidade da forma solúvel. Possivelmente, as proteínas contidas nessa estrutura podem ser liberadas de forma gradual aumentando a potencialidade da resposta imune. Essa hipótese será testada através de experimentos adicionais.

VI
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

VI.1. Conclusões

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

- A estratégia utilizada para a clonagem e expressão da ORF do gene *cpb* que codifica a toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B mostrou-se bastante eficiente.
- A utilização do sistema de expressão vetor pET 11a em *E. coli* BL21 DE3 permitiu a produção da toxina beta recombinante em grande quantidade.
- A toxina foi obtida na forma solúvel e insolúvel com alto grau de purificação e concentração.
- A toxina recombinante não apresentou letalidade, sendo expressa na forma de toxóide, dispensando etapas adicionais de inativação da toxina.
- O toxóide beta apresentou similaridade antigênica com a toxina nativa.
- O toxóide beta na sua forma solúvel e insolúvel apresentou-se imunogênico, induzindo a produção de altos níveis de anticorpos em animais imunizados. Assim, foi possível uma boa produção de anticorpos a partir de corpos de inclusão.
- Os anticorpos anti-beta recombinante apresentaram boa reatividade contra a toxina nativa, sendo que a reatividade foi maior utilizando os anticorpos anti-beta insolúvel.
- Os bons títulos de anticorpos anti-beta recombinante insolúvel obtidos no presente trabalho sinalizam que o toxóide beta produzido com a técnica descrita apresenta-se como um forte candidato para a construção de uma vacina recombinante polivalente contra enterotoxemias causadas por *Clostridium perfringens*, com custos de produção mais baixos e com amostras apresentando resultados mais precisos, puros e homogêneos do que as tecnologias utilizadas tradicionalmente.

VI.2. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes perspectivas podem ser inferidas:

- Ensaio de soroneutralização cruzada em camundongos para verificar se os anticorpos anti-beta recombinante neutralizam efetivamente a toxina nativa.
- Avaliação da resposta imunológica do toxóide beta nas principais espécies-alvo: caprinos, ovinos e bovinos.
- Otimização do processo de produção da toxina beta recombinante em escala industrial.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Produção de outras toxinas recombinantes de *Clostridium perfringens*, como as toxinas alfa e iota, com o objetivo de preparar vacinas recombinantes de toxóides polivalentes contra enterotoxemias produzidas por essa bactéria. É importante ressaltar que o presente trabalho faz parte de um projeto muito maior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, em que já se conseguiu a obtenção da toxina épsilon recombinante com sucesso.

- Construção de uma vacina de toxóides recombinante polivalente contra enterotoxemias causadas por *Clostridium perfringens*.

VII
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O.** Bacterial agents of foodborne illness. The Royal Society of Chemistry: Guildford, 1995. 364 pp.
- AFZAL, A. J.; LIGHTFOOT, D. A.** Soybean disease resistance protein RHG1-LRR domain expressed, purified and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies: preparation for a functional analysis. *Protein Expr. Purif.*, v.53, n.2, p.346-55, 2007.
- AL-MASHAT, R. R.; TAYLOR, D. J.** *Clostridium sordellii* in enteritis in an adult sheep. *Veterinary Record*, v.112, n.1, 1983(a).
- AL-MASHAT, R. R.; TAYLOR, D. J.** Production of diarrhoea and enteric lesions in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Clostridium sordellii*. *Veterinary Record*, v.112, n.7, p.141-146, 1983(b).
- ARAÚJO, S. C.** Clonagem, expressão e caracterização de toxinas das aranhas *Phoneutria nigriventer* e *Loxosceles intermedia*. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. 2005. 183 p.
- AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; MAIA, J. D.; NASCIMENTO, R. A. P.;** Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.3, p.239-242, 1998.
- BAI, J.; ZHANG, Y.; ZHAO, B.** Cloning of α - β fusion gene from *Clostridium perfringens* and its expression. *World J Gastroenterol*, v.12, n.8, p.1229-1234, 2006.
- BALDASSI, L.; HIPÓLITO, M.; CALIL, E. M. B.** Observações sobre a incidência da gangrena gasosa e do carbúnculo sintomático durante 10 anos-1970-1979, no Estado de São Paulo. *Biológico*, v.51, n.6, p.161-165, 1985.
- BALDASSI, L.; CALIL, E. M. B.; PORTUGAL, M. A. S. C.** Mastite gangrenosa bovina causada por agentes do gênero *Clostridium*. *Arq. Inst. Biol.*, v.62, n.1/2, p.15-20, 1995.
- BALSAMÃO, G. M.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.** Evaluación de la potência de vacunas contra *Clostridium sordellii*. In: Anais do XXI WORLD BUIATRICS CONGRESS; Punta del este, Uruguai, p.117, 2000.
- BANEYX, F.** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, v.10, n.5, p.411-421, 1999.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M.** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, v.22, n.11, p.1399-1408, 2004.
- BARKER, L. K.; VAN DREUMEL, A. A.; PALMER, N.** The Alimentary System. In: Pathology of Domestic Animals. San Diego, California: Academic Press, 4^a Ed. 1993, p.237-247.
- BIZZINI, B.** *Clostridium tetani*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. C.L Gyles e C. O. Thoen (eds). Ames: Iowa University Press, 2^a Ed, 1993. p.97-105.
- BLAST.** Basic alignment Search Tool. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em agosto de 2009.
- BLENCOWE, H.; LAWN, J.; VANDELAER, J.; ROPER, M.; COUSENS, S.** Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus. *Int. J. Epidemiol.*, v.39, Apr, Suppl 1, p.102-109, 2010.

- BRADFORD, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, May 7, p.248-54, 1976.
- BRASIL.** Ministério da Agricultura e Abastecimento. Diário Oficial da União, Portaria n.49, maio 1997.
- BUESCHEL, D. M.; JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J.; TRINH, H. T.; SONGER, J. G.** Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.121-129, 2003.
- BUOGO, C.; CAPAUL, S.; HÄNI, H.; FREY, J.; NICOLET, J.** Diagnosis of *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.42, n. 1, p.51-58, 1995.
- BUXTON, D.; DONACHIE, W. C.** Clostridial Diseases. In: Diseases of Sheep. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2ª Ed, 1991. p.104-114.
- CARRIÓ, M. M.; CUBARSÍ, R.; VILLAVERDE, A.** Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett.*, v.471, n.1, p.7-11, 2000.
- CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S. M.** Genus *Clostridium*. In: Sneath, P. (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins. v. 2, p.1179-1182, 1986.
- CHALMERS, J. J.; KIM, E.; TELFORD, J. N.; WONG, E. Y.; TACON, W. C.; SHULER, M. L.; WILSON, D. B.** Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl. Environment. Microbiol.*, v.56, n.1, p.104-111, 1990.
- CHOI, J. H.; LEE, S. Y.** Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 64, n.5, p.625–635, 2004.
- CHOU, C. P.** Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.76, n.3, p.521-532, 2007.
- CLARK, E. B.** Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, v.12, n.2, p.202-207, 2001.
- CORNELIS, P.** Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current Opinion in Biotechnology*, v.11, n.5, p.450–454, 2000.
- DAVIS, M. M.; ZIMMERMAN, J. L.; WHEELER, J. R. C.; FREED, G. L.** Childhood vaccine purchase costs in the public sector: past trends, future expectations. *Am. Journ. Public Health*, v.92, p.1982-1987, 2002.
- DORNELAS, H. G.** Expressão e Caracterização Parcial da Proteína 442 da Glândula de Veneno da Aranha *Loxosceles intermedia*. Departamento de Biologia Geral, ICB, UFMG. 2007. 82 p.
- DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L.** The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr Purif.*, v.37, n.1, p.203-206, 2004.

- EBERT, E.; OPPLING, V.; WERNER, E.; CUSSLER, K.** Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* beta and epsilon-toxoid containing veterinary vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v.24, n.3, p.299-311, 1999.
- EL IDRISSE, A. H.; WARD, G. E.** Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. *Veterinary Microbiology*, v.31, n.1, p.89-99, 1992(a).
- EL IDRISSE, A. H.; WARD, G. E.** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Veterinary Microbiology*, v.31, n. 4, p.389-396, 1992(b).
- EUA (Leis).** Code of Federal Regulations. Washiton: Office of Federal Register National Archives and Records Administration, 1991. 743 p.
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; FISHER, D. J.; POON, R.; SAYEED, S.; ADAMS, V.; ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; UZAL, F. A.** Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect. Immun.*, v.75, n.3, p.1443–1452, 2007.
- FITZGERALD, G. R.; BARKER, T.; WELTER, M. W.; WELTER, C. J.** Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infectious agents. *Veterinary Medicine*, v. 83, n. 1, p. 80-86, 1988.
- FORRER, P.; JAUSSE, R.** High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* by fusion to the bacteriophage lambda head protein D. *Gene*, v.224, n.1-2, p.45-52, 1998.
- FOULKERS, G. K.; FAUCI, A. S.** Vaccine research and development: the key roles of the National Institutes of Health and others United States government agencies. *The Jordan Report 20th Anniversary. Accelerated Development of Vaccines*. NIH, NIAID, US Department of Health and Human Services, p.97-102, 2002.
- FOULKES, M. A.; ELLENBERG, S. S.** Vaccine efficacy and safety evaluation. *The Jordan Report 20th Anniversary. Accelerated Development of Vaccines*. NIH, NIAID, US Department of Health and Human Services, p.63-68, 2002.
- FRADKIN, A. H.; BOAND, C. S.; EISENBERG, S. P.; ROSENDAHL, M. S.; RANDOLPH, T. W.** Recombinant murine growth hormone from *E. coli* inclusion bodies: expression, high-pressure solubilization and refolding, and characterization of activity and structure. *Biotechnol Prog.*, v.26, n.3, p.743-7499, 2010.
- FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M.** Microbiologia dos Alimentos. São Paulo, Editora Atheneu, 1996.
- FRANK, F. W.** *Clostridium perfringens* type B from enterotoxemia in young ruminants. *American Journal of Veterinary Research*, v.17, n.64, p.492-494, 1956.
- GALLOWAY, C. A.; SOWDEN, M. P.; SMITH, H. C.** Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E.coli* by induction during late log phase. *Biotechniques*, n.34, n.3, p.524-526, 2003.
- GEORGIU, G.; VALAX, P.** Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol.*, v.309, p.48-58, 1999.

- GEORGIU, G.; SEGATORI, L.** Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol*, v.16, n.5, p.538–545, 2005.
- GIBERT, M.; JOLIVET-REYNAUD, C.; POPOFF, M. R.** β 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, v.203, n.1, p.65–73, 1997.
- GKIOURTZIDIS, K.; FREY, J.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; ILIADIS, N.; SARRIS, K.** PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Veterinary Microbiology*, v.82, p.39-43, 2001.
- GOMES, M. J. P.** Gênero *Clostridium spp.* Microbiologia Clínica, LABACVET II, UFGS, 2007.
- GREGERSEN, J. P.** Vaccine development: The long road from initial idea to product licensure. *New generation vaccines*. Nova York/Basel/Hong Kong, Marcel Dekker, Inc. 2ª ed., p.1165-1194, 1997.
- HARLOW, E.; LANE, D.** Antibodies, a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988. 956p.
- HARTLEY, J. L.** Cloning technologies for protein expression and purification. *Curr Opin Biotechnol*, v.17, n.4, p.359–366, 2006.
- HATHEWAY, C. L.** Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiological Reviews*, v.3, n.1, p.66-98, 1990.
- HOMMA, A.** Gestão de projetos biotecnológicos. Em Emerick e Valle (orgs.), Gestão de projetos biotecnológicos: alguns tópicos. Rio de Janeiro, Interciência, 1999.
- HOMMA, A.; MARTINS, R. M.; JESSOUROUM, E.; OLIVA, O.** Desenvolvimento tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. *Hist. cienc. saude-Manguinhos*, v.10, suppl.2, p.671-696, 2003.
- HRMOVA, M.; STONE, B. A.; FINCHER, G. B.** High-yield production, refolding and a molecular modelling of the catalytic module of (1,3)-beta-D-glucan (curdian) synthase from *Agrobacterium sp.* *Glycoconj J.*, v.27, n.4, p.461-76, 2010.
- HUNTER, S. E.; BROWN, J. E.; OYSTON, P. C.; SAKURAI, J.; TITBALL, R. W.** Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, v.61, n.9, p.3958–3965, 1993.
- IBGE.** Instituto Brasileiro de Geografia. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em agosto de 2010.
- JANSEN, B. C.** The beta toxin of *C. welchii* type B Wildosn, in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.28, n.4, p.495-549, 1961.
- JENSEN, R.; MACKEY, D. R.** Diseases of feedlot cattle. Philadelphia: Lea & Febiger, 1974. 377p.

- JOHNSON, M. W.; FITZGERALD, G. R.; WELTER, M. W.; WELTER, C. J.** The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Veterinary Medicine*, v.87, n.4, p.382-386, 1992.
- JOHANSSON, A.** Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.251-257, 2004.
- JONASSON, P.; LILJEQVIST, S.; NYGREN, P. A.; STAHL, S.** Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v.35, Pt.2, p.91-105, 2002.
- JÜRGEN, B.; BREITENSTEIN, A.; URLACHER, V.; BÜTTNER, K.; LIN, H.; HECKER, M.; SCHWEDER, T.; NEUBAUER, P.** Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.*, v.9, n.41, 2010.
- KLAASEN, H. L.; MOLKENBOER, M. J.; BAKKER, J.; MISEREZ, R.; HANI, H.; FREY, J.; POPOFF, M. R.; VAN DEN BOSCH, J. F.** Detection of the beta-2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.24, n.3, p.325-332, 1999.
- KNIGHT, P. A.; QUEMINET, J.; BLANCHARD, J.H.; TILLERAY, J. H.** *In vitro* tests for the measurement of clostridal toxins, toxoids and antisera. II. Titration of *Clostridium perfringens* toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals*, v.18, n.4, p.263-270, 1990.
- KRT, B.** Development and evaluation of various enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Clostridium perfringens* beta anti-toxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.24, n.3, p.293-297, 1999.
- LAEMMLI, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- LAWRENCE, G. W.; LEHMANN, D.; ANIAN, G.; COAKLEY, C. A.; SALEU, G.; BARKER, M. J.; DAVIS, M. W.** Impact of active immunisation against enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet*, v.336, n.8724, p.1165-1167, 1990.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. H.; XU, Z.** Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.*, v.21, n.1, p.45-52, 2003.
- LEWIS, C. J.** Clostridial diseases. In: W. B. Martin and I. D. Aitkin (ed.), Diseases of sheep. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom, 3^o Ed., 2000. p.131-143.
- LI, J.; MACCLANE, B. A.** Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and ph-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.7620-7625, 2006.
- LINDSAY, C. D.; HAMBROOK, J. L.; UPSHALL, D. G.** Examination of Toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the MDCK Cell Line. *Toxicon*, v.9, p.213-218, 1995.
- LIU, C. F.; PAN, T. M.** Recombinant expression of bioactive peptide lunasin in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v.88, n.1, p.177-186, 2010.

- LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; MAIA, J. D.; NASCIMENTO, R. A.; ALMEIDA, A. C.** Teste de potência de vacinas botulínicas por diferentes métodos. In: ENCONTRO DE PESQUISA VETERINÁRIA DA UFMG, 14, Belo Horizonte. Belo Horizonte, 1994. p.36
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.** Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, ano 19, n.113, p. 29-33, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R. A.; MARTINS, N. E.; GONÇALVES, L. C. B.** Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.4, p.313-318, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.** Diagnóstico de Clostridioses e Controle de Qualidade das Vacinas. Laboratórios Pfizer Ltda, p.45-52, 2001.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; BALSAMÃO, G. M.; ABREU, V. L. V.; NASCIMENTO, R. A. P.; NEVES, R. D.** Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.439-442, 2004.
- LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A.** Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, v.102, n.561-562, p.23-34, 2007.
- LOBATO, F. C. F.; DIAS, L. D.; SALVARANI, F. M.; MARTINS, N. E.; NASCIMENTO, R. A. P.; ASSIS, R. A.** Avaliação da potência de vacinas contra *Clostridium septicum* comercializadas no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, n.2, p.225-228, 2008.
- LOBATO, F. C.; LIMA, C. G.; ASSIS, R. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R.O.; SALVARANI F. M.; CARMO, A. O.; CONTIGLI, C.; KALAPOTHAKIS, E.** Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, v.28, n.38, p.6125-6127, 2010.
- MACKINNON, J. D.** Enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type C. *Pig Veterinary Journal*, v. 22, p.119-125, 1989.
- MANICH, M.; KNAPP, O.; GIBERT, M.; MAIER, E.; JOLIVET-REYNAUD, C.; GENY, B.; BENZ, R.; POPOFF, M. R.** *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences. *PLoS One*, v.3, n.11, e3764, 2008.
- MANTECA, C.; DAUBE, G.; JAUNIAUX, T.; LINDEN, A.; PIRSON, V.; DETILLEUX, J.; GINTER, A.; COPPE, P.; KAECKENBEECK, A.; MAINIL, J. G.** A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet. Microbiol.*, v.86, n.3, p.191–202, 2002.
- MAKRIDES, S. C.** Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, v.60, n.3, p.521-538, 1996.
- MAPA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em agosto de 2010.
- MARTEL, A.; DEVRIESE, L. A.; CAUWERTS, K.; DEGUSSEM, K.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F.** Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 3-7, 2004.

- MARVAUD, J. C.; STILES, B. G.; CHENAL, A.; GILLET, D.; GIBERT, M.; SMITH, L. A.; POPOFF, M. R.** *Clostridium perfringens* iota toxin: mapping of the Ia domain involved in docking with Ib and cellular internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, p.43659-43666, 2002.
- MATSUDA, T.; OKADA, Y.; INAGI, E.; TANABE, Y.; SHIMIZU, Y.; NAGASHIMA, K.; SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; TANAKA, S.** Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult. *Pathol. Int.*, v.57, n.9, p.622-626, 2007.
- MCCLANE, B. A.; UZAL, F. A.; MIYAKAWA, M. F.; LYERLY, D.; WILKINS, T.** The enterotoxic clostridia, In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenburg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes*, vol. 4. Springer-Verlag, New York, NY. 2006. p.698-752.
- MCDONEL, J. L.** *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacology and Therapeutics*, v.10, n.3, p.617-655, 1980.
- MCDONEL, J. L.** Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. In: *Pharmacology of bacterial toxins*. Pergamon Press. 2ª Ed., 1986. 517p.
- MDIC.** Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/>. Acesso em agosto de 2010.
- MEDYNSKI, D.; TUAN, M.; LIU, W.; WU, S.; LIN, X.** Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, v.52, n.2, p.395-402, 2007.
- MEER, R. R.; SONGER, J. G.** Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal Veterinary Research*, v.58, p.702-705, 1997.
- MENDES, T. M.** Antígenos para a produção de soro contra o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, 2007. 262 p.
- MERIAL.** Merial Saúde Animal. Disponível em: <http://www.merial.com.br/>. Acesso em agosto de 2010
- MICHEL, E.; REICH, K. A.; FAVIER, R.; BERCHE, P.; COSSART, P.** Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitution in listeriolysin O. *Mol. Microbiol.*, v.4, n.12, p.2167-2178, 1990.
- MICLARD, J.; VAN BAARLEN, J.; WYDER, M.; GRABSCHEID, B.; POSTHAUS, H.** *Clostridium perfringens* beta-toxin binding to vascular endothelial cells in a human case of enteritis necroticans. *J Med Microbiol.*, v.58, Pt 6, p.826-828, 2009
- MIDDELBERG, A. P. J.** Preparative protein refolding. *Trends in biotechnology*, v.20, n.10, p.437-443, 2002.
- MISAWA, S.; KUMAGAI, I.** Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers*, v.51, n.4, p.297-307, 1999.
- MITCHELL, T. J.; ANDREW, P. W.; SAUNDERS, F. K.; SMITH, A. N.; BOULNOIS, G. J.** Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol. Microbiol.*, v.5, n.8, p.1883-1888, 1991.

- MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; SHIMAMOTO, S.; OKABE, A.** 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.
- MORRIS, W. E.; UZAL, F. A.; FATTORINI, F. R.; TERZOLO, H.** Malignant edema associated with blood sampling in sheep. *Australian Veterinary Journal*, v.80, n.5, p.280-281, 2002.
- MURBY, M.; SAMUELSON, E.; NGUYEN, T. N.; MIGNARD, L.; POWER, U.; BINZ, H.; UHLEN, M.; STAHL, S.** Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. *Eur. J. Biochem.*, v.230, n.1, p.38-44, 1995.
- NAGAHAMA, M.; KOBAYASHI, K.; OCHI, S.; SAKURAI, J.** Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS microbiological Letters*, v.68, n.1, p.41-44, 1991.
- NAGAHAMA, M.; KIHARA, A.; MIYAWAKI, T.; MUKAI, M.; SAKAGUCHI, Y.; OCHI, S.; SAKURAI, J.** *Clostridium perfringens* beta-toxin is sensitive to thiol-group modification but does not require a thiol group for lethal activity. *Biochim Biophys Acta*, v.1454, n.1, p.97–105, 1999.
- NAGAHAMA, M.; HAYASHI, S.; MORIMITSU, S.; SAKURAI, J.** Biological Activities and Pore Formation of *Clostridium perfringens* Beta Toxin in HL 60 Cells. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.38, p.36934-36941, 2003.
- NCBI.** National Center for Biotechnology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em agosto de 2009.
- NIJLAND, R.; LINDNER, C.; HARTSKAMP, M. V.; HAMOEN, L. W.; KUIPERS, O. P.** Heterologous production and secretion of *Clostridium perfringens* beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *Journal of Biotechnology*, v.127, n.3, p.361–372, 2007.
- NIILO, L.** *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Canadian Veterinary Journal*, v.21, n.5, p.141-148, 1980.
- PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOQUET, P.; POPOFF, M. R.** Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.61, n.12, p.5147-5156, 1993.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, v.7, n.3, p.104-110, 1999.
- PETRILLO, T. M.; BECK-SAGUE, C. M.; SONGER, J. G.; ABRAMOWSKY, C.; FORTENBERRY, J. D.; MEACHAM, L.; DEAN, A. G.; LEE, H.; BUESCHEL, D. M.; NESHEIM, S. R.** Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *N. Engl. J. Med.*, v.342, n.17, p.1250–1253, 2000.
- PIEPER, U.; ESWAR, N.; BRABERG, H.; MADHUSUDHAN, M. S.; DAVIS, F. P.; STUART, A. C.; MIRKOVIC, N.; ROSSI, A.; MARTI-RENOM, M. A.; FISER, A.; WEBB, B.; GREENBLATT, D.; HUANG, C. C.; FERRIN T. E.; SALI, A.** MODBASE, a database of

- annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res*, v.32, Database issue: D217-22, 2006.
- PINKNEY, M.; BEACHEY, E.; KEHOE, M.** The thiol-activated toxin streptolysin O does not required a thiol group for cytolytic activity. *Infect. Immun.*, v.57, n.8, p.2553-2558, 1989.
- PIVINICK, H.; HABEEB, A. F. S. A.; GORENSTEIN, B.** Effect of pH on toxigenesis by *C. perfringens* type D. *Canadian Journal Microbiology*, v.11, n.1, p.45-55, 1964.
- PIVINICK, H.; HABEEB, A. F. S. A.; GORENSTEIN, B.** Effect of pH on toxigenesis by *C. perfringens* type C. *Canadian Journal Microbiology*, v.10, n.3, p.329-344, 1965.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. J.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C.** Gênero *Clostridium*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, 2005. p.94-105.
- REN, W. H.; XU, Y.; ZHANG, S. Q.; YANG, G.** Cloning, expression and bioactivity of BAFF from *Petaurus breviceps*. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.137, n.3-4, p.332-336, 2010.
- ROBERTS, R. S.; MCEWEN, A. D.** Gas gangrene infection of sheep. *Journal Comparative Pathology and Therapeutics*, v.44, p.180-191, 1931.
- ROOD, J. I.; COBE, S. T.** Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, v.55, n.4, p.621-648, 1991.
- ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; RICHARD, W. T.** The clostridia: molecular biology and pathogenesis. San Diego, Calif.: Academic Press, 1997. 533 p.
- ROOD, J. I.** Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Reviews in Microbiology*, v.52, p.333-360, 1998.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L.** Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Infection and Immunity*, v.18, n.3, p.741-745, 1977.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L.** Some properties of beta toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. *Infect. Immun.*, v.21, n.2, p.678-680, 1978.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L.** Effect of carbohydrates and control of culture pH on beta toxin produccion by *C. perfringens* tipo C. *Microbiological Immunological*, v.23, n.5, p.313-318, 1979.
- SAKURAI, J.; FUJII, Y.** Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin. *Toxicon*, v.25, n.12, p.1301-1310, 1987.
- SAKURAI, J.** Toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Med. Microbiol.*, v.6, p.175-185, 1995.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; OCHI, S.** Major toxins of *Clostridium perfringens*, *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, v.16, p.195-214, 1997.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M.** *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin: Characterization and Mode of Action. *J Biochem*, v.136, n.5, p.569-574, 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 2 Ed., 1989.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of the Science*, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SAUNDERS, F. K.; MITCHELL, T. J. ; WALKER, J. A.; ANDREW, P. W.; BOULNOIS, G. J.** Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect. Immun.*, v.57, n.8, p.2547-2552, 1989.
- SCHOTTE, U.; TRUYEN, U.; NEUBAUER, H.** Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, v.51, n.10, p.423-426, 2004.
- SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; JOST, B. H.; SONGER, J. G.; TWETEN, R. K.** *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent cation-selective channels in lipid bilayers. *Infection and Immunity.*, v.68, n.10, p.5546-5551, 2000.
- SHIMIZU, T.; OHTANI, K.; HIRAKAWA, H.; OHSHIMA, K.; YAMASHITA, A.; SHIBA, T.; OGASAWARA, N.; HATTORI, M.; KUHARA, S.; HAYASHI, H.** Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, n.2, p.996-1001, 2002.
- SMITH, L. D .S.** Botulism: the organism, it's toxins, the disease. Llinois, Charles C. Thomas,1977. 236p.
- SMITH, L. D. S.** Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Infectious Diseases*, v.1, n.2, p.254-262, 1979.
- SONGER, J. G.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiological Reviews*, v.9, n.2, p.216-234, 1996.
- SONGER, J. G.** Clostridial diseases of animals. In: The Clostridia, Academic Press, San Diego, 1° Ed, 1997. p.153-182.
- STEINTHORSDDOTTIR, V.; FRIDIKSDOTTIR, V.; GUNNARSON, E.; ANDRESSON, O. S.** Expression and purification of *Clostridium perfringens* L-toxin glutathione-S-transferase fusion protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.130, n.2-3, p.273-278,1995.
- STEINTHORSDDOTTIR, V.; HALLDORSSON, H.; ANDRESSON, O. S.** *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb. Pathog.*, v.28, n.1, p.45-50, 2000.
- SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K.** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J.Biotechn.*, v. 115, p.113-128, 2005(a).
- SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K.** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, v.4, n.1, p. 1-8, 2005(b).
- SOUZA, A. M.; REIS, J. K.; ASSIS, R. A.; HORTA, C. C.; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S.; ALVARENGA, E. R.; CASTRO, C. S.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O.; PIRES, P. S.; CONTIGLI, C.; LOBATO, F.C.; KALAPOTHAKIS, E.** 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, M. F. J.** Teste de neutralização para toxina épsilon e titulação de toxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* tipos C e D em cultura de células. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 31p.
- SPRINGER, S.; SELBITZ, H. J.** The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.24, n.3, p.333–336, 1999.
- STERNE, M.; BATTY, I.** Pathogenic clostridia. London: Butterworth, 1975. 144 p.
- STILES, B. G.; WILKINS, T. D.** *Clostridium perfringens* iota toxin: synergism between two proteins. *Toxicon*, v.24, n.8, p.767-773, 1986(a).
- STILES, B. G.; WILKINS, T. D.** Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two non linked proteins for biological activity. *Infection and Immunity*, v.54, n.3, p.683-688, 1986(b).
- SUN, Z.; BAO, L.; LI, D.; HUANG, B.; WU, B.** Effect of *Leptospira interrogans* outer membrane proteins LipL32 on HUVEC. *Microb Pathog.* v.49, n.3, 2010.
- SWARTZ, J. R.** Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*, v.12, n.2, p.195–201, 2001.
- TWETEN, R. K.** *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, v.82, n.1, p.1-9, 2001.
- TERPE, K.** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.72, n.2, p.211–222, 2006.
- TITBALL, R.; DUCHESNES, C.; GRANUM, P. E.; MENOZZI, M. G.; PECK, M.; PELKONEM, S.; POPOFF, M.; STACKEBRANDT; MAINIL, J.** Genus *Clostridium* – Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. *European Concerted Action*, 214, 2006.
- TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E.** Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 8^o Ed, 1988. 951 p.
- USDA.** United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.usdabrazil.org.br/>. Acesso em agosto de 2010.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.** Enterotoxemia in goats. Review Article. *Veterinary Research Communications*, v.20, n.6, p.481-492, 1996.
- UZAL, F. A.; OLAECHEA, F. V.; VANNELLI, S. A.** Hepatitis infecciosa necrosante en una oveja sin *Fasciola hepatica*. *Revista de Medicina Veterinaria*, v.77, p.377-379, 1996(a).
- UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; O'BOYLE, D.; KELLY, W. R.** Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faces and in gastrointestinal contents of goats. *Letters Applied Microbiology*, v.23, p.13-17, 1996(b).

- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.** The effects of experimental intravenous inoculation of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on goat kids and on lambs. *Journal of Comparative Pathology*, v.116, p.63-71, 1997.
- UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; KELLY, W. R.** PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxin in faeces of goats. *Letters Applied Microbiology*, v.25, n.5, p.339-344, 1997.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.** Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Veterinary Record*, v.142, n.26, p.722-725, 1998.
- UZAL, F. A.; BODERO, D. A.; KELLY, W. R.; NIELSEN, K.** Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. *Veterinary Record*, v.143, n.17, p.472-474, 1998.
- UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; TOMAS, R.; HORNITZKY, M.; GALEA, F.** 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. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v.15, n.2, p. 94-99, 2003.
- UZAL, F. A.; SONGER, J. G.** Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, n.3, p.253-265, 2008.
- VALENTE, C.; CUTERI, V.** Infezioni da batteri del genere *Clostridium*. *Praxis Veterinary.*, n.1, p.8-12, 1997.
- VENCZEL, L. V.; ARROWOOD, M.; HURD, M.; SOBSEY, M. D.** Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed oxidant disinfectant and by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.4, p.1598-1601, 1997.
- VIEIRA, A. A. S.** Padronização e aplicação da PCR Multiplex na tipificação de *Clostridium perfringens* isolados de suínos diarreicos. Dissertação (Mestrado), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M.** Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, v.25, n.17, p.1385-1395, 2003.
- VIULLARD, L.; FREEMAN, A.** Molecular Biology Protocols: Preparation of active proteins from inclusion bodies. University de St. Andrews U. K.: Disponível em: <<http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/www.nwfsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>> Acesso em: junho de 2009.
- WALL, J. G.; PLÜCKTHUN, A.** Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.6, n.5, p.507-516, 1995.
- WEDDEL, W.; WORTHINGTON, R. W.** An enzyme labelled immunosorbent assay for measuring *Clostridium perfringens* epsilon toxin in gut contents. *N. Z. Vet. J.*, v.33, p.36-37, 1984.
- WEICKERT, M. J.; DOHERTY, D.H.; BEST, E. A.; OLINS, P.O.** Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, v.7, n.5, p.494-499, 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ZHANG, J.; LI, J. F.; ZHANG, S. Q. Production of Bioactive Human Hemangiopoietin in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, v.75, n.4, p.481-485, 2010.