

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Doutorado em Ciência Animal**

**Relação parasito-hospedeiro na infecção
de macrófagos por *Clostridium chauvoei***

Prhiscylla Sadanã Pires

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.
Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato
Co-orientadores: Prof. Dr. Renato de Lima Santos e Prof. Dr. Tatiane Alves da Paixão

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2015

P667r Pires, Prhiscylla Sadanã, 1984-
Relação parasito-hospedeiro na infecção de macrófagos por *Clostridium chauvoei* /
Prhiscylla Sadanã Pires. – 2015.
69 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato

Co-orientadores: Renato de Lima Santos, Tatiane Alves da Paixão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Clostridium – Teses. 3. Macrófagos – Teses.
I. Lobato, Francisco Carlos Faria. II. Santos, Renato de Lima, III. Paixão, Tatiane Alves da.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 969



FOLHA DE APROVAÇÃO

PRHISCYLLA SADANÁ PIRES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 29 de Abril de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Francisco Carlos Faria Lobato
Presidente - Orientador

Profª. Agueda Palmira Castagna de Vargas
Universidade Federal de Santa Maria

Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG

Profª. Elaine Maria Sales Dorneles
Escola de Veterinária - UFMG

Prof.. Andrey Pereira Lage
Escola de Veterinária - UFMG



Verso da folha de assinatura

Dedicatória

A minha família, meu bem mais precioso: meu pai, Swâmi Sadanã Agripino; minha mãe, Rosária Maria Fátima Pires Agripino; minha irmã, Shaiana Alves Agripino. Também ao meu companheiro, Marcelo Vidigal Coscarelli, por compartilhar e viver ao meu lado o sonho da busca por conhecimento.

Agradecimento

A Deus, por me dar forças para acreditar em mim mesma, quando meu próprio pensamento me indicava que tudo isso não seria possível.

Para meu pai, pela presença marcante em momentos de dificuldade. A minha mãe, pela luta diária, contribuindo para cada etapa dessa minha jornada com o mais confortante afeto. A minha irmã, que, com graça e leveza, me aconselhou tanto nos momentos difíceis por meio conversas descontraídas. Ao meu amor Marcelo Coscarelli, que esteve sempre ao meu lado, suportando e esperando pacientemente o caminhar por essa jornada.

Ao Professor Francisco, pelo constante exemplo de ética e bondade que sempre me inspiraram a construir uma vida profissional pautada no conhecimento e permeada por nobres sentimentos.

Aos meus co-orientadores, Professor Renato e Professora Tatiane, que contribuíram significativamente para os resultados científicos aqui encontrados.

Para a Professora Roselene Ecco, uma amiga que ganhei nessa trajetória e que me orienta e me ajuda em momentos tão diversos da minha vida profissional e pessoal.

Aos meus amigos e amigas que esta jornada me proporcionou: Luciana Gonçalves, pela força e suporte carinhoso; Laura Bernardes, pelo apoio e empenho na execução de muitas das tarefas e pela alegria e encorajamento constante; José Uribe, pela amizade, apoio e incentivo; Felipe Salvarani, pela generosidade na reaproximação e incentivos; Marina Duarte, pelo apoio nesta etapa final de conclusão da tese; Carlos Oliveira, pela paciência nos desabafos.

A todos os colegas que passaram por nossa equipe, meu muito obrigada!

Aos professores da Escola de Veterinária: Zélia Lobato, Marcos Bryan, Andrey Lage, Elias Facury Filho, Lívio Molina e Roberto Guedes.

Aos colegas e funcionários desta escola: Elaine, Caio, Auricélio, Fernanda, Amanda, Érica, Camila, Gazielle, Graciela, Eduardo, Agda e André.

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

Epígrafe

“O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las.”

Mário Sérgio Cortella

“Com muita sabedoria, estudando muito, pensando muito, procurando compreender tudo e todos, um homem consegue, depois de mais ou menos quarenta anos de vida, aprender a ficar calado.”

Millôr Fernandes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Gênero <i>Clostridium</i>	16
3.2	<i>Clostridium chauvoei</i>	17
3.3	Fatores de Virulência	17
3.3.1	Antígenos solúveis.....	18
3.3.2	Toxina alfa.....	18
3.3.3	Toxina beta	19
3.3.4	Toxina gama	19
3.3.5	Toxina delta	20
3.3.6	Neuraminidase.....	20
3.3.7	Toxina A de <i>Clostridium chauvoei</i> (CctA)	21
3.4	Antígenos celulares	21
3.4.1	Antígenos somáticos.....	21
3.4.2	Antígenos flagelares	22
3.5	Esporos	23
3.6	Carbúnculo sintomático: uma doença de ocorrência mundial cuja patogênese é explicada por hipóteses	26
3.7	Situação do carbúnculo sintomático no Brasil.....	29
3.8	Evolução do diagnóstico do carbúnculo sintomático	30
3.9	Prevenção, controle e erradicação do carbúnculo sintomático	31
4	CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE MEIOS PARA OBTENÇÃO DE SUSPENSÕES BACTERIANAS HOMOGÊNEAS DE <i>CLOSTRIDIUM CHAUVOEI</i>	34
4.1	Introdução.....	34
4.2	Material e Métodos	35
4.2.1	Amostra de referência e condições de cultivo.....	35
4.2.2	Preparo da suspensão bacteriana contendo predominantemente células vegetativas de <i>Clostridium chauvoei</i>	35
4.2.3	Preparo da suspensão de esporos de <i>Clostridium chauvoei</i>	36
4.3	Resultados e Discussão	37
5	CAPÍTULO 3: CINÉTICA DE INFECÇÃO DE <i>CLOSTRIDIUM CHAUVOEI</i> EM MACRÓFAGOS MURINOS E BOVINOS	43
5.1	Introdução.....	43
5.2	Material e métodos.....	44
5.2.1	Locais de realização dos experimentos	44
5.2.2	Animais	44
5.2.3	Linhagem celular	44
5.2.4	Amostra de referência e condições de cultivo bacteriológico	44
5.2.5	Concentração inibitória mínima de sete antimicrobianos contra <i>Clostridium chauvoei</i>	44
5.2.6	Determinação da multiplicidade de infecção de <i>Clostridium chauvoei</i> em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7	45
5.2.7	Cinética de infecção de <i>Clostridium chauvoei</i> em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7	46

5.2.8	Microscopia eletrônica de transmissão	47
5.2.9	Cinética de infecção de <i>Clostridium chauvoei</i> em macrófago derivado de monócitos de sangue periférico de bovino.....	48
5.2.10	Perfil de citocinas produzidas por macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos infectados por <i>Clostridium chauvoei</i>	49
5.2.11	PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	50
5.2.12	Análise estatística	51
5.3	Resultados e Discussão	51
5.3.1	Sensibilidade antimicrobiana.....	51
5.3.2	Multiplicidade de infecção.....	52
5.3.3	Cinética de <i>Clostridium chauvoei</i> em macrófagos RAW 264.7.....	55
5.3.4	Sobrevivência de <i>Clostridium chauvoei</i> em macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos	61
5.3.5	Perfil de transcritos de citocinas produzidas por macrófagos infectados com <i>Clostridium chauvoei</i>	63
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos principais antígenos solúveis produzidos por <i>Clostridium chauvoei</i>	18
Tabela 2: Composição dos meios de cultura testados para obtenção de suspensões de esporos de <i>Clostridium chauvoei</i>	36
Tabela 3: Avaliação dos tempos de cultivo em caldo Reinforced <i>Clostridium</i> Medium para obtenção de suspensões de <i>Clostridium chauvoei</i> com maior proporção de células vegetativas.	40
Tabela 4: Viabilidade e percentual de esporos e células vegetativas de <i>Clostridium chauvoei</i> após o cultivo em diferentes meios de esporulação.	40
Tabela 5: Genes e iniciadores avaliados nas reações de PCR em tempo real para avaliação do perfil de transcritos de citocinas em macrófagos bovinos infectados com <i>Clostridium chauvoei</i> na forma esporulada e vegetativa	50
Tabela 6: Concentração inibitória mínima de sete antimicrobianos para amostra de <i>Clostridium chauvoei</i> (ATCC10092).....	51
Tabela 7: Avaliação de diferentes multiplicidades de infecção de <i>Clostridium chauvoei</i> na forma vegetativa após uma e 24 horas de infecção dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das principais espécies patogênicas do gênero <i>Clostridium</i> , segundo o sítio de ação das exotoxinas.	16
Figura 2: Representação esquemática das alterações estruturais da célula bacteriana durante a esporulação.	24
Figura 3: Representação típica da estrutura do esporo.....	25
Figura 4: Coloração de Gram da amostra <i>Clostridium chauvoei</i> (ATCC 10092), após 24 horas de cultivo.	38
Figura 5: Coloração de esporos da amostra <i>Clostridium chauvoei</i> (ATCC 10092) A: após 24 horas de cultivo em Reinforced Clostridial Medium.....	39

Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 após 72 horas de infecção com <i>Clostridium chauvoei</i> na forma esporulada.	55
Figura 7: Cinética de infecção <i>Clostridium chauvoei</i> na forma vegetativa em macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	56
Figura 8: Cinética de infecção de <i>Clostridium chauvoei</i> na forma esporulada em macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	57
Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 uma hora após a infecção com <i>Clostridium chauvoei</i> na forma vegetativa.	58
Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 após uma hora de infecção com <i>Clostridium chauvoei</i> na forma esporulada (asterisco).....	59
Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 após 72 horas de infecção com <i>Clostridium chauvoei</i> na forma vegetativa.....	59
Figura 12: Avaliação da sobrevivência de <i>Clostridium chauvoei</i> na forma vegetativa após a internalização por macrófagos bovinos nos diferentes tempos de infecção..	61
Figura 13: Avaliação da sobrevivência de <i>Clostridium chauvoei</i> na forma esporulada após internalização por macrófagos bovinos em diferentes tempos de infecção.....	62
Figura 14: Expressão relativa de transcritos de IL-10 (A), IL12 (B), IL-23 (C) e TGF-beta (D) de macrófagos bovinos (n=6) infectados com <i>Clostridium chauvoei</i> na forma vegetativa e esporulada durante 1, 6, 12 e 24 horas.....	64

Resumo

Clostridium chauvoei é o agente etiológico do carbúnculo sintomático, doença com alta taxa de letalidade e mortalidade que acomete bovinos jovens. Apesar da reconhecida importância dessa doença, a sua patogênese e os mecanismos de virulência do agente etiológico ainda não foram completamente elucidados. Dentre as lacunas de conhecimento, destaca-se o mecanismo envolvido no tráfego de *C. chauvoei* do intestino para a musculatura. Essa etapa, essencial para a deposição do esporo no sítio de infecção, permitiria que o agente permanecesse latente até que encontrasse condições favoráveis para germinar e multiplicar. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de sobrevivência de *C. chauvoei* após internalização de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos bovinos. Buscou-se avaliar as diferenças quanto às taxas de sobrevivência da forma vegetativa com a esporulada, bem como o perfil de transcritos de citocinas induzidos pela infecção por uma dessas duas formas. Para isso, macrófagos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos foram infectados com *C. chauvoei* na multiplicidade de infecção (MOI) 1:50 com uma das seguintes formas bacterianas: vegetativa ou esporo. A sobrevivência de *C. chauvoei* foi avaliada após 1 (T1), 24 (T24), 48 (T48) e 72 (T72) horas de infecção. Para se avaliar o perfil de transcritos de citocinas exibido por macrófagos bovinos infectados com *C. chauvoei*, os macrófagos foram infectados com *C. chauvoei* na MOI 1:50, sendo avaliados os tempos de T1, 6 (T6), 12 (T12) e T24 horas de infecção. Os transcritos de citocinas dosados foram: interleucina 10 (IL-10), IL-4, IL-12, IL-23 e fator de crescimento beta (TGF-beta). *C. chauvoei*, tanto na forma esporulada quanto vegetativa, é capaz de resistir ao processo microbicida dos macrófagos por até 72 horas de infecção. Contudo, o prolongamento da infecção com a forma vegetativa resultou em um decréscimo ($p < 0,01$) do número de bactérias internalizadas viáveis a partir do T48 de infecção. Ao contrário, o número de esporos internalizados viáveis permaneceu constante ao longo dos tempos de infecção avaliados. Essa diferença de sobrevivência entre as formas infectantes (vegetativa e esporo) não foi demonstrada no modelo de infecção com macrófagos bovinos, no qual ambas as formas bacterianas permaneceram igualmente viáveis durante todo o período avaliado (T72). Com relação ao perfil de transcritos de citocinas, observou-se que os macrófagos bovinos infectados com *C. chauvoei* na forma predominantemente vegetativa detinham um perfil de transcritos de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-23 ($p < 0,001$). Esse perfil de transcritos de citocinas poderia contribuir para os efeitos microbicidas desses fagócitos. Ao contrário, quando os macrófagos bovinos foram infectados com *C. chauvoei* na esporulada, observou-se um perfil de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-beta. Esse perfil de transcritos de citocinas poderia determinar a latência dessa forma bacteriana após internalização por macrófagos. Os resultados apresentados indicam que *C. chauvoei* na forma vegetativa e na forma esporulada são capazes de resistir aos efeitos microbicidas dos macrófagos, sendo a forma esporulada mais resistente à morte mediada por macrófagos por um período maior de infecção. Essa é a primeira evidência de que *C. chauvoei* é capaz de resistir aos efeitos microbicidas dos macrófagos e de que as formas infectantes (vegetativa e esporulada) exibem um perfil de transcritos de citocinas divergente.

Palavras-Chave: Clostridiose, mionecrose, carbúnculo sintomático, cinética de infecção.

Abstract

Clostridium chauvoei is the etiologic agent of blackleg, a high mortality disease that affects calves. Despite the recognized importance of this disease, its pathogenesis and microorganism virulence factors have not been fully elucidated. Among the knowledge absences, there is the mechanism involved in *C. chauvoei* bowel traffic to the muscles. This step is essential for spore deposition in infection site, the agent would remain dormant until they find favorable conditions to germinate and multiply. In light of this, the aim of this study was to evaluate the survivability of *C. chauvoei* after internalization of murine macrophage RAW 264.7 lineage and bovine macrophage. It was evaluated the differences in survival rates of vegetative and spore *C. chauvoei* and the cytokine profile of transcripts induced by infection with one of these two bacterial form. The RAW 264.7 macrophages and bovine macrophages derived from peripheral monocytes were infected with *C. chauvoei* at multiplicity of infection (MOI) 1:50 with one of bacterial forms: vegetative or spore. The survival of *C. chauvoei* was assessed after 1 (T1), 24 (T24), 48 (T48) and 72 (T72) hours of infection. To assess the cytokine transcripts profile from bovine macrophages infected with *C. chauvoei* at MOI 1:50, it was evaluated the times T1, 6 (T6), 12 (T12) and T24 hours of infection. Cytokine transcripts that were measured: interleukin 10 (IL-10), IL-4, IL-12, IL-23 and growth factor beta (TGF-beta). *C. chauvoei*, both the spore and vegetative form, resist to microbicide macrophages process for 72 hours for infection. However, the lengthening of infection with vegetative form resulted in a decrease ($p < 0.01$) in the number of viable internalized bacteria at T48. In contrast, the number of viable spores internalized was constant over the time of infection evaluated. There were any differences in survival between the infective forms (vegetative and spore) in infection with bovine macrophages throughout the study period (T72). Regarding the cytokine transcripts profile, it was observed that bovine macrophages infected with vegetative *C. chauvoei* owned a pro-inflammatory cytokines profile, such as IL-12 IL-23 ($p < 0.001$). This profile could contribute to the microbicidal effects of these phagocytes. Contrariwise, when bovine macrophages were infected with spores of *C. chauvoei*, it was observed an anti-inflammatory cytokines profile, such as IL-10 and TGF-beta. This profile could cause the latency of this bacterial medium after macrophages internalization. The present results indicate that *C. chauvoei* the vegetative and sporulated form are able to resist to microbicidal macrophages effects. Nevertheless, spore form showed to be more resistant to death mediated by macrophages over a longer period infection. This is the first evidence that *C. chauvoei* is able of resisting the microbicidal effects of macrophages and the infectious forms (vegetative and spore) exhibit a diverging cytokine transcripts profile.

Keywords: Clostridiosis, myonecrosis, blackleg, infection kinetics.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Clostridium* compreende mais de 200 espécies bacterianas com forma de bastonetes, coloração Gram-positiva e respiração do tipo anaeróbia estrita que, diante de condições adversas, como ausência de nutrientes e presença de oxigênio, são capazes de esporular e permanecer viáveis e infectantes por longos períodos de tempo (LOBATO et al., 2013). Felizmente, a maioria das espécies pertencentes a esse gênero são não patogênicas e comensais, podendo ser encontradas nas plantas, pele e mucosas de animais e seres humanos, em especial no trato intestinal (TITBALL, 2009). Dentre as espécies patogênicas, cerca de 50, a maioria dos microrganismos são considerados patógenos secundários por se multiplicarem em feridas previamente infectadas por outros agentes. Apenas 15 espécies de *Clostridium* são tidas como importantes patógenos primários para seres humanos e/ou animais (POPOFF; BOUVET, 2013).

Dentre os patógenos primários, um grupo de bactérias do gênero *Clostridium* se destaca por ser capaz de causar miosites necrosantes, geralmente fatais, denominadas gangrena gasosa e carbúnculo sintomático. A gangrena gasosa ou edema maligno é uma infecção que acomete praticamente todas as espécies de interesse veterinário, como bovinos (ASSIS et al., 2002; ASSIS, R. A DE et al., 2010), ovinos e caprinos (LIMA et al., 2006), suínos (PINTO et al., 2005), equinos (PEEK et al., 2003; MACÊDO et al., 2013), canídeos (RIBEIRO et al., 2012) e aves (TELLEZ et al., 2009). Essa doença é causada por uma espécie ou pela associação das seguintes: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. novyi* tipo A, *C. perfringens* tipo A e *C. sordellii*. A ocorrência da gangrena gasosa está relacionada ao estrito contato entre esses agentes e os animais domésticos. Isso favorece a contaminação de feridas decorrentes de práticas cirúrgicas e até de vacinações sem cuidados assépticos (UZAL, 2012).

Ao contrário da gangrena gasosa, o carbúnculo sintomático é uma infecção que resulta da ativação de esporos latentes de *C. chauvoei* presentes no músculo, acometendo apenas os ruminantes domésticos. A principal hipótese é a de que o esporo desse agente seja depositado no músculo após transporte pela circulação sanguínea, a partir do intestino, possivelmente veiculado por macrófagos (UZAL et al., 2003), embora o *C. chauvoei* seja considerado exclusivamente extracelular. Os fatores responsáveis pela germinação desses esporos na musculatura ainda não foram estabelecidos. Acredita-se, porém, que traumas, principalmente nas grandes massas musculares, criam um ambiente propício para germinação e consequente produção de toxinas, que normalmente culminam com necrose muscular e morte rápida dos animais acometidos (HATHEWAY, 1990). Portanto, tanto os mecanismos pelos quais *C. chauvoei* é carregado até a musculatura quanto os fatores envolvidos em sua germinação ainda são obscuros, carecendo de estudos científicos que permitam o completo entendimento da patogênese dessa doença.

Estudos sobre o potencial bactericida dos macrófagos frente a bactérias do gênero *Clostridium* são escassos e restritos a *C. perfringens* tipo A e *C. difficile* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000, 2003, 2004; PAREDES-SABJA; SARKER, 2012). Mandell (1974) estabeleceu que os neutrófilos humanos são capazes de matar as estirpes de *C. perfringens* tipo A *in vitro* tanto em anaerobiose quanto em aerobiose. Ao contrário, O'Brien e Meville (2000) demonstraram que *C. perfringens*, na forma vegetativa, é capaz de escapar dos fagossomo de macrófagos e sobreviver no citoplasma desse fagócito por ao menos 25 horas. A habilidade de escapar da morte mediada por macrófagos foi atribuída ao efeito citotóxico das toxinas alfa e perfringolisina O para o fagossomo e para o próprio macrófago (O'BRIEN; MELVILLE, 2004).

Recentemente, Paredes-Sabja; Sarker (2012) concluíram que os esporos de *C. perfringens* tipo A são capazes de germinar no interior dos macrófagos, mesmo em condições de aerobiose. No entanto, as células vegetativas, recém germinadas, são eficientemente mortas pelos macrófagos, possivelmente pela limitada capacidade de produção de toxina.

Apesar de pioneiros, os estudos supracitados não foram capazes de estabelecer protocolos efetivos para eliminação de bactérias extracelulares. Esse fato dificultou análises mais profundas sobre a cinética de infecção, pois *C. perfringens* é, entre os clostrídios patogênicos, um microrganismo relativamente aerotolerante. Além disso, os ensaios de infecção de macrófagos por clostrídios foram realizados apenas com as linhagens celulares J774-33 (O'BRIEN; MELVILLE, 2000, 2003, 2004) e RAW264.7 (PAREDES-SABJA; SARKER, 2012). Contudo, sabe-se que a cinética de infecção pode ser diferente quando se aplica macrófagos derivados de monócitos periféricos de outras espécies de animais. Portanto, ainda não é possível inferir se a sobrevivência da forma vegetativa e a germinação dos esporos no interior de macrófagos é uma característica do gênero *Clostridium* ou apenas da espécie já estudada ou se é devida à origem dos macrófagos utilizados. Por isso, pesquisas sobre a cinética de infecção de *C. chauvoei* em macrófagos, além de pioneiras, são de extrema relevância para o entendimento e prevenção da ocorrência de carbúnculo sintomático, uma das importantes doenças que acomete a bovinocultura mundial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de sobrevivência do *Clostridium chauvoei*, tanto na forma vegetativa quanto esporulada, após internalização por macrófagos murinos da linhagem contínua de células RAW 264.7 e macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos. Além disso, buscou-se avaliar o perfil de transcritos de citocinas de macrófagos bovinos infectados com as duas formas bacterianas de *C. chauvoei*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo para obtenção de esporos de *C. chauvoei*.
- Desenvolver um protocolo de infecção para infecção de macrófagos com *C. chauvoei* para avaliação da cinética de infecção.
- Avaliar e comparar a cinética de infecção de *C. chauvoei* na forma vegetativa e esporulada em macrófagos linhagem celular RAW 264.7
- Avaliar e comparar a cinética de infecção de *C. chauvoei* na forma vegetativa e esporulada em macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos.
- Avaliar o perfil de transcritos de citocinas de macrófagos bovinos infectados com a forma vegetativa e esporulada de *C. chauvoei*.

3 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Clostridium*

O gênero *Clostridium* é compreendido pelo filo Firmicutes, classe Clostridia, ordem Clostridiales e família Clostridiaceae. Esse gênero engloba bactérias Gram-positivas e anaeróbias estritas que possuem habilidade de esporular diante de condições adversas. Reconhecido como o gênero bacteriano mais toxigênico, *Clostridium* sp determina a ocorrência de infecções e intoxicações que apresentam altas taxas de letalidade e mortalidade tanto em seres humanos como em animais (LOBATO et al., 2013). As exotoxinas secretadas pelas espécies patogênicas possuem sítio de ação específico, o que permite o agrupamento das doenças causadas por *Clostridium* spp., conforme a atividade da toxina e o tecido afetado (Figura 1).

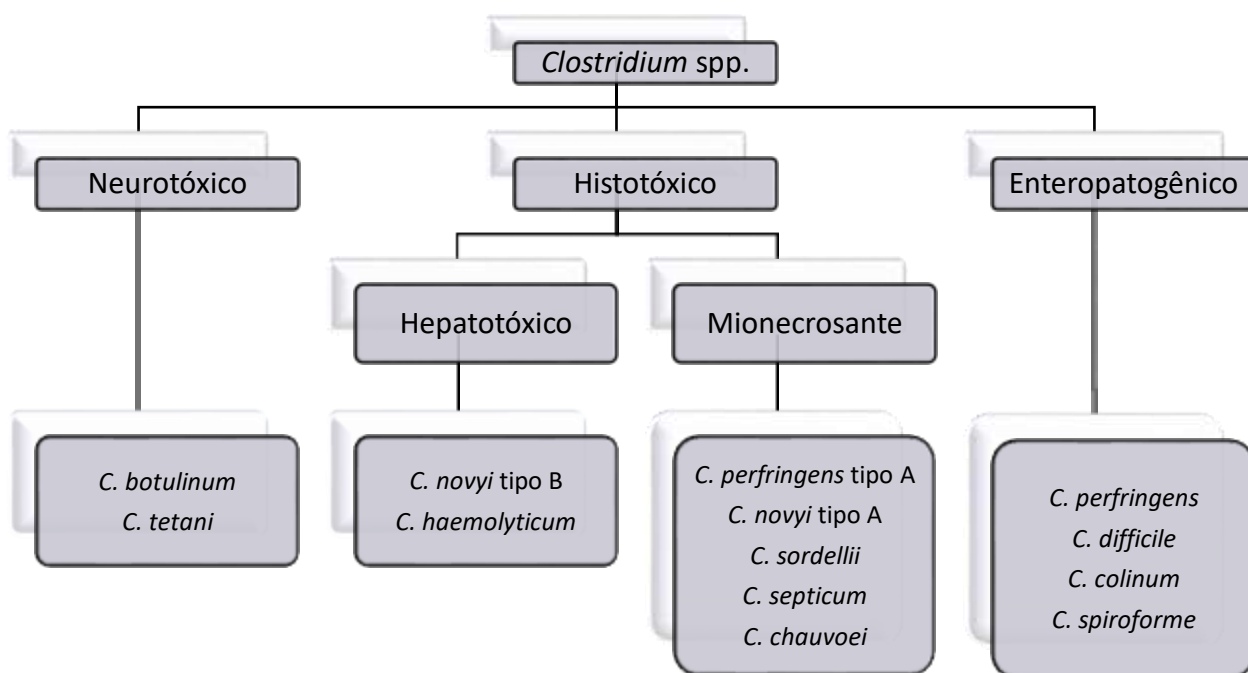


Figura 1: Representação esquemática das principais espécies patogênicas do gênero *Clostridium*, segundo o sítio de ação das exotoxinas.

Dentre as doenças causadas por *Clostridium* spp., as mionecrosantes, representadas pela gangrena gasosa e carbúnculo sintomático, são as que acarretam maiores perdas para a pecuária brasileira. Embora gangrena gasosa e carbúnculo sintomático sejam praticamente indistinguíveis na avaliação clínica e patológica, a etiologia e a forma de infecção apresentam diferenças marcantes. A gangrena gasosa pode ser causada por um agente ou pela associação daqueles elencados na Figura

1. O carbúnculo sintomático, no entanto, é causado exclusivamente por *C. chauvoei*. Além disso, enquanto para a ocorrência de gangrena gasosa faz-se necessário uma ferida como porta de entrada para penetração de esporos, para ocorrência do carbúnculo sintomático, assume-se, por uma hipótese amplamente difundida e aceita, que os esporos de *C. chauvoei* permaneçam latentes na musculatura após serem carreados do intestino por macrófagos (UZAL, 2012).

3.2 *Clostridium chauvoei*

C. chauvoei destaca-se como um patógeno particularmente importante em medicina veterinária. Verifica-se isso pelos relatos sobre gangrena gasosa e carbúnculo sintomático feitos desde a metade do século XIX, com descrição de *C. chauvoei* em 1887 (ARLOING et al., 1887). Desde então, essa bactéria tem sido responsabilizada por consideráveis perdas para a pecuária mundial (UZAL, 2012).

C. chauvoei é um bastonete móvel, com 0,5-1,7 a 1,6-9,7 µm, ocorrendo separadamente ou aos pares. Os esporos formados são ovais, centrais a subterminais causando deformação na célula mãe (LIMA, 1992). O genoma dessa espécie foi recentemente depositado no GenBank (FALQUET et al., 2013), e uma posterior análise genômica demonstrou a presença de um único cromossomo circular com mais de 2,8 milhões de pares de bases, que é relativamente pequeno se comparado a outros *Clostridium* sp. O material genético compacto de *C. chauvoei* explica o pequeno número de espécies de animais usualmente susceptíveis ao agente, como bovinos, ovinos e caprinos. Das mais de duas mil janelas de leitura “*Open Reading Frames*” (ORF) analisados, apenas 13 estão relacionados aos fatores de virulência primários, como as toxinas, dentre elas leucocidinas e hemolisinas. O restante do genoma é responsável por codificar elementos necessários para a formação da cápsula e da parede celular; também por induzir a esporulação e a dormência, a resistência a antimicrobianos, o metabolismo bacteriano e a elaboração de cofatores. Além disso, a estirpe estudada por esses pesquisadores demonstrou apresentar apenas um plasmídeo do tipo críptico (FREY; FALQUET, 2015), cuja função ainda não foi esclarecida.

Amplamente difundido, principalmente em áreas de produção de bovinos, como pastagens e currais de confinamento (HANG’OMBE et al., 2000; SATHISH; SWAMINATHAN, 2009), o *C. chauvoei* contamina solo, bebedouros e currais por meio da decomposição de carcaças e pela eliminação de esporos nas fezes. Uma vez contaminada, a área pode permanecer assim durante anos (SATHISH; SWAMINATHAN, 2008; BAGGE et al., 2009). A manutenção de esporos viáveis no ambiente é o fator mais significativo para infecção dos animais. A ingestão de pastos e aguadas contaminados com esporos se constitui a principal via de transmissão do carbúnculo sintomático, visto que a transmissão direta de animal para animal não ocorre. A contaminação ambiental permite, assim, a perpetuação do agente, principalmente em criatórios nos quais a doença é endêmica (SOJKA et al., 1992).

3.3 Fatores de Virulência

Apesar de sua reconhecida importância como agente patogênico para os animais domésticos, principalmente para bovinos, poucos estudos têm sido conduzidos com o intuito de se caracterizar melhor o agente e seus fatores de virulência. Moussa (1958) dividiu os antígenos de *C. chauvoei* em dois grupos: antígenos celulares e antígenos solúveis, ambos pouco caracterizados. Os antígenos celulares são classificados em antígenos somáticos e flagelares, enquanto os antígenos solúveis englobam as toxinas. Além disso, em se tratando de bactérias do gênero *Clostridium*, a capacidade de formar esporos deve ser considerada um fator de virulência essencial. Essa

habilidade permite que essas bactérias anaeróbias persistam em ambientes diversos, mantendo-as potencialmente infectantes por períodos indeterminados de tempo.

3.3.1 Antígenos solúveis

Existem poucas informações com relação às toxinas de *C. chauvoei* e, apesar da maioria das estirpes serem sabidamente patogênicas, elas não produzem toxinas com títulos tão elevados quando comparada a outros clostrídios histotóxicos, como *C. septicum*. Até bem recentemente, conheciam-se apenas cinco toxinas produzidas *C. chauvoei*: hemolisina estável na presença de oxigênio (alfa), DNase (beta), hialuronidase (gama), hemolisina sensível à presença de oxigênio (teta) (HATHEWAY, 1990) e neuraminidase (USEH et al., 2003). A toxina alfa foi responsabilizada durante muitos anos como o principal fator tóxico responsável pelos sinais clínicos observados nas doenças causadas por *C. chauvoei*. Contudo, não existem estudos que comprovem que a toxina alfa ou quaisquer das toxinas supracitadas sejam essenciais para a ocorrência da gangrena gasosa ou do carbúnculo sintomático. Recentemente, Frey et al. (2012) descreveram uma toxina cuja presença parece ser essencial para a ocorrência da doença, chamada de toxina A de *C. chauvoei* (CctA). Além de ser considerada um fator de virulência essencial, o toxóide feito a partir da CctA conferiu uma resposta considerada protetora frente ao desafio proposto pela Farmacopeia Europeia, que é adotado para controle oficial de vacinas contra o carbúnculo sintomático em muitos países dentre eles, o Brasil. Um resumo sobre as características dos antígenos solúveis de *C. chauvoei* encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização dos principais antígenos solúveis produzidos por *Clostridium chauvoei*.

Toxina	Fonte	Peso molecular (KdA)	Ação
Alfa	Moussa (1958)	27	Hemolisina com ação necrosante e letal.
Beta (DNase)	Carloni et al. (2005)	45	Clivagem hidrolítica do DNA degradando-o.
Gama (hialuronidase)	Hatheway (1990)	Não determinada	Degradação do hialuronato, principal constituinte e responsável pela arquitetura estrutural de tecidos conjuntivo, músculo e pele.
Delta	Hatheway (1990)	Não determinada	Atua em membranas celulares com grande quantidade de colesterol, formando poros e lise celular.
Sialidase / Neuraminidase	Useh et al. (2003)	135	Clivagem de ácido siálico e glicoproteínas presentes nos tecidos do hospedeiro.
CctA	Frey et al. (2012)	33	Leucocidina (citotoxina contra leucócitos) formadora de poros.

3.3.2 Toxina alfa

A toxina alfa foi primeiramente estudada por Moussa (1958) e Verpoort et al. (1966), que relataram algumas atividades e características biológicas a partir de filtrados de cultura de *C. chauvoei* não purificados. Essa hemolisina foi caracterizada como uma proteína necrosante, hemolítica e letal (HANG'OMBE et al., 2006), pertencente à superfamília III das hemolisinas

expressas por grande variedade de microrganismos Gram-positivos, patogênicos ou não (FREY; FALQUET, 2015).

Essa mesma toxina foi purificada e parcialmente caracterizada pela primeira vez por Tamura et al. (1992). Esses pesquisadores e seus colaboradores demonstraram que a produção da toxina tem pico máximo na fase logarítmica de crescimento bacteriano e que os eritrócitos de ovinos, bovinos e aves (galinhas) são susceptíveis à ação hemolítica dessa proteína, enquanto as hemácias de caprinos, coelhos e cobaias foram classificadas como parcialmente resistentes, e as de equinos consideradas como resistentes.

Hang'ombe et al. (2006) também analisaram a sensibilidade de eritrócitos oriundos de diferentes espécies de animais e encontraram resultados semelhantes aos de Tamura et al. (1992). A única diferença entre os trabalhos foi quanto à sensibilidade: aqueles autores demonstraram que as hemácias de ovinos eram mais sensíveis, e estes, as de bovinos. Especula-se que essa variação de sensibilidade entre as espécies pode ser explicada pela existência ou ausência de receptores presentes nas membranas das hemácias, necessários para a ligação da toxina (HANG'OMBE et al., 2006), embora não exista confirmação experimental e/ou caracterização desses receptores.

A toxina tem sua ação dependente da temperatura. Para causar hemólise em 50% dos eritrócitos a quantidade requerida de toxina é muito menor a 30°C, do que a 20°C, que por sua vez foi menor que a 10°C. No entanto, nenhum estudo conseguiu elucidar, até o momento, o mecanismo de ação da toxina alfa de *C. chauvoei*. Como existiam pouco estudos conclusivos sobre as demais toxinas de *C. chauvoei*, a toxina alfa foi considerada, por muito tempo, como o principal fator tóxico dessa espécie de *Clostridium* spp. (HATHEWAY, 1990). Contudo, seu papel na patogenia do carbúnculo sintomático não foi comprovado.

3.3.3 Toxina beta

A toxina beta é uma enzima do tipo desoxiribonuclease (DNase), tendo sido encontrada em mais de 80% das estirpes de *C. chauvoei* (CARLONI et al., 2005), embora as amostras bacterianas analisadas tenham demonstrado diferentes capacidade de produção dessa toxina. Trata-se de uma proteína termoestável, responsável pela degradação nuclear das células musculares (HATHEWAY, 1990), participando ativamente nos casos de mionecroses clostridiais (CORTINAS et al., 1999). Como descrito para a toxina alfa, a produção das toxinas DNases é influenciada pela temperatura, pelo suprimento de carboidratos e pelo pH do cultivo bacteriológico (MATTAR et al., 1997).

3.3.4 Toxina gama

Hialuronidase é um termo geral que descreve enzimas que são produzidas pela maioria, se não todas, as bactérias Gram-positivas, sendo capazes de degradarem o hialuronato, presente no ácido hialurônico e no hialurano. O hialuranato, substrato da toxina gama produzida por *C. chauvoei*, é um polímero linear de glicosaminoglicano não sulfatado, encontrados na maioria dos tecidos e fluidos corporais. O hialuranato é ainda um dos principais constituintes do tecido conjuntivo, do músculo e da pele. Por isso, os patógenos que produzem hialuronidase, ao degradarem o hialuranato, tornam-se capazes de causar infecções a partir da mucosa, tecido subcutâneo e/ou pele (HYNES; WALTON, 2000).

Normalmente, o tecido conjuntivo e a pele são considerados um mecanismo de defesa contra agentes infecciosos, resistindo a penetração da maioria dos patógenos. No entanto, as bactérias produtoras de hialuronidase, como *C. chauvoei*, são capazes de destruir as restrições impostas pela constituição dos tecidos conjuntivos, destruindo-os e facilitando a propagação bacteriana. Em se tratando de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa, embora a toxina gama não seja considerada uma toxina letal, acredita-se que ela seja responsável pela destruição do tecido conjuntivo frouxo que envolve os músculos, permitindo a disseminação da bactéria em fibras musculares mais profundas (CARLONI et al., 2005). Além disso, os produtos finais da degradação de hialuronato são dissacarídeos, que podem ser fonte de nutrientes para o patógeno (HYNES; WALTON, 2000).

3.3.5 Toxina delta

Toxinas delta são citolisinas tiol-ativada (BRYANT; STEVENS, 2006) que atuam nas membranas celulares com alto conteúdo de colesterol. Após se ancorarem nas membranas plasmáticas, essas toxinas se oligomerizam, formando poros com até 50 subunidades da toxina (GILBERT, 2002). Tratam-se de proteínas sensíveis à presença de oxigênio, cujo contato resulta na diminuição da ação hemolítica. Embora não exista uma caracterização detalhada dessa toxina, sabe-se apenas que ela é semelhante a perfringolisina O, produzida por *C. perfringens*, e a tetanopasmina, produzida por *C. tetani* (HATHEWAY, 1990).

3.3.6 Neuraminidase

As neuraminidasas produzidas por *C. chauvoei*, também chamadas de sialidasas, pertencem a uma classe de glicosil-hidrolases que liberam a porção terminal N-acetilneuramínicos, ou resíduos de ácido siálico de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos. Os substratos dessa proteína existem em quantidades abundantes no tecido muscular e na parede celular dos eritrócitos que contribui com a hidrólise dessas células e tecidos. Toxinas do tipo neuraminidasas têm sido detectadas em uma variedade de microrganismos, tais como vírus, bactérias e protozoários (USEH et al., 2003). Assim também, *C. chauvoei* produz neuraminidasas que desempenham papel significativo na patogênese do carbúnculo sintomático (HEUERMANN et al., 1991).

As sialidasas ativas são compostas de três domínios: a porção N terminal, que parece ser responsável pela ligação desta a seu receptor; a porção central, que se liga ao ácido siálico; e uma porção C terminal com atividade enzimática. Trata-se de uma toxina de origem cromossomal, cuja transcrição genética é determinada pelo gene *nanA*, que foi encontrado em inúmeras estirpes de *C. chauvoei*, incluindo a amostra de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC 10092). A sialidase obtida a partir da clonagem e da expressão do gene *nanA* resulta em uma proteína dimérica, com 150- kDa, cuja clivagem proteolítica torna-a metabolicamente ativa (65 kDa). A sialidade de *C. chauvoei* apresenta similaridade de 82% com sialidade produzida por *C. septicum* (VILEI et al., 2011).

Quando isolada de cultivos de *C. chauvoei*, a neuraminidase é uma proteína dimérica com 135 kDa, estável após ciclos de congelamento e descongelamento (HEUERMANN et al., 1991). Além disso, essa toxina permanece ativa numa ampla gama de temperaturas (4 - 50°C) e valores de pH (4 - 7,5) (USEH et al., 2006). Isso sugere que, mesmo em condições aparentemente desfavoráveis, a toxina permanece ativa, sendo capaz de favorecer o crescimento e a disseminação bacteriano, causando danos musculares após a propagação do *C. chauvoei* (HEUERMANN et al., 1991).

3.3.7 Toxina A de *Clostridium chauvoei* (CctA)

Recentemente, Frey et al. (2012) descreveram e caracterizaram uma nova toxina produzida por *C. chauvoei*. Chamada de toxina A de *C. chauvoei* (CctA), trata-se de uma proteína pertencente à família das toxinas formadoras de poros do tipo barril-beta (*beta-barrel*), da superfamília das leucocidinas. A análise sequencial do gene da CctA mostrou uma similaridade com os genes da hemolisina alfa de *C. botulinum* (50% identidade e 80% de similaridade aminoacídica-aa), da toxina da enterite necrótica similar a toxina beta (NET-B) de *C. perfringens* (44% de identidade e 60% similaridade aa) e da toxina beta de *C. perfringens* (33% identidade e 51% de similaridade aa).

Aproximadamente um terço das toxinas produzidas por bactérias do gênero *Clostridium* são classificadas como formadoras de poro (POPOFF; BOUVET, 2013). As proteínas formadoras de poro tipo barril-beta, são caracterizadas por apresentarem estrutura conservada que incluem: domínios capazes de se ligarem a receptores específicos das células alvo, sequência hidrofóbica, que é internalizada na membrana celular do hospedeiro, permitindo a ancoragem da proteína. Após a ligação e ancoragem da proteína, ocorre uma oligomerização, geralmente de heptâmeros, formando os poros, que culminam com grande influxo de conteúdo extracelular e consequente lise das células afetadas (REISS; BHAKDI, 2012).

O gene responsável pela produção da CctA parece ser estável e conservado, tendo sido identificado em estirpes isoladas em diferentes continentes, como também na amostra de referência da ATCC 10092. Embora as toxinas descritas anteriormente tenham sido consideradas responsáveis pelos quadros de carbúnculo sintomático e gangrena gasosa, anticorpos específicos contra CctA protegeram 90% dos animais desafiados, neutralizando todos os efeitos citotóxicos e hemolíticos promovidos pelo sobrenadante de culturas de *C. chauvoei* (FREY et al., 2012). Estes resultados são considerados bastante promissores, visto que essa é a primeira vez que a vacinação de cobaios com uma exotoxina produzida por *C. chauvoei* foi capaz de proteger os animais desafiados.

3.4 Antígenos celulares

Segundo Roberts (1931) os antígenos celulares de *C. chauvoei* podem ser subdivididos em antígenos somáticos e flagelares. Os antígenos somáticos incluem: antígeno aglutinogênico; antígeno O termoestável; antígeno não aglutinogênico, e antígeno termolábil, que não apresenta os antígenos O e H (CRICHTON et al., 1990). Por sua vez, os antígenos flagelares (H) são termolábeis, tendo sido identificados dois antígenos distintos (ROBERTS, 1931). De maneira geral, os estudos relativos aos antígenos somáticos restringem-se a avaliação quanto ao potencial imunogênico dos mesmos. Ao contrário, alguns estudos demonstraram a importância do flagelo na virulência da estirpe.

3.4.1 Antígenos somáticos

Os antígenos somáticos são associados a parede da célula bacteriana. Tais antígenos foram considerados durante muito tempo como componentes imunogênicos cruciais para a proteção contra infecções por *C. chauvoei*, embora os estudos sobre o potencial imunogênico desse antígeno sejam bastante controversos (HENDERSON, 1932; HAMILTON; CHANDLER, 1975). A produção desse componente varia conforme a curva de crescimento bacteriano e as condições do meio, como pH e disponibilidade de carboidratos, sendo observada maior expressão na fase

estacionária (CORTINAS et al., 1994). Respeitando-se as condições de cultivo, a expressão desse antígeno é bastante semelhante quando se compara estirpes de diferentes origens (MATTAR et al., 2002) mesmo que elas tenham sido recuperadas de espécies animais diferentes (HENDERSON, 1932).

3.4.2 Antígenos flagelares

As bactérias se movimentam em gradientes químicos utilizando um dos menores e mais complexos motores, o flagelo. Essa estrutura é praticamente idêntica entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, exceto pelo fato de que nas primeiras emergem de uma segunda membrana externa a qual está ausente em bactérias Gram-positivas. Além disso, os flagelos também ajudam na função sensorial, permitindo que a bactéria responda a estímulos químicos e evite ambientes desfavoráveis, tais como, extremos de pH e elevadas concentrações salinas (CHEVANCE; HUGHES, 2008).

Os flagelos são constituídos por um longo filamento helicoidal composto por polímeros de flagelina o qual emerge de um “gancho” (hook) conectado a um corpo basal (*basal body*) que está ancorado no interior da membrana celular (DUAN et al., 2013). Existe apenas um estudo sobre modelo estrutural do flagelo de *C. chauvoei*, que segundo Hamilton e Chandler (1975) teria uma aparência semelhante aos flagelos das demais bactérias Gram-positivas.

A flagelina de *C. chauvoei* é transcrita a partir do gene da flagelina C (*fliC*), que apresenta composição aminoacídica semelhante a flagelina da *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Segundo Kojima et al., 1999, esse polímero apresenta baixo percentual de prolina, metionina, tirosina e histidina, não sendo detectados cisteína e triptofano em sua constituição. Apesar da semelhança constitucional, a pouca caracterização estrutural do flagelo de *C. chauvoei* limita comparações mais detalhadas com o flagelo de outras bactérias.

Os flagelos são mais conhecidos por seu papel na motilidade bacteriana, mas para certas bactérias patogênicas eles têm um aspecto importante na interação do parasita com o hospedeiro. Assim, estirpes de *C. chauvoei* com flagelo são mais virulentas que as naturalmente não flageladas (TAMURA et al., 1995). Sabe-se que a composição é fundamental no arranjo estrutural do flagelo, determinando regiões polarizadas ou não, hidrofóbicas ou hidrofílicas e, até mesmo, epítomos. Por isso, modificações aminoacídicas, mesmo que pequenas, podem determinar diminuição da motilidade, menor habilidade de colonização, com consequente perda de virulência (FAULDS-PAIN et al., 2014).

Se por um lado a estrutura e o papel do flagelo de *C. chauvoei* durante a infecção ainda não foram bem caracterizados, o potencial imunogênico, como constituinte de formulações vacinais, foi amplamente analisado. Antagonicamente aos demais *Clostridium sp.*, em que a imunidade contra as toxinas sempre foi considerada a forma predominante de proteção, a imunidade contra *C. chauvoei* foi considerada, por muitos anos, como sendo exclusivamente anti-bacteriana (CHANDLER; GULASEKHARAM, 1970). Por isso, a imunogenicidade do flagelo foi alvo de estudo de vários pesquisadores, que buscavam produzir uma vacina que induzisse uma resposta protetora nos animais. Foram propostas e testadas diversas técnicas de purificação da flagelina (HAUER; ROSENBUSCH, 1996), bem como a recombinação gênica (KOJIMA et al., 2000), mas infelizmente os resultados obtidos com esses imunógenos são controversos. Com o passar dos anos, o único consenso a respeito do flagelo é que ele é um importante mecanismo de

virulência e imunogenicidade, mas ainda não se pode afirmar que o mesmo é essencial para as infecções promovidas por *C. chauvoei* nem que a resposta imune gerada por ele seja protetora.

3.5 Esporos

Os esporos são formas bacterianas pequenas, desidratadas e metabolicamente quiescentes pelas quais passam algumas bactérias mediante depleção de nutrientes ou condições adversas nos meios em que elas vivem, sendo que cada célula bacteriana é capaz de formar apenas um único esporo (PAREDES et al., 2005). Essa habilidade é restrita para as seguintes classes bacterianas: *Bacilli*, *Clostridiae* e *Negativicutes* (POPOFF; BOUVET, 2013).

A esporulação é um mecanismo importante que permite a sobrevivência dos clostrídios em condições adversas, garantindo a persistência e a disseminação dessas bactérias em diferentes ambientes. Os esporos desses microrganismos são encontrados em todo o mundo, nas camadas superficiais do solo e no sistema digestivo dos seres humanos e de diversos animais. Essa forma bacteriana resiste aos mais diversos antissépticos e ao aquecimento (GALPERIN et al., 2012).

O processo de formação de esporo dentro de uma célula vegetativa é chamado de esporulação ou esporogênese. O esporo resultante é uma célula em repouso, altamente resistente a dessecação, temperaturas extremas, radiação e a agentes químicos (SETLOW, 2007). Além disso, os esporos protegem os *Clostridium* spp. das condições adversas impostas por seus hospedeiros como o ácido gástrico no estômago (HONG et al., 2009).

Apesar da esporogênese ser uma sequência de eventos altamente complexas, essa é dividida em sete estágios, baseados nos aspectos morfológicos do esporo (MADIGAN; MARTINKO, 2008). O estágio 0 compreende as bactérias na forma vegetativa, metabolicamente ativas, que para *Clostridium* spp. são bastonetes cujo crescimento pode culminar ou não com a esporulação (Figura 2). Análises ultraestruturais de bactérias do gênero *Clostridium* nesse estágio revelam: ausência de septação; citoplasma eletrodense; e nucleóide disperso no citoplasma (TAKAGI et al., 1960).

Se a bactéria se comprometer com a esporulação, inicia-se, então, a Fase I (Figura 2). Nesse estágio, as condições adversas do meio desencadeiam um processo de diferenciação celular regulados por genes que determinam a formação do esporo. Não se sabe exatamente os fatores deflagradores da esporulação, acredita-se que, mesmo dentro de um único gênero, esses fatores influenciam de maneira diferentes as diversas espécies bacterianas (DÜRRE, 2011). Não está claro quais condições realmente ativam o processo de esporogênese, mas sabe-se que para a maioria das *Clostridium* spp. a esporulação está associada a restrições nutricionais (PAREDES-SABJA et al., 2009).

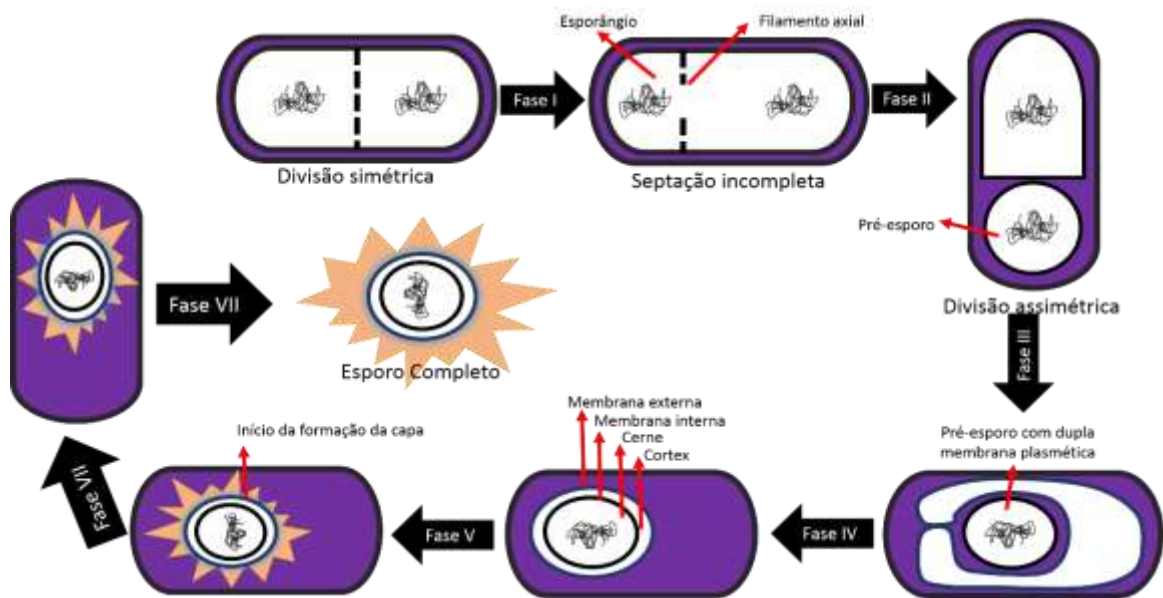


Figura 2: Representação esquemática das alterações estruturais da célula bacteriana durante a esporulação.

Certos domínios de proteínas quinases, presentes na membrana celular bacteriana de *Clostridium* spp., funcionam como sensores. Quando esses domínios são ativados, por uma alteração na composição ambiental, promovem fosforilação dessas proteínas que, em cascata, provocam a fosforilação de fatores sigmas que, por sua vez, influenciam na expressão de genes relacionados a esporulação. Adicionalmente a este mecanismo das quinases sensoriais, *Clostridium* spp. apresentam uma série de quinases órfãs desses sensores que, apesar disso, podem igualmente serem fosforiladas e induzirem a esporulação por vias não muito bem conhecidas (DÜRRE, 2011).

Iniciado o processo de esporulação, ocorre a duplicação do material genético bacteriano com consequente aumento da célula bacteriana. Assim, por mecanismos também não muito bem explicados para *Clostridium* spp., após a duplicação cromossômica, apenas uma parte do material genético se direciona para um dos polos da célula bacteriana, que passa a ser chamada de esporângio. O final da fase I de esporulação culmina com a formação de um filamento axial, que é uma protrusão da membrana plasmática em direção ao citoplasma, mas não causa uma septação completa na célula bacteriana (LEGGETT et al., 2012).

Na fase II, uma pequena porção do citoplasma é, então, isolada pelo filamento axial com uma protrusão da membrana citoplasmática (septo) em direção ao citoplasma bacteriano, determinando uma divisão celular assimétrica (Figura 2). O compartimento menor, recém-formado, é então chamado pré-esporo, sendo composto pela membrana citoplasmática, material genético e um pequeno conteúdo citoplasmático (cerne), contendo proteínas e ribossomos. Após a septação completa do pré-esporo este é captado pela célula mãe devido a uma invaginação da membrana plasmática, de modo a produzir um pré-esporo com membrana citoplasmática dupla, perfazendo o estágio III da esporulação (PIGGOT; HILBERT, 2004).

Ao final desse estágio, observa-se o esporo ligado a célula mãe ou esporângio, envolto por uma dupla membrana celular, que passam a ser chamadas de membrana interna e externa do esporo, respectivamente. Essas membranas são intercaladas por uma camada fina de peptidoglicano, que

se encontrava sobreposto a membrana celular que promoveu a invaginação (Figura 2) (LEGGETT et al., 2012). Durante o processo de esporulação, a membrana interna do esporo passa a ter menor permeabilidade que a membrana celular da bactéria na forma vegetativa, embora a composição lipídica das duas seja a mesma. Isto se deve a uma mudança na mobilidade dos lipídios, possivelmente devido a compressão provocada pelo córtex ou pela própria desidratação do cerne (COWAN et al., 2004).

No estágio IV a invaginação se completa, e observa-se entre as membranas uma contínua síntese de peptidoglicano que se torna mais denso, determinando a formação do córtex. Embora a parede celular também seja composta por peptidoglicano, a estrutura química desse no córtex é completamente diferente da encontrada na célula vegetativa. Uma das principais diferenças é a ausência de ácido teicóico no córtex, estrutura antigênica, reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, presente exclusivamente na célula vegetativa. Além disso, as moléculas de peptidoglicano que compõem o córtex fazem poucas ligações cruzadas e conservam as proteínas necessárias para a germinação (ADAMS et al., 2013).

No estágio subsequente (V), observa-se a síntese da capa do esporo, uma estrutura bastante variável entre espécies e entre estirpes de uma mesma espécie. Por sua vez, a capa do esporo é composta basicamente de queratina, que confere grande resistência frente a agentes químico antimicrobianos e pouca permeabilidade; e proteínas. Ainda há na capa uma pequena quantidade de carboidrato, sendo a maioria glicosilados com polipeptídios. As proteínas possuem diversas funções como: atividades enzimáticas; maturação; e morfogênese do esporo e prevenção de penetração de grandes moléculas, o que permite a resistência dos esporos a diversos componentes que normalmente determinariam a morte de bactérias na forma vegetativa (PERMPOONPATTANA et al., 2013). O exósporo é a última camada do esporo, que não está presente em todas as espécies de bactérias esporuladas, cuja função não é bem compreendida.

A maturação do esporo acontece no estágio VI. Uma vez completada a esporogênese, o esporo é liberado (estágio VII) no ambiente, podendo sobreviver por muitos anos (LEGGETT et al., 2012) (Figura 2). Ao final do processo de esporulação o esporo contém as seguintes estruturas: cerne, membrana interna, córtex, membrana externa, capa e exósporo (Figura 3). Em conjunto, são essas as estruturas que conferem ao esporo grande resistência as adversidades físicas e químicas.

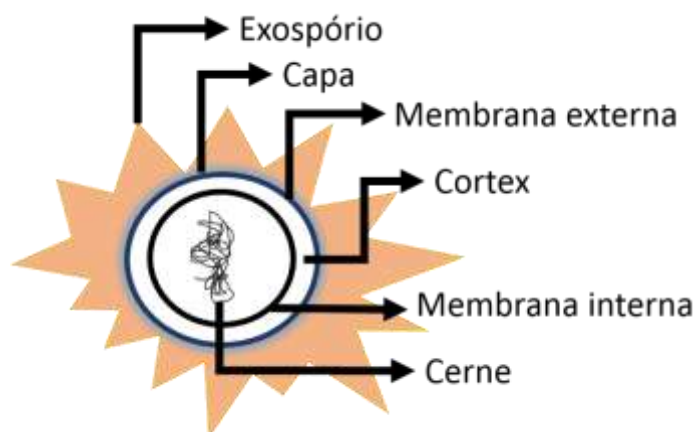


Figura 3: Representação típica da estrutura do esporo.

A maior parte do citoplasma do cerne é eliminada quando se completa a esporogênese. Assim, as reações metabólicas só ocorrem em níveis quase imperceptíveis. O cerne do esporo tem apenas DNA, RNA, ribossomos, enzimas e algumas poucas moléculas pequenas, porém importantes. Dentre essas, estão incluídas grande quantidade de ácido dipicolínico, junto com grandes quantidades de íons cálcio (SETLOW, 2007). O ácido dipicolínico, combinado com o cálcio, é característico do endósporo bacteriano, não estando presentes nas células vegetativas. Essa condição desidratada do cerne é que protege o DNA bacteriano de danos ambientais (LEGGETT et al., 2012).

3.6 Carbúnculo sintomático: uma doença de ocorrência mundial cuja patogênese é explicada por hipóteses

Até 1870, o carbúnculo sintomático era considerado uma forma específica do antraz, sendo denominado antraz sintomático. Bollinger e Feser foram os primeiros a demonstrar que o antraz e carbúnculo sintomático se tratavam de duas doenças diferentes e, que o antraz sintomático era causado por *C. chauvoei*. Desde então, a doença passou a ser conhecida como carbúnculo sintomático (HATHEWAY, 1990). Popularmente, está patologia também é conhecida como manqueira, peste da manqueira ou mal de ano. Atualmente, carbúnculo sintomático é considerado uma doença de distribuição mundial, sendo enzoótico em algumas regiões, embora a incidência seja frequentemente controlada com vacinação (USEH et al., 2006; SATHISH; SWAMINATHAN, 2008; UZAL, 2012).

O carbúnculo sintomático é uma miosite gangrenosa dos ruminantes causada por *C. chauvoei*, caracterizada pela ativação de esporos latentes previamente presentes na musculatura. Essa definição é o que diferencia o carbúnculo da gangrena gasosa. Nessa última, *C. chauvoei* também pode participar como agente causador, mas o microrganismo atua como contaminante de feridas. Para diagnóstico, prognóstico e estudos epidemiológicos é muito importante fazer a distinção entre essas duas patologias (VANVLEET; VALENTINE, 2007).

A presença da lesão muscular, mesmo que característica, não permite distinguir o carbúnculo sintomático da gangrena gasosa, nem mesmo após a identificação de *C. chauvoei* na lesão (UZAL, 2012). Por isso, diagnóstico de carbúnculo sintomático deve ser feito imediatamente ou logo após a morte do animal, preferencialmente em mais de um animal do rebanho, quando da ocorrência de surtos, sendo a anamnese clínica imprescindível para avaliação de manejo que propiciem a ocorrência de feridas ou não (GROSETH et al., 2011).

O carbúnculo sintomático normalmente ocorre em bovinos e ovinos e raramente em outras espécies (VANVLEET; VALENTINE, 2007). Contudo, devido à grande importância dessa patologia para a pecuária bovina, alguns autores chegam a considerá-la como uma doença quase exclusiva de bovinos criados extensivamente (ASSIS et al., 2005). A doença afeta animais com boa condição corporal, que de maneira geral são considerados os de maiores massas musculares do rebanho. Em bovinos, a doença é normalmente observada em animais jovens, com até 36 meses, sendo a maior parte dos relatos restritos a animais com faixa etária entre 9 e 24 meses (WILSON, 1946).

Quando os animais acometidos por carbúnculo sintomático morrem e as carcaças não são adequadamente destinadas, as mesmas podem contaminar o solo com esporos de *C. chauvoei* (BARNES et al., 1975; HANG'OMBE et al., 2000). Análises genéticas e proteômicas de amostras

de *C. chauvoei*, isoladas de áreas enzoóticas para o carbúnculo sintomático, revelaram que os animais são infectados pela mesma estirpe presente no ambiente. Isso prova que a contaminação ambiental, e não a introdução do agente no ambiente, é uma das principais formas de manter a doença em um rebanho, mesmo que os casos tenham sido observados após lapsos temporais (SATHISH; SWAMINATHAN, 2008).

No solo, a bactéria pode então ser disseminada para áreas adjacentes como pastos, aguadas e estábulos pelos próprios bovinos, que podem carrear a bactéria em seus intestinos e/ou se tornarem doentes perpetuando o ciclo (BARNES et al., 1975; HANG'OMBE et al., 2000). Salienta-se que embora não tenha sido comprovada a capacidade de *C. chauvoei* se proliferar no solo, os esporos bacterianos permanecem viáveis e retém, além da sua vitalidade, seus mecanismos de virulência por longos períodos de tempo (SATHISH; SWAMINATHAN, 2008).

Não se sabe ao certo, como acontece a contaminação de tecidos saudáveis. Acredita-se que os animais jovens, ingiram os esporos disseminados no ambiente. A maioria dos esporos ingeridos passam pelo trato intestinal sem serem degradados ou causarem danos aos próprios animais. Eventualmente, alguns desses esporos são captados por macrófagos, presentes na lâmina própria, e carreados para outros tecidos saudáveis, onde permaneceriam latentes até que uma condição ideal para sua germinação fosse estabelecida (UZAL, 2012).

Já foi comprovado que esporos latentes de *C. chauvoei* (MINETT, 1948a) e de outros *Clostridium* spp. podem ser recuperados da carcaça, fígado e baço de animais saudáveis. Em animais experimentalmente inoculados com clostrídios, as bactérias podem ser encontradas, por pelo menos após dois meses da inoculação, em locais diferentes do ponto de entrada, mesmo que os animais não tenham desenvolvido nenhuma sintomatologia clínica (MINETT, 1948b). Não se sabe ao certo porque o carbúnculo acomete primariamente bovinos jovens, nem porque *C. chauvoei* é a única espécie do gênero envolvido nessa patologia, dada a habilidade de outros *Clostridium* spp. permanecerem latentes.

Tendo sido comprovada a capacidade de sobrevivência do *C. chauvoei* em animais e tecidos saudáveis (MINETT, 1948b; SATHISH; SWAMINATHAN, 2008), tem-se discutido as condições que naturalmente tornariam os tecidos musculares propícios para a germinação de esporos latentes, na ausência de injúria muscular. Sabe-se que a tensão de oxigênio muscular, nas condições naturais, é considerada mais baixa que a tensão de oxigênio atmosférico (CAMPBELL; DUDLEY, 1923), embora não seja suficiente para permitir a germinação e multiplicação de bactérias do gênero *Clostridium* (HATHEWAY, 1990; O'BRIEN; MELVILLE, 2000). Por isso, pressupõe-se que a ocorrência de carbúnculo sintomático esteja associada a fatores adicionais que proporcionem maior oxidação muscular.

Outra possibilidade seria a alta concentração de ácido láctico, capaz de induzir a queda do pH muscular, promovendo danos as fibras musculares. Isso geraria uma condição inicial para germinação dos esporos devido à baixa solubilidade do oxigênio e grande disponibilidade de nutrientes (MINETT, 1948b). O ácido láctico poderia ser acumulado tanto após exercícios físicos extenuantes como após ao desequilíbrio ácido-base gerado por dietas com alto conteúdo energético, principalmente de carboidratos (MINETT, 1948a). Se a germinação estiver associada a presença de ácido láctico, isso explicaria, pelo menos parcialmente, por que os animais com maiores massas musculares e principalmente os quartos traseiros são os mais acometidos.

Os animais com melhores condições corpóreas, assim como os quartos traseiros, têm grande área de tecido muscular que recebe aporte sanguíneo proporcional. Mediante uma injúria tecidual provocada, por exemplo, pela presença do ácido láctico, esses animais receberiam, também, aporte proporcional de células de defesa para proteger o tecido do dano. No entanto, o infiltrado inflamatório, mais do que proteger o corpo, promoveria um dano adicional com diminuição da oxigenação tecidual e geração das condições necessárias para germinação dos esporos. Assim, essa área acometida por dano tecidual também seria maior nos animais com grande cobertura muscular do que nos com menores coberturas (MINETT, 1948a).

Adicionalmente, a insulinemia, provocada por grande aporte nutricional de carboidratos, promove uma redução na tensão de oxigênio e um aumento na tensão de gás carbônico muscular, devido a uma vasoconstrição periférica (CAMPBELL; DUDLEY, 1923). Fator que também poderia contribuir para a geração de condições necessárias para a germinação e multiplicação de esporos de bactérias do gênero *Clostridium*. No entanto, nenhuma dessas hipóteses foram comprovadas e essas explicações não seriam suficientes para explicar porque somente animais jovens são acometidos ou por que algumas vezes o diafragma ou coração são as únicas áreas afetadas. Restamos o encargo de melhor compreender uma doença responsável pela morte dos melhores animais de um rebanho.

Após a germinação de *C. chauvoei*, as condições nutricionais necessárias para a multiplicação do microrganismo estariam relacionadas à fermentação do glicogênio, presente no tecido muscular (MINETT, 1948a). Quando as lesões ocorrem no músculo esquelético dos membros levam à claudicação; na língua, podem produzir disfagia, enquanto no miocárdio e no diafragma, podem resultar em morte súbita sem sinais premonitórios (VANVLEET; VALENTINE, 2007).

Quando o carbúnculo sintomático não é rapidamente controlado, o animal desenvolve toxemia sistêmica e choque. As lesões encontradas na carcaça compreendem aumento de volume do músculo afetado acompanhado de edema enfisematoso. Ao corte e a palpação, a região afetada encontra-se frequentemente crepitante, sendo possível evidenciar a saída de gás com odor butírico e discreto extravasamento de fluido levemente avermelhado. O edema subcutâneo e hemorragia do membro afetado pode estender-se para toda a parte ventral do abdome e tórax. As fâscias e os feixes musculares apresentam-se distendidos e separados devido a presença de gases. Os músculos apresentam cor vermelho-escura tendendo ao preto (indicando forte hemorragia local). Alguns dos músculos podem apresentar tonalidade acinzentada (indicando necrose muscular) (PIRES et al., 2012). Os danos teciduais geralmente são extensos e determinam a morte do animal. A morte ocorre como consequência do efeito das toxinas na hemodinâmica do sistema vascular (ROOD, 1998).

O estudo histológico muscular de animais afetados por *C. chauvoei* revela presença de intenso infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos e poucos macrófagos nas fâscias musculares. São observadas hemorragias leve a moderada, inclusive em áreas próximas as fibras musculares fragmentadas. As fibras musculares encontram-se difusamente fragmentadas (necrose flocular). Os bacilos, quando presentes, estão difusamente distribuídos e presentes em quantidades moderadas a intensas (PIRES et al., 2012).

O tratamento dessa infecção é notoriamente difícil, pois são afetados tecidos que tem a perfusão vascular diminuída, conseqüentemente, as terapias a base de antibióticos têm uma eficiência limitada, sendo frequentemente combinadas com outras intervenções como a remoção cirúrgica

do tecido afetado. Portanto, as medidas gerais se restringem a cuidados de manejo e administração sistemática de imunógenos (LOBATO et al., 2013).

3.7 Situação do carbúnculo sintomático no Brasil

A ocorrência do carbúnculo sintomático no Brasil é bastante antiga e acompanhou toda a evolução do sistema da criação de bovinos, no país. Inicialmente, o aspecto clínico do carbúnculo sintomático não era considerado específico, pois a evolução dos sinais clínicos não podia ser percebida por produtores e veterinários. Isso porque a ocorrência da doença estava associada a animais de criação extensiva, na qual não era comum reunir o gado para manejo e inspeção. Assim, as carcaças dos animais mortos por essa infecção só eram encontradas muitos dias após a morte e em avançado estágio de putrefação, mascarando total ou parcialmente as alterações antomo-patológicas (RODRIGUES, 1939).

Portanto, havia grande dificuldade de se chegar a um consenso a respeito do agente etiológico envolvido nos casos de carbúnculo sintomático. Além dos fatores relacionados ao modelo de criação, o cultivo bacteriológico era reconhecidamente difícil, dada a extrema exigência nutricional e atmosférica do *C. chauvoei*. Somando-se a isto, eram frequentes os isolamentos de outros clostrídios histotóxicos, o que fomentava os questionamentos a respeito da etiologia (RODRIGUES, 1939).

Somente em 1905, Rocha Lima reuniu provas suficientes para demonstrar de maneira definitiva o envolvimento de *C. chauvoei* nos casos de carbúnculo sintomático. Assim, naquele mesmo ano, o Ministério da Justiça incumbiu o Instituto Oswaldo Cruz de descobrir uma maneira eficaz de minimizar as perdas provocadas pela doença que dizimava os rebanhos paulistas e mineiros. Foi em 1906 que Alcides Godoy, cientista do referido instituto, descobriu a primeira vacina veterinária do país para profilaxia de doenças infectocontagiosas: a vacina contra o carbúnculo sintomático (MORAES, 2008). O imunógeno produzido foi patenteado e os direitos provindos da venda da Vacina Anticarbunculosa Manguinhos foi cedida ao Instituto. A ocorrência da doença era um gargalo tão grande para a pecuária brasileira, naquele momento, que a venda dessa vacina foi uma das maiores fontes de renda da instituição, viabilizando estudos sobre a doença de Chagas, febre amarela e leishmaniose (CHAMAS, 2006).

Os avanços no controle, na prevenção e no diagnóstico da doença minimizaram as perdas provocadas por ela, mas não foram capazes de erradicá-la. Assim, *C. chauvoei* foi apontado como um dos principais agentes infecciosos responsáveis pela morte de animais entre 1970 e 1979, estando envolvido tanto em casos de gangrena gasosa como de carbúnculo sintomático, em São Paulo. *C. chauvoei* também foi considerado um dos três mais importantes agentes envolvidos na morte de ruminantes domésticos em Minas Gerais entre 1982 a 1989 (BALDASSI et al., 1985). Depois disso, diversos casos isolados de carbúnculo sintomático ou surtos foram descritos (ASSIS et al., 2005), existindo poucos relatos de tratamento bem-sucedido (GREGORY et al., 2006). No entanto, não existem dados consistentes que permitam avaliar a real ocorrência da doença no país.

O carbúnculo sintomático ainda é tratado como um problema grave para a saúde animal. O agente etiológico dessa patologia é também o mais frequentemente encontrado nos casos de gangrena gasosa (ASSIS et al., 2010), fato que demonstra a importância do contínuo estudo do agente e da doença provocada por *C. chauvoei*.

3.8 Evolução do diagnóstico do carbúnculo sintomático

No Brasil, apesar do significativo número de focos, a maior parte dos diagnósticos é baseada apenas em sinais clínicos, pouco conclusivos, e/ou lesões de necropsia, existindo poucos relatos de confirmação laboratorial (LOBATO et al., 2013). O primeiro relato sobre o diagnóstico sistemático da ocorrência de carbúnculo sintomático, no Brasil, foi feito por Rodrigues (1939). O pesquisador teve acesso a 44 casos suspeitos da doença, analisando materiais de diferentes tipos e grau de conservação variado, todos oriundo do interior do Estado de São Paulo. *C. chauvoei* foi identificado em 75% dos materiais analisados, sendo o único agente encontrado em mais de 47% das amostras enviadas. A metodologia diagnóstica, um dos objetos do estudo foi baseado no aspecto morfológico do crescimento em placa e em meio tarozzi; no quadro da doença em cobaia e no exame bacterioscópico da impressão do peritônio.

Nos anos seguintes, os diagnósticos de carbúnculo sintomático no Brasil foram baseados em quatro métodos para seleção da bactéria: agentes químicos (fenol) capazes de selecionar estirpes de *C. chauvoei*, agentes físicos, principalmente calor, cultivo bacteriológico e inoculação em animais susceptíveis, optando-se, normalmente por uma associação dessas técnicas. A utilização de agentes químicos e físicos para isolamento de *C. chauvoei*, foram bastante criticadas devido à grande variabilidade quanto a resistência das estirpes diante dos desafios impostos pela aplicação dos componentes físicos e químicos. O cultivo bacteriológico também era um grande obstáculo para os pesquisadores da época. As dificuldades relatadas variavam, sendo relatada a impossibilidade de se obter um meio suficientemente rico para suportar o crescimento desse microrganismo fastidioso, a observação de colônias com características morfológicas variáveis e o crescimento de outros microrganismos menos exigentes com consequente inibição do crescimento de *C. chauvoei*. Além disso, mesmo que o isolamento fosse bem-sucedido, a manutenção do microrganismo isolado era, por vezes impossibilitada, devido a extensa produção de gás que provocavam a comunicação dos meios de cultivo com o ambiente externo (RODRIGUES, 1939).

Por último, o diagnóstico por meio da inoculação de cobaias com cultivos primários de espécimes clínicos era bastante controverso. Alguns autores sugeriam a realização do diagnóstico por meio da observação de necropsia dos animais inoculados, o que permitiria a diferenciação entre os diversos *Clostridium* sp. histotóxicos. Outros, no entanto, ressaltavam a grande variedade de quadros observados nos animais inoculados e a possibilidade de inocular cultivos não purificado, produzindo assim uma infecção mista. Para resolver esse impasse, foi utilizada também a inoculação complexa. De acordo com esse método diagnóstico, cobaias previamente imunizadas com apenas uma estirpe de *Clostridium* sp. histotóxico deveriam ser desafiadas com espécime clínico, o que permitiria a identificação etiológica através da neutralização (RODRIGUES, 1939).

Com o implemento de técnicas imunológicas, e devido ao crescimento fastidioso do agente, foram propostas metodologias alternativas que pudessem ser mais rapidamente executadas, possibilitando o emprego de medidas profiláticas que protegesse o restante do rebanho e minimizassem os custos e perdas provocadas pela doença. Nesse contexto o uso da imunofluorescência direta (IFD), baseada na técnica desenvolvida por Batty e Walker (1963), passou a ser considerada método padrão ouro. O reconhecimento da técnica fez com que pesquisadores brasileiros desenvolvessem a metodologia necessária para obtenção e conjugação de anticorpos necessário para a detecção específica de *C. chauvoei* (ASSIS et al., 2001; PINTO et al., 2005), a fim de diminuir os custos e disseminar a utilização da mesma. Apesar do sucesso obtido na produção dos insumos necessário para a realização da técnica, na rapidez e segurança

do método, o diagnóstico por IFD ainda encontra alguns entraves como: necessidade de microscópio especial para a leitura, perda de fluorescência dos anticorpos primários marcados com fluorocromos e necessidade de material fresco ou especialmente processado (ASSIS et al., 2001).

Assim, a imunistoquímica (IHQ) surgiu como uma possibilidade alternativa. A técnica combina análises histológicas, imunológicas e bioquímicas e permite localizar o agente infeccioso *in situ* mediante o emprego de anticorpos específicos e moléculas marcadoras. Embora seja uma técnica mais demorada que a IFD, a IHQ apresenta como vantagem a utilização de materiais fixados em formol, aumentando-se o prazo entre coleta e processamento laboratorial sem, contudo, interferir no diagnóstico. A ampliação desse prazo, sem prejuízo do material clínico coletado, é de extrema relevância em medicina veterinária, pois grande parte das propriedades rurais está distante dos centros de diagnóstico e pesquisa. Além disso, a fixação dos tecidos evita a autólise dos mesmos impedindo que clostrídios saprófitos se multipliquem. Todos esses fatores aumentam a precisão do diagnóstico etiológico, informação que possibilita a adoção de esquemas de imunização adequados além de servir de referência para a indústria produtora de vacinas (ASSIS et al., 2005; ASSIS et al., 2010).

Outra alternativa para o diagnóstico, já disponível no Brasil, é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que busca identificar *C. chauvoei* em cultura ou em espécimes clínicos armazenados em papel filtro (RIBEIRO et al., 2012). Os protocolos de PCR convencional para identificação de *C. chauvoei* são diversos, tendo sido descritas PCR monoplex (FARIAS et al., 2012), duplex para detecção múltipla de *C. septicum* e *C. chauvoei* (ASSIS et al., 2008) e multiplex (RIBEIRO et al., 2012), todos baseados na detecção do gene da flagelina. A PCR tem a desvantagem de não permitir identificação do agente *in situ*.

3.9 Prevenção, controle e erradicação do carbúnculo sintomático

A vacinação contra os diversos patógenos do gênero *Clostridium*, incluindo-se *C. chauvoei*, tem sido mundialmente empregada como principal medida profilática. Particularmente, a vacinação contra *C. chauvoei* é uma das principais medidas sanitárias de manejo na pecuária bovina. No entanto, as evidências científicas da eficácia da vacinação, assim como dos antígenos empregados na formulação das vacinas, na prevenção da doença e das mortes por ela provocadas, são escassos (UZAL, 2012).

Diversas composições antigênicas foram propostas. Os primeiros estudos com relação aos imunógenos procuraram estabelecer se a formulação vacinal deveria ser baseada em bacterinas, toxóides ou bacterinas/toxóides. Talvez, pelas dificuldades de cultivo, foi inicialmente proposto que a imunidade seria conferida apenas pela bacterina que compunham então os antígenos comerciais (ROBERTS, 1946; CHANDLER; HAMILTON, 1975). Os toxóides eficientes só eram conseguidos em formulações laboratoriais, com condições de produção controladas associadas a concentração das toxinas antes da etapa de inativação (STERNE et al., 1951).

A formulação vacinal também foi objeto de estudo de Coackley e Weston (1957). Esses pesquisadores imunizaram três grupos de ovelhas com os seguintes antígenos: toxóide, bacterina e bacterina/toxóide. Somente as ovelhas vacinadas com toxóide morreram após desafio. Isso reforçou a ideia inicial que os imunógenos deveriam ser baseados principalmente em bacterinas.

Como a bactéria tinha sido considerada um dos componentes antigênicos mais importantes, buscou-se descobrir qual seria a porção mais antigênica da célula bacteriana, a parede celular (antígenos somáticos) ou o flagelo (TAMURA et al., 1984). Com resultados controversos, predominou por muito tempo a ideia de que ambos seriam, isolada ou combinadamente, capazes de induzir uma resposta protetora. Os anticorpos gerados nesta resposta seriam importantes na opsonização do patógeno, aumentando a eficiência das vacinas e protegendo os animais frente ao desafio por *C. chauvoei* (TAMURA; TANAKA, 1987).

Com a descoberta da CctA (FREY et al., 2012) abriu-se novas perspectivas com relação a composição dos imunógenos contra o carbúnculo sintomático. Os pesquisadores fizeram o teste de potência recomendado pela Farmacopeia Europeia utilizando uma toxina recombinante CctA e observaram que todos os animais vacinados sobreviveram ao desafio. Assim, a nova toxina não só seria capaz de conferir imunidade protetora aos animais como a técnica de proteínas recombinantes facilitaria a produção do imunógeno.

Apesar da falta de consenso sobre a composição ideal dos imunógenos contra o carbúnculo sintomático, a vacinação contra a *C. chauvoei* faz parte da gestão de saúde da pecuária Brasileira e mundial. Apesar de não haver comprovação científica, preconiza-se que os bovinos sejam imunizados entre 4 e 6 meses de idade, com pelo menos um reforço 30 dias após a primovacinação. Posteriormente, a vacinação deve ser anual. Em locais de alta prevalência o intervalo de vacinação deve ser reduzido para 9 meses (UZAL, 2012).

No Brasil, a vacinação contra clostridiose é voluntária. No entanto, estes imunógenos só são produzidos em menor escala do que a vacina contra febre aftosa, que é obrigatória e semestral na maior parte do território nacional. Por ano, mais de 200 milhões de doses de vacinas, contra doenças causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, são produzidas, refletindo o impacto causado por estas enfermidades nos sistemas de criação, e a crescente necessidade de se proteger um grande número de animais frente às mesmas.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) avalia sistematicamente as bacterinas de *C. chauvoei*, os toxóides botulínicos tipos C e D e, desde 2009, os toxóides beta e épsilon de *C. perfringens* tipo B, C e D (LIMA et al., 2011). Segundo a Portaria N° 49 do MAPA, o controle das partidas de vacinas contra *C. chauvoei* comercializadas no país é feito para atestar a inocuidade, a esterilidade e potência mediante teste de eficiência em cobaias. Assim, somente as partidas consideradas aprovadas no teste oficial são liberadas para comercialização, garantindo a qualidade das mesmas (BRASIL, 1997).

Apesar da intensa imunização do rebanho brasileiro, e da avaliação governamental da potência desses imunógenos contra *C. chauvoei*, a ocorrência do carbúnculo sintomático ainda é um entrave para a pecuária brasileira. Segundo (ASSIS-BRASIL et al., 2013), essa é a segunda doença mais frequentemente detectada em bezerros com idade entre 4-6 meses, sendo descritas algumas ocorrências em rebanhos previamente imunizados (GREGORY et al., 2006). Descartando-se a possibilidade de falha nos procedimentos de vacinação, alguns pesquisadores sugeriram uma eventual possibilidade de variações antigênicas entre as estirpes vacinais e as de campo ou um problema à eficiência das vacinas frente a desafios naturais.

Como a eficiência de todas as vacinas comerciais são avaliadas frente ao desafio de cobaias previamente vacinadas com a estirpe oficial Manguinhos-Teixeira (MT), Santos (2003) comparou a proteção observada em cobaias vacinadas com imunógenos comerciais quando parte delas

foram submetidas ao desafio com a amostra oficial MT e as demais com uma estirpe isolada de uma ocorrência natural. Esse pesquisador observou uma proteção de 95,46% quando o desafio foi feito com a estirpe MT. Por outro lado, quando os animais imunizados foram desafiados com uma estirpe de local, apenas 36,36% das vacinas foram capazes de proteger os animais. Discordância de proteção mediante o desafio com estirpes heterólogas também foram demonstrados por outros pesquisadores brasileiros (ARAUJO et al., 2010). No entanto, não existe um consenso na literatura nacional ou internacional a respeito desse assunto. Outros pesquisadores não encontraram diferença na imunidade conferida por diferentes estirpes de *C. chauvoei*. Para esses autores, as eventuais falhas vacinais teriam causas não relacionadas à estirpe utilizadas na vacina (VARGAS et al., 2012). Somando-se as controvérsias sobre composição vacinal, a eficácia da vacina contra carbúnculo sintomático em prevenir a ocorrência da doença é tida mais como uma evidência anedótica do que científica, propriamente dita. Apesar do grande consenso a respeito da importância da vacinação, existe pouca evidência científica sobre os protocolos de vacinação eficientes (UZAL, 2012).

Alguns estudos brasileiros buscaram avaliar a importância da imunidade passiva e o melhor protocolo de vacinação de bezerros. Segundo Araújo et al. (2009), a imunidade passiva pode ser detectada em bezerros por até três meses após receberem colostro de vacas vacinadas até 30 dias antes do parto. Os autores salientam ainda que há uma correlação positiva entre o título de anticorpos observado nos bezerros e o momento da vacinação da vaca. Assim, quanto mais próximo do parto as vacas recebiam a imunização, maior o título de anticorpos dos bezerros aos três meses de idade.

Com relação a imunização ativa de bezerros, Araujo et al. (2010) avaliariam a resposta sorológica de animais submetidos a três diferentes protocolos de vacinação contra carbúnculo sintomático: animais vacinados aos quatro e oito meses; vacinados aos oito meses com reforço 30 dias após a primo-vacinação e aqueles que receberam uma única dose da vacina aos oito meses de idade. Por meio de ELISA, os autores concluíram que somente o último esquema de vacinação não garantiria título de anticorpos satisfatórios para os animais vacinados quando estes tivessem 10 meses de idade. Infelizmente, não foi objeto de nenhum desses estudos avaliar a efetividade da proteção da imunidade passiva e ativa mediante desafio direto dos animais avaliados.

4 CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE MEIOS PARA OBTENÇÃO DE SUSPENSÕES BACTERIANAS HOMOGÊNEAS DE *Clostridium chauvoei*

4.1 Introdução

Clostridium spp. são bactérias Gram-positivas e anaeróbias estritas, que tem capacidade de esporular mediante condições ambientais adversas. O esporo bacteriano gerado é uma célula em repouso que possui alta resistência a dessecação, temperaturas extremas, radiação e a agentes químicos. Essas propriedades garantem a persistência dessa forma bacteriana por longos períodos mesmo que em condições ambientais desfavoráveis (STRINGER et al., 2011).

A manutenção de esporos viáveis no ambiente, que podem retornar ao estado vegetativo se lhes forem oferecidas condições ideais para germinação, é o fator mais significativo para infecções causadas por bactérias do gênero *Clostridium* (LOBATO et al., 2013). Além disso, essa forma bacteriana pode resistir aos processos de eliminação de patógenos relacionados a imunidade inata e/ou adquirida do hospedeiro, apesar de ser considerada uma célula quiescente. Por isso, os esporos são também considerados uma importante forma de persistência bacteriana no organismo hospedeiro (PAREDES-SABJA et al., 2012; PAREDES-SABJA; SARKER, 2012).

Apesar de serem incapazes de produzirem exotoxinas, principal fator de virulência do gênero, e por isso considerados inertes (LEGGETT et al., 2012), os esporos são a forma bacteriana infectante para inúmeras e importantes clostridioses, dentre elas o carbúnculo sintomático causado por *C. chauvoei*. A ingestão de esporos presentes no ambiente constitui-se na principal via de transmissão da doença. Embora a maioria dos esporos seja excretada nas fezes, alguns podem deixar o intestino e serem distribuídos nos tecidos onde permanecem dormentes até que condições propícias permitam a germinação e a intensa proliferação bacteriana, com consequente produção de toxinas que são responsáveis pelo quadro patológico (UZAL, 2012).

Diante da grande importância dos esporos na ocorrência de diversas clostridioses, o estudo dessa forma bacteriana torna-se cada vez mais desafiador. A produção de suspensões puras de esporos de *Clostridium* spp. é indispensável para a investigação de sua fisiologia, bioquímica e para a realização de estudos relacionados a patogênese. Entretanto, o maior desafio para a produção de suspensões contendo exclusivamente esporos de *Clostridium* spp. são os hábitos, normalmente não sincronizados, de multiplicação bacteriana. Isso faz com que o cultivo de *Clostridium* spp. tenha a forma esporulada e vegetativa simultaneamente, havendo predominância de uma das formas bacterianas, mas não a homogeneidade (YANG et al., 2009).

Outra dificuldade, reportada na produção de suspensão de esporos, é o fato que os cultivos e procedimentos adotados para tal não podem ser universalmente aplicados a todas as bactérias do gênero. Assim, apesar do relativo avanço nas técnicas adotadas para obtenção de esporos de *C. difficile* (PAREDES-SABJA et al., 2012), *C. perfringens* (ORSBURN et al., 2009) e *C. botulinum* (STRINGER et al., 2011), poucos estudos foram feitos com *C. chauvoei*. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes meios de esporulação para obtenção de uma suspensão de esporos de *C. chauvoei*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Amostra de referência e condições de cultivo

Foi utilizada uma estirpe liofilizada da *American Type Culture Collection* (ATCC)¹ de *C. chauvoei* (ATCC 10092), pertencente a bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFGM. A amostra foi reconstituída em caldo *Reinforced Clostridial Medium* (RCM)² e após 48 horas de incubação, em jarra de anaerobiose³, contendo mistura gasosa (80% N₂; 10% CO₂; e 10% H₂), a 37°C, foi semeada em tubos de ensaio com tampa rosca, contendo RCM, e em duas placas com ágar sangue de carneiro a 5% (v/v). Os tubos e uma das placas foram incubados em anaerobiose a 37°C por 48 horas. A outra placa foi incubada em aerobiose para avaliação da pureza da amostra. As colônias foram avaliadas visualmente e pelo método de Gram quanto à morfologia e pureza. Para confirmação da identidade, a estirpe foi submetida à técnica de IFD (ASSIS et al., 2001) e PCR multiplex (RIBEIRO et al., 2012).

4.2.2 Preparo da suspensão bacteriana contendo predominantemente células vegetativas de *Clostridium chauvoei*

Para avaliação do tempo de cultivo necessário para obtenção de uma suspensão bacteriana contendo predominantemente células vegetativas de *C. chauvoei*, foram feitos cinco repiques sucessivos, em caldo RCM⁴, da estirpe de referência. Após o último repique a amostra foi transferida para três tubos contendo caldo RCM⁵ e incubada por 12, 24 e 48 horas, em jarra de anaerobiose⁶, contendo mistura gasosa (80% N₂; 10% CO₂; e 10% H₂), a 37°C. Após esse período de incubação, a suspensão bacteriana foi submetida a contagem bacteriana, em ágar sangue de carneiro a 5% (v/v) (MANTECA et al., 2001) para determinação da quantidade de unidade formadora de colônias viáveis. Para se obter o percentual de bactérias na forma vegetativa em relação a forma esporulada, uma alíquota da suspensão bacteriana foi submetida a contagem bacteriana na câmara de Neubauer. Foram contadas 300 bactérias agrupando-se as bactérias contadas conforme a forma bacteriana em esporuladas ou vegetativas. O número de bactérias na forma vegetativa obtido foi dividido por 300 e multiplicado por 100 para se obter o percentual final de bactérias na forma vegetativa da suspensão avaliada.

Para remoção das toxinas e restos celulares produzidos, o cultivo foi centrifugado a 3000 x g, em temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em uma solução estéril de salina fosfatada tamponada (PBS- 137 mM de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 2,7 mM de KCl em pH de 7,4). O procedimento de centrifugação foi repetido e o pellet obtido foi ressuscitado em PBS (pH 7,4) para a densidade ótica (DO) 1 à 600 nm e mantido a -80°C⁷ até o momento do uso (YANG et al., 2009).

¹ NIBISC, Inglaterra.

² Difco Laboratories, EUA.

³ Oxoid, Inglaterra.

⁴ Difco Laboratories, EUA.

⁵ Difco Laboratories, EUA.

⁶ Oxoid, Inglaterra.

⁷ Revco, EUA.

4.2.3 Preparo da suspensão de esporos de *Clostridium chauvoei*

4.2.3.1 Meios de cultura

Para produção de esporos foram testados os meios Bifásico (CLIFFORD; ANELLIS, 1971), *Brain Heart Infusion* (BHI⁸), Dunkan (STERNE; BATTY, 1975), Ellner (ELLNER, 1956) e Kolbe (KOLBE et al., 1981). O BHI foi preparado conforme recomendações do fabricante. Os meios Bifásicos Dunkan e Ellner foram preparados conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Composição dos meios de cultura testados para obtenção de suspensões de esporos de *Clostridium chauvoei*

Meios de cultura					
Bifásico (CLIFFORD; ANELLIS, 1971)		Dunkan (STERNE; BATTY, 1975)		Ellner (ELLNER, 1956)	
Componentes	% (p/v)	Componentes	% (p/v)	Componentes	% (p/v)
<i>Cooked meat medium</i> (CMM)	0,34	Extrato de levedura	0,4	Polipeptona	1,0
	0,02	Proteose peptona	1,5	Extrato de levedura	0,3
	0,001	Amido	0,4	Amido	0,3
		Tioglicolato de sódio	0,1	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,01
		Na ₂ HPO ₄	1	KH ₂ PO ₄	0,15
				Na ₂ HPO ₄ , 7 H ₂ O	5

Para preparação do meio de Kolbe 100 g de fígado bovino foram cortados em cubos de aproximadamente 2 x 2 x 2 cm e adicionados a 200 mL de água destilada. A seguir foi acrescentado 0,2 g de papaína dissolvida em 5 mL de água destilada e o pH de 7,2 foi obtido pela adição de NaOH 1N. A mistura fígado papaína foi aquecida e mantida em Banho-Maria a 64°C por 120 minutos e após esse período centrifugada a 3000 x g, durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi clarificado por filtração, e ajustado para o pH 7,3 com solução de NaOH a 1 N. Foi adicionado ao filtrado 4% de tripticase, 2% de ágar bacteriológico e 1% de extrato de levedura (Kolbe et al., 1984). Todos os meios foram esterilizados mediante autoclavagem sobre pressão de 3 atm, 127°C durante 20 minutos e mantidos na câmara de anaerobiose (80% N₂; 10% CO₂; e 10% H₂), ou seja, pré-reduzidos, até o momento da inoculação.

4.2.3.2 Cultivo da suspensão de esporos

Para obtenção de uma suspensão de esporos de *C. chauvoei*, a estirpe de referência foi previamente cultivada em caldo RCM⁹ por 24 horas em condições de anaerobiose, a 37°C. Com objetivo de obter um inóculo homogêneo, durante cinco dias consecutivos, a cada 24 horas, o cultivo obtido foi transferido na proporção de 10% (v/v) para um tubo contendo RCM fresco e pré-reduzido e incubado em condições de anaerobiose, a 37°C. O último cultivo foi aquecido a 82°C durante duas horas, para provocar a morte de células vegetativas, e em seguida semeado nos diferentes meios de esporulação (BHI, bifásico, Dunkan, Ellner e Kolbe). Todos os meios foram mantidos em ambiente de anaerobiose, a 37°C, durante 24 horas. No dia seguinte, os meios foram

⁸ Difco Laboratories, EUA.

⁹ Difco Laboratories, EUA

retirados da estufa e mantidos em condições de anaerobiose a temperatura ambiente durante 30 dias.

Após esse período, os cultivos assim obtidos foram centrifugados a 3000 x g, em temperatura ambiente, durante 30 minutos, e ressuspensos com 40 mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes para remoção de toxinas e impurezas dos meios. As bactérias assim recuperadas foram avaliadas quanto ao percentual de esporos e viabilidade bacteriana. A suspensão de esporos foi submetida a contagem bacteriana, em ágar sangue de carneiro a 5% (v/v) (MANTECA et al., 2001) para determinação da quantidade de unidade formadora de colônias viáveis. Para se obter o percentual de bactérias na forma vegetativa em relação a forma esporulada, uma alíquota da suspensão bacteriana foi submetida a contagem bacteriana na câmara de Neubauer. Foram contadas 300 bactérias agrupando-se as bactérias contadas conforme a forma bacteriana em esporuladas ou vegetativas. O número de bactérias na forma vegetativa obtido foi dividido por 300 e multiplicado por 100 para se obter o percentual final de bactérias na forma vegetativa da suspensão avaliada.

4.2.3.3 Purificação dos esporos

O cultivo obtido em meios de esporulação foi submetido a um protocolo de purificação de esporos segundo Yang et al. (2009), com modificações. Brevemente: os cultivos foram centrifugados a 3.000 x g, em temperatura ambiente, durante 30 minutos. Para lise de células vegetativas remanescentes e liberação do esporo da célula mãe, o sedimento foi ressuspensionado em 20 mL de uma solução de PBS contendo 500 µg/mL de lisozima¹⁰ e vigorosamente agitado em vórtex durante 1 minuto. Após esses procedimentos, as células bacterianas foram sonicadas durante 30 minutos (amplitude 40%, cinco pulsos, 10 segundos), sendo feita avaliação visual por microscopia de contraste de fase, coloração de esporos e células vegetativas a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C, durante duas horas, para completa digestão de células vegetativas. Para remoção dos fragmentos de células vegetativas e da lisozima, as suspensões de esporos foram lavadas por 14 vezes por meio de centrifugação a 3.000 x g, em temperatura ambiente, durante 30 minutos e sedimento ressuspensionado com PBS. A pureza das suspensões de esporos foi determinada por meio da avaliação visual pela coloração de Gram e coloração de esporos Wirtz-Concklin.

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que a estirpe de *C. chauvoei* (ATCC 10092) encontrava-se pura, e a identidade foi confirmada tanto pela técnica de PCR quanto pela IFD. O crescimento bacteriano exponencial obtido após a reconstituição da estirpe liofilizada demonstra que esse método é uma maneira eficaz de conservar as bactérias. Quando semeadas em placas com ágar contendo 5% de sangue de carneiro, sob condições de anaerobiose, verificou-se que as colônias eram compatíveis com a morfologia descrita pela literatura (LIMA, 1992). Não houve crescimento na placa incubada em aerobiose, e a avaliação das colônias, pelo método de Gram, revelou apenas bastonetes Gram positivos, com ou sem esporos, morfologia compatível com a espécie analisada (Figura 4).

¹⁰ Sigma, St Louis, MO, USA

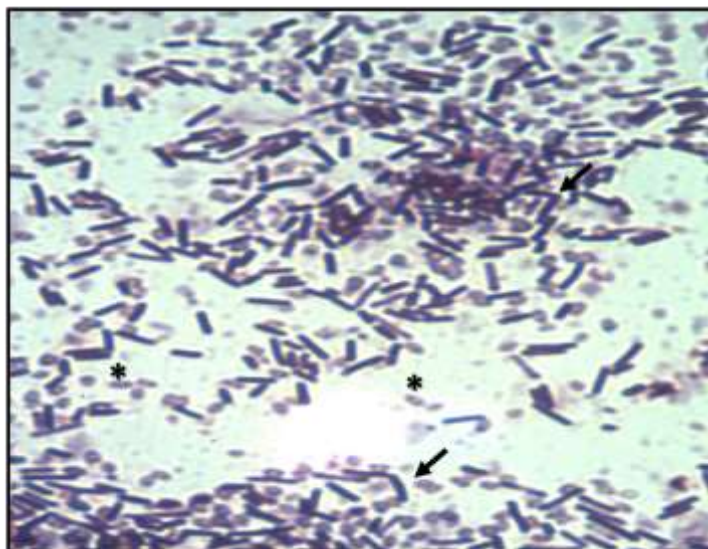


Figura 4: Coloração de Gram da amostra *Clostridium chauvoei* (ATCC 10092), após 24 horas de cultivo: bastonetes Gram-positivos grandes, alguns diplobacilos angulados (setas), bastonetes com esporos centrais (asteriscos) e esporos completos. Objetiva 63X

Observou-se ainda maior proporção de bactérias vegetativas em relação às esporuladas na amostra crescida em RCM após 12 e 24 horas de cultivo, ambas com pelo menos 90% de bactérias na forma vegetativa (Figura 5A). Com 48 horas de cultivo, houve uma pequena redução na proporção de bactérias na forma vegetativa (87%). Percebeu-se uma maior diferença entre o número de bactérias viáveis e os tempos de cultivo avaliados (Tabela 3). Assim, o número de bactérias foi maior passadas 48 horas de cultivo. A maior diferença das contagens bacterianas foi observada entre 12 e 24 horas de cultivo.

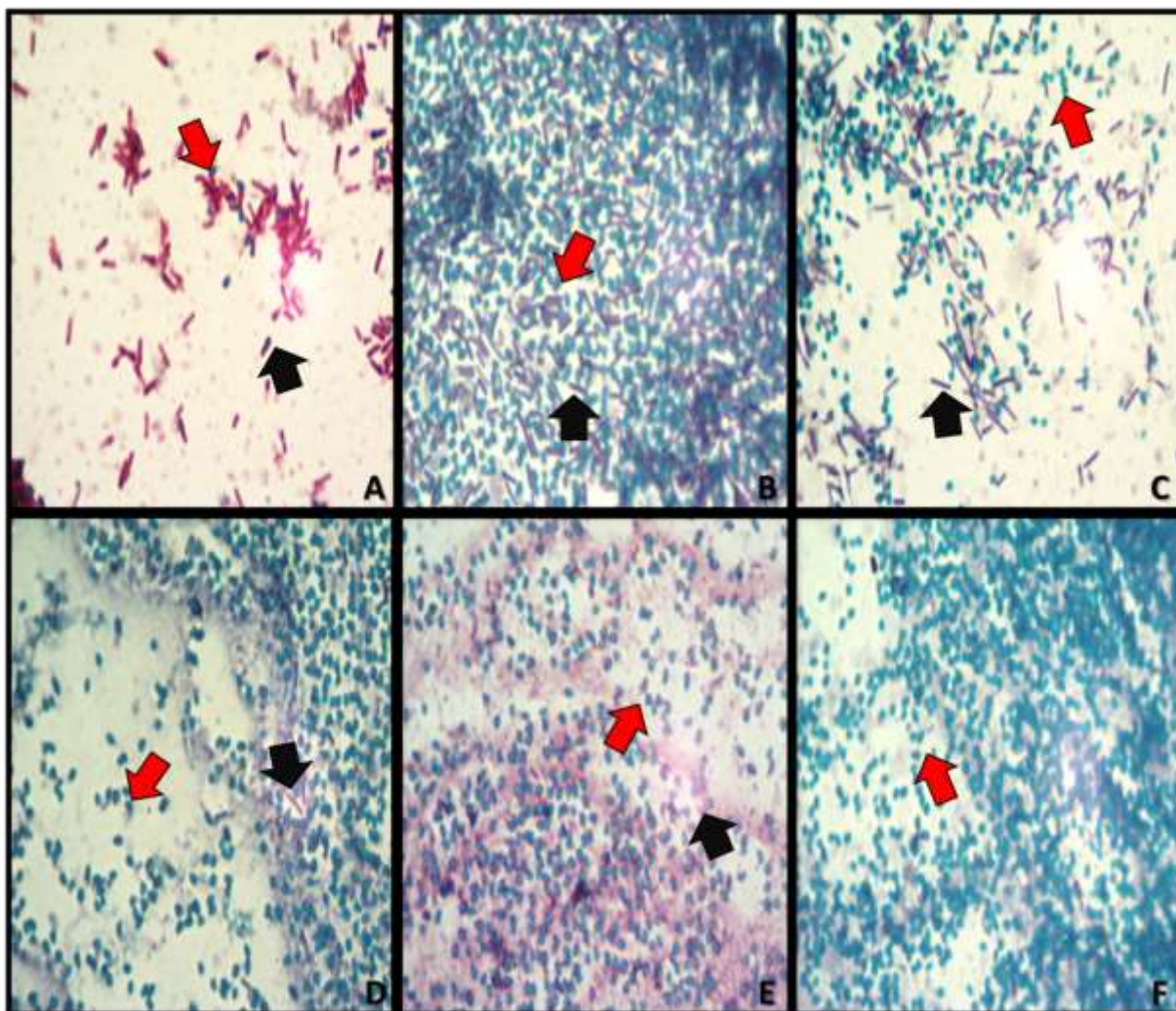


Figura 5: Coloração de esporos da amostra *Clostridium chauvoei* (ATCC 10092) A: após 24 horas de cultivo em *Reinforced Clostridial Medium*. Os bastonetes encontram-se corados pela fucsina, enquanto os esporos, completos ou não, foram corados pelo verde malaquita. As setas pretas indicam esporos incompletos e as setas vermelhas esporos completos. B: após 31 dias de cultivo em meio Kolbe. Os bastonetes encontram-se corados pelo cristal violeta (seta preta), enquanto os esporos, completos ou não, foram corados pelo verde malaquita (seta vermelha). C a F: após 31 dias de cultivo em meio Kolbe e protocolo de purificação de esporos. C: a amostra foi submetida ao processo de purificação de esporos que envolvia adição de lisozima e sonicação durante 10 minutos. Os bastonetes encontram-se corados pelo cristal violeta (seta preta), enquanto os esporos, completos ou não, foram corados pelo verde malaquita (seta vermelha). D: a amostra foi submetida ao processo de purificação de esporos que envolvia adição de lisozima e sonicação durante 20 minutos. Os esporos, completos ou não, foram corados pelo verde malaquita (seta vermelha). E: para completa digestão das células vegetativas, a amostra foi incubada em estufa durante duas horas. F: em seguida a amostra foi lavada 14 vezes para remoção dos fragmentos celulares. A suspensão de esporos de *Clostridium chauvoei* usada na padronização da multiplicidade de infecção está representado em F. Objetiva 63x

Tabela 3: Avaliação dos tempos de cultivo em caldo *Reinforced Clostridium Medium* para obtenção de suspensões de *Clostridium chauvoei* com maior proporção de células vegetativas.

Tempo de cultivo	Percentual de bactérias na forma vegetativas em relação a de esporos	UFC/mL
12	90	6×10^7
24	90	4×10^9
48	87	7×10^9

Os repiques por cinco dias consecutivos da amostra, antes da incubação final, permitem a seleção constante de bactérias na fase exponencial de crescimento ou de esporos em fase inicial de germinação. Esses estágios bacterianos estão associados à liberação de moléculas que podem ser captadas por outros esporos. Estes passam a se comprometer com o processo de germinação, mas infelizmente esse processo não ocorre de maneira simultânea em toda a população bacteriana (STRINGER et al., 2011; WEBB et al., 2012).

Com relação aos meios de esporulação avaliados (Tabela 4), foi necessário a adoção de um protocolo adicional para purificação e obtenção de esporos descrito por Yang et al. (2009). Como esperado, esses meios foram capazes de induzir um percentual de esporulação maior (ELLNER, 1956; KOLBE et al., 1981) do que aquele observado durante o cultivo para obtenção da suspensão bacteriana na forma vegetativa (Tabela 3), mas não induziram a esporulação de 100% das bactérias cultivadas.

Tabela 4: Viabilidade e percentual de esporos e células vegetativas de *Clostridium chauvoei* após o cultivo em diferentes meios de esporulação.

Meio de cultura	Percentual de bactérias na forma esporulada em relação a vegetativas ¹	Esporo/mL ²	Esporo/mL ³
Kolbe	75	$7,9 \times 10^{14}$	$4,1 \times 10^{14}$
Bifásico	60	$6,6 \times 10^{14}$	$3,8 \times 10^{14}$
Ellner	50	$4,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
Duncan	50	$4,7 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
<i>Brain heart Infusion</i>	30	$3,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$

¹ O percentual de bactéria na forma esporulada foi avaliado antes do processo de purificação dos esporos

² O teste de viabilidade dos esporos foi realizado antes do processo de purificação de esporos por meio de contagem em placa.

³ O teste de viabilidade dos esporos foi realizado antes do processo de purificação de esporos por meio de contagem em placa.

A proporção de esporos foi maior no meio de Kolbe, seguido pelo Bifásico, Ellner, Duncan e BHI (Tabela 4). Além disso, observou-se uma grande diferença quando se comparou o número de bactérias viáveis recuperadas após o cultivo. O meio Kolbe (Figura 5B) e Duncan mostraram-se superiores aos demais, sendo possível obter cerca de 10^6 vezes mais bactérias. O menor número de bactérias viáveis foi observado quando o cultivo foi feito em meio Duncan.

A produção de uma cultura homogêneas de bactérias do gênero, ou seja, com apenas uma morfologia bacteriana, tem sido considerada um grande desafio. Essa dificuldade já foi reportada por outros autores (YANG et al., 2009; HASAN et al., 2011), ao cultivarem outras bactérias do gênero *Clostridium*. A multiplicação e a esporulação dessas bactérias não são sincronizadas. Além disso, nem todas as bactérias em um cultivo são capazes de esporular, como também nem todo

esporo é capaz de germinar (YANG et al., 2009; STRINGER et al., 2011; LEGGETT et al., 2012). Assim, a maioria dos cultivos são compostos por todas as formas possíveis de bactérias: células vegetativas jovens, células em vários estágios de esporulação e esporos em diferentes estágios de germinação (HASHIMOTO; NAYLOR, 1959; BURNS; MINTON, 2011), sendo necessário a implementação de técnicas adicionais para se obterem suspensões bacterianas homogêneas.

Nesse trabalho, somente após a realização do protocolo de purificação de esporos, foi possível obter uma suspensão com apenas uma forma bacteriana, ou seja 100% de esporos. Dentre os tempos de sonicação avaliados, percebeu-se que 10 minutos foram insuficientes (Figura 5C). Sonicando-se a suspensão bacteriana por apenas 10 minutos, restou cerca de 30% de bactérias na forma vegetativas (Figura 5C). Embora o processo de sonicação provocasse a morte de bactérias na forma vegetativa em todos os tempos avaliados, elas não podiam ser separadas dos esporos por centrifugação simples. A partir de 20 minutos de sonicação, não se percebeu mais a presença de bastonetes nas colorações empregadas. O emprego de 20 ou 30 minutos não produzia efeito visual adicional (Figura 5D).

A etapa de incubação a 37°C com lisozima também se mostrou imprescindível, uma vez que apenas a sonicação não foi capaz de eliminar todas as bactérias na forma vegetativa (Figura 5E). As lavagens reduziram de maneira significativa os fragmentos celulares e foram suficientes para total remoção da lisozima (Figura 5F). O protocolo de purificação de esporos promoveu redução na contagem bacteriana total (Tabela 4), possivelmente devido à morte das bactérias na forma vegetativa.

De maneira geral, as estratégias para cultivo de bactérias esporuladas envolvem choque térmico, congelamento, cultivo em temperaturas sub ótimas, longos períodos de incubação e meios com baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente glicose (YANG et al., 2009; BURNS; MINTON, 2011; STRINGER et al., 2011). No entanto, todos eles envolvem uma etapa adicional que determinará a lise das células mãe e das bactérias na forma vegetativas restantes (YANG et al., 2009) ou a purificação dos esporos por gradiente de concentração (STRINGER et al., 2011; PAREDES-SABJA et al., 2014).

Dentre os protocolos para cultivo de *Clostridium* spp. esporulados, optou-se pela adoção da metodologia sugerida por Yang et al. (2009), pois ela combina diferentes técnicas tanto na incubação do cultivo como na purificação dos esporos, além de promover a completa lise das células mãe através da sonicação e adição de lisozima. Todas essas etapas foram consideradas essenciais na obtenção de uma suspensão de *C. chauvoei* com apenas esporos.

Uma diferença deste estudo quanto à metodologia proposta por Yang et al. (2009) foi a utilização do meio de esporulação sugerido por Kolbe et al. (1984), que se mostrou bastante satisfatório na produção de esporos (Tabela 4), gerando 75% de esporos (Figura 5B). Esse meio já havia sido empregado na produção de esporos de *C. sordellii*, apresentando também um rendimento de esporos satisfatório (LOBATO et al., 2004).

Embora o percentual de esporos obtido após o cultivo de *C. chauvoei* em meio Kolbe tenha sido apenas ligeiramente superior, quando esse meio foi comparado ao meio bifásico (Tabela 4), ele foi bem superior, quando comparado ao Duncan e ao Ellner. Além disso, após a lise das bactérias na forma vegetativa, o número de esporos viáveis foi de $4,1 \times 10^{14}$ UFC/mL, cerca de 10^3 vezes superior ao BHI, Duncan e Ellner. Interessante ressaltar que, no presente estudo, os meios com melhores rendimentos eram parcialmente ou totalmente sólidos, indicando que, além de restrição

de nutrientes e cultivo em temperatura sub ótima, a redução na atividade de água é um fator importante para induzir a esporulação.

Nenhum dos meios testados permitiu a obtenção de uma amostra com a totalidade das bactérias na forma vegetativa ou esporulada. O cultivo de *C. chauvoei* em RCM por períodos iguais ou inferiores a 24 horas permite a obtenção de uma suspensão bacteriana com maior proporção de células vegetativas, embora a redução no tempo de cultivo comprometa a quantidade de bactérias recuperadas. Com relação à obtenção de suspensões de esporos, o meio Kolbe foi o que apresentou maior rendimento e proporção de esporos em relação às bactérias na forma vegetativa, seguido do Bifásico, Ellner e Duncan. No entanto, independentemente do meio utilizado, a adição de protocolos adicionais é indispensável para obtenção de uma suspensão de esporos homogênea.

5 CAPÍTULO 3: CINÉTICA DE INFECÇÃO DE *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI* EM MACRÓFAGOS MURINOS E BOVINOS

5.1 Introdução

Clostridium chauvoei é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia estrita e formadora de esporos, que está presente na maioria das áreas de criação de bovinos no mundo (UZAL, 2012). Acredita-se que a ingestão de esporos do agente, presentes no ambiente, é a principal via de transmissão do carbúnculo sintomático, sendo transferidos do intestino para os tecidos onde eles permanecem dormentes. Esses esporos permanecem quiescentes até que uma lesão tecidual produza um ambiente de anaerobiose, permitindo a germinação com conseqüente multiplicação do agente. A seqüência de eventos que leva a distribuição dos endosporos nos tecidos não está clara. Há poucos estudos sobre a patogênese da doença, mas acredita-se que os esporos sejam transportados para os tecidos por macrófagos, uma vez que a doença ocorre na ausência de uma ferida aparente (LOBATO et al., 2013).

Os estudos sobre o potencial bactericida dos macrófagos frente a bactérias do gênero *Clostridium* são escassos e restritos a *C. perfringens* tipo A e *C. difficile*, agentes etiológicos da gangrena gasosa (O'BRIEN; MELVILLE, 2000, 2003, 2004) e colite pseudomebranosa (PAREDES-SABJA et al., 2012), respectivamente. *C. perfringens* no estado vegetativo é capaz de escapar do fagossomo do macrófago e sobreviver no citoplasma desse fagócito por ao menos 24 horas (O'BRIEN; MELVILLE, 2000). O escape do fagossomo foi determinado pela ação das toxinas alfa e perfringolisina O, fatores de virulência que são reconhecidos capacidade de induzir a formação de poros nas membranas celulares. Isto permitiu que os microrganismos fagocitados, não fossem expostos ao ambiente do fagolisossomo maduro. Ao contrário das células vegetativas, os esporos de *C. perfringens* são eficientemente mortos pelos macrófagos após sua germinação, que ocorre em condições de aerobiose, possivelmente por sua limitada capacidade de produzir toxinas (PAREDES-SABJA; SARKER, 2012).

Motivados pela observação de que *C. difficile* é capaz de persistir e causar danos aos hospedeiros, mesmo na presença de intensa resposta inflamatória, um estudo similar também foi realizado com este agente. Ao contrário do observado com *C. perfringens*, os esporos de *C. difficile* persistem no interior de macrófagos por até 72 horas. Já a forma vegetativa de *C. difficile* foi morta pelos macrófagos após cinco horas de infecção. A resistência dos esporos de *C. difficile* foi atribuída a dormência dessa forma bacteriana que, na ausência de fatores germinantes, foram incapazes de sair do estado de latência (PAREDES-SABJA; SARKER, 2012).

Devido à grande diversidade das espécies que compõem o gênero *Clostridium*, os estudos sobre cinética de infecção já realizados não nos permitem concluir se a sobrevivência da forma vegetativa e a germinação/latência dos esporos no interior de macrófagos é uma habilidade do gênero ou apenas das espécies previamente. Por isso, pesquisas sobre a cinética de infecção de *C. chauvoei* em macrófagos, além de pioneiras, são de extrema relevância para o entendimento e prevenção da ocorrência de carbúnculo sintomático, uma das mais importantes doenças que acomete a bovinocultura brasileira.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Locais de realização dos experimentos

Os ensaios de cinética de infecção de macrófagos com *C. chauvoei* foram realizados no Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada no Centro de Microscopia da UFMG. A coleta de sangue dos animais foi realizada na Clínica de Ruminantes do Hospital Veterinário, EV-UFMG. O perfil de transcritos de citocinas foi realizado no Laboratório Coletivo II do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG.

5.2.2 Animais

Para isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram utilizados seis bovinos da raça holandesa (*Bos taurus taurus*), hígidos, de ambos os sexos. Foram selecionados animais não vacinados contra carbúnculo sintomático com idade entre 2 e 3 meses. Os bezerras eram mantidos em instalações individuais, cobertas e presos por corda. Foram fornecidos, todos os dias, seis litros de leite por animal e água a vontade.

5.2.3 Linhagem celular

Foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 cultivados com o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)¹¹, suplementado com 50 mg/mL de penicilina¹², 50 mg/mL de estreptomicina¹³, 2 mM de L-glutamina¹⁴, 10% (v/v) de soro fetal bovino¹⁵ em uma atmosfera de 90% de umidade contendo 5% de CO₂ a 37°C. A concentração celular utilizada nos ensaios de infecção foi definida pela menor concentração celular que completou 90% de confluência em 24 horas.

5.2.4 Amostra de referência e condições de cultivo bacteriológico

Foi utilizada a estirpe bacteriana liofilizada da *American Type Culture Collection* (ATCC)¹⁶ de *C. chauvoei* (ATCC 10092), pertencente a bacterioteca do Laboratório de Anaeróbios da EV-UFMG. As infecções foram realizadas com suspensões bacterianas contendo 90% das células na forma vegetativa ou um inóculo com 100% de esporos, produzidos conforme descrito no Capítulo 2.

5.2.5 Concentração inibitória mínima de sete antimicrobianos contra *Clostridium chauvoei*

Para determinação da sensibilidade de *C. chauvoei* frente as diferentes bases de antimicrobianos e escolha das bases potenciais para serem usada nos ensaios de infecção foram testados sete

¹¹ Gibco, EUA.

¹² Sigma-Aldrich, EUA.

¹³ Sigma-Aldrich, EUA.

¹⁴ Sigma-Aldrich, EUA.

¹⁵ Gibco, EUA.

¹⁶ NIBISC, Inglaterra.

antimicrobianos: florfenicol¹⁷, metronidazol¹⁸, penicilina¹⁹, vancomicina²⁰, oxitetraciclina²¹, eritromicina²² e tilosina²³. As soluções foram preparadas e diluídas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) e os testes foram realizados anteriormente aos ensaios de cinética de infecção.

Para o controle do teste, foi utilizada uma estirpe de referência de *Bacterioides fragillis* (ATCC 25285)²⁴. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de diluição em ágar, recomendado pelo CLSI (2009). Todas as drogas foram diluídas em salina 0,85%, para conter concentrações finais de 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL; 1 µg/mL, 2 µg/mL; 4 µg/mL; 8 µg/mL; 16 µg/mL; 32 µg/mL; 64 µg/mL; 128 µg/mL; 256 µg/mL. Cada concentração do antimicrobiano foi adicionada em ágar *Brucella*²⁵ suplementado com 5% de sangue de carneiro, hemina²⁶ e vitamina K²⁷, e distribuído em duas placas de Petri descartáveis (90 x 15cm) e incubado a 37°C, em aerobiose, por 24 horas para realização de teste de esterilidade. Após este período, a suspensão bacteriana contendo esporos e células vegetativas foi ajustada para a turbidez 0,5 da escala MacFarland e foi utilizado o replicador de Steers, padronizando o inóculo de cada amostra em 10 µL, para a aplicação das amostras nas placas. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose²⁸ com mistura gasosa, a 37°C por 24 horas, de acordo com o CLSI (2009). A visualização de somente uma colônia ou de um crescimento muito leve, de difícil visualização a olho nu, foi considerado como inibição CLSI (2009).

5.2.6 Determinação da multiplicidade de infecção de *Clostridium chauvoei* em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7

Para estabelecer a multiplicidade de infecção (MOI) mais adequada na avaliação da sobrevivência de *C. chauvoei* nos macrófagos murinos RAW 264.7 foram testadas quatro MOI: 1:2, 1:5, 1:20 e 1:50 da suspensão bacteriana contendo células predominantemente na forma vegetativa. Para isso, 24 horas antes do ensaio, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/poço) em uma atmosfera com 90% de umidade, contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, *C. chauvoei* foi adicionado nas respectivas MOI e as placas foram incubadas, nas condições previamente descritas, durante uma hora. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com 100 µL de tampão fosfato (PBS- 1 M, pH 7,4). Após esse procedimento o sobrenadante foi retirado, adicionando-se em seguida RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e vancomicina²⁹ (200 µg/mL). A placa foi incubada nas mesmas condições, por uma hora. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi substituído por RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e submetido a contagem bacteriana (MANTECA et al., 2001), para avaliar a quantidade de bactérias extracelulares. Promoveu-se a lise de macrófagos, após uma e 24 horas

¹⁷ Sigma-Aldrich, EUA.

¹⁸ Sigma-Aldrich, EUA.

¹⁹ Sigma-Aldrich, EUA.

²⁰ Sigma-Aldrich, EUA.

²¹ Sigma-Aldrich, EUA.

²² Sigma-Aldrich, EUA.

²³ Sigma-Aldrich, EUA.

²⁴ NIBISC, Inglaterra.

²⁵ Difco Laboratories, EUA.

²⁶ Sigma-Aldrich, EUA.

²⁷ Sigma-Aldrich, EUA.

²⁸ ThermoScience, EUA.

²⁹ Sigma-Aldrich, EUA.

de infecção, pela adição de Tween-20³⁰ 1% (v/v), em RPMI, para se avaliar a taxa de bactérias fagocitadas. Foram realizados três ensaios independentes, cada um deles em triplicata. Optou-se pela MOI com maior taxa de infecção aliada a menor proporção de bactérias extracelulares.

5.2.7 Cinética de infecção de *Clostridium chauvoei* em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7

Os ensaios de infecção foram realizados baseados nos descritos por O'Brien e Meville (2000) tanto com a suspensão bacteriana na forma vegetativa quanto na forma esporulada, com modificações. Brevemente: 24 horas antes do ensaio, os macrófagos murinos foram cultivados em placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/poço), em estufa com uma atmosfera de 90% de umidade, contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as suspensões de *C. chauvoei* foram adicionados na MOI 1:50 e a placa incubada, nas mesmas condições anteriormente descritas, durante uma hora. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com 100 µL de PBS (1 M, pH 7,4), e o lavado foi submetido a contagem bacteriana (MANTECA et al., 2001) para determinação da concentração de bactérias extracelulares.

Para eliminação de células bacterianas aderidas e/ou extracelulares, adicionou-se aos poços RPMI suplementado com vancomicina³¹ 200 µg/mL e a placa foi incubada por uma hora nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, o sobrenadante dos poços foi substituído por RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de vancomicina. A cada 24 horas de infecção, o sobrenadante dos poços foi substituído por RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, e o sobrenadante retirado foi submetido a contagem bacteriana (MANTECA et al., 2001) para determinação de bactérias extracelulares.

Após os tempos de infecção de 1 (T1), 24 (T24), 48 (T48) e 72 (T72) horas, os macrófagos foram lisados pela adição de 1% de Tween-20³² (CAMPBELL; ADAMS, 1992). O lisado foi diluído na base 10, em salina 0,85% (p/v) estéril, e submetido a contagem bacteriana expressa em UFC ou esporo/mL (MANTECA et al., 2001) para avaliar o percentual de sobrevivência bacteriana após a fagocitose. As contagens obtidas diretamente das bactérias intracelulares após uma hora de infecção (T1) foi considerada como 100% e o percentual de sobrevivência da bactéria nos demais tempos foi calculado baseado em T1 (UFC/mL em cada tempo de infecção/ UFC/mL após uma hora de infecção x 100) (BOUNOUS et al., 1993). Foram realizados três ensaios independentes, cada um deles em triplicata.

Para verificação da forma infectante (vegetativa ou esporo) de *C. chauvoei* presentes nos macrófagos infectados com a suspensão bacteriana contendo predominantemente bactérias na forma vegetativa, metade do lisado obtido nos diferentes tempos de infecção foi aquecido a 80°C durante uma hora. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram diluídas na base 10, em salina 0,85% (p/v) estéril, e submetido a contagem bacteriana expressa em UFC ou esporo/mL (MANTECA et al., 2001).

³⁰ Synth, Brasil.

³¹ Sigma-Aldrich, EUA.

³² Synth, Brasil.

5.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar a infecção de macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264,7 por microscopia eletrônica, as células foram cultivadas em lamínulas (10 x 10 mm). Para isso, as lamínulas foram previamente lavadas com Etoxa-clean³³ e gaze, e imersas em detergente neutro *overnight*. No dia seguinte, as lamínulas foram enxaguadas com abundante água destilada e deixadas *overnight* em solução de ácido clorídrico (1 M). As lamínulas foram novamente enxaguadas em abundante água destilada e secas em estufa a 37°C. Em seguida, as lamínulas foram esterilizadas por autoclavação (121°C, 3 atm, 20 minutos).

As lamínulas estéreis foram alocadas em placas de 6 poços, sendo alocada uma lamínula por poço. Adicionou-se sobre cada lamínula 30 µL de RPMI suplementado com 50% de soro fetal bovino e a placa foi incubada em uma atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ a 37°C, durante uma hora. Em seguida, o meio de cultivo foi retirado e adicionou-se, sobre a lamínula, 50 µL da suspensão celular de RAW 264.7 contendo 8 x 10⁵ células/mL. As placas foram novamente incubadas durante uma hora e após esse período os poços foram preenchidos com RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, sendo a placa incubada em estufa com atmosfera úmida *overnight*. No dia seguinte, procedeu-se a infecção como descrito anteriormente. Após 1, 24, 48 e 72 horas de infecção, o sobrenadante foi trocado por uma solução com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato³⁴ 0,1 M (pH 7,2) e placa foi incubada a 4°C durante 24 horas.

A microscopia eletrônica foi realizada após o processamento da amostra pela técnica de *flattening embedding*. Brevemente, após a fixação primária das células dispostas sobre as lamínulas, a solução contendo o agente fixador foi trocada por tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2) e as amostras foram armazenadas em geladeira, a 4°C, até o momento do processamento (STEINER et al., 1994). As lamínulas foram lavadas com tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2) três vezes, durante 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram pós fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 2%, ferrocianeto de potássio 1,5% em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2) em temperatura ambiente durante duas horas. As células foram desidratadas pela imersão em soluções de álcool com concentrações crescentes (35, 50, 70, 90, e 100%), duas vezes durante 10 minutos. Após a desidratação, as lamínulas foram imersas em acetona, duas vezes durante 10 minutos. Para infiltração, procedeu-se a imersão da lamínula em uma solução de iguais volumes de acetona e resina (54% v/v de araldite n° 504, 44% v/v de anidro duodecenilsuccinico e 2% de benzildimetiladmina) durante duas horas. As etapas seguintes de infiltração compreenderam aumento gradual da proporção de resina em relação a acetona, respectivamente 3:1 e 4:1, sendo a primeira incubação *overnight* e a outra por duas horas. A inclusão foi feita por adição da resina em uma cápsula de *Been*, imediata colocação da lamínula sobre a cápsula, e incubação a temperatura ambiente durante duas horas. Em seguida, as amostras foram incubadas em estufa 45°C durante duas horas e na estufa 60°C por 48 horas. Após os procedimentos de inclusão, as lamínulas foram destacadas da resina depois de serem mantidas em nitrogênio líquido durante 20 minutos. Após o descolamento, foram realizados cortes ultrafinos de 55 nm de espessura utilizando-se navalha de diamante (Diatome, ultra 45°). Os cortes foram coletados em telas de Cobre de 300 mesh e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% por 8 minutos a 60°C seguida de solução de citrato de chumbo (solução de Reynold's) por 5 minutos a temperatura

³³ Sigma-Aldrich, EUA.

³⁴ Sigma-Aldrich, EUA.

ambiente. Imagens digitais dos cortes ultrafinos foram capturadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit com aceleração de 120 kV.

5.2.9 Cinética de infecção de *Clostridium chauvoei* em macrófago derivado de monócitos de sangue periférico de bovino

5.2.9.1 Obtenção de macrófagos bovinos

Os monócitos de sangue periférico bovino foram obtidos conforme descrito por Campbell e Adams (1992), com modificações. Foram coletados, assepticamente por punção venosa da jugular, 60 mL de sangue bovino em tubos contendo citrato ácido dextrose (ACD), após tricotomia e assepsia da região puncionada. O sangue foi diluído em igual volume com RPMI e colocado sobre uma camada de Ficoll³⁵ e centrifugado por 20 minutos a 400 x g, a 18°C. Após a centrifugação o anel de leucócitos foi coletado, transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 minutos a 400 x g, a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspensos com RPMI e centrifugados nas mesmas condições por quatro vezes para a completa remoção de Ficoll. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspensado em 5 mL de RPMI³⁶ suplementado com 4 mM de L-glutamina³⁷, 1 mM de aminoácidos não essenciais³⁸, 1 mM de piruvato de sódio³⁹ e 12,5% de soro fetal bovino (RPMI-S). A suspensão de células foi transferida para frascos Erlenmeyer de teflon⁴⁰, previamente lavados com Etoxa-clean⁴¹, contendo 10 mL de RPMI-S e mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂, permitindo a aderência de monócitos.

Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado, para a remoção de células não aderentes, sendo adicionado RPMI-S até um volume final aproximado de 15 mL. A cultura foi mantida nessas condições por 10 dias, trocando-se o meio a cada três dias. No 11º dia, os frascos de teflon⁴² contendo os macrófagos já diferenciados foram então colocados sobre o gelo por 30 minutos, seguido de agitação para promover a liberação das células do fundo dos frascos. As células obtidas foram centrifugadas a 1000 x g, por 10 minutos, à 4°C, e ressuspensas em RPMI⁴³ para concentração final de 4x10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi observada por meio de coloração com azul de Tripán a 1% (MACEDO et al., 2013).

5.2.9.2 Infecção de macrófagos bovinos para avaliação da persistência de *Clostridium chauvoei*

Para garantir a aderência dos macrófagos durante o protocolo de infecção, placas de cultivo celular de fundo chato com 24 poços foram previamente inoculadas com uma solução contendo 10% de soro fetal bovino diluído em solução de colágeno (1% de colágeno em ácido acético 0,01 M) e incubadas a 37°C *overnight*. Em seguida, a solução foi retirada e os poços foram lavados uma vez com PBS 1X. Após esses procedimentos, as placas sensibilizadas foram armazenadas a 4°C até o momento da infecção (ZANINA et al., 2013).

A suspensão de macrófagos (4x10⁵ células/mL) foi transferida para placas de cultivo celular previamente sensibilizados com colágeno e soro fetal bovino e incubados em estufa úmida com

³⁵ GE Healthcare, EUA.

³⁶ Gibco, EUA.

³⁷ Sigma, EUA.

³⁸ Sigma, EUA.

³⁹ Sigma, EUA.

⁴⁰ NalgeNunc, EUA.

⁴¹ Sigma, EUA.

⁴² NalgeNunc, EUA.

⁴³ Gibco, EUA.

5% de CO₂, a 37°C, durante 24 horas. Após esse período, adicionou-se suspensões de *C. chauvoei* na MOI 1:50, avaliando-se a forma vegetativa e esporulada separadamente, e a placa foi incubada nas mesmas condições anteriormente descritas, durante uma hora. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com 100 µL de tampão fosfato (PBS-1 M, pH 7,4). Após esse procedimento foi adicionado RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e vancomicina 200 µg/mL e a placa foi incubada nas mesmas condições, por uma hora. Após esse período, o sobrenadante dos poços foi substituído por RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino e submetido a contagem bacteriana (MANTECA et al., 2001), para se avaliar a quantidade de bactérias extracelulares. Promoveu-se a lise de macrófagos, após 1 e 24 horas de infecção, pela adição de Tween-20⁴⁴ 1% (v/v) em RPMI, para avaliar a taxa de bactérias fagocitadas. Foram realizados seis ensaios independentes, cada um deles em triplicata.

5.2.10 Perfil de citocinas produzidas por macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos infectados por *Clostridium chauvoei*

5.2.10.1 Protocolo de infecção

Os macrófagos bovinos diferenciados (4 x 10⁵ células/mL) foram transferidos para placas de cultivo celular de fundo chato com 24 poços, previamente sensibilizados com colágeno e soro fetal bovino, e incubados em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C, durante 24 horas. Após esse período, as suspensões de esporos e células vegetativas de *C. chauvoei* foram adicionados (MOI 1:50) e a placa incubada, durante uma hora. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com 500 µL de PBS, e posteriormente foi adicionado RPMI suplementado com 200 µg/mL de vancomicina e a placa foi incubada por uma hora nas mesmas condições descritas. Em seguida e após 6, 12 e 24 horas de infecção, os macrófagos infectados foram submetidos a extração de RNA. Como controle positivo e negativo, a adição do inóculo bacteriano foi substituída por LPS⁴⁵ e RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (MACEDO et al., 2013), respectivamente. Os ensaios com os macrófagos bovinos (n=6) foram feitos em quadruplicata.

5.2.10.2 Extração de RNA

Após cada tempo de infecção (1, 6, 12 e 24 horas) foi realizada a extração de RNA total da monocamada de células infectadas e de células controle usando o TRIzol Reagent⁴⁶ de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, o método consistiu em uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células com 0,5 mL de Trizol por 5 minutos a temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteína. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, 2 a 3 minutos de incubação a temperatura ambiente e centrifugação à 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases, onde a fase incolor superficial (fase aquosa) contém o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos à 4°C para precipitação do RNA. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos à 4°C. O RNA foi solubilizado em água livre de RNase. A pureza e a concentração do RNA foram verificadas por espectrofotometria, sendo posteriormente estocado a -80°C.

⁴⁴ Synth, Brasil.

⁴⁵ Sigma-Aldrich, EUA.

⁴⁶ Invitrogen, EUA.

5.2.10.3 Transcrição reversa

Para obtenção do cDNA foi realizada a transcrição reversa usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor*⁴⁷, seguindo as especificações do fabricante. Para a síntese do cDNA, foram utilizados 2 µg de RNA extraído, em 20 µL de uma solução contendo tampão de transcrição reversa, 5,5 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, 2,5 µM de random hexamer, 0,4 U/µL de inibidor de RNase, 1,25 U/µL de transcriptase reversa. O cDNA foi estocado a -80°C até seu uso.

5.2.11 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A determinação quantitativa dos níveis de transcrição dos genes de interesse, foi feita por PCR em tempo real (qRT-PCR) usando o kit SYBR®Green PCR Master Mix⁴⁸, 10 µM de cada iniciador e 2 µL de cDNA, para um volume final de 20 µL. Os iniciadores usados estão descritos na (Tabela 5). A reação foi realizada no termociclador da Applied Biosystems modelo 7500 com os seguintes parâmetros: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram obtidos em valores de limiar de detecção (Ct – *cycle threshold*).

Tabela 5: Genes e iniciadores avaliados nas reações de PCR em tempo real para avaliação do perfil de transcritos de citocinas em macrófagos bovinos infectados com *Clostridium chauvoei* na forma esporulada e vegetativa

Gene	Sequência de iniciadores (forward and reverse (5'-3'))	Tamanho (pb)	Referência
GAPDH	ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC	121	CARVALHO NETA et al., 2008
IL-10	TGC TGG ATG ACT TTA AGG G AGG GCA GAA AGC GAT GAC A	186	MACEDO et al., 2013
IL-12	TTAATTGAGGTCGTGGTAGAAGCTG GGTCTCAGTTGCAGGTTCTTGG	116	CARVALHO NETA et al., 2008
TGF-b	GCCATCCGCGCCAGATTTTGT AGGCTCCGTTTCGGCACTTTCC	150	CARVALHO NETA et al., 2008
IL-23	GCAGTCCTCCGGACATGCAAA CCAGAAGCATGGCAGTTTCCCCC	54	CARVALHO NETA et al., 2008

Para a avaliação quantitativa do nível de transcrição de mRNA por PCR em tempo real usou-se o método de comparação dos valores de Ct no qual o gene GAPDH foi usado como normalizador. O cálculo do ΔCt foi feito a partir dos valores de Ct de cada amostra. Em cada ciclo de amplificação a amostra apresenta amplificação exponencial, no qual o ΔCt refere-se à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra para o gene controle (GAPDH), e o $\Delta \Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse (expressão em

⁴⁷ Applied Biosystems, EUA

⁴⁸ Applied Biosystems, EUA

determinado tempo) e o ΔC_t da amostra calibradora (controle negativo). Os resultados foram expressos pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Estes ensaios foram realizados em duplicata (CARVALHO NETA et al., 2008).

5.2.12 Análise estatística

Para análise estatística, os dados de infecção de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e bovinos foram obtidos, respectivamente, a partir de três e seis experimentos, completamente independentes, cada um deles realizados em triplicata e quadruplicata. As contagens de bactérias intracelulares e extracelulares, dos diferentes tempos de infecção e ensaios, foram logaritmicamente transformadas e submetidas a análise de variância do tipo (ANOVA). As médias foram comparada pelo teste de Turkey.

Para análise estatística do perfil de citocinas, os valores normalizados obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foram submetidos a transformação logarítmica. Após a transformação os dados foram submetidos a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste T de Student.

5.3 **Resultados e Discussão**

5.3.1 Sensibilidade antimicrobiana

A amostra de *C. chauvoei* (ATCC10092) foi considerada sensível a todos os antibióticos avaliados (Tabela 6). Os antibióticos capazes de inibir o crescimento de *C. chauvoei* com menor concentração foram a penicilina e oxitetraciclina, enquanto a maior concentração foi observada com a eritromicina. Esta etapa foi importante para delinear o protocolo de infecção.

Tabela 6: Concentração inibitória mínima de sete antimicrobianos para amostra de *Clostridium chauvoei* (ATCC10092)

Antibiótico	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)
Penicilina	0,25
Oxitetraciclina	0,25
Florfenicol	0,5
Tilosina	0,5
Metronidazol	0,5
Vancomicina	1
Eritromicina	2

Sathish e Swaminathan (2008), ao avaliarem a sensibilidade antimicrobiana de estirpes de *C. chauvoei* isoladas de duas fazendas de confinamento de bovinos, ambas enzoóticas para o carbúnculo sintomático, observaram que 25% das amostras eram resistentes aos betalactâmicos como penicilina, ampicilina e amoxicilina. Cerca de 10% dos isolados tinham sensibilidade intermediária a eritromicina e ao cloranfenicol. Todas as estirpes foram sensíveis ao iminopem e metronidazol. Não foram encontrados outros dados na literatura consultada sobre a sensibilidade antimicrobiana das estirpes de *C. chauvoei*. As diferenças entre a sensibilidade da amostra do presente estudo e das testadas por Sathish e Swaminathan (2008) podem ser explicadas pelas diferentes metodologias utilizadas. Ao contrário do realizado neste trabalho, os pesquisadores utilizaram a técnica de micro diluição em caldo, que embora seja mais fácil e rápido que a adotada pelo presente experimento, é considerada pouco adequada para avaliação de anaeróbios (CLSI,

2009). O perfil antimicrobiano da amostra testada no presente estudo, foi parecido com o da maioria das bactérias do gênero *Clostridium*, que normalmente são altamente sensíveis a penicilina, tilosina, metronidazol, florfenicol e vancomicina (SALVARANI et al., 2012; SILVA et al., 2013).

Baseado na sensibilidade antimicrobiana, quaisquer dos antibióticos testados poderiam ser utilizados para eliminar as bactérias extracelulares e/ou aderidas. Porém, foram tomados alguns cuidados com relação a esta escolha. A penicilina foi excluída pois nos ensaios de infecção de macrófagos com *C. perfringens* houve morte tanto das bactérias intracelulares como das extracelulares, mostrando que além de muito efetiva, essa base é capaz de ser internalizada pelos macrófagos e exercer efeito microbida nos microrganismos internalizados (O'BRIEN; MELVILLE, 2000). Nas infecções de macrófagos por *C. perfringens* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000), foi sugerido que a permeabilidade a penicilina ocorria devido a formação de poros induzidos pela liberação da toxina alfa. Como também foi descrito que *C. chauvoei* produz uma toxina formadora de poros (FREY et al., 2012), optou-se pela utilização não utilização da penicilina. Paredes-Sabja et al. (2012), nos ensaios de infecção com esporos de *C. difficile*, não utilizaram antibióticos, adotando como estratégia para eliminação de bactérias extracelulares apenas as lavagens, no entanto, estes autores não mencionam a quantificação da presença ou ausência de bactérias extracelulares. Como não foi possível eliminar todas as bactérias extracelulares apenas com as lavagens, optou-se pela adoção de uma estratégia diferente da proposta por esses pesquisadores.

A permeabilidade das células de defesa aos antimicrobianos é bastante variável, podendo ser influenciada por fatores como pH, pela modulação da própria bactéria que promove infecção, concentração da droga extracelular, dentre outros (EDOUARD; RAOULT, 2013). Em um estudo sobre a capacidade de atuação de algumas bases antimicrobianas na eliminação de *Staphylococcus aureus* fagocitados por macrófagos, foi verificado que embora a vancomicina tivesse uma boa atuação extracelular, esse fármaco não se acumulava no interior dos fagócitos (BARCIA-MACAY et al., 2006).

Dessa forma, optou-se pela adoção da vancomicina nos ensaios *in vitro* por ser uma molécula grande, o que dificultaria sua passagem por poros, por sua baixa capacidade de penetração em macrófagos e pela sensibilidade mostrada pelo *C. chauvoei* a esta base. Além disso, o uso de vancomicina neste estudo foi fundamental para completa eliminação de bactérias extracelulares nas infecções por *C. chauvoei* e representa uma alternativa nos protocolos de infecção de bactérias do gênero *Clostridium* na forma vegetativa.

5.3.2 Multiplicidade de infecção

Foram avaliadas as multiplicidades de infecção 2, 5, 20 e 50, durante o T1 e o T24 de infecção (Tabela 7). Em ambos os tempos avaliados, recuperou-se *C. chauvoei* no interior de macrófagos para todas as MOI avaliadas. Foram encontradas de 3,6 a 5 Log de UFC/mL correspondendo a aproximadamente 0,325 bactérias por macrófagos. Isso indica que a bactéria foi internalizada no T1 e sobreviveu no interior de macrófagos por pelo menos 24 horas (T24), independentemente da MOI utilizada.

Tabela 7: Avaliação de diferentes multiplicidades de infecção de *Clostridium chauvoei* na forma vegetativa após uma e 24 horas de infecção dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.

Multiplicidade de infecção	Inóculo (UFC/mL)	Taxa de entrada¹	Taxa de infecção²	Percentual de sobrevivência (%)³
2	8x10 ⁵	0,021	0,004	21
5	1x10 ⁶	0,035	0,008	24
20	8x10 ⁷	0,122	0,058	38
50	2x10 ⁷	0,325	0,143	45

1. Número de bactérias internalizadas (UFC/mL de *C. chauvoei*) no T1 em relação ao número de macrófagos inoculados

2. Número de bactérias que permaneceram vivas (UFC/mL de *C. chauvoei*) no T24 em relação ao número de macrófagos inoculados

3. Percentual de sobrevivência no T24 em relação as internalizadas no T1.

Os macrófagos murinos RAW 264.7, utilizados nesse experimento, foram capazes de fagocitar a bactéria na forma vegetativa após a primeira hora de infecção sem que fosse necessário a implementação de protocolos adicionais independentemente da MOI utilizada. Na infecção com a MOI 1:2 mesmo após as cinco lavagens com PBS e emprego de antibióticos para remoção de bactérias extracelulares e/ou aderidas aos macrófagos, ainda assim foi possível recuperar bactérias extracelulares viáveis no T1 de infecção ($1,2 \times 10^3$ UFC/mL). Como o contato com 200 µg/mL de vancomicina durante apenas uma hora, não foi suficiente para a completa eliminação das bactérias extracelulares, optou-se pelo prolongamento do contato com antibiótico, numa concentração mais baixa (50 µg/mL) por mais 24 horas.

Ainda no T1 da infecção com a MOI 1:2, estavam aderidas ou foram fagocitadas $7,8 \times 10^3$ UFC/mL. No entanto, partir do T24, não foram mais observadas bactérias extracelulares viáveis e haviam $1,6 \times 10^3$ UFC/mL de bactérias internalizadas. Após as primeiras 24 horas de infecção com as células vegetativas, todas as bactérias extracelulares foram eficientemente eliminadas, possibilitando a retirada do antibiótico e as células infectadas passaram a ser incubadas apenas com RPMI suplementado com soro fetal bovino quando a infecção foi prolongada por tempos superiores. Como não foram recuperadas bactérias extracelulares, estas foram consideradas bactérias exclusivamente fagocitadas.

Macrófagos RAW 264.7 infectados com a MOI 5, 20 e 50 apresentaram $2,9 \times 10^3$, $1,1 \times 10^4$ e $2,4 \times 10^4$ UFC/mL de bactérias extracelulares no T1 de infecção, respectivamente. Apesar do aumento do número de bactérias inoculadas, a quantidade de bactérias extracelulares variou pouco, apenas 1,2 Log₁₀ de UFC/mL no T1. As bactérias extracelulares foram totalmente eliminadas após 24 horas de infecção, independentemente do inóculo infectante utilizado. Isso nos permite concluir que embora a quantidade de bactérias extracelulares seja estatisticamente diferente quando se aumenta a MOI no T1, a partir de 24 horas de infecção a concentração do inóculo infectante não interfere na observação de bactérias extracelulares.

As infecções com diferentes MOI demonstraram que mesmo quando apenas 8×10^5 UFC/mL de bactérias (MOI 2), menor inóculo avaliado, eram colocadas em contato com macrófagos, 21% das que foram internalizadas ($8,4 \times 10^4$ UFC/mL) no T1 permaneceram viáveis por pelo menos 24 horas de infecção, mesmo que em condições de aerobiose (Tabela 7). Foram recuperadas no interior dos macrófagos $1,4 \times 10^4$; $6,1 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^5$ UFC/mL no T1 e $3,4 \times 10^3$; $2,3 \times 10^4$ e $5,7 \times 10^4$ UFC/mL no T24 para as MOI 5, 20 e 50, respectivamente. O aumento da MOI tornou o número de bactérias internalizada recuperadas superior na MOI 50 comparando-a com as demais, assim como um maior percentual de sobrevivência após horas de infecção ($p < 0,01$) (Tabela 7). Pode-se inferir que o aumento da MOI não influenciou na eliminação de bactérias extracelulares

após 24 horas de infecção e promoveu um aumento na quantidade de bactérias internalizadas e na taxa de sobrevivência.

O maior percentual de sobrevivência no T24 de infecção, em qualquer uma das MOI utilizadas (Tabela 7), ocorreu provavelmente devido a diferença fenotípica dos macrófagos que compõem a linhagem celular utilizada. Segundo O'Brien e Meville (2000), as linhagens celulares são compostas por uma mistura de células com diferentes fenótipos o que confere somente a algumas células a capacidade de fagocitar. Como os macrófagos RAW 264.7 são capazes de fagocitar mais de uma bactéria simultaneamente (PAREDES-SABJA et al., 2012), o aumento da MOI, além de aumentar a pressão de infecção pode também levar ao aumento de bactérias fagocitadas por macrófagos, como observado na Tabela 7. Por isso, dentre as MOI analisadas optou-se pela MOI 1:50, pois esta apresentou maior taxa de sobrevivência quando foram comparadas ao percentual de bactérias fagocitadas no T1 e no T24.

O protocolo de infecção utilizado na avaliação da sobrevivência dos clostrídios internalizados por macrófagos é bastante diverso. Trabalhos realizados com *C. perfringens* utilizaram a MOI 1:1 e 1:10 em macrófagos da linhagem J774 e avaliaram a cinética de infecção por cinco horas (O'BRIEN; MELVILLE, 2004). Segundo os autores, a sobrevivência de *C. perfringens*, independentemente da MOI utilizada, está estritamente associada a produção das toxinas alfa e perfringolisina O, que foram produzidos mesmo quando a infecção foi realizada em condições de aerobiose. Certamente, a produção dessas toxinas aumentaram a citotoxicidade quando os macrófagos foram infectados com a MOI 1:10 em relação a MOI 1:1. Contudo, a diferença na citotoxicidade entre as duas MOI avaliadas pelos pesquisadores não foi analisada estatisticamente. Ressalta-se, que a presença de toxinas é um achado extremamente interessante dada as condições de aerobiose em que o estudo foi realizado e ao fato que *C. perfringens* é um anaeróbio estrito, embora seja aerotolerante. Embora o presente experimento não tenha mensurado a citotoxicidade das diferentes MOI, alterações que indicassem citotoxicidade não foram observadas neste estudo. As células estavam viáveis na visualização ao microscópio de luz comum no momento da lise e esta viabilidade foi confirmada por microscopia eletrônica (Figura 6).

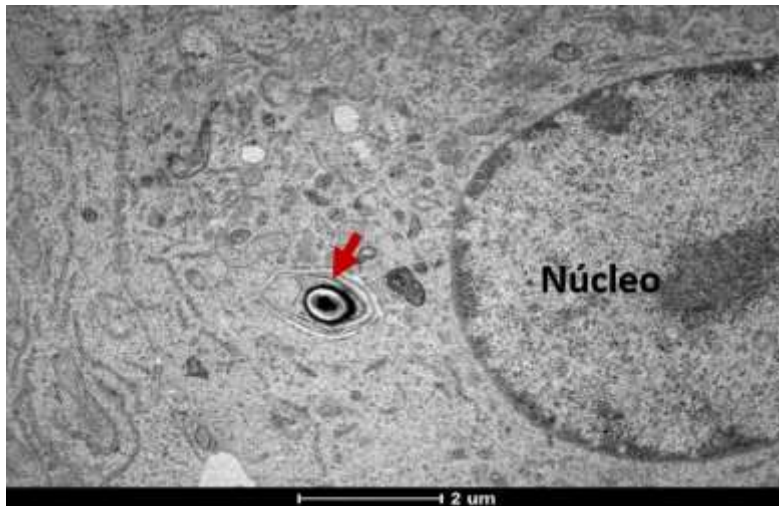


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 após 72 horas de infecção com *Clostridium chauvoei* na forma esporulada: Esporo de *C. chauvoei* internalizado pelo macrófago murino. O macrófago encontra-se íntegro com membrana celular, núcleo e organelas citoplasmáticas preservadas sem sinais que indiquem que a infecção por *C. chauvoei* tenha provocado danos celulares. A seta vermelha destaca um esporo de *Clostridium chauvoei*.

5.3.3 Cinética de *Clostridium chauvoei* em macrófagos RAW 264.7

Tradicionalmente, as bactérias patogênicas do gênero *Clostridium* sempre foram consideradas microrganismos exclusivamente extracelulares, produtoras de potentes toxinas capazes de causar sérios danos aos hospedeiros infectados. Recentemente, alguns pesquisadores demonstraram a habilidade de patógenos como *C. perfringens* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000) e *C. difficile* (PAREDES-SABJA et al., 2012) sobreviverem após a internalização por células de defesa, comprovando que as bactérias desse gênero exibem mecanismos patogênicos ainda não completamente esclarecidos capazes de conferir viabilidade intracelular à alguns microrganismos. Pela primeira vez, têm-se evidências de que *C. chauvoei* também é um patógeno capaz de resistir aos mecanismos de eliminação bacteriana exibidos por macrófagos.

Nos três ensaios de infecção com as bactérias predominantemente na forma vegetativa foram utilizadas 2×10^7 UFC/mL de *C. chauvoei*. As bactérias foram capazes de sobreviver após serem fagocitadas em todos os tempos de infecção avaliados (Figura 7), mas observou-se uma redução gradativa na quantidade de bactérias internalizadas ao longo do experimento. Comparando-se o percentual de bactérias na forma vegetativa no interior de macrófagos entre o T24, T48 e T72 com o T1, observamos que, 45, 33, e 8% das bactérias internalizadas no T1 permaneciam vivas nos demais tempos, respectivamente.

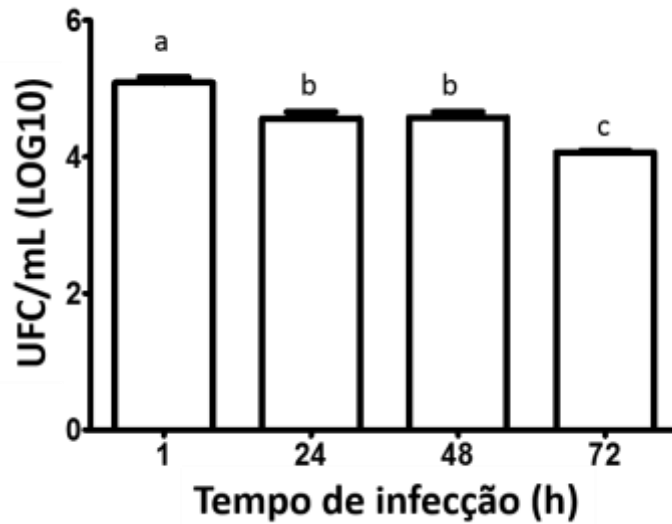


Figura 7: Cinética de infecção *Clostridium chauvoei* na forma vegetativa em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,01$) entre as contagens médias de bactérias internalizadas nos tempos de infecção avaliados. As barras demonstram o desvio padrão.

Foi observada diferença significativa taxa de sobrevivência entre o T1 e os demais tempos avaliados ($p < 0,01$). Também se constatou uma diferença entre o T72 e os demais tempos ($p < 0,01$). As bactérias na forma vegetativa permaneceram viáveis por pelo menos 48 horas (Figura 7), indicando que são capazes de resistir ao efeito microbicida dos macrófagos. A completa eliminação de bactérias extracelulares e/ou aderidas só foi possível após as primeiras 24 horas de infecção e está associada a principalmente a presença do antibiótico e a toxicidade do oxigênio a elas. Assim, a redução de 55% no número de bactérias no T24 em relação ao T1 pode ser justificada principalmente pela interferência das células aderidas na avaliação das fagocitadas no T1, e não ao efeito microbicida dos macrófagos sobre as bactérias internalizadas. Com a completa eliminação das bactérias extracelulares, observou-se ausência de diferença estatística entre o T24 e T48, havendo um percentual de sobrevivência de 75% das bactérias fagocitadas entre estes tempos.

Apesar de serem recuperadas bactérias internalizadas no T72, neste tempo haviam apenas 0,03 bactérias internalizadas por macrófagos, número muito inferior quando comparado aos T24 e T48 cuja relação era de 0,143 e 0,111 bactérias por macrófagos, respectivamente. Assim, no T72, havia apenas 21% das bactérias internalizadas no T48. A redução no T72 pode ser atribuída a morte de bactérias na forma vegetativa e sobrevivência quase que exclusiva das esporuladas, que perfaziam 10% da suspensão bacteriana inicialmente inoculada. Este fato ficou evidente quando o lisado foi submetido ao tratamento térmico, através do qual se comprovou não haver diferenças nas contagens bacterianas do lisado tratado ou não tratado termicamente. Ao contrário das células vegetativas, os esporos resistem ao tratamento térmico e a contagem similar do lisado aquecido e do não aquecido indicam que haviam poucas bactérias na forma vegetativa no T72.

Nos três ensaios com bactérias esporuladas, os macrófagos foram infectados também com 2×10^7 esporos/mL de *C. chauvoei*. Esporos extracelulares permaneceram viáveis, sendo recuperados $2,9 \times 10^4$, $4,6 \times 10^3$, $4,6 \times 10^3$ e $3,5 \times 10^3$ esporos viáveis/mL nos T1, T24, T48 e T72, respectivamente.

Ao contrário do observado com *C. chauvoei* na forma vegetativa, a infecção com a forma esporulada mostrou uma taxa de sobrevivência semelhante quando foram comparados o T1 com os demais tempos (Figura 8). Comparando-se o percentual de esporos no interior de macrófagos entre o T24, T48 e T72 com o T1, observamos que, respectivamente 100, 83, e 78% das bactérias que foram internalizadas no T1 permaneciam vivas nos demais tempos. Não foi observada diferença significativa entre o número de bactérias fagocitadas nos tempos avaliados, indicando que os esporos são mais resistentes ao ambiente intracelular do macrófago que as bactérias na forma vegetativa.

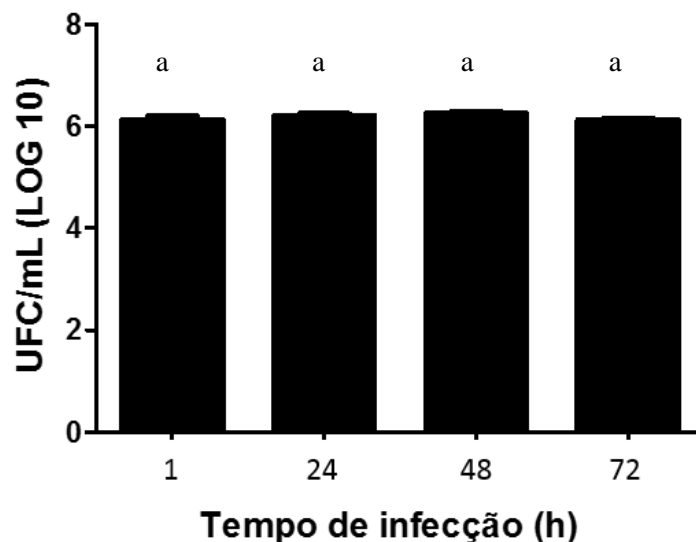


Figura 8: Cinética de infecção de *Clostridium chauvoei* na forma esporulada em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Letras minúsculas idênticas indicam ausência de diferença significativa entre as contagens médias de esporos internalizados nos tempos de infecção avaliados. As barras indicam o desvio padrão.

A redução percentual discreta e não significativa no número de esporos internalizados foi acompanhada pela redução significativa de bactérias extracelulares. Essa redução pode ser explicada pela troca de meios a cada 24 horas e não necessariamente pelo efeito microbicida do macrófago. Contudo, como não foi possível a completa eliminação de esporos extracelulares em nenhum dos tempos avaliados, pois estas formas bacterianas não são sensíveis aos antibióticos nem a presença de oxigênio. É possível que o elevado percentual de sobrevivência possa ter sido influenciado pela constante fagocitose de bactérias extracelulares, o que pode ter mascarado a influência da multiplicação e morte da linhagem celular na contagem de esporos internalizados, impossibilitando outras inferências a respeito da cinética de infecção das duas formas bacterianas.

Na microscopia eletrônica, bactérias aderidas a membrana celular dos macrófagos só foram observadas no T1 durante a infecção com suspensão bacteriana contendo predominantemente bactérias na forma vegetativa (Figura 9). Adicionalmente, foram observadas nos tempos T1, T24 e T48 a presença de bactérias tanto na forma vegetativa quanto na forma esporulada no interior de macrófagos. No T72, como esperado só foram encontradas internalizadas bactérias na forma esporulada.

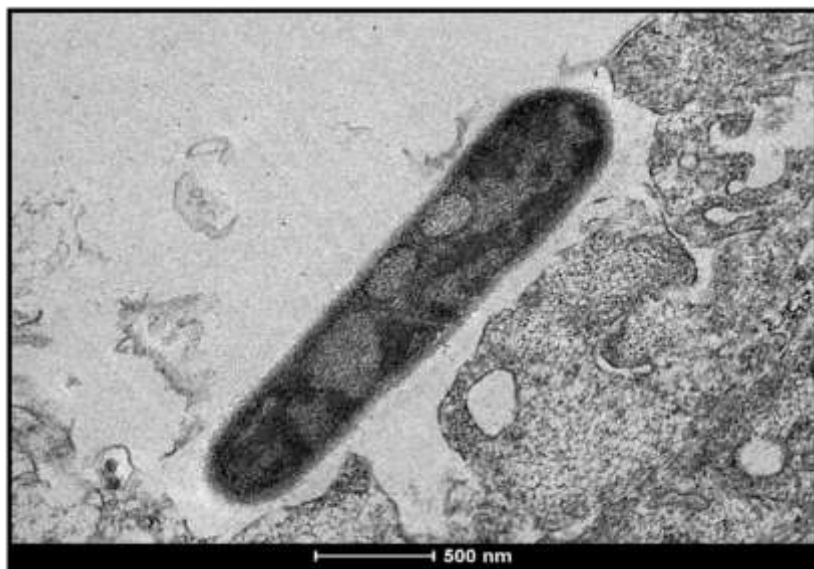


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 uma hora após a infecção com *Clostridium chauvoei* na forma vegetativa. Bastonete de *C. chauvoei* aderido a membrana celular do macrófago.

Como esperado, na infecção com suspensões de esporos, somente essas formas foram encontradas tanto internalizadas como aderida a membrana dos fagócitos em todos os tempos avaliados. Não foram encontradas nenhuma das formas bacterianas livre no citoplasma, nem indícios de germinação de esporos, indicando que os esporos permanecem dormentes durante os períodos de infecção. A manutenção da dormência dos esporos pode estar diretamente relacionada à habilidade de sobrevivência desses agentes após a internalização pelos fagócitos (PAREDES-SABJA et al., 2012; PAREDES-SABJA; SARKER, 2012). O baixo metabolismo apresentado por esporos do gênero *Clostridium* pode levar ao não reconhecimento dos mesmos pelos macrófagos, impedindo que esse fagócito deflagre os mecanismos responsáveis pela eliminação dos patógenos. Ao contrário, quando os macrófagos são infectados com esporos capazes de germinar, como os de *C. perfringens*, as bactérias resultantes são rapidamente eliminadas pelos macrófagos. Assim, bactérias recém germinadas são mais susceptíveis a morte mediada por macrófagos, principalmente pela baixa produção de toxinas (PAREDES-SABJA; SARKER, 2012).

Tanto na infecção com *C. chauvoei* na forma vegetativa quanto com a forma esporulada, os macrófagos RAW 264.7 foram capazes de internalizar as bactérias que permaneceram estruturalmente intactas dentro dos fagócitos. Nas infecções com a forma esporulada, as bactérias estavam íntegras mesmo após aparente fusão do lisossomo (Figura 10). Os esporos internalizados foram encontrados em compartimentos delimitados por membrana plasmática, com morfologia sugestiva de fagossomo. Foi possível observar a fusão de diversas vesículas ao fagossomo contendo esporos, sugerindo que a infecção com esta forma bacteriana não impede a maturação do fagolisossomo. Assim, apesar de expostos aos diversos mecanismos antimicrobianos dos macrófagos, não foi observada alterações ultraestruturais dos esporos internalizados em nenhum dos tempos avaliados.

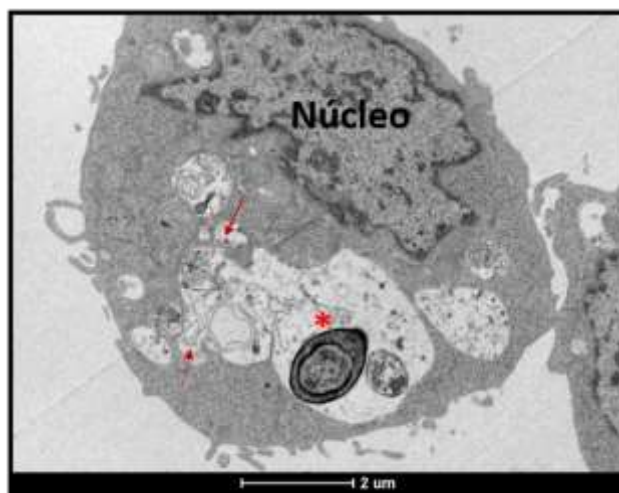


Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 após uma hora de infecção com *Clostridium chauvoei* na forma esporulada (asterisco). As setas vermelhas indicam uma descontinuidade da membrana citoplasmática do compartimento, possivelmente devido a fusão de lisossomos.

Em alguns dos macrófagos contendo esporos dentro de fagossomos foi observada uma descontinuidade na membrana desta estrutura, associada a estreita interação entre a membrana do fagossomo e a membrana externa do esporo (Figura 11). A sobrevivência em fagossomos maduros e a interação dos esporos com a membranas desses fagossomos também foram observados em macrófagos infectados com esporos de *C. difficile* (PAREDES-SABJA et al., 2012). Segundo Paredes-Sabja et al. (2012) esses achados confirmam a capacidade de sobrevivência dos esporos após a internalização de macrófagos e sugerem a possível modulação da atividade de fagolisossomas por proteínas de superfície expressas pelos esporos.

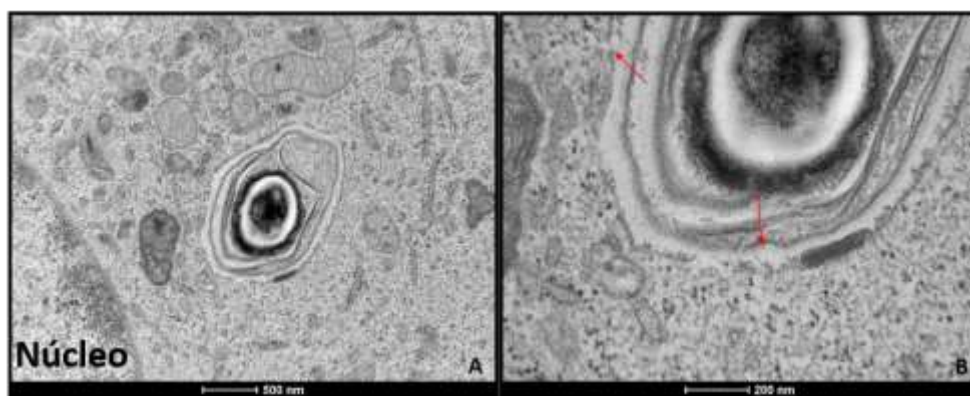


Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 após 72 horas de infecção com *Clostridium chauvoei* na forma vegetativa. A: O macrófago encontra-se aparentemente íntegro, com organelas citoplasmáticas preservadas. A bactéria na forma esporulada apresenta-se íntegra e dentro de um compartimento delimitado por membrana citoplasmática. B: As setas vermelhas indicam uma descontinuidade da membrana citoplasmática do fagossomo, associada a uma interação entre a membrana externa do esporo e membrana do fagossomo.

Esta é a primeira evidência que *C. chauvoei* tanto na forma vegetativa (Figura 7) quanto na esporulada (Figura 8) é capaz de sobreviver no interior de macrófagos *in vitro*. Contudo, a sobrevivência da forma esporulada não sofre influência com o prolongamento do tempo de infecção dos macrófagos persistindo por até 72 horas. Ao contrário, a forma vegetativa, é progressivamente morta pelos macrófagos, não estando mais presente no T72. As comparações do presente estudo com outros realizados com bactérias do gênero *Clostridium* são limitadas pois os protocolos são bastante distintos. Diante dos resultados apresentados, percebe-se que potencialmente as duas formas bacterianas podem ser consideradas importantes na etiologia do carbúnculo sintomático.

Devido a citotoxicidade do oxigênio para a forma vegetativa, acredita-se que os esporos sejam mais importantes na contaminação de animais susceptíveis ao carbúnculo sintomático, sendo considerados a forma de resistência desses patógenos no ambiente (LOBATO et al., 2013). Capazes de resistir aos efeitos microbicidas dos macrófagos, os esporos de *C. chauvoei* captados no ambiente podem ser posteriormente disseminados para outros tecidos e permanecerem latentes (UZAL, 2012). Os resultados aqui apresentados reforçam a teoria de que os esporos seriam a principal forma infectante do carbúnculo sintomático. Além disso, o longo período de persistência dos esporos fagocitados (Figura 8) demonstra que os macrófagos são ineficazes na eliminação do patógeno garantindo-lhe o potencial de disseminar-se para tecidos saudáveis.

Até bem pouco tempo, os esporos de *Clostridium* spp. eram considerados formas bacterianas inertes, ou seja, incapazes de induzir danos ao hospedeiro. De fato, nesse estágio de vida, *Clostridium* spp. são incapazes de produzir seus principais fatores de virulência, as exotoxinas (LEGGETT et al., 2012). No entanto, estudos recentes têm revelado a importância dessa forma bacteriana em resistir aos processos de eliminação de patógenos tanto da imunidade primária quanto da adquirida (PAREDES-SABJA et al., 2012; PAREDES-SABJA; SARKER, 2012). Assim, uma contribuição do presente estudo é a comprovação da interação dos esporos de *C. chauvoei* com a célula hospedeira, mesmo em condições de aerobiose.

Os resultados obtidos no presente estudo e os anteriormente descritos para infecções com *C. perfringens* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000) e *C. difficile* (PAREDES-SABJA et al., 2012) na forma vegetativa demonstraram que a habilidade de sobrevivência dessa forma bacteriana é uma habilidade intrínseca a espécie de interesse. Assim, já foi anteriormente demonstrado que a forma vegetativa de *C. perfringens* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000) é capaz de resistir aos efeitos microbicidas no macrófago, enquanto *C. difficile* na forma vegetativa (PAREDES-SABJA et al., 2012) não é. A capacidade das bactérias na forma vegetativa sobreviverem após a internalização por macrófagos seria muito importante nos estágios iniciais de infecção, em que os fagócitos são recrutados, mas incapazes de exercer seu efeito bactericida sobre as bactérias vegetativas recém germinadas e, conseqüentemente, incapazes de eliminar a infecção. Este fato pode permitir a disseminação e agravamento da lesão e morte do animal, como sugerido para *C. perfringens* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000). Ressalta-se, no entanto, que durante as infecções, *C. chauvoei* produz potentes toxinas que são citotóxicas para as células de defesa, não sendo a resistência a fagocitose um mecanismo essencial ao dano gerado pela presença desta bactéria.

Este estudo traz pela primeira vez a avaliação da sobrevivência de *C. chauvoei* em macrófagos e demonstrou que tanto a forma vegetativa quanto a esporulada são capazes de sobreviver após serem internalizadas por macrófagos. Os resultados encontrados são considerados bastante promissores devido ao limitado conhecimento sobre o agente e a patogênese do carbúnculo sintomático.

5.3.4 Sobrevivência de *Clostridium chauvoei* em macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos

Nos seis ensaios de infecção tanto com bactérias na forma vegetativa quanto esporulada foram utilizadas 2×10^7 UFC/mL de *C. chauvoei* (MOI 1:50). Os macrófagos bovinos foram capazes de internalizar as bactérias tanto na forma vegetativa quanto na forma esporulada após a primeira hora de infecção sem que fosse necessário a implementação de protocolos adicionais (Figura 12). As cinco lavagens utilizadas não foram suficientes para remoção de todas as bactérias extracelulares ou aderidas. O contato com 200 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina durante apenas uma hora, não foi suficiente para a completa eliminação dessas bactérias. No entanto, o prolongamento do contato com antibiótico, numa concentração mais baixa (50 $\mu\text{g/mL}$), por mais 24 horas foi eficiente apenas na eliminação de bactérias na forma vegetativa a partir das 48 de infecção, resultados similares aos observados na infecção de macrófagos murinos. As bactérias na forma vegetativa internalizadas foram capazes de sobreviverem em todos os tempos de infecção avaliados (Figura 12). Comparando-se o percentual de células no interior de macrófagos entre o T24, T48 e T72 com o T1, observamos que, respectivamente 68, 63, e 58% das bactérias que foram fagocitadas no T1 permaneciam vivas nos demais tempos.

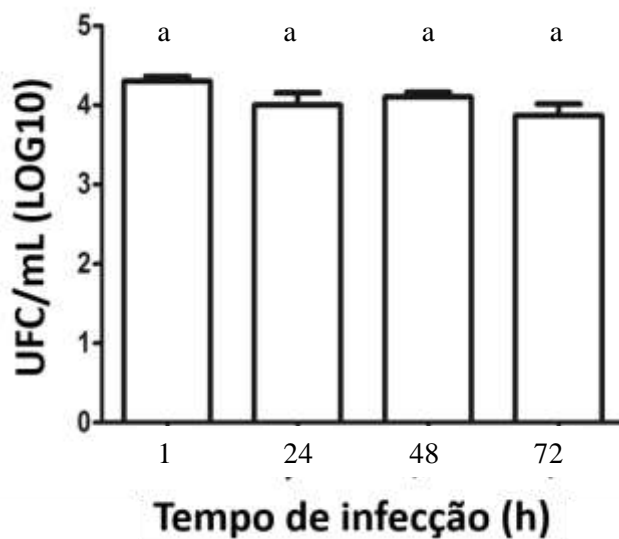


Figura 12: Avaliação da sobrevivência de *Clostridium chauvoei* na forma vegetativa após a internalização por macrófagos bovinos nos diferentes tempos de infecção. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre as contagens médias de bactérias internalizadas nos tempos de infecção avaliados. As barras indicam o desvio padrão.

Esses resultados deixam evidentes duas marcantes diferenças entre as infecções dos macrófagos murinos e bovinos com *C. chauvoei*. A primeira é que a infecção dos macrófagos bovinos com *C. chauvoei* não culmina em uma diferença estatística no número de bactérias internalizadas ao longo do ensaio, ao contrário do observado na infecção de macrófagos murinos que houve diferenças entre os T1 e T72 com os demais tempos (Figura 7). A segunda é que o percentual de bactérias internalizadas que permanecem viáveis após a internalização por macrófagos bovinos é superior em todos os tempos analisados. A taxa de internalização de bactérias na forma vegetativa

foi superior nas infecções com macrófagos bovinos do que de murinos, sendo de 0,5 e 0,325 bactérias/macrófagos, respectivamente. As diferenças podem estar relacionadas a maior capacidade de internalização de *C. chauvoei* por macrófagos bovinos. Isso promove uma diminuição no número de bactérias extracelulares existentes, conseqüentemente, essa maior internalização influenciou nas diferenças de contagem observadas entre o T1 e os demais tempos quando se analisou as infecções com macrófagos murinos (Figura 7). A manutenção da taxa de sobrevivência observada no modelo de macrófagos bovinos, pode ser atribuída as características do cultivo primário desses macrófagos que não replicam e mantem as condições de cultivo similares ao longo do experimento.

A bactéria na forma esporulada também foi capaz de sobreviver após internalização em todos os tempos de infecção avaliados (Figura 13), não havendo diferença estatística quando os tempos de infecção foram comparados. Esse resultado é similar ao encontrado nos ensaios de infecção de macrófagos murinos com *C. chauvoei* esporulado (Figura 8). Comparando-se o percentual de células no interior de macrófagos entre o T24, T48 e T72 com o T1, observamos que, respectivamente 77, 71 e 71% das bactérias que foram fagocitadas no T1 permaneciam vivas nos demais tempos.

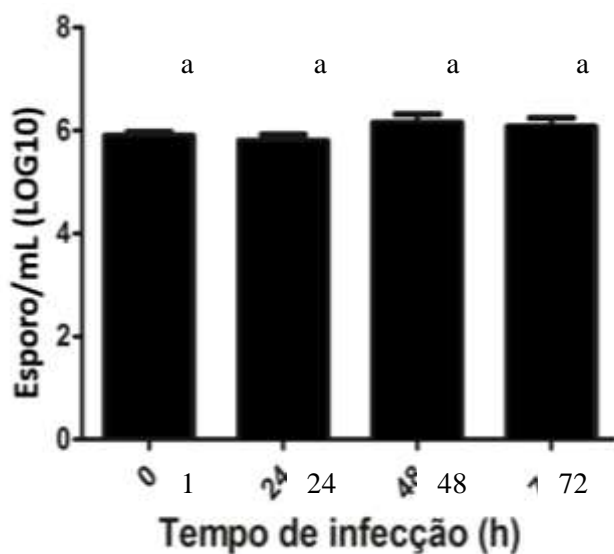


Figura 13: Avaliação da sobrevivência de *Clostridium chauvoei* na forma esporulada após internalização por macrófagos bovinos em diferentes tempos de infecção. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre as contagens médias de bactérias internalizadas nos tempos de infecção avaliados. As barras indicam o desvio padrão.

A quantidade de esporos de *C. chauvoei* internalizados por macrófagos bovinos foi maior que a de bactérias na forma vegetativa, sendo de 2,35 esporos por macrófagos bovinos no T1 de infecção. Essa maior taxa de infecção pode ser atribuída a não eliminação de esporos extracelulares devido à grande resistência dos mesmos na presença de oxigênio e inatividade do antibiótico para esta forma bacteriana. Essa diferença entre as taxas de infecção entre as duas formas bacterianas infectantes, vegetativa e esporo, também foi demonstrada na infecção com macrófagos murinos.

Ressalta-se que todos os ensaios foram realizados em aerobiose, condição que impede a multiplicação bacteriana e produção de fatores tóxicos em níveis detectáveis. Apesar disso, o agente demonstrou habilidade de resistir aos mecanismos microbicidas dos macrófagos sobrevivendo por até 72 horas de infecção nestas condições. Por isso, os resultados aqui apresentados são considerados promissores e abrem caminho para diversos outros estudos que busquem esclarecer os mecanismos de virulência associados a *C. chauvoei* durante o processo de infecção.

Para explicar a ocorrência do carbúnculo sintomático, teorizava-se, sem comprovação científica, que os esporos de *C. chauvoei* eram carreados do intestino para a musculatura por meio de macrófagos. No tecido muscular, esses esporos permaneceriam latentes até que uma condição de anaerobiose fosse gerada, culminando com a germinação, multiplicação e produção de toxinas responsáveis pelas alterações clínico-patológicas (PIRES et al., 2012; UZAL, 2012). A sobrevivência *in vitro* dos esporos de *C. chauvoei* internalizados por macrófagos, demonstrados nesse trabalho, fortalecem essa hipótese. Por isso, não só a sobrevivência dos esporos internalizados por macrófagos murinos (Figura 8) e bovinos (Figura 13), como também a ausência de indícios de germinação (Figura 10), demonstrados no presente trabalho, sugerem que os esporos de *C. chauvoei* podem ser carreados aos tecidos musculares no interior de macrófagos, que são incapazes de eliminar essa forma bacteriana.

A interação entre as células do hospedeiro e as bactérias na forma vegetativa ainda são pouco compreendidas, principalmente no tangente a interação com as células de defesa. Contudo, este entendimento, permite uma melhor compreensão dos estágios iniciais das doenças causadas pelas bactérias do gênero *Clostridium* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000) e, nas últimas décadas, ficou comprovado que *C. perfringens* na forma vegetativa era capaz de sobreviver após internalização de macrófagos (O'BRIEN; MELVILLE, 2000, 2004; PAREDES-SABJA; SARKER, 2012). No entanto, quando os esporos de *C. perfringens* infectam macrófagos eles são capazes de iniciar o processo de germinação, mesmo em condições de aerobiose, sendo reconhecidos e eficientemente mortos pelos fagócitos (PAREDES-SABJA; SARKER, 2012). Ao contrário, quando os macrófagos infectados com *C. difficile* eliminam a forma vegetativa, mas não os esporos (PAREDES-SABJA et al., 2012).

Esta é primeira vez que macrófagos bovinos, espécie alvo do carbúnculo sintomático, são infectados com bactérias do gênero *Clostridium*. Este estudo demonstrou que *C. chauvoei* é capaz de sobreviver após ser internalizado por macrófagos tanto na forma vegetativa como na forma esporulada, o que pode contribuir para diferentes estágios do carbúnculo sintomático.

5.3.5 Perfil de transcritos de citocinas produzidas por macrófagos infectados com *Clostridium chauvoei*

A transcrição de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foi avaliada através da quantificação relativa de RNA mensageiro obtido de macrófagos infectados com as seguintes formas de *C. chauvoei*: vegetativa ou esporulada, após 1, 6, 12 e 24 horas de infecção (Figura 14).

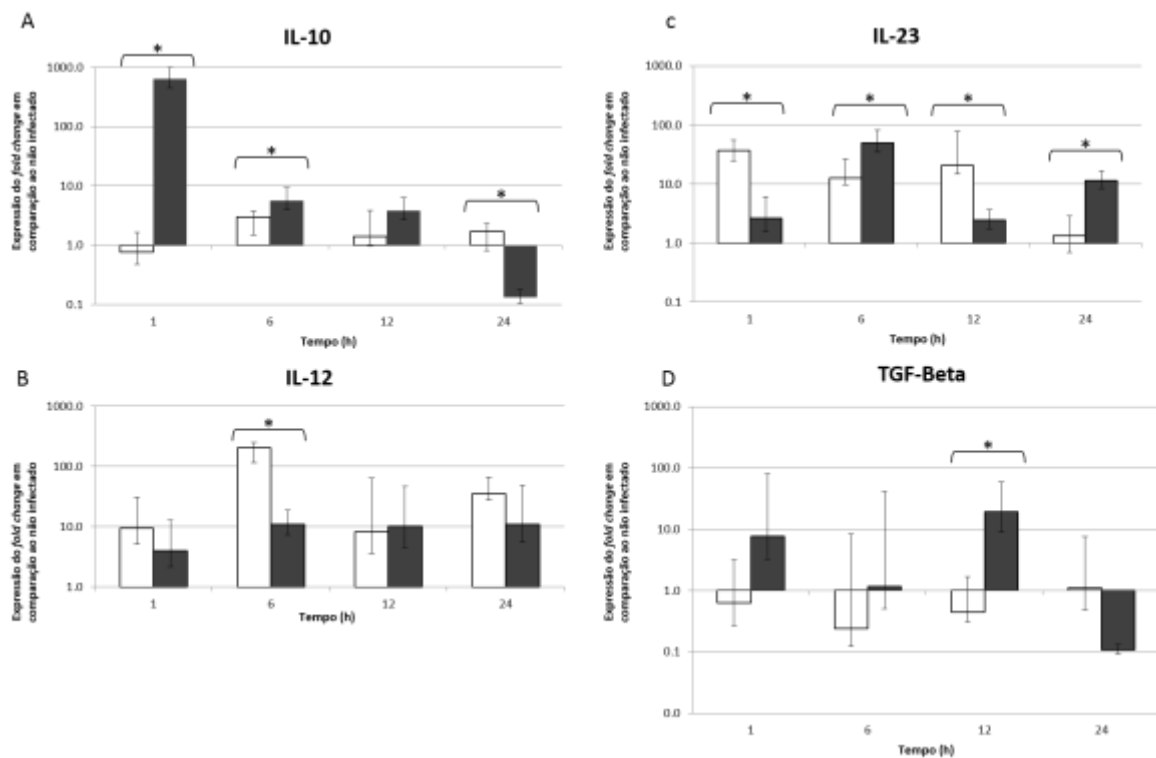


Figura 14: Expressão relativa de transcritos de IL-10 (A), IL12 (B), IL-23 (C) e TGF-beta (D) de macrófagos bovinos (n=6) infectados com *Clostridium chauvoei* na forma vegetativa e esporulada durante 1, 6, 12 e 24 horas. As colunas representam a média geométrica e erro padrão. As colunas brancas representam a forma vegetativa e as colunas cinzas representam os esporos. Os resultados foram submetidos a transformação logarítmica e posterior análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste T de Student. Diferenças estatísticas entre a expressão de citocinas de macrófagos infectados com *C. chauvoei* na forma vegetativa e esporulada estão indicadas por asteriscos (* $p < 0,001$).

Durante a primeira hora de infecção, os macrófagos infectados com *C. chauvoei* na forma vegetativa apresentaram níveis superiores de transcritos de IL-23 (Figura 14 C) enquanto os infectados com esporos apresentaram níveis superiores de transcritos de IL-10 (Figura 14 A) ($p < 0,0001$). Passadas seis horas de infecção, os macrófagos infectados com *C. chauvoei* na forma vegetativa passaram a apresentar níveis de transcritos de IL-12 (Figura 14 B) maiores que os macrófagos infectados com esporos. Esses por sua vez, continuaram com níveis de transcritos de IL-10 ainda superiores, além de apresentarem um aumento significativo de transcritos de IL-23.

Com o prolongamento da infecção, a partir de 12 horas já não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão de transcritos de IL-10 (Figura 14 A) e IL-12 (Figura 14 B), no entanto houve uma diferença significativa nos níveis dos transcritos de IL-23 (Figura 14 C) e TGF-beta (Figura 14 D) que foram superiores nos macrófagos infectados com *C. chauvoei* na forma vegetativa e esporulada, respectivamente. Já com 24 horas de infecção houve uma inversão nos níveis de transcritos de IL-23, que passou a ser superior nos macrófagos infectados com esporos.

Apesar serem considerados células da imunidade inata e que participam, portanto, como primeira linha de defesa do organismo frente as infecções, a secreção de citocinas por macrófagos tem um papel importante na modulação da imunidade adaptativa. Por isso, o perfil de citocinas produzidas por essa célula pode contribuir para eliminação e/ou persistência dos diferentes patógenos (MALYSHEV; MALYSHEV, 2015). No presente estudo, macrófagos bovinos infectados com esporos de *C. chauvoei* apresentaram um perfil de transcritos de citocinas anti-inflamatórias que podem ter contribuído, portanto, para a persistência dessa forma bacteriana no interior do fagócito.

A IL-10 pode inibir uma resposta imune protetora, culminando em baixa produção de citocinas pró-inflamatórias por células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos, e favorecer a sobrevivência de patógenos intracelulares. A sinalização promovida pela TGF-beta nos linfócitos T demonstrou ser crítica para a inibição da proliferação e diferenciação em células efectoras (REDFORD et al., 2011). Assim, macrófagos que expressem citocinas que inibem a resposta inflamatória ao invés de ativá-la favorece a persistência dos esporos e sua disseminação no organismo hospedeiro. A transcrição de citocinas anti-inflamatórias pode ser uma estratégia bastante interessante nas infecções promovidas por *C. chauvoei*, principalmente na fase em que os esporos são captados do ambiente e circulam até a musculatura onde permanecem latentes até que encontrem condições favoráveis para germinar e multiplicar.

Ao contrário do observado nas infecções com esporos, uma vez internalizadas, as bactérias na forma vegetativa, levam ao aumento de transcritos de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-23 (Figura 14 B e C). Esta resposta é reconhecida por favorecer o controle de patógenos pois aumenta a capacidade microbicida do macrófago e contribui para a migração desses fagócitos para o sítio de infecção (CHAWLA, 2010). A liberação de citocinas pró inflamatórias é essencial para a eliminação de muitos patógenos e já foi observada em macrófagos que fagocitaram proteínas da superfície de células vegetativas de *C. difficile* (COLLINS et al., 2014) e vesículas de membrana secretadas por *C. perfringens* (JIANG et al., 2015).

Apesar dos agentes do gênero *Clostridium*, envolvidos na ocorrência de mionecroses, serem produtores de potentes toxinas, que inibem a migração de células de defesa para o sítio de infecção e/ou exibem efeito citotóxico sobre as células de defesa (FREY et al., 2012; LOBATO et al., 2013; FREY; FALQUET, 2015). No começo do processo infeccioso, a produção desses fatores de virulência pode ser limitada pela pequena população bacteriana presente na lesão. Isso poderia determinar o insucesso da infecção. Assim, a habilidade de sobreviver, ainda que apenas por 48 horas, pode ser bastante importante nos primeiros estágios da doença, no qual o número de bactérias em relação aos fagócitos é relativamente pequeno. Essa característica da bactéria na forma vegetativa foi considerada particularmente importante para os agentes causadores de mionecroses clostridiais como *C. perfringens* (O'BRIEN; MELVILLE, 2000).

No presente estudo, macrófagos bovinos infectados com *C. chauvoei* na forma vegetativa apresentaram um perfil de transcritos de citocinas inflamatórias. Em geral, macrófagos que exibem uma maior produção de citocinas inflamatórias são mais eficientes na eliminação e/ou controle da multiplicação de patógenos (MACEDO et al., 2013). A IL-12, por exemplo, é reconhecida por promover uma ativação dos linfócitos T auxiliares do tipo 1, que promovem a ativação clássica dos macrófagos e ativam os linfócitos T citotóxicos, mecanismos relacionados com a eliminação da infecção (HOEBE et al., 2004). A IL-23 também é considerada uma citocina pró-inflamatória cuja expressão pode promover a ativação e garantir a sobrevivência de linfócitos Th17, que regulam a imunidade inata, especificamente a inflamação, culminando no recrutamento

e acúmulo de neutrófilos a sítios de infecção aguda e dano tecidual (TCHATALBACHEV et al., 2010). O perfil de citocinas demonstrados com esse trabalho corroboram com a miosite neutrofílica aguda que é frequentemente observada nas patologias envolvendo *C. chauvoei* (PIRES et al., 2012).

Apesar da notória sobrevivência de *C. chauvoei* na forma vegetativa após internalização por macrófagos bovinos *in vitro*, os resultados da infecção natural são difíceis de serem previstos devido a produção de toxinas por *C. chauvoei*. A presença de IL-12 e IL-23 poderia determinar a morte das bactérias fagocitadas devido à modulação do sistema imunológico por essas citocinas. Desta forma, a infecção de macrófagos por células vegetativas pode induzir uma resposta inflamatória do hospedeiro associado a lesões musculares causadas por toxinas *C. chauvoei* no carbúnculo sintomático. Além disso, possivelmente, os macrófagos infectados com *C. chauvoei* na forma vegetativa deflagrariam uma resposta imune adaptativa celular. Embora a reposta imunológica efetora contra *Clostridium* sp. seja tida como exclusivamente humoral, uma vez que essas bactérias sejam fagocitadas, não é surpreendente que assim como a resposta a outros patógenos intracelulares, o sistema imunológico se programe para desenvolver uma reposta imune celular. No entanto, *C. chauvoei*, em condições de anaerobiose, produz diversas toxinas que podem restringir o acesso das células inflamatórias, bem como matar as células presentes no sítio de infecção (FREY; FALQUET, 2015).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

C. chauvoei é o agente etiológico do carbúnculo sintomático, uma doença que tem grande importância em medicina veterinária por acometer bovinos submetidos aos mais diversos sistemas de criação em todo o mundo. Apesar dos avanços percebidos no entendimento das muitas doenças que acometem os animais domésticos, *C. chauvoei* e o carbúnculo sintomático continuam sendo pouco compreendidos, havendo poucos estudos cujo foco seja o agente e seus mecanismos de virulência. Diante do exposto o presente trabalho, além de pioneiro, contribui de maneira significativa com a melhor compreensão do agente.

Os resultados aqui demonstrados são as primeiras evidências de que *C. chauvoei*, apesar de ser um microrganismo anaeróbio estrito, é capaz de sobreviver após internalização por macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e por macrófagos derivados de monócitos periféricos bovinos. A forma vegetativa de *C. chauvoei* demonstrou ser menos resistente aos mecanismos microbicidas dos macrófagos da linhagem RAW 264.7, sendo progressivamente eliminadas até 72 horas de infecção. Contudo, durante a infecção da linhagem RAW 264.7 com os esporos de *C. chauvoei* não se observou diminuição na quantidade de bactérias internalizadas. A microscopia eletrônica confirmou a presença das duas formas bacterianas no interior dos macrófagos, nas primeiras horas de infecção, mas somente esporos foram observados a partir de 48 horas de infecção. As bactérias internalizadas estavam delimitadas por dupla membrana, indicando que as bactérias internalizadas não tem acesso ao citoplasma. Essas evidências, demonstram quem embora ambas as formas bacterianas não sejam prontamente eliminadas pelos macrófagos, o esporo é a principal forma de resistência. A sobrevivência dos esporos, garantiria que o mesmo pudesse ser carregado para regiões do corpo do animal diferentes de onde foi fagocitados, permanecendo viáveis e, por isso, potencialmente infectantes, corroborando com a explicação corrente sobre a ocorrência do carbúnculo sintomático.

Este também foi o primeiro estudo que demonstrou que uma bactéria do gênero *Clostridium* é capaz de resistir aos mecanismos microbicidas de macrófagos bovinos obtidos por cultivo primário. Além disso, dentre os estudos de cinética de infecção com bactérias deste gênero, este é o único que avaliou o perfil de transcritos de citocinas. Constatou-se que ambas as formas bacterianas de *C. chauvoei* resistem aos mecanismos microbicidas dos macrófagos bovinos. Contudo, os macrófagos bovinos infectados com a forma vegetativa apresentam níveis mais elevados de transcritos de citocinas inflamatórias, enquanto os infectados com esporos apresentam de citocinas anti-inflamatória. Assim, os macrófagos infectados com bactérias na forma vegetativa poderiam resultar em ativação dos macrófagos. Ao contrário, aqueles infectados com a forma esporulada seriam menos efetivos na eliminação do patógeno infectante, contribuindo para a sobrevivência do agente e disseminação do mesmo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C. M.; ECKENROTH, B. E.; PUTNAM, E. E.; DOUBLIÉ, S.; SHEN, A. Structural and Functional Analysis of the CspB Protease Required for Clostridium Spore Germination. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 1–17, 2013.
- ARAÚJO, R. F.; CURCI, V. C. L. M.; DUTRA, I. DOS S. Anticorpos de origem colostrar em bezerros contra Clostridium chauvoei. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 535–539, 2009.
- ARAÚJO, R. F.; CURCI, V. C. L. M.; NOBREGA, F. L. C.; FERREIRA, R. M. M.; DUTRA, I. S. Vaccination protocol and bacterial strain affect the serological response of beef calves against blackleg. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 554–558, 2010.
- ARLOING, S.; CORNEVIN, C.; THOMAS, O. **Le charbon symptomatique du boeuf**. 2nd ed. Paris: Asseling and Hauzeau, 1887.
- ASSIS, R. A DE; MABONI, F.; PIRES, P. S.; SALVARANI, F. M.; LEOPOLDO, P. Bovine clostridial myonecrosis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 331–334, 2010.
- ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. E.; et al. An outbreak of malignant edema in cattle. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 543, p. 143–145, 2002.
- ASSIS, R. A. DE; FACURY FILHO, E. J.; LOBATO, F. C. F.; et al. Surto de carbúnculo sintomático em bezerros. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 945–947, 2005.
- ASSIS, R. A. DE; LOBATO, F. C. F.; NASCIMENTO, R. A. P.; et al. Mionecroses clostridiais bovinas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 331–334, 2010.
- ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F.; DIAS, L. D.; et al. Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 82, n. 2, p. 2001, 2001.
- ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F.; LOBATO, Z. I. P.; et al. PCR multiplex para identificação de isolados de Clostridium chauvoei e Clostridium septicum. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 294–298, 2008.
- ASSIS-BRASIL, N. D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; HINNAH, F. L.; et al. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 423–430, 2013.
- BAGGE, E.; LEWERIN, S. S.; JOHANSSON, K.-E. Detection and identification by PCR of Clostridium chauvoei in clinical isolates, bovine faeces and substrates from biogas plant. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 8, 2009.
- BALDASSI, L.; HIPÓLITO, M.; CALIL, E. M. B. Observações sobre a incidência de gangrena gasosa e carbúnculo sintomático durante 10 anos, 1970-79, no estado de São Paulo. **Biológico**, v. 51, p. 161–165, 1985.

- BARCIA-MACAY, M.; SERAL, C.; MINGEOT-LECLERCQ, M.-P.; TULKENS, P. M.; BAMBEKE, F. VAN. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activities of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a Model of THP-1 macrophages. **Helicobacter**, v. 50, n. 3, p. 841–851, 2006.
- BARNES, D. M.; BERGELAND, M. E.; HIGBEE, J. M. Selected blackleg outbreaks and their relation to soil excavation. **Canadian Veterinary Journal**, v. 16, n. 9, p. 257–259, 1975.
- BATTY, I.; WALKER, P. D. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 85, p. 512–521, 1963.
- BOUNOUS, D. I.; ENRIGHT, F. M.; GOSSETT, K. A; BERRY, C. M. Phagocytosis, killing, and oxidant production by bovine monocyte-derived macrophages upon exposure to *Brucella abortus* strain 2308. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 37, n. 3-4, p. 243–256, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n. 49 de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para produção, controle e emprego de vacinas contra o carbúnculo sintomático, gangrena gasosa, enterotoxemia e tétano. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de maio de 1997. Seção 1, p.10168-10169.
- BRYANT, A. E.; STEVENS, D. L. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. In: J. E. Alouf; M. R. Popoff (Eds.); **The comprehensive sourcebook of bacterial toxins**. 1st ed., p.919–929, 2006. Londres: Elsevier.
- BURNS, D. A.; MINTON, N. P. Sporulation studies in *Clostridium difficile*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 2, p. 133–138, 2011.
- CAMPBELL, A.; DUDLEY, H. W. The effect of insulin on the oxygen and carbon dioxide tensions in air between the skin and the muscle. **Journal of Physiology**, v. 1, n. 2, p. 348–354, 1923.
- CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 34, n. 3-4, p. 291–305, 1992.
- CARLONI, G. H.; BENTANCOR, L. D.; TORRES, R. A. D. E. Detección de la actividad de desoxirribonucleasa (DNasa) en cepas de *Clostridium chauvoei*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 37, p. 87–88, 2005.
- CARVALHO NETA, A. V.; STYNEN, A. P. R.; PAIXÃO, T. A.; et al. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 1897–1907, 2008.
- CHAMAS, C. I. A Propriedade Intelectual e a Vacina contra a Peste da Manqueira. **Revista Brasileira de Inovação**, v. 5, n. 1, p. 203–218, 2006.

CHANDLER, H. M.; GULASEKHARAM, J. An evaluation of characteristics of *Clostridium chauvoei* which possibly indicate a highly protective strain. **The Australian journal of experimental biology and medical science**, v. 48, n. 2, p. 187–197, 1970.

CHANDLER, H. M.; HAMILTON, R. C. The Protective Antigenicity of Protoplasts and Sphaeroplasts of a Highly Protective Strain of *Clostridium chauvoei*. **Journal of general microbiology**, v. 88, p. 179–183, 1975.

CHAWLA, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circulation Research**, v. 106, n. 10, p. 1559–1569, 2010.

CHEVANCE, F. F. V; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 455–465, 2008.

CLIFFORD, W. J.; ANELLIS, A. *Clostridium perfringens*: I. Sporulation in biphasic glucose-ion exchange resin medium. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 856–861, 1971.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. , 2009.

COACKLEY, W.; WESTON, S. J. Studies on *Clostridium chauvoei* vaccine in Kenya. **Journal of comparative pathology**, v. 67, n. 2, p. 157–164, 1957. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(57\)80015-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(57)80015-0)>. .

COLLINS, L. E.; LYNCH, M.; MARSZALOWSKA, I.; et al. Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 5, p. 391–400, 2014. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.02.001>>. .

CORTINAS, T. I.; MATTAR, M. A.; GUZMAN, A. M. S. DE. Alpha and beta toxin activities in local strains of *Clostridium chauvoei*. **Anaerobe**, v. 5, p. 297–299, 1999.

CORTINAS, T. I.; MICALIZZI, B.; GUSMAN, A. M. Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*. **Journal of applied bacteriology**, v. 77, n. 4, p. 1994, 1994.

COWAN, A. E.; OLIVASTRO, E. M.; KOPPEL, D. E.; et al. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7733–7738, 2004.

CRICHTON, R.; SOLOMON, J.; BARTON, A M. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* antigens. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 18, n. 1, p. 49–54, 1990.

DUAN, Q.; ZHOU, M.; ZHU, L.; ZHU, G. Flagella and bacterial pathogenicity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 1–8, 2013.

DÜRRE, P. Ancestral sporulation initiation. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 584–587, 2011.

EDOUARD, S.; RAOULT, D. Use of the plaque assay for testing the antibiotic susceptibility of intracellular bacteria. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1301–1316, 2013. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L369951220> \n<http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.98>\n<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=17460913&id=doi:10.2217/fmb.13.98&atitle=Use+of+the+plaque+assay+for+testing+the+ant>>. .

ELLNER, P. D. A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v. 4, n. 1, p. 495–496, 1956.

FALQUET, L.; CALDERON-COPETE, S. P.; FREY, J. Genome Sequences of Three Atypical. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, p. 13–14, 2013.

FARIAS, L. D. A.; BOTTON, S. D. A.; COSTA, M. M. DA; VARGAS, A. P. C. DE. Molecular identification of *clostridium chauvoei* from common filter paper. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1–5, 2012.

FAULDS-PAIN, A.; TWINE, S. M.; VINOGRADOV, E.; et al. The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence. **Molecular microbiology**, v. 94, n. September, p. 272–289, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135277>>. .

FREY, J.; FALQUET, L. Patho-genetics of *Clostridium chauvoei*. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 4, p. 384–392, 2015. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250814002198>>. .

FREY, J.; JOHANSSON, A.; BÜRKI, S.; VILEI, E. M.; REDHEAD, K. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. **Vaccine**, v. 30, n. 37, p. 5500–5505, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.050>>. .

GALPERIN, M. Y.; MEKHEDOV, S. L.; PUIGBO, P.; et al. Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: Towards the minimal set of sporulation-specific genes. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 2870–2890, 2012.

GILBERT, R. J. C. Pore-Forming toxins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 832–844, 2002.

GREGORY, L.; LIBERA, A. M. M. DELLA; JUNIOR, E. H. B.; POGLIANI, F. C. Comunicação Clínica E Acompanhamento Da Recuperação De Bovino Acometido De “Manqueira.” **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 243–246, 2006.

GROSETH, P. K.; ERSDAL, C.; BJELLAND, A. M.; STOKSTAD, M. Large outbreak of blackleg in housed cattle. **Veterinary Record**, v. 169, n. 13, p. 339–339, 2011.

HAMILTON, R. C.; CHANDLER, H. M. Ultrastructure of the basal organelles of flagella of *Clostridium chauvoei*. **Journal of general microbiology**, v. 89, n. 1, p. 191–194, 1975.

HANG'OMBE, B. M.; ISOGAI, E.; LUNGU, J.; et al. Detection and characterization of *Clostridium* species in soil of Zambia. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 277–284, 2000.

HANG'OMBE, B. M.; KOHDA, T.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S. Purification and sensitivity of *Clostridium chauvoei* hemolysin to various erythrocytes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 4, p. 263–268, 2006.

HASAN, J. A.; JAPAL, K. M.; RCHRISTENSEN, E.; SAMALOT-FREIRE, L. C. In vitro production of *Clostridium difficile* spores for use in the efficacy evaluation of disinfectants: a precollaborative investigation. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 1, p. 259–272, 2011.

HASHIMOTO, T.; NAYLOR, H. B. Studies of the Fine Structure of Microorganisms: II Electron microscopic studies on sporulation of *Clostridium sporogenes*. **Journal of bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 344–354, 1959.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 66–98, 1990.

HAUER, P. J.; ROSENBUSCH, R. F. Identifying and purifying protective immunogens from cultures of *Clostridium chauvoei*. **Development Biological Standards**, v. 86, p. 332–348, 1996.

HENDERSON, D. W. STUDIES ON CLOSTRIDIUM CHAUVUEI . I : THE ANALYSIS OF THE “ H ” AND “ O ” ANTIGENS OF C . CHAUV (EI . **Carnegie Research Fellow**, v. 86, p. 412–420, 1932.

HEUERMANN, D.; ROGGENTIN, P.; KLEINEIDAM, R. G.; SCHAUER, R. Purification and characterization of a sialidase from *Clostridium chauvoei* NC08596. **Glycoconjugate journal**, v. 8, n. 2, p. 95–101, 1991.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptive immunity. **Nature immunology**, v. 5, n. 10, p. 971–974, 2004.

HONG, H. A.; TO, E.; FAKHRY, S.; et al. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 6, p. 375–379, 2009. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.006>>. .

HYNES, W. L.; WALTON, S. L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 183, p. 201–207, 2000.

JIANG, Y.; KONG, Q.; ROLAND, K. L.; ILL, R. C. Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 0, p. 431–443, 2015.

KOJIMA, A.; AMIMOTO, K.; OHGITANI, T.; TAMURA, Y. Characterization of flagellin from *Clostridium chauvoei*. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 231–237, 1999.

KOJIMA, A.; UCHIDA, I.; SEKIZAKI, T.; et al. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. **Veterinary Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 359–372, 2000.

KOLBE, D. R.; CLAUS, K. D.; NERVIG, R. M. A method for the production of *Clostridium haemolyticum* spores on solid medium. **Journal of Biological Standardization**, v. 9, n. 1, p. 115–119, 1981.

LEGGETT, M. J.; MCDONNELL, G.; DENYER, S. P.; SETLOW, P.; MAILLARD, J. Y. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 485–498, 2012.

LIMA, C. G. R. D.; LOBATO, Z. I. P.; PIRES, P. S.; et al. Padronização de teste de Potência in vitro Para vacinas que contenham toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 507–512, 2011.

LIMA, C.; SALVARANI, F. M.; GOMES, A. D. M.; et al. Outbreak of gas gangrene in a flock of sheeps and goats. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 9, n. 2/3, p. 106–109, 2006.

LIMA, F. G. F. Tipos de colônias e características bioquímicas de cultura de *Clostridium chauvoei* isoladas de bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 3/4, p. 1992, 1992.

LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A. DE; BALSAMÃO, G. M.; et al. 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.; GONÇALVES, L. A.; et al. Clostridioses Dos Animais De Produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 29–48, 2013.

MACEDO, A. A.; COSTA, E. A.; SILVA, A. P. C.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 151, n. 3-4, p. 294–302, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.001>>. .

MACÊDO, J. T. S. A.; PIRES, P. S.; EMYDIO, E.; et al. Edema maligno em equino causado por *Clostridium chauvoei* Malignant Edema Caused by *Clostridium chauvoei* in a Horse. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. October, p. 75–78, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. Metabolism and growth. In: M. t. Madigan; J. m. Martinko (Eds.); **Brock Biology of Microorganisms**. 10th ed., p.85–117, 2008. São Francisco: Pearson Education.

MALYSHEV, I.; MALYSHEV, Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage (Switch)

Phenotype. **Biomed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1–22, 2015. Hindawi Publishing Corporation.

MANDELL, G. L. Bactericidal Activity of Aerobic and Anaerobic Polymorphonuclear Neutrophils. **Infection and immunity**, v. 9, n. 2, p. 337–341, 1974.

MANTECA, C.; DAUBE, G.; PIRSON, V.; et al. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 21–32, 2001.

MATTAR, M. A.; CORTIAS, T. I.; GUZMÁN, A. M. S. DE. Immunogenic protein variations of *Clostridium chauvoei* cellular antigens associated with the culture growth phase. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 9–14, 2002.

MATTAR, M. A.; CORTINAS, T. I.; GUZMAN, A. M. S. DE. Effect of temperature and glucose concentrations on DNase production by *Clostridium septicum*. **Clinical Infectious Disease**, v. 25, n. 2, p. 158–159, 1997.

MINETT, F. C. Pathogenesis of black quarter; influence of nutrition and of muscular exercise. **The Journal of comparative pathology and therapeutics**, v. 58, n. 4, p. 245–258, 1948a. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(48\)80024-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(48)80024-X)>. .

MINETT, F. C. Pathogenesis of Black Quarter. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 58, p. 201–209, 1948b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0368174248800202>>. .

MORAES, A. F. DE. Informação e inovação na vacina da peste da manqueira. **Informação e sociedade**, v. 18, n. 3, p. 97–103, 2008.

MOUSSA, R. S. Complexity of toxins from *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei*. **Journal of bacteriology**, v. 76, n. 5, p. 538–545, 1958.

O'BRIEN, D. K.; MELVILLE, S. B. The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 505–519, 2000.

O'BRIEN, D. K.; MELVILLE, S. B. Multiple effects on *Clostridium perfringens* binding, uptake and trafficking to lysosomes by inhibitors of macrophage phagocytosis receptors. **Microbiology**, v. 149, n. 6, p. 1377–1386, 2003.

O'BRIEN, D. K.; MELVILLE, S. B. Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5204–5215, 2004.

ORSBURN, B.; SUCRE, K.; POPHAM, D. L.; MELVILLE, S. B. The SpmA/B and DacF proteins of *Clostridium perfringens* play important roles in spore heat resistance: Research Letter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 291, n. 2, p. 188–194, 2009.

PAREDES, C. J.; ALSAKER, K. V.; PAPOUTSAKIS, E. T. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 969–978, 2005.

PAREDES-SABJA, D.; COFRE-ARANEDA, G.; BRITO-SILVA, C.; PIZARRO-GUAJARDO, M.; SARKER, M. R. Clostridium difficile spore-macrophage interactions: Spore survival. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

PAREDES-SABJA, D.; SARKER, M. R. Interactions between Clostridium perfringens spores and Raw 264.7 macrophages. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 148–156, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.019>>. .

PAREDES-SABJA, D.; SETLOW, P.; SARKER, M. R. The protease CspB is essential for initiation of cortex hydrolysis and dipicolinic acid (DPA) release during germination of spores of Clostridium perfringens type A food poisoning isolates. **Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 3464–3472, 2009.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. Clostridium difficile spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 7, p. 406–416, 2014.

PEEK, S. F.; SEMRAD, S. D.; PERKINS, G. A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). **Equine veterinary journal**, v. 35, n. 1, p. 86–92, 2003.

PERMPOONPATTANA, P.; PHETCHARABURANIN, J.; MIKELSONE, A.; et al. Functional characterization of Clostridium difficile spore coat proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 7, p. 1492–1503, 2013.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of Bacillus subtilis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 579–586, 2004.

PINTO, F. F.; ASSIS, R. A. DE; LOBATO, F. C. F.; et al. Edema maligno em suíno. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 227–229, 2005.

PINTO, F. F.; ASSIS, R. A. DE; LOBATO, F. C. F.; GONÇALVES, L. A. Edema maligno em suíno. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 227–229, 2005.

PIRES, P. S.; ECCO, R.; ARAUJO, M. R. DE; et al. Comparative analysis of lesions caused by histotoxic clostridia in experimentally induced myonecrosis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2337–2346, 2012. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/10374>>. .

POPOFF, M. R.; BOUVET, P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. **Toxicon**, v. 75, p. 63–89, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003>>. .

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O’GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 3, p. 261–270, 2011.

REISS, K.; BHAKDI, S. Pore-forming bacterial toxins and antimicrobial peptides as modulators of ADAM function. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 4, p. 419–426, 2012.

RIBEIRO, M. G.; SILVA, R. O. S.; PIRES, P. S.; et al. Myonecrosis by *Clostridium septicum* in a dog, diagnosed by a new multiplex-PCR. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 504–507, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.003>>. .

ROBERTS, R. S. Ovine and bovine strains of *B. chauvoei*. **Journal Comparative Pathology**, v. 44, p. 246–251, 1931.

ROBERTS, R. S. The prophylaxis of bovine blackquarter. **The Journal of comparative pathology and therapeutics**, v. 56, n. 1, p. 128–138, 1946. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(46\)80011-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(46)80011-0)>. .

RODRIGUES, C. Estudos sobre a manqueira. Etiologia a diagnóstico. **Instituto Biológico**, v. 10, p. 439–442, 1939.

ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual review of microbiology**, v. 52, p. 333–360, 1998.

SALVARANI, F. M.; OTÁVIO, R.; SILVA, S.; et al. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATED FROM PIGLETS WITH OR WITHOUT DIARRHEA IN BRAZIL Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, Belo Horizonte., p. 1030–1033, 2012.

SANTOS, I. D. **Avaliação da eficácia em cobaias de imunógenos contra carbúnculo sintomático em uso no Brasil.**, 2003. Universidade Estadual Paulista.

SATHISH, S.; SWAMINATHAN, K. Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: Analysis of cross-contamination. **Anaerobe**, v. 14, n. 3, p. 190–199, 2008.

SATHISH, S.; SWAMINATHAN, K. Genetic diversity among toxigenic clostridia isolated from soil, water, meat and associated polluted sites in South India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 311–320, 2009.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 172–180, 2007.

SILVA, R. O. S.; LOBATO, F. C. F.; PIRES, P. S.; et al. Neonatal diarrhea in piglets associated with cpb-2 positive *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 6, n. 1, p. 11–14, 2013.

SOJKA, J. E.; BOWERSOCK, T. L.; PARKER, J. E.; BLEVINS, W. G.; IRIGOYEN, L. *Clostridium chauvoei* myositis infection in a neonatal calf. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 4, n. 2, p. 201–203, 1992.

STEINER, M.; SCHÖFER, C.; MOSGOELLER, W. In situ flat embedding of monolayers and cell relocation in the acrylic resin LR White for comparative light and electron microscopy studies. **The Histochemical Journal**, v. 26, n. 12, p. 934–938, 1994.

STERNE, M.; BATTY, I. **Patogenic Clostridia**. 1st ed. Londres: Butlerworths & CO, 1975.

STERNE, M.; THOROLD, P.; SCHEUBER, J. R. A note on a new method for preparing a potent anti-chauvoei vaccine. **Journal of comparative pathology**, v. 61, n. 2, p. 150–154, 1951. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(51\)80013-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(51)80013-4)>. .

STRINGER, S. C.; WEBB, M. D.; PECK, M. W. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 228–235, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.003>>. .

TAKAGI, A.; KAWATA, T.; YAMAMOTO, S. Electron microscope studies on ultrathin sections of spores of the *Clostridium* group, with special reference to the sporulation and germination process. **Journal of bacteriology**, v. 80, p. 37–46, 1960.

TAMURA, Y.; KIJIMA, M.; SUZUKI, S.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, M. NII-Electronic Library Service. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, n. 5, p. 1049–1050, 1992.

TAMURA, Y.; KIJIMA-TANAKA, M.; AOKI, A.; OGIKUBO, Y.; TAKAHASHI, T. Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. **Microbiology**, v. 141, n. 3, p. 605–610, 1995.

TAMURA, Y.; MINAMOTO, N.; TANAKA, S. Demonstration of protective antigen carried by flagella of *Clostridium chauvoei*. **Microbiology and immunology**, v. 28, n. 12, p. 1325–1332, 1984.

TAMURA, Y.; TANAKA, M. Opsonic Activity of Anti-flagellar Serum against *Clostridium chauvoei* by Mouse Polymorphonuclear Leucocytes. **Veterinary Microbiology**, v. 14, p. 81–86, 1987.

TCHATALBACHEV, S.; GHAI, R.; HOSSAIN, H.; CHAKRABORTY, T. Gram-positive pathogenic bacteria induce a common early response in human monocytes. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 275, 2010. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/275>>. .

TELLEZ, G.; PUMFORD, N. R.; MORGAN, M. J.; WOLFENDEN, A. D.; HARGIS, B. M. Evidence for *Clostridium septicum* as a primary cause of cellulitis in commercial turkeys. **Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 21, n. 3, p. 374–377, 2009.

TITBALL, R. W. *Clostridium perfringens* vaccines. **Vaccine**, v. 27, n. SUPPL. 4, p. 44–47, 2009.

USEH, N. M.; AJANUSI, J. O.; ESIEVO, K. A. N.; NOK, A. J. Characterization of a sialidase (neuraminidase) isolated from *Clostridium chauvoei* (Jakari strain). **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 4, p. 347–352, 2006.

USEH, N. M.; NOK, A J.; ESIEVO, K. A N. Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuraminidase. A short review. **The Veterinary quarterly**, v. 25, n. 4, p. 155–159, 2003.

UZAL, F. A; PARAMIDANI, M.; ASSIS, R.; MORRIS, W.; MIYAKAWA, M. F. Outbreak of clostridial myocarditis in calves. **The Veterinary record**, v. 152, n. 5, p. 134–136, 2003.

UZAL, F. A. Evidence-Based Medicine Concerning Efficacy of Vaccination Against Clostridium chauvoei Infection in Cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 71–77, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.12.006>>. .

VANVLEET, J. F.; VALENTINE, B. A. Muscle and tendon. In: K. Jubb; S. Palmers (Eds.); **Pathology of domestic animals**. 5th ed., p.185–279, 2007. Toronto: eLSEVIER sUNDERS.

VARGAS, A. P. C.; BALZAN, C.; SIMEONI, C. P.; FARIAS, L. D. A. Testes de vacinas frente ao desafio com uma cepa de campo de Clostridium chauvoei . In: , 2012, S. In: SBPC (Ed.); 64^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - Jornada Nacional de Iniciação Científica. **Anais...** . p.12, 2012. São Luís.

VERPOORT, J. A.; JOUBERT, F. J.; JASEN, B. C. Studies on the soluble antigen and haemolysin of Clostridium chauvoei strains. **African Journal of Agriculture Science**, v. 9, p. 153–172, 1966.

VILEI, E. M.; JOHANSSON, A.; SCHLATTER, Y.; REDHEAD, K.; FREY, J. Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from Clostridium chauvoei. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 2, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/2>>. .

WEBB, M. D.; STRINGER, S. C.; MARC, Y. LE; BARANYI, J.; PECK, M. W. Does proximity to neighbours affect germination of spores of non-proteolytic Clostridium botulinum? **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 104–109, 2012.

WILSON, S. G. The incidence of black-quarter in native cattle in the Central Province, Nyasaland. **The Journal of comparative pathology and therapeutics**, v. 56, n. 4, p. 269–285, 1946. Elsevier. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(46\)80024-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(46)80024-9)>. .

YANG, W. W.; CROW-WILLARD, E. N.; PONCE, A. Production and characterization of pure Clostridium spore suspensions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 27–33, 2009.

ZANINA, N.; MORA, L.; OTHMANE, A.; et al. Differences in Caco-2 cell attachment, migration on collagen and fibronectin coated polyelectrolyte surfaces. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 1, p. 144–154, 2013.