

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



TESE DE DOUTORADO

Caracterização molecular, clonagem e expressão de isoformas da toxina alfa de *Clostridium perfringens* e sua aplicação na imunização de animais

ORIENTADA: Flávia de Faria Siqueira

ORIENTADOR: Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO 2013

Flávia de Faria Siqueira

Caracterização molecular, clonagem e expressão de isoformas da toxina alfa de *Clostridium perfringens* e sua aplicação na imunização de animais

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais com requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Genética

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Pós-Graduação em Genética
Belo Horizonte, fevereiro de 2013

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes instituições:

- Departamento de Biologia Geral – ICB – UFMG
- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Escola de Veterinária - UFMG
- Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG
- Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG
- Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Dedico este trabalho aos meus pais, Julio e Fátima,
e ao meu marido Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Evanguedes Kalapothakis, pelos ensinamentos, pela agradável convivência, pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades a mim concedida. Você é um grande exemplo de profissional para mim e tenha certeza que estes anos de trabalhos foram fundamentais para meu crescimento e amadurecimento profissional. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Francisco Lobato, que me acolheu e auxiliou prontamente em várias etapas do projeto, se tornando um colaborador essencial para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral pela presença de professores e funcionários que contribuíram ativamente para a minha formação e, especialmente, ao Coordenador Prof. Eduardo Tarazona, por estar sempre disposto a ajudar, e à Mary dos Santos e Natália Ramalho, funcionárias muito queridas!

Às agências de fomento FAPEMIG, Capes e CNPq, pelo recurso financeiro.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Andréa Amaral, Dra. Christiane Contigli, Dra. Jovita Gazzinelli e Prof. Francisco Lobato, pelas contribuições que auxiliaram na continuidade do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Luciana Silva, Dra. Jovita Gazzinelli, Prof. Jacques Nicoli, Prof. Francisco Lobato, Prof. Adriana Abalen, Prof. Andréa Amaral, pela disponibilidade e atenção.

Aos queridos colegas e companheiros do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM): Ana Paula, Anderson, Bárbara Bruna, Bárbara Freitas, Bruno, Camila, Carolina, Daniel, Érika Alvarenga, Hugo, Isabella, Lucas, Marcelle (parceira de projeto!), Susanne, Tânia, Tatiana, pelo apoio, ensinamentos, amizade e torcida. Fica difícil mensurar o quanto cada um de vocês contribuíram para a conclusão desse trabalho, seja "*botando a mão na massa*" ou simplesmente convivendo de forma harmoniosa. Muito obrigada Kalapogrupos!!!

Aos colegas que fizeram parte do LBMM, e que também participaram de alguma forma desse trabalho: Adriana, Arthur, Caio, Camila, Cibele, Egiancarla, Érika Carvalho, Flavinha, Gabriela, Juliano, Kelly, Lorena, Lorryne, Lucilânia, Raphael, Valéria, William, e mais alguns que eu possa ter esquecido.

Aos membros do Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, especialmente ao Felipe, ao Rodrigo e à Prhiscylla, pelos ensinamentos e por estarem sempre tão dispostos a ajudar.

Ao Prof. Carlos Chavéz, por ceder espaço no infectório para a manutenção dos coelhos, e a seus alunos, especialmente a Thaís Mendes, sempre atenciosa e disponível.

A todos os professores, funcionários e alunos de outros laboratórios do ICB pelo apoio mútuo, muitas vezes imprescindível. Ao Jamil, pelas dicas de purificação de proteínas.

À Prof. Vilminha, Prof. Adlane e a Noeli, por contribuírem para minha formação como docente, durante o período em que fui professora substituta do Departamento de Biologia Geral.

Aos colegas da Phoneutria: Júnia, Priscila, Júlia, Carolina, Luiz, Cleidi e Izabela, pela convivência e pelo apoio nessa reta final.

Às minhas queridas amigas Carolzinha e Regiane, pelo incentivo, amizade e torcida. Aos amigos da PUC Minas, por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

Acima de tudo à minha grande e amada família: meus pais, Julio e Fátima, que nunca mediram esforços para me ver feliz, e sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. Ao meu amado marido, companheiro e amigo Eduardo, por acreditar em mim e me incentivar incondicionalmente. Aos meus irmãos, Camila e Rafael, pelo amor sempre presente. Aos meus cunhados (as), sobrinhos (as), sogra, vó e vô (saúde!), tios e tias, primos e primas, enfim, toda família pela torcida e por compreender minha ausência em alguns momentos.

A Deus, força que me guia em todos os momentos da minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais essa etapa da minha vida, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. VISÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	16
1.2. GÊNERO <i>Clostridium</i>	17
1.3. CLOSTRIDIOSES	18
1.4. <i>Clostridium perfringens</i>	19
1.5. PRINCIPAIS TOXINAS E FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>C. perfringens</i>	21
1.5.1. Toxina Alfa	22
1.5.2- Toxina Beta.....	24
1.5.3- Toxina Beta-2.....	25
1.5.4- Toxina Épsilon	25
1.5.5- Toxina Iota.....	25
1.5.6- Toxina netB.....	26
1.5.7- Enterotoxina.....	26
1.5.8- Outros fatores de virulência.....	26
1.6- VACINAS CLOSTRIDIAIS	27
1.7- EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM <i>Escherichia coli</i>	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOFORMAS DA TOXINA ALFA DE <i>C. perfringens</i>	32
3.1.1. Isolamento de <i>C. perfringens</i> a partir de amostras ambientais.....	32
3.1.2. Extração de DNA dos isolados.....	35
3.1.3. Tipificação toxigênica através de PCR multiplex	35
3.1.4. Amplificação do gene <i>plc</i> através de PCR.....	35
3.1.5. Purificação e sequenciamento dos <i>amplicons</i> da toxina alfa.....	36
3.1.6. Análise dos dados obtidos.....	37
3.2. CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TOXINA ALFA.....	38
3.2.1. Clonagem no vetor pGEM-T Easy	41

3.2.1.1. Amplificação do gene <i>plc</i> por PCR e purificação.....	41
3.2.1.2. Ligação do produto purificado no vetor pGEM-T Easy.....	42
3.2.1.3. Transformação do plasmídeos em <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue eletrocompetentes e seleção dos transformantes	42
3.2.1.4. PCR de colônia	43
3.2.1.5. Extração e purificação do DNA plasmidial pGEM: α	43
3.2.1.6. Sequenciamento dos plasmídeos positivos.....	43
3.2.1.7. Digestão enzimática do plasmídeo pGEM: α para liberação do inserto.....	44
3.2.2. Subclonagem da toxina alfa no vetor pMAL -c2e.....	44
3.2.2.1. Digestão enzimática do vetor pMAL -c2E modificado.....	44
3.2.2.2. Ligação do inserto no vetor de expressão.....	44
3.2.2.3. Seleção de clones positivos (pMAL: α) e com a matriz de leitura correta	45
3.2.2.4. Extração e purificação do DNA plasmidial pMAL: α e transformação em BL21-DE3	45
3.2.2.5. Expressão piloto da toxina alfa em pMAL -c2E na linhagem BL21-DE3	45
3.2.2.6. SDS-PAGE da expressão da toxina alfa recombinante.....	46
3.2.2.7. Padronização das condições de expressão e lise celular	46
3.2.2.8. Solubilização dos corpos de inclusão, purificação da alfa toxina recombinante e digestão com protease TEV	47
3.2.3. Subclonagem da toxina alfa no vetor pET26b	48
3.2.3.1. Digestão enzimática do vetor pET26b	48
3.2.3.2. Ligação do inserto no vetor de expressão.....	48
3.2.3.3. Seleção de clones positivos (pET26b: α)	48
3.2.3.4. Extração e purificação do DNA plasmidial pET26b: α e transformação em linhagens de expressão	49
3.2.3.5. Expressão piloto da toxina alfa em pET26b em ambas linhagens	49
3.2.3.6 Padronização das condições de expressão, choque osmótico e lise celular.....	49
3.2.3.7. Purificação das isoformas da toxina alfa recombinante	50
3.3. CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DAS ISOFORMAS ALFA RECOMBINANTES	51
3.3.1. Dosagem das isoformas purificadas	51
3.3.2. Produção de soro anti-alfa em coelhos	51
3.3.3. Teste de ELISA indireto	52
3.3.4. Ensaio de atividade de lecitinase em emulsão de gema de ovo.....	53

3.3.5. Ensaio de atividade hemolítica em ágar-sangue.....	54
4. RESULTADOS	55
4.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOFORMAS DA TOXINA ALFA DE <i>C. perfringens</i>	55
4.1.1. Isolamento de <i>C. perfringens</i> a partir de amostras de fezes de animais e ambientais	55
4.1.2. Amplificação do gene <i>plc</i>	55
4.1.3. Tipificação dos isolados.....	56
4.1.4. Caracterização molecular do gene <i>plc</i>	57
4.2. CLONAGEM DO GENE PLC NO VETOR pGEM-T EASY	61
4.2.1. Ligação ao vetor de clonagem, transformação de bactérias e seleção pelo sistema IPTG/X-gal.....	61
4.2.2. Confirmação dos clones positivos, extração e purificação do DNA plasmidial pGEM: α e sequenciamento.....	63
4.2.3. Digestão enzimática pGEM: α para liberação do inserto.....	63
4.3. SUBCLONAGEM DO GENE <i>plc</i> NO VETOR pMAL -C2E.....	64
4.3.1. Obtenção dos plasmídeos pMAL: α	64
4.3.2. Determinação das condições de expressão da toxina alfa em pMAL -c2E.....	65
4.3.3. Tentativa de purificação da toxina alfa recombinante e liberação da proteína fusionada MBP	66
4.4. SUBCLONAGEM DO GENE PLC NO VETOR pet-26b	67
4.4.1. Obtenção dos plasmídeos pET26b: α	67
4.4.2. Determinação das condições de expressão da toxina alfa em pET26b	68
4.4.3. Purificação das isoformas recombinantes de pET26b: α	69
4.5. CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DAS ISOFORMAS ALFA RECOMBINANTES.....	71
4.5.1. Dosagem das isoformas purificadas	71
4.5.2. Titulação e reatividade dos soros obtidos na imunização	72
4.5.3. Atividade de lecitinase e hemolítica das isoformas alfa recombinantes	76
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO.....	89
7. PERSPECTIVAS	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS.....	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática dos alvos e modo de ação de toxinas de <i>C. perfringens</i> e de enzimas hidrolíticas	22
FIGURA 2: Representação da estrutura cristal da toxina alfa de <i>C. perfringens</i>	23
FIGURA 3: Ação da toxina alfa em membranas artificiais e biológicas.	23
FIGURA 4: Estrutura dos principais substratos da toxina alfa de <i>C. perfringens</i>	24
FIGURA 5: Iniciadores desenhados para amplificação do gene da toxina alfa de <i>C. perfringens</i>	36
FIGURA 6: Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM-T easy.	39
FIGURA 7: Representação esquemática do vetor de expressão pMAL -c2E.	40
FIGURA 8: Representação esquemática do vetor de expressão pET26b	40
FIGURA 9: Placa de Ágar SPS ilustrando o isolamento de <i>C. perfringens</i>	55
FIGURA 10: Resolução eletroforética do produto amplificado do gene <i>plc</i> em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.	56
FIGURA 11: Resolução eletroforética da reação de PCR Multiplex.	57
FIGURA 12: Árvore filogenética não enraizada inferida a partir das sequências de aminoácidos de fosfolipase C de <i>C. perfringens</i> definidas nesse trabalho e de sequências obtidas no banco de dados do NCBI.	60
FIGURA 13: Purificação de banda para ligação do inserto em vetor pGEM-T Easy.	62
FIGURA 14: Seleção de colônias pelo sistema IPTG/X-gal	62
FIGURA 15: Plasmídeos pGEM: α extraídos a partir do método de lise alcalina	63
FIGURA 16: Resultado da digestão enzimática dos plasmídeos pGEM: α para liberação do inserto.	64
FIGURA 17: Resultado da PCR de colônia dos clones contendo a construção pMAL: α	65
FIGURA 18: Expressão bacteriana do plasmídeo pMAL: α em <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	66
FIGURA 19: Tentativa de purificação da proteína alfa fusionada a MBP.	67
FIGURA 20: Resultado da PCR de colônia dos clones contendo a construção pET26b: α	68
FIGURA 21: Expressão bacteriana do plasmídeo pET26b: α em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	69
FIGURA 22: Purificação da toxina alfa recombinante em coluna HisTrap™ HP.	70
FIGURA 23: Perfil cromatográfico do extrato bacteriano contendo a toxina alfa recombinante em coluna HisTrap™ HP de 5ml.	70
FIGURA 24: Quantificação das isoformas recombinantes.	71
FIGURA 25: Reatividade e titulação do soro dos animais imunizados com a toxina alfa nativa e as duas isoformas recombinantes ao longo do programa de imunização.	73
FIGURA 26: Titulação dos soros hiper-ímmunes (3º reforço) dos coelhos imunizados com a toxina alfa nativa e as duas isoformas recombinantes.	75
FIGURA 27: Teste de atividade de lecitinase das isoformas das toxinas alfa recombinantes	76
FIGURA 28: Dinâmica da expressão de isoformas das toxinas alfa recombinantes revelados através do teste de atividade de lecitinase	77
FIGURA 29: Atividade hemolítica das isoformas recombinantes da toxina alfa	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação das principais clostridioses que acometem animais de importância econômica.....	19
TABELA 2: Classificação dos tipos toxigênicos de <i>C. perfringens</i> , baseado em Uzal e McClane, 2011	21
TABELA 3: Descrição dos isolados de <i>C. perfringens</i> obtidos a partir das amostras analisadas.	33
TABELA 4: Sequência dos iniciadores utilizados na amplificação do gene plc visando a clonagem da toxina alfa de <i>C. perfringens</i>	41
TABELA 5: Reação de ligação da ORF da toxina alfa de <i>C. perfringens</i> ao vetor pMAL -c2E.	45
TABELA 6: Programa para obtenção de soro anti-toxina alfa de <i>C. perfringens</i>	52
TABELA 7: Haplótipos e sítios polimórficos com os nucleotídeos alterados.....	58
TABELA 8: Posição dos aminoácidos variáveis das isoformas caracterizadas.	59
TABELA 9: Diversidade genética no gene plc de <i>C. perfringens</i> nas sequências obtidas nesse trabalho, nas do banco de dados do NCBI e em ambos os grupos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro Albumina Bovino
<i>PfoA</i>	Gene que codifica a toxina theta de <i>C. perfringens</i>
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CDS	<i>Complete coding sequences</i>
<i>colA</i>	Gene que codifica a toxina kappa de <i>C. perfringens</i>
<i>cpb</i>	Gene que codifica a toxina beta de <i>C. perfringens</i>
<i>cpb2</i>	Gene que codifica a toxina beta-2 de <i>C. perfringens</i>
<i>cpe</i>	Gene que codifica a enterotoxina de <i>C. perfringens</i>
DL50	Dose letal de 50%
DNA	Ácido dexossirribonucléico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotritol
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ENA	Enterite Necrótica em Aves
<i>etx</i>	Gene que codifica a toxina épsilon de <i>C. perfringens</i>
g	Força G
GST	<i>glutathione-S-transferase</i>
H	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>iap</i>	Gene que codifica a subunidade A da toxina iota de <i>C. perfringens</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia
<i>ibp</i>	Gene que codifica a subunidade B da toxina iota de <i>C. perfringens</i>
IgG	Imunoglobulina G
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactosídeo
kDa	Quilo Dalton
Kg	Quilogramas
LacZ	Gene que codifica a β -galactosidase
<i>lam</i>	Gene que codifica a toxina lambda de <i>C. perfringens</i>
LB	Meio de Cultura Luria-Bertani
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mb	Megabase
MBP	Proteína ligadora de maltose, <i>Maltose-binding protein</i>
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
mg	Mili-grama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Mili-Molar
mV	Milivolt
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>namH</i>	Gene que codifica a neuramidase de <i>C. perfringens</i>

ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamino
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase de leitura aberta)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel Campo Pulsado
<i>PfoA</i>	Gene que codifica a toxina theta de <i>C. perfringens</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto interno Bruto
<i>plc</i>	Gene que codifica a toxina alfa de <i>C. perfringens</i>
pmol	Picomol
PSA	Persulfato de Amônio
qPCR	PCR quantitativa
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
rep-PCR	PCR de elementos repetitivos
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SPS	Ágar <i>Sulfite polymyxin sulfadiazine</i>
TE	Tampão Tris e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA transportador
U	Unidade de enzima
UI	Unidade internacional
U.V.	Ultra Violeta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactose
Y	Tirosina
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

RESUMO

Clostridium perfringens é uma bactéria anaeróbia obrigatória, Gram-positiva, ubíqua e está envolvida em doenças entéricas de animais domésticos (como p. ex. Enterite Necrótica em aves, bezerros, caprinos, ovinos e leitões; enterotoxemias; mionecrose; enterocolite em cavalos) e em quadros de toxinfecção alimentar em humanos. Devido ao caráter agudo dessas enfermidades, medidas de tratamento tornam-se algumas vezes inviáveis, sendo que o controle e a prevenção de doenças deve ser baseada em ações de manejo e vacinação sistemática de todo o rebanho. Esses microorganismos diferem em sua patogenicidade e as doenças envolvidas são devido aos diferentes tipos (A-E), de acordo com sua capacidade de produzir as quatro principais toxinas letais: alfa, beta, épsilon e iota. A toxina alfa, objeto desse estudo, é codificada pelo gene *plc* e tem origem cromossômica, estando, por isso, presente em todos os tipos de *C. perfringens*. Os objetivos deste trabalho foram isolar *C. perfringens* a partir de diferentes origens, a fim de verificar a existência de polimorfismos não-sinônimos no gene *plc*; clonar e expressar em sistema heterólogo duas isoformas dessa toxina. Foram sequenciados o gene *plc* de 73 isolados e identificados 71 sítios polimórficos que resultaram em 34 isoformas distintas. Após comparação com sequências disponíveis no banco de dados no NCBI, foi possível descrever 22 novas isoformas dessa toxina. Analisando os resíduos alterados na toxina alfa dos isolados descritos neste trabalho, verificou-se que em seis isoformas (17,6 %) houve substituições de aminoácidos considerados essenciais para estrutura ou função da proteína. Para a clonagem e expressão da toxina alfa, foi selecionado um isolado que possuía a isoforma mais prevalente (α Z23) e um isolado o qual foi identificado uma mutação em um resíduo (posição 11; H→Y) funcionalmente importante (α AV1b). A sequência da toxina madura alfa foi amplificada e clonada em vetor de expressão pMAL -c2E e pET26b. A construção foi expressa em *Escherichia coli* (BL21 e Rosetta) e purificada em resina de níquel. Através do teste de atividade de lecitinase e hemolítica, foi possível demonstrar que a isoforma α Z23 foi expressa de forma ativa, ao passo que α AV1b não teve atividade, demonstrando que a mutação no resíduo essencial foi capaz de inibir essa ação. Os soros produzidos após vacinação de coelhos usando ambas isoformas recombinantes foram imunogênicos, e, caso sejam neutralizantes, serão utilizados como componentes de uma vacina recombinante polivalente contra clostridioses.

ABSTRACT

Clostridium perfringens is a ubiquitous Gram-positive obligate anaerobic bacterium which is involved in enteric diseases of domestic animals (e.g. Necrotic enteritis in poultry, calves, goats, sheep and pigs; enterotoxemia; myonecrosis; enterocolitis in horses), as well as in cases of food poisoning in humans. Due to the acute evolution of the infection, treatment interventions are occasionally unfeasible. Thus, control and prevention of the disease should be based on management actions and systematic vaccination of all livestock. These microorganisms differ in pathogenicity and diseases they are associated to because of their different types (A-E), according to their ability to produce the four major lethal toxins: alpha, beta, epsilon, and iota. The alpha toxin, which is the object of the present study, is encoded by the *plc* gene and has a chromosomal origin, therefore, it is present in all types of *C. perfringens*. The aim of this study was to isolate *C. perfringens* from different sources in order to investigate the presence of non-synonymous polymorphisms in the *plc* gene. Subsequently, the objective was to clone and express two isoforms of alpha toxin in heterologous system. The *plc* gene of 73 isolates was sequenced, 71 polymorphic sites were identified resulting in 34 distinct isoforms. Comparison between sequences obtained from the NCBI database resulted in the identification of 22 new isoforms of the toxin. By analyzing the altered residues in the isolates described in this work, we found in six isoforms (17.6%) substitutions of amino acids that are considered essential to the toxin's structure or function. For the cloning and expression of alpha toxin, we selected one isolate that had the most prevalent isoform ($\alpha Z23$), and one isolate in which a functionally important residue mutation was identified ($\alpha AV1b$; residue 11; H \rightarrow Y). The sequence of the mature alpha-toxin was amplified and cloned into pET26b and pMAL -c2E expression vectors. The constructs were expressed in *Escherichia coli* (BL21 and Rosetta) and purified with nickel resin. Lecithinase and hemolytic activity assays were performed to demonstrate that the $\alpha Z23$ isoform was actively expressed, while $\alpha AV1b$ had no activity, showing that the mutation in the essential residue was able to inhibit these actions. Sera produced in rabbits after immunization using both recombinant isoforms were immunogenic. If they have neutralizing actions, these sera will be used as components of a multivalent recombinant clostridial vaccine.

1. INTRODUÇÃO

1.1. VISÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Indubitavelmente, o Brasil destaca-se no agronegócio mundial. Esse setor corresponde a aproximadamente 26,4% do PIB nacional, sendo que, dessa porcentagem, a pecuária corresponde a 28,9% (MAPA, 2008). Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), o país possui um dos maiores rebanhos de aves, bovinos, ovinos e caprinos do mundo. No ranking de produção de carnes bovina, de frango e suína os países ocupam, respectivamente, a 2ª, 3ª e 4ª posição. Em relação à exportação, o país ocupa a 1ª posição para carne bovina e de frango e a 4ª colocação para carne suína (MDIC, 2010). De acordo com o estudo de projeções do agronegócio brasileiro para os próximos 10 anos, as estimativas projetam um quadro favorável para as exportações de carnes brasileiras. As projeções indicam elevadas taxas de crescimento na exportação de carne bovina, de frango e suína, sendo que a carne de frango lidera a taxa de crescimento anual das exportações (MAPA, 2012). Desse modo, a pecuária apresenta expressiva importância econômica, tanto para o consumo interno quanto para a exportação.

O tratamento, controle e profilaxia das doenças de animais de criação exige uma grande atenção dos produtores e do governo. As clostridioses (infecções e intoxicações provocadas por bactérias do gênero *Clostridium*) destacam-se entre as principais doenças, por serem fatais e estar distribuídas por todo o Brasil. Assim, essas enfermidades estão entre as doenças bacterianas causadas por anaeróbios que mais preocupam os criadores.

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microorganismos ubíquos, anaeróbios, Gram-positivos e formadores de esporos. Estes organismos estão presentes no solo e no trato digestivo dos animais e do homem. Estas bactérias penetram no corpo do hospedeiro, sob a forma de esporo, através de feridas ou alimentos contaminados. *Clostridium perfringens* é um representante dessas bactérias patogênicas, responsável por vários quadros clínicos como diarreias, enterotoxemia, mionecroses e enterite hemorrágica em animais. A patogenicidade desse grupo está associada com as toxinas produzidas, o que permite a classificação dos isolados em 5 tipos toxigênicos (Petit *et al.*, 1999). Dentre essas principais toxinas, destaca-se a toxina alfa, o objeto desse estudo. Ela está presente em todos os isolados, devido à sua origem cromossomal, e é codificada pelo gene *plc*. Essa toxina é uma fosfolipase C que hidrolisa a fosfatidilcolina e, em menor proporção, a esfingomielina. A ação da toxina alfa caracteriza-se por hemólise intravascular, danos capilares, processos inflamatórios, agregação plaquetária e alterações do metabolismo, resultando em morte celular (Popoff e Bouvet, 2009). Sendo assim, essa toxina é apontada como fator de virulência determinante para o desencadeamento de gangrena gasosa em diversos animais, enterite necrótica em aves e em casos de enterotoxemias.

Devido ao caráter agudo dessas enfermidades, a imunização sistemática dos animais torna-se uma importante estratégia adotada pelos criadores, já que os animais estão em permanente contato com as bactérias e seus esporos, além também de estarem susceptíveis a fatores adicionais que podem desencadear as doenças. As vacinas clostridiais são, na sua maioria, polivalentes e possuem toxóides em sua formulação. O país é um dos principais mercados consumidores dessas vacinas do mundo e, apesar da existência de uma portaria para o controle oficial de todos os antígenos (Brasil, 1997), apenas *C. chauvoei* e o toxoide botulínico tipos C e D são avaliados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) (Lobato e Assis, 2000). Alguns trabalhos identificaram uma baixa qualidade das vacinas clostridiais nacionais (Azevedo *et al.*, 1998; Lobato *et al.*, 2000; Lobato *et al.*, 2008). A produção de vacinas com métodos tradicionais é bastante onerosa e laboriosa, sendo importante a utilização de técnicas alternativas. Sendo assim, as vacinas recombinantes surgem como uma nova geração de vacinas que podem apresentar resultados mais satisfatórios do que as tecnologias empregadas tradicionalmente.

Diante desse contexto, a idéia inicial desse trabalho foi isolar *C. perfringens* a partir de amostras randômicas, no intuito de se obter o máximo de diversidade genética possível. Optamos pela caracterização da toxina alfa devido sua importância em patologias animais e por ainda não ter sido estudada pelo nosso grupo de pesquisa. Conforme será descrito ao longo desse estudo, a caracterização molecular do gene *plc* dos isolados obtidos revelou uma surpreendente diversidade genética nesse locus. E a partir dessas isoformas identificadas, foram selecionadas duas candidatas para serem clonadas e expressas em sistemas heterólogos de expressão, afim de verificar o potencial imunogênico de cada isoforma. O objetivo final dos resultados alcançados até aqui, é a criação de uma vacina polivalente contra clostridioses, associando outras toxinas recombinantes de *C. perfringens* já produzidas pela nossa equipe.

1.2. GÊNERO *Clostridium*

O gênero *Clostridium* pode ser definido por quatro características principais: capacidade de formação de endósporos; metabolismo anaeróbico obrigatório; incapacidade de reduzir sulfato em sulfeto; e possuir parede celular Gram-positiva. Essas bactérias podem ser encontradas nos mais diversos ambientes podendo viver sobre substratos variados (Murray *et al.*, 2006). A ubiquidade é uma de suas características relevantes, sendo assim, esses microorganismos apresentam uma ampla distribuição geográfica em solos, em água doce, em água salgada, alimentos de origem animal e vegetal. Algumas espécies desse gênero vivem como comensais fazendo parte da microbiota residente do trato gastrointestinal, podendo também estar presente no trato respiratório do homem e de animais (Hatheway, 1990).

As células possuem morfologia de bastonetes, medindo 0,3-2,0 X 1,5-20,0 µm. Estão arranjados aos pares ou em cadeias curtas com as extremidades arredondadas e, algumas vezes,

pontiagudas. Em geral, são organismos pleomórficos e com grande mobilidade, atribuída a presença de flagelos peritríquios. Bioquimicamente são catalase negativos e possuem atividade metabólica muito diversa, com temperatura ótima entre 10-65 °C (Gomes, 2007).

Entre o grupo Eubactéria, clostrídias destaca-se entre o gênero que mais produz toxinas (Johnson, 1999). Dentre as principais atribuições que contribuem para que alguns clostrídios sejam patogênicos, pode-se citar a capacidade de sobrevivência em condições ambientais adversas devido à formação de esporos; o rápido crescimento em ambientes enriquecidos e privados de oxigênio, bem como a síntese de numerosas toxinas histolíticas, enterotoxinas e neurotoxinas (Murray *et al.*, 2006). O recente sequenciamento do genoma de *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. difficile* e *C. botulinum* mostrou que esses microorganismos não possuem muitos genes que codificam enzimas fundamentais para biosíntese de aminoácidos. Tal fato, torna-os altamente dependentes de substratos adequados (Popoff e Bouvet, 2009). A presença desses microorganismos, juntamente com a falta de oxigênio em fermentos e nos tubos digestivos de animais, facilita a invasão dos tecidos pela bactéria anaeróbia, culminando em sua maior proliferação com conseqüente aumento da produção das toxinas. Desse modo, o início das enfermidades está intimamente relacionado a práticas de manejo dos animais, apresentando-se também como doenças típicas de animais confinados (Rood *et al.*, 1997).

1.3. CLOSTRIDIOSES

As clostridioses são um conjunto de infecções e intoxicações, frequentemente fatais, causadas por bactérias do gênero *Clostridium*. Dentre mais de 200 espécies nesse gênero, ao menos 15 produzem potentes toxinas que são responsáveis por diversas doenças para animais e humanos. As principais espécies causadoras de doenças são o *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. difficile*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordelii* e *C. tetani*. Diante disso, as clostridioses apresentam grande interesse médico e veterinário, pois afetam a saúde humana e, principalmente, a pecuária, o que causa grandes prejuízos econômicos para os produtores (Lobato *et al.*, 2007a).

Por não serem bactérias invasivas, a patogenia de algumas espécies de *Clostridium* ocorre devido a secreção de moléculas ativas que atuam a distância, provocando as lesões e sintomas das clostridioses. Os clostrídios podem entrar no hospedeiros por duas vias. Na presença de fatores de risco, a via oral permite o crescimento bacteriano com conseqüente produção das toxinas em alguns compartimentos do trato digestivo, levando ao surgimento de doenças gastrointestinais e infecções alimentares. A outra possibilidade de entrada dos clostrídios é pelo tegumento, através de ferimentos, permitindo o crescimento bacteriano anaeróbico na presença de tecidos necrosados (Quinn *et al.*, 2005; Popoff e Bouvet, 2009).

As clostridioses podem ser classificadas em mionecroses, enterotoxemias, doenças hepáticas e doenças neurotrópicas conforme revisado por Lobato *et al.* (2007a) e demonstradas na Tabela 1.

TABELA 1: Classificação das principais clostridioses que acometem animais de importância econômica.

Classificação	Espécies/tipo	Principais características	Exemplo	Animais acometidos
Mionecrose	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> tipo A, <i>C. perfringens</i> tipo A e <i>C. sordellii</i>	Afecções em que os agentes multiplicam-se na musculatura e tecido subcutâneo, resultando em um quadro de toxemia	Carbúnculo sintomático e gangrena gasosa ou edema maligno.	Ovinos, bovinos, suínos, equinos
Enterotoxemias	<i>C. perfringens</i> tipos A, B, C, D, e provavelmente o tipo E, e ocasionalmente <i>C. sordellii</i> e <i>C. septicum</i>	Esses microrganismos multiplicam no trato intestinal dos animais e produzem exotoxinas responsáveis pelo quadro nosológico.	Enterotoxemias, Enterite Necrótica em Aves (ENA)	Cordeiros, bezerros, ovinos, caprinos, leitões, potros, aves, dentre outros.
Doenças hepáticas	<i>C. novyi</i> tipo B e <i>C. haemolyticum</i>	Infecção hepática necrótica	Hepatite necrótica e hemoglobínúria bacilar	Bovinos e ovinos
Doenças neurotrópicas	<i>C. botulinum</i> e <i>C. tetani</i>	São afecções em que o sistema nervoso é primariamente acometido	Botulismo e Tétano	Diversos animais

Não existem muitos estudos epidemiológicos na literatura sobre clostridioses no Brasil. Tal fato pode ser atribuído às dificuldades inerentes ao diagnóstico dessas doenças, uma vez que o curso dessas é muito rápido. Muitas vezes, todos os animais de uma criação são submetidos aos mesmos fatores de risco e algumas clostridioses podem provocar a morte simultânea de vários indivíduos em um mesmo lote. Sendo assim, é consenso entre criadores e especialistas que essas enfermidades são uma das doenças que mais atingem os animais de criação.

As clostridioses, na maioria das vezes, possuem evolução rápida, inviabilizando qualquer medida de tratamento. Entretanto, o soro contendo a(s) antitoxina(s), se disponível, pode ter sucesso quando administrado nos períodos iniciais ou nos casos crônicos da doença, combinado com a aplicação de antibióticos (penicilina G, tetraciclina, cloranfenicol, furazolidona, bacitracina, eritromicina, lincomicina). Uma medida de controle da enterotoxemia importante é a redução da quantidade de grãos e o aumento do consumo de fibras na dieta dos animais (Gomes, 2007). Por apresentar caráter endêmico ou epidêmico, a prevenção e o controle dessas doenças são as medidas mais efetivas para que não haja acometimento de mais indivíduos.

1.4. *Clostridium perfringens*

C. perfringens é um importante patógeno envolvido em doenças entéricas de animais domésticos e em quadros de toxinfecção alimentar em humanos. Esse microrganismo foi descrito inicialmente por Welch e Nuttall em 1892. *C. perfringens* é um bastonete reto e grosso, ocorrendo tanto individualmente quanto aos pares e, raramente em cadeias. Possui cerca de 1 micrômetro de

largura e 4-8 micrômetros de comprimento, considerado pleomórfico. Raramente eles são capazes de formar esporos, mas, quando geram, esses são ovais e pequenos, geralmente não deformando a parede celular do bastonete. Embora tenham pouca mobilidade, são capazes de crescer rapidamente em condições laboratoriais adequadas (Murray *et al.*, 2006, Gomes, 2007).

O crescimento e multiplicação dessa espécie caracteriza-se pela capacidade de multiplicação em temperatura alta, estando ótima entre 37 °C e 45 °C; o pH ideal entre 5,0 e 8,0; e a necessidade de 13 aminoácidos essenciais para crescimento. Como algumas outras espécies de clostrídios, apesar de ser classificado como microorganismo anaeróbio, o *C. perfringens* pode sobreviver e crescer na presença de oxigênio (McClane *et al.*, 2006). Essa bactéria é fermentadora e cresce rapidamente em meios que contenha carboidratos. Sob essas condições, elas produzem grandes quantidades de H₂ e CO₂, o que ajuda a manter o ambiente em anaerobiose. Diante dessas características de crescimento e pela fácil manipulação em laboratório, *C. perfringens* se tornou um organismo modelo para o desenvolvimento genético no gênero em que pertence (Rood *et al.*, 1997).

C. perfringens foi a primeira bactéria Gram-positiva a ter o seu genoma mapeado, apresentando um único cromossoma circular de 3,6 Mb (Canard *et al.*, 1989). Posteriormente, Shimizu *et al.* (2002) seqüenciaram o genoma completo da linhagem 13 de *C. perfringens* e identificaram uma variedade de genes que codificam toxinas e enzimas responsáveis por lesões mionecróticas. O genoma desse organismo apresentou 3.031.430 pares de bases, 2.660 regiões que codificam proteínas, 10 genes de rRNA e um baixo conteúdo G + C (28,6%).

O genoma do *C. perfringens*, quando comparado ao da bactéria não patogênica *C. acetobutylicum*, apresenta como principal diferença a existência de genes de virulência. Foram identificados nos cromossomos dois tipos de genes codificadores de proteínas que se ligam a matriz extracelular e cinco genes para hemolisina, todos relacionados a virulência e também descritos em outras espécies de bactérias. Esse estudo também mostrou que os genes de virulência não estão agrupados em único *locus*. Embora *C. perfringens* possua regiões altamente conservadas no seu genoma, sabe-se que os genes de uma bactéria podem ser perdidos e transmitidos horizontalmente para outra. Assim, os genes codificadores de toxinas e dos fatores de virulência estão distribuídos em várias regiões cromossomais e em elementos transponíveis (Shimizu *et al.*, 2002).

Continuando a caracterização do genoma da espécie, uma considerável diversidade entre os genomas de linhagens distintas de *C. perfringens* foi identificada, o que pode ser relacionado às diferentes características fenotípicas e de virulência dessas linhagens (Myers *et al.*, 2006). Recentemente, Nowell *et al.* (2012) utilizaram o sequenciamento de nova geração para acessar o genoma de uma linhagem de *C. perfringens* isolada de um caso de abomasite em bovino, mas não conseguiram explicar ou predizer qual o fator de virulência para esta doença. Por outro lado, eles contribuíram para aumentar o conhecimento sobre a diversidade do genoma dessa bactéria.

Existem diversos estudos de diversidade genética que utilizaram outras técnicas de biologia molecular para a caracterização de linhagens de *C. perfringens*. Dentre eles, a reação em cadeia da polimerase (PCR), especialmente em sua versão multiplex, vem sendo amplamente empregada para a detecção dos genes das toxinas alfa, beta, épsilon, iota, beta-2 e enterotoxina (Uzal *et al.*, 1997, Kanakaraj *et al.*, 1998, Baums *et al.*, 2004, Heikinheimo e Korkeala, 2005, Erol *et al.*, 2008). A PCR em tempo real (qPCR) também vem sendo uma ferramenta útil para a identificação dos tipos toxigênicos de diferentes isolados (Gurjar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011) Além disso, Schalch *et al.* (1999) também sugerem o uso da caracterização de plasmídeos, a ribotipagem e eletroforese em gel campo pulsado (PFGE) para esse tipo de análise. A última técnica vem se destacando na caracterização da diversidade genética e inferências evolutivas de isolados distintos (Engström *et al.*, 2003, Ferreira, 2006, Gholamiandekhordi *et al.*, 2006, Abildgaard *et al.*, 2009).

C. perfringens diferem em sua patogenicidade e nas doenças envolvidas devido aos seus diferentes tipos de genótipos e as toxinas produzidas (Petit *et al.*, 1999). As diferentes cepas podem produzir pelo menos 16 fatores de virulência conhecidos (Smith, 1979). Recentemente, a classificação da espécie em tipos toxigênicos de A a E, é baseada na produção das quatro toxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota, juntamente com a presença ou não dos genes que codificam a toxina beta-2 (cpb2) e enterotoxina (cpe), conforme descrito na Tabela 2.

TABELA 2: Classificação dos tipos toxigênicos de *C. perfringens*, baseado em Uzal e McClane, 2011

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

1.5. PRINCIPAIS TOXINAS E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *C. perfringens*

Como esperado de um agente responsável por uma variedade de condições patológicas, *C. perfringens* possui ao menos 16 potenciais fatores de virulência, incluindo 12 toxinas, enterotoxina, hemolisina, neuramidase (sialidase), dentre outras. Muitos desses fatores são enzimas hidrolíticas secretadas pelo organismo que o auxilia em seus hábitos saprófitas (Rood, 1991). De acordo com Hatheway (1990), o termo toxina, em relação ao gênero *Clostridium*, se refere a proteínas biologicamente ativas que são antigênicas na natureza, sendo que sua atividade pode ser neutralizada especificamente com soros adequados.

A Figura 1, retirada de Petit *et al.* (1999) ilustra o modo de ação de algumas dessas moléculas nas células dos hospedeiros. As principais toxinas e fatores de virulência de *C. perfringens* serão descritos a seguir.

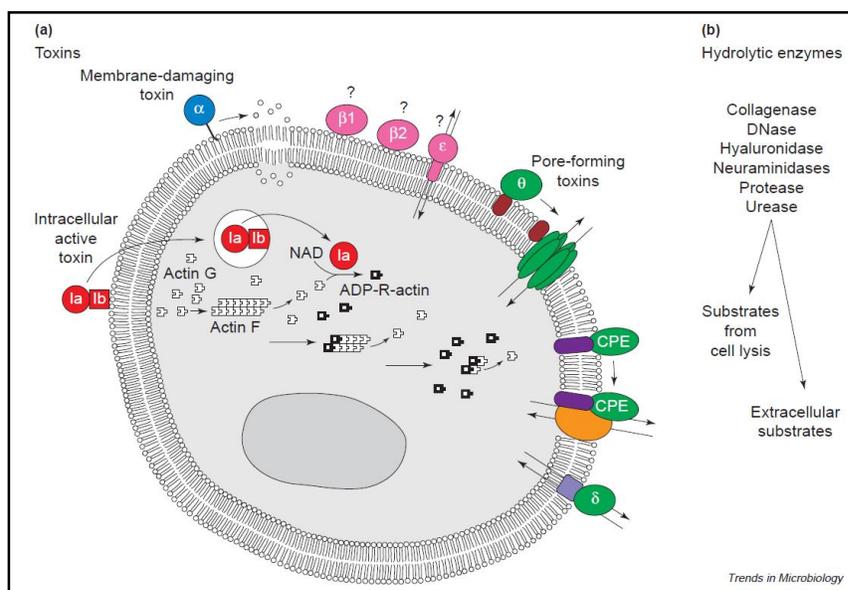


FIGURA 1: Representação esquemática dos alvos e modo de ação de toxinas de *C. perfringens* e de enzimas hidrolíticas. Em A) A toxina α (azul) atua na membrana, pois possui atividade de fosfolipase C. As toxinas formadoras de poros (verde) reconhecem receptores específicos de membrana: colesterol (marrom) para a toxina θ (PfoA), Gangliosido GM2 (lilás) para toxina δ, e um receptor de proteína (roxo) para enterotoxina (CPE), que se associa com outra proteína de membrana (laranja) formando um grande complexo. As toxinas β1 e β2 podem ser prejudiciais a membrana, uma vez que a toxina β1 mostra significativa homologia com as toxinas α e γ de *Staphylococcus aureus*, que formam poros na membrana celular. A toxina ε forma um grande complexo com uma proteína de membrana, alterando a permeabilidade celular. Por outro lado, a toxina ι, que é uma toxina binária (vermelha), atua de modo intracelular. O componente de ligação (Ib) age como intermediário na interiorização do componente enzimático (Ia) que catalisa a ADP ribosilação de monômeros de actina, levando a despolimerização do citoesqueleto. Em B) o esquema ilustra que *C. perfringens* também produz diversas enzimas hidrolíticas, que atuam como fatores de virulência adicionais nas lesões gangrenosas, favorecendo a degradação dos substratos extracelulares e de células lisadas, fornecendo nutrientes para o crescimento de *C. perfringens* (Imagem reproduzida de Petit *et al.*, 1999).

1.5.1. Toxina Alfa

A toxina alfa de *C. perfringens* está envolvida em enfermidades como a gangrena gasosa e a enterite necrótica em aves (Titball *et al.*, 1999). Essa toxina é codificada pelo gene *plc* e possui origem cromossomal, ao contrário das outras toxinas principais que possuem origem plasmidial, apresentando-se, assim, em todos os toxinotipos de *C. perfringens*. Análises da organização cromossômica da espécie revelou que alguns dos genes que codificam toxinas extracelulares (incluindo o gene *plc*) estão agrupados em uma região com cerca de 250pb, próximo a *oriC* (Rood, 1998).

MacFarlane e Knight (1941) descreveram a atividade dessa toxina como uma fosfolipase C, sendo a primeira toxina bacteriana identificada a apresentar atividade enzimática. A cristalografia

dessa enzima revelou a existência de dois domínios: N-terminal, constituído por nove alfa-hélices compactadas, com similaridade estrutural à fosfolipase C fosfatidilcolina-específica (PC-PLC) de *Bacillus cereus*; e o C-terminal, constituído por oito cadeias antiparalela β -sanduíche, semelhante ao domínio eucariótico “calcium-binding C2” (Naylor *et al.*, 1998) (Figura 2).

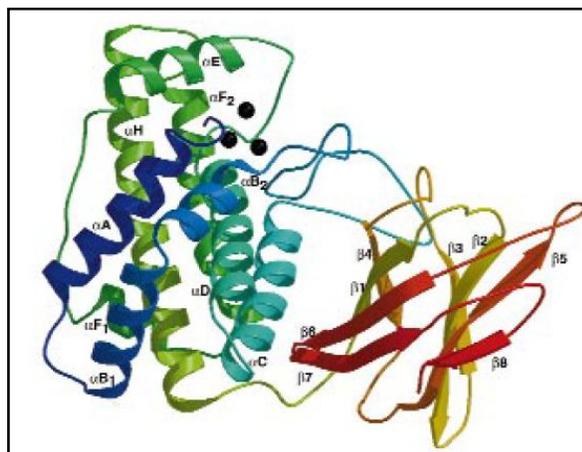


FIGURA 2: Representação da estrutura cristal da toxina alfa de *C. perfringens*. A sequência é representada em escala de cores iniciando do azul (resíduo 1) até vermelho (resíduo 370). As três esferas pretas indicam a posição dos íons zinco no sítio ativo (Imagem reproduzida de Naylor *et al.*, 1998).

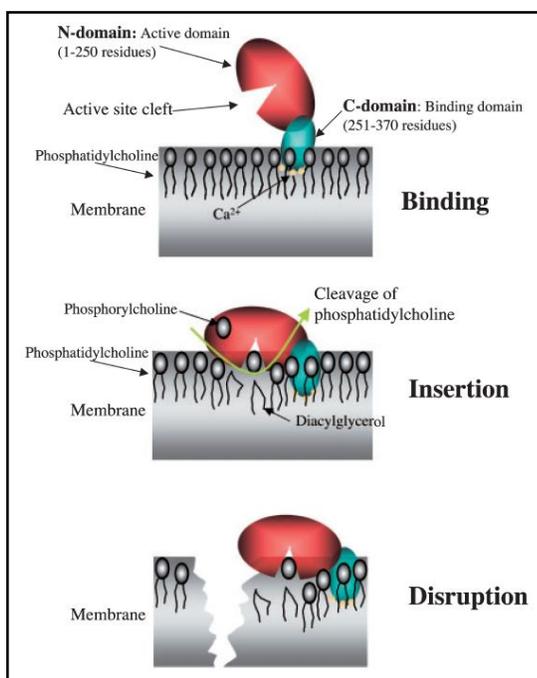


FIGURA 3: Ação da toxina alfa em membranas artificiais e biológicas. A imagem ilustra os três passos até a lise celular: ligação do domínio c-terminal à membrana; inserção da toxina na membrana com clivagem da fosfatidilcolina; e rompimento completo da célula (Imagem reproduzida de Sakuray *et al.*, 2004).

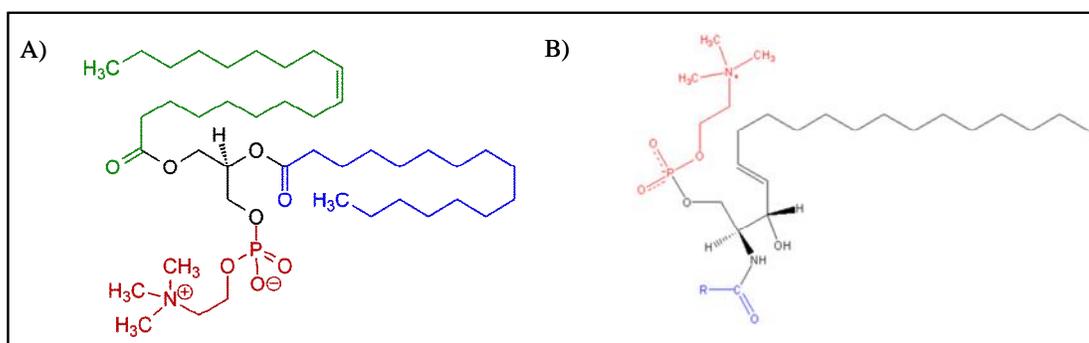


FIGURA 4: Estrutura dos principais substratos da toxina alfa de *C. perfringens*. Em A) Fosfatidicolina e em B) esfingomiéline.

A toxina alfa possui 370 resíduos e atua preferencialmente nos substratos fosfatidicolina e esfingomiéline, na presença de íons cálcio (Nagahama *et al.* 1996; Urbina *et al.*, 2009) (Figuras 3 e 4). Há uma susceptibilidade diferenciada quanto à hemólise em determinadas espécies. Isso pode ser explicado pela diferente composição de fosfolípidos de membranas dos eritrócitos de cada espécie (Jepson e Titball, 2000). Além disso, a hidrólise dos fosfolípidos ativa outras vias celulares que são responsáveis por diversos efeitos citotóxicos observados. O acúmulo do subproduto diacilglicerol ativa a via do ácido aracídônico, que gera a produção de tromboxana A₂, um potente mediador inflamatório. O diacilglicerol também ativa a proteína quinase C, o que ativa fosfolipases C e D de células eucarióticas, promovendo enormes danos celulares (Fujii e Sakurai, 1989; Titball, 1993). A ação dessa proteína de peso molecular de 43 kDa caracteriza-se por hemólise intravascular, danos capilares, processos inflamatórios, agregação plaquetária e alterações do metabolismo culminando com a morte celular (Stevens, 1988; Sugahara, 1976; Ohsaka, 1978; Canard, 1989).

A análise de diversidade genética a partir do sequenciamento do gene da toxina alfa é restrita a poucos trabalhos, que revelaram haver grande similaridade entre as sequências dessa toxina obtida a partir de diferentes isolados (Tsutsui, 1995, Titball *et al.*, 1999, Sheedy *et al.*, 2004, Abildgaard *et al.*, 2009). O esforço desse trabalho para a caracterização de polimorfismos existentes no gene *plc* de isolados provenientes de diferentes origens, juntamente com as sequências desse gene disponíveis em banco de dados, contribuirá com o aumento do conhecimento acerca das isoformas da toxina alfa presentes na natureza.

1.5.2- Toxina Beta

Essa toxina é codificada pelo gene *cpb* que possui origem plasmidial. A proteína possui peso molecular de aproximadamente 40 kDa e as bases moleculares de seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. O efeito citotóxico da toxina beta é atribuído à capacidade de formação de poros em membranas de células susceptíveis, levando ao inchaço e a lise celular (Steinthorsdottier *et al.*, 2000; Nagahama *et al.*, 2003). Ela atua nos canais seletivos para sódio e potássio, causando

despolarização das membranas celulares excitáveis e alterações na permeabilidade vascular do sistema nervoso (Hatheway, 1990; Shatursky *et al.*, 2000).

1.5.3- Toxina Beta-2

Essa toxina é codificada pelo gene *cpb-2* que possui origem plasmidial. Gibert *et al.* (1997) foram os primeiros a descreverem essa toxina, a partir de um isolado proveniente de um suíno com enterite necrótica hemorrágica neonatal. A proteína apresenta peso molecular de 28 kDa e não apresenta homologia significativa com a toxina beta. Embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido, acredita-se que envolve a lise celular através da formação de poros na membrana celular (Petit *et al.*, 1999). Diversos trabalhos apontam essa toxina como principal fator de virulência em enterites e enterotoxemias de diversos animais (Herholz *et al.*, 1999; Thiede *et al.*, 2001; Manteca *et al.*, 2002; Bueschel *et al.*, 2003; Lebrun *et al.*, 2007). Porém, van Asten *et al.* (2010) revisou a ocorrência do gene *cpb-2* em animais domésticos, selvagens e em humanos e concluiu que os estudos existentes ainda deixam dúvidas quanto a participação da beta-2 para estas doenças.

1.5.4- Toxina Épsilon

Toxina codificada pelo gene *etx* que possui origem plasmidial. A proteína é secretada na forma de protoxina, com peso molecular de 32,7 kDa e, é ativada por clivagem proteolítica (tripsina) no trato gastrointestinal, ficando com peso molecular de 31,2 kDa (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999). Postula-se que essa ativação proteolítica no trato gastrointestinal compromete a barreira intestinal dos animais intoxicados, promovendo a disseminação da toxina na corrente sanguínea, alcançando os principais órgãos, como os rins e o cérebro (Bokori-Brown *et al.*, 2011; Morris *et al.* 2012). O modo preciso de ação dessa toxina permanece desconhecido mas ela pertence às toxinas heptaméricas formadoras de poros. Seu mecanismo de ação envolve a ligação específica a receptores na superfície das células endoteliais promovendo a desestabilização da membrana com alteração da permeabilidade vascular com resultante escape de líquidos e destruição celular (Popoff, 2011).

1.5.5- Toxina Iota

Essa toxina, descrita inicialmente por Bosworth (1943), é formada por duas subunidades protéicas imunologicamente distintas denominadas iota A (Ia; 47,5 kDa), codificada pelo gene *iap*, e iota B (Ib; 74 kDa), codificada pelo gene *ibp*, ambas de origem plasmidial. A subunidade Ib se liga ao receptor nas células alvo e transloca Ia para o citoplasma (Stiles e Wilkins, 1986a; Stiles e Wilkins, 1986b). Essa, por sua vez, atua como ADP-ribosiltransferase e NAD⁺-glicohidrolase, provocando desorganização do citoesqueleto com consequente morte celular. A toxina iota é produzida na forma de protoxina, sendo ativada na presença de enzimas proteolíticas (Perelle *et al.* 1993, Sakurai *et al.* 2009).

1.5.6- Toxina netB

Essa toxina foi descrita recentemente por Keyburn *et al.* (2008) e tem se mostrado um importante, mas não o único, fator de virulência em casos de enterite necrótica em aves (Johanson *et al.*, 2010; Keyburn *et al.*, 2010; Toloee *et al.*, 2011). Ela possui um peso de 33 kDa e demonstrou ter similaridade com a toxina beta. O modo de ação dessa toxina se baseia na formação poros heptaméricos estruturalmente similar às toxinas de *Staphylococcus aureus*, sendo que sua atividade é aumentada pelo colesterol (Savva *et al.*, 2012).

1.5.7- Enterotoxina

A toxina é codificada pelo gene *cpe* que possui origem cromossomal e/ou plasmidial. A proteína apresenta peso molecular de 35 kDa e é a única toxina conhecida de *C. perfringens* que não é secretada a partir de células bacterianas vegetativas, mas é produzida durante a esporulação (Rood, 1998). Seu mecanismo de ação envolve a formação de poros através da ligação a receptores específicos na superfície das células epiteliais do intestino dos animais, levando ao desequilíbrio osmótico e consequente lise celular (Li e McClane, 2006). Uma promissora linha de pesquisa com essa toxina baseia-se no uso dela como agente antitumoral. Foi demonstrado que a enterotoxina exerce um efeito citotóxico agudo em células de câncer pancreático, resultando em necrose e inibição do crescimento do tecido tumoral *in vivo*. Ainda está sendo investigado a sua utilização em outros tipos de câncer (mama, cólon e estômago), bem como a eficiência a longo prazo e a ausência de toxicidade (Patyar *et al.*, 2010).

1.5.8- Outros fatores de virulência

As toxinas secundárias são representadas por:

- Theta: é codificada pelo gene *PfoA*, de origem cromossomal, possui peso molecular de 51 kDa e seu mecanismo de ação envolve atividades hemolíticas e necrosantes;
- Delta: com peso molecular de 35 kDa e localização plasmidial, seu mecanismo de ação envolve atividade hemolítica através da formação de poros;
- Kappa (colagenase): é codificada pelo gene *colA*, de origem cromossomal, com peso molecular de 80 kDa. Seu mecanismo de ação envolve hidrólise de colágeno e necrose celular;
- Lambda, é codificada pelo gene *lam*, de origem plasmidial, com peso molecular de 36 kDa e seu mecanismo de ação envolve atividades proteolíticas (caseinase);
- Neuramidase (sialidase), codificada pelo gene *nanH*, de origem cromossomal, com peso molecular de 42,8 kDa e mecanismo de ação envolvendo aglutinação de eritrócitos, resultando num aumento da viscosidade sanguínea e formação de trombos

(Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Manich *et al.*, 2008).

1.6- VACINAS CLOSTRIDIAIS

As doenças causadas por *Clostridium* geram perdas consideráveis ao rebanho, uma vez que o tratamento, em geral, é impraticável. Além disso, a erradicação das doenças relacionadas a esses organismos é praticamente impossível, devido às características ecológicas do agente e a sua forma esporulada de resistência. Diante disso, a profilaxia das clostridioses deve basear-se em vacinações sistemáticas de todo o rebanho e em medidas adequadas de manejo. As vacinas clostridiais são, na sua maioria, polivalentes e possuem toxóides (toxinas inativadas) em sua formulação. Elas contêm múltiplos antígenos para serem utilizadas como estratégia diante da ampla variedade de agentes e suas toxinas (Lobato e Assis, 2000).

Uma boa vacina polivalente contra clostridiose deve cobrir o espectro de todos os tipos de clostrídios responsáveis por doenças nos ruminantes; no Brasil, devem ser incluídos o *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* (B ou C e D), *C. sordellii*, *C. novyi* e *C. tetani*. Nas regiões onde a hemoglobinúria bacilar é enzoótica, a vacina polivalente deve incluir também o *Clostridium haemolyticum* (Lobato e Assis, 2000). No Brasil, não existem vacinas específicas apenas para a enterotoxemia e a proteção é obtida pela vacinação contra a clostridiose de modo geral, na qual inclui o *Clostridium perfringens* na sua formulação (Merial Saúde Animal, 2013: <http://www.merial.com.br/>). Atualmente no país, segundo dados do Compêndio de produtos veterinários do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), é possível encontrar 26 produtos na classe terapêutica de vacinas com o termo "perfringens" utilizado para busca. A maioria deles é composto por suspensão inativada de cepas de diversas espécie de *Clostridium* contendo variados toxóides clostridiais. Entretanto, não há nenhuma menção a imunobiológicos que contenham em sua composição os toxóides alfa de *C. perfringens* (SINDAN, 2013)

A produção de toxóides tradicionais é dispendiosa e trabalhosa, já que são necessários processos complexos de purificação. Para isso, é necessário utilizar cepas que produzam grandes quantidades de toxinas, estando atento ao fato de que repiques sucessivos em laboratório destas amostras podem ocasionar a perda de mediadores toxigenicos, resultando em baixos títulos ou mesmo a perda total da toxigenicidade das amostras utilizadas para a confecção das vacinas (Hatheway, 1990; Petit *et al.*, 1999). Alguns aspectos são considerados relevantes na linha de produção de toxóides eficientes. Dentre eles destacam-se as linhagens utilizadas, a composição dos meios de cultura, pH, tempo, temperatura, atmosfera de incubação, além da forma de inativação das toxinas para que essas não percam suas propriedades imunogênicas (Jansen, 1961; Pivinick *et al.*, 1964; Pivinick *et al.*, 1965; Smith, 1977; Sakurai e Duncan, 1979; Rood e Cobe, 1991). No âmbito industrial e comercial, a produção de toxinas clostridiais necessita o uso de fermentadores que permitem o monitoramento de grande parte das variantes do processo, sendo que muitos fatores

relacionados à cultura desses microorganismos e a produção de cada toxina são críticos e dificultam o processo.

Lobato *et al.* (2000), alertou que, no Brasil, há um incremento na produção e comercialização de vacinas para as clostridioses, devido às modificações ocorridas nos sistemas de criação, levando ao surgimento de novas doenças e o aumento de outras. No país, são produzidas em torno de 140 milhões de doses de vacinas clostridiais a cada ano, o que corrobora a grande utilização desses imunógenos. Porém, apenas a bacterina contra *C. chauvoei* e os toxóides botulínicos C e D são submetidos ao controle oficial, ficando os demais antígenos a critério dos laboratórios produtores (Lobato *et al.*, 2007b).

Nesse contexto, diversos trabalhos apontam a baixa qualidade e ineficiência de muitas vacinas clostridiais comercializados no país. No intuito de avaliar a eficiência de algumas vacinas contra enterotoxemias, Azevedo *et al.* (1998) testaram a resposta de antitoxinas beta e épsilon de *C. perfringens* induzida em coelhos por sete vacinas comercializadas no Brasil, sendo que uma delas é produzida fora do país. Foi constatado que somente a vacina importada induziu respostas de anticorpos neutralizantes. Em 2000, Lobato *et al.* também analisaram a resposta dessas antitoxinas induzidas em coelhos e bovinos por seis vacinas comerciais disponíveis no país. Foi verificado que apenas duas delas atendiam as exigências das normas de controle internacionais. Para vacinas contendo *Clostridium novyi* tipo B, Nascimento *et al.* (2003) avaliaram a eficiência de 13 vacinas, sendo que somente duas apresentaram títulos satisfatórios. Lobato *et al.* (2004) avaliaram a eficiência de 12 vacinas comerciais contra clostridioses que continham em sua composição *C. sordellii* e constataram que duas delas (16,6%), apresentaram resultado igual à bacterina padrão, protegendo todos os animais desafiados. Ineficiência semelhante de proteção foi determinada em vacinas contendo *C. tetani*, o qual foi determinado que 50% das vacinas contra este agente testadas, comercializadas no Brasil, foram incapazes de estimular títulos sorológicos compatíveis com os níveis de teste recomendado (Lobato *et al.*, 2007).

Diante dessas considerações acerca das vacinas tradicionais comercializadas atualmente, e do avanço das técnicas de biologia molecular, surgem novas perspectivas para a produção de vacinas: as vacinas recombinantes. Essas tecnologias demandam um maior conhecimento a cerca dos patógenos e dos antígenos de interesse, mas apresentam resultados mais precisos, puros e homogêneos do que as tecnologias anteriores. Desde a formulação da primeira vacina recombinante (contra hepatite B) e seu licenciamento em 1986, várias outras vacinas com essa metodologia vem sendo formuladas e comercializadas com sucesso, demonstrando que essa tecnologia é a melhor escolha para a confecção de novas vacinas (Homma *et al.*, 2003).

1.7- EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM *Escherichia coli*

Proteínas nativas raramente são obtidas em grandes quantidades e com grau de pureza desejável para aplicação biotecnológica. Na década de 1980, o desenvolvimento da engenharia genética proporcionou que a produção e expressão de proteínas alvo fosse possível sob a forma recombinante, usando para isso diferentes células hospedeiras, como bactérias, fungos e células eucarióticas. Basicamente, os genes são introduzidos após promotores reguláveis presentes em elementos genéticos independentes, os plasmídeos (Yokohama, 2003). Sendo assim, essa estratégia permitiu a produção de proteínas puras e funcionais a custos mais baixos, com maior grau de purificação e em tempo reduzido.

Atualmente, existem diversos sistemas de expressão sendo utilizados, cada um com suas vantagens e desvantagens. Para a escolha de um sistema em particular, deve-se considerar as características da proteína de interesse e o uso que a ela se destina. O uso da enterobactéria *E. coli* tem sido o mais amplamente utilizado, sendo que aproximadamente 60% dos registros de proteínas recombinantes na literatura optaram por esse sistema (Correa e Oppezzo, 2011). Essa escolha por *E. coli* pode ser justificada pelo grande número de informações sobre sua genética, pelo amplo conhecimento sobre sua fisiologia, bioquímica e biologia molecular e ao intenso aperfeiçoamento das ferramentas disponíveis para a sua manipulação genética (Sørensen e Mortensen, 2005).

Visando otimizar a expressão da proteína e resolver os problemas de purificação como solubilidade, estabilidade e níveis de expressão, é comum produzir proteínas de fusão. Para isso, as sequências codificantes da proteína de interesse são integradas aos genes de outras proteínas que possuem as características apropriadas (proteínas transportadoras). Outra alternativa é expressar as proteínas com pequenas caudas ou etiquetas (*tags*) que são adicionadas às extremidades N- ou C-terminal, facilitando a purificação e/ou detecção da proteína. Um exemplo muito utilizado é a cauda de histidinas, com seis a dez resíduos consecutivos que permitem a purificação da proteína por cromatografia de afinidade (GE Healthcare, 2009).

Outro fator importante a ser considerado na expressão de um gene é a região promotora do vetor de expressão. A construção de um sistema funcional deve ser baseada em um promotor forte, como por exemplo o T7 promotor, reconhecido pela RNA polimerase do bacteriófago T7. Esta polimerase é muito seletiva resultando em alto níveis de transcrição, e posterior tradução, dos genes regulados por esse promotor. Esses sistemas são designados pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*). Alguns vetores dessa série apresentam o promotor T7-*lac*, que regula a expressão da proteína pela presença de IPTG, reduzindo portanto o *background* de expressão da proteína alvo na ausência desse indutor (Novagen, 2003).

No final do último século, diversos trabalhos realizaram a clonagem e expressão das principais toxinas de *C. perfringens* (Titball *et al.*, 1989; Hunter *et al.*, 1992; Hunter *et al.*, 1993; Perelle *et al.*, 1993; Katahira *et al.*, 1997). Visando a produção de uma vacina polivalente contra clostridioses, nosso grupo de pesquisa iniciou os trabalhos com toxinas recombinantes de *C. perfringens* e vem obtendo resultados satisfatórios. Inicialmente, foi produzida a toxina épsilon recombinante (Souza, 2008; Souza *et al.* 2010) em *E. coli* BL21 (DE3), utilizando o vetor pET11a. A épsilon recombinante foi expressa, principalmente, na forma insolúvel, retida em corpos de inclusão, e mostrou atividade letal em camundongo com DL50/mL de 25×10^2 . A imunização de coelhos, caprinos, ovinos e bovinos com esse toxóide gerou títulos de anticorpos satisfatórios correspondendo, respectivamente, a 40, 14,3, 26, e 13,1 UI/mL (Lobato *et al.*, 2010). Almeida (2010) produziu a toxina beta recombinante em *E. coli* BL21 (DE3), com o vetor pET11a e mostrou que o toxóide recombinante apresentou similaridade antigênica e imunogênica em relação a toxina beta nativa. O presente trabalho clonou e expressou duas isoformas da toxina alfa em *E. coli* Rosetta (DE3) usando o vetor pET26b, e testou o potencial imunogênico de cada uma delas. Diante de uma isoforma ativa ($\alpha Z23$) e uma inativa ($\alpha AV1b$), com uma mutação em um resíduo essencial, foi possível observar uma reatividade imunológica muito semelhante de seus soros perante a toxina alfa nativa. Tal fato, sugere que o uso de um mutante inativo natural possa ser utilizado como um dos componentes para uma vacina polivalente contra clostridioses.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização em nível molecular de isoformas da toxina alfa de *Clostridium perfringens* e uso de duas candidatas recombinantes na imunização e geração de soros neutralizantes contra essa toxina.

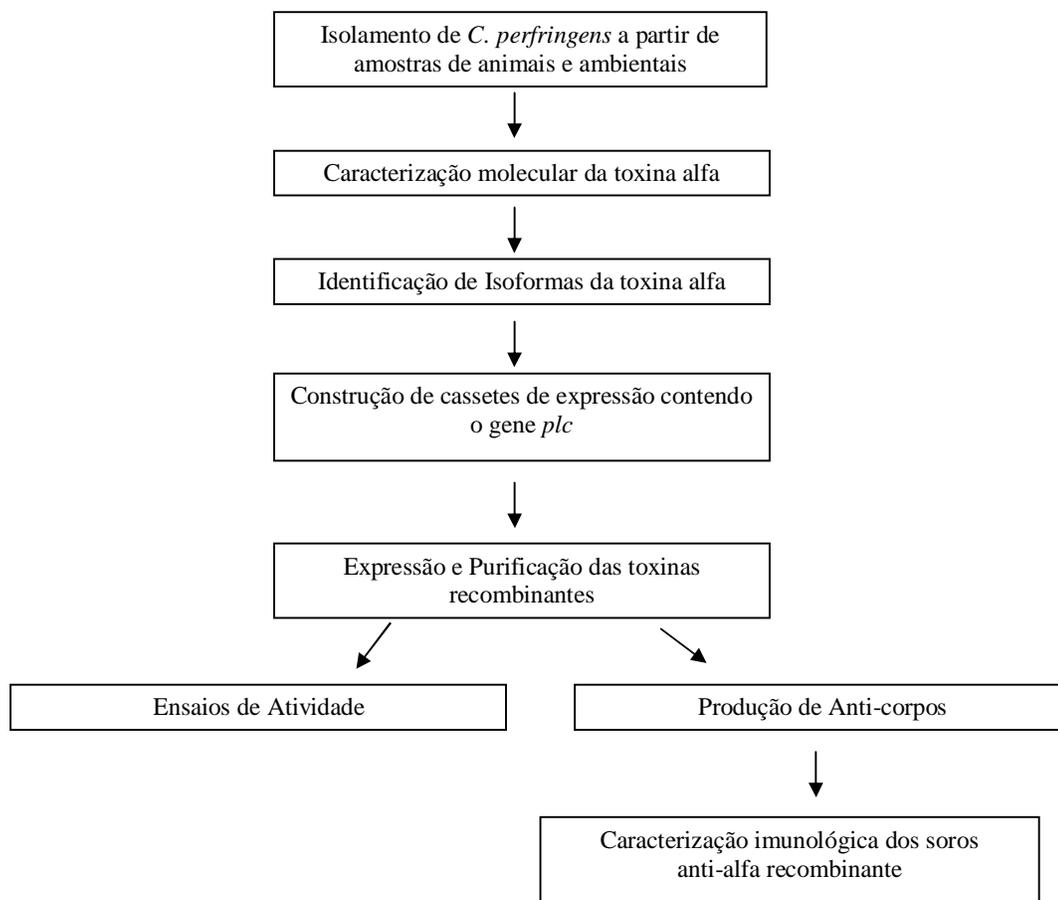
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de *C. perfringens* a partir de amostras randômicas utilizando meio de cultura seletivo;
- Caracterização molecular dos isolados a partir da extração de DNA, amplificação e seqüenciamento do gene *plc*, que codifica a toxina alfa;
- Classificação dos isolados quanto ao seu tipo toxigênico por PCR multiplex;
- Análises *in silico* das sequências de DNA obtidas para a busca de polimorfismos e identificação as isoformas;
- Comparação dos dados obtidos com sequências depositadas em banco de dados, afim de caracterizar mutações ainda não descritas e inferir padrões filogenéticos entre fosfolipases C de outras espécies de *Clostridium*;
- Clonagem em vetor de clonagem (pGEM-T Easy), sub-clonagem em vetores de expressão (pMAL -c2E e pET26b) e purificação das duas isoformas selecionadas;
- Análise da atividade enzimática, hemolítica e caracterização imunológica das toxinas recombinantes, verificando a reatividade de anticorpos anti-alfa recombinante contra a toxina alfa nativa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Estratégia Geral do Trabalho

As etapas da metodologia utilizada estão resumidas no esquema abaixo:



3.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOFORMAS DA TOXINA ALFA DE *C. perfringens*

3.1.1. Isolamento de *C. perfringens* a partir de amostras ambientais

Amostras fecais de animais doentes e sadios (bovinos, suínos, equínos, frangos, aves, cães, coelhos, caprinos) e amostras ambientais (sedimento, ração, serragem) foram coletadas em diferentes locais no estado de Minas Gerais, Brasil (n = 51, Tabela 3). As fezes de frangos, rações e serragens foram obtidas em granjas de pequeno porte distribuídas em Belo Horizonte - MG. Alguns isolados foram obtidos a partir do banco de microorganismos presente no Laboratório de Bacterioses e Pesquisa do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato. Amostras de sedimento de um lago no Parque Estadual do Rio Doce foram gentilmente cedidas pela doutoranda Patrícia Silva Costa, orientada pela Prof^ª. Dra. Andréa Maria Amaral, do Laboratório de Genética Molecular e de Microorganismos

(ICB/UFGM). As demais amostras foram obtidas de animais criados em residências ou fazendas particulares. Uma amostra referência proveniente da ATCC (*American Type Culture Collection*, ATCC 3628) também foi utilizado como controle.

O procedimento de isolamento destes microorganismos foi realizado no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, sobre a coordenação do Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato, colaborador do projeto. Após a coleta do material (fezes, solo, ração), o mesmo foi imediatamente submetido ao processo de isolamento. Quando necessário, o material foi acondicionado a -20°C até o momento do isolamento. Cerca de 0,08-0,12 gramas de cada amostra foram diluídas em 1ml de solução salina estéril e 50 µl dessa diluição foi semeada com alça microbiológica por esgotamento em meio bacteriológico seletivo sólido ágar SPS (*Sulfite polymyxin sulfadiazine*, Difco Laboratories, Detroit, MI). A incubação foi realizada em jarras de anaerobiose, de acordo com as seguintes condições: temperatura de 37° C durante 24 horas em atmosfera de anaerobiose (CO₂: 9,8%; H₂: 10,4%; N₂: 79,8%). Colônias umbilicadas e enegrecidas, com características morfológicas sugestivas de *C. perfringens*, foram individualmente coletadas para extração do DNA. Essa aparência se deve ao fato dos clostrídios serem capazes de reduzir o sulfito em sulfeto, que reage com o ferro do citrato férrico para formar um precipitado negro de sulfeto de ferro (Manual Difco™ & BBL™, 2009).

TABELA 3: Descrição dos isolados de *C. perfringens* obtidos a partir das amostras analisadas. São mostrados detalhes quanto procedência, identificação, estado de saúde do animal de origem, tipo toxigenico e haplótipo. CpA: *C. perfringens* tipo A; CpA/beta2: *C. perfringens* tipo A com gene que codifica a toxina beta-2; CpC: *C. perfringens* tipo C; CpD: *C. perfringens* tipo D.

Isolado <i>C. perfringens</i>	Origem da Amostra	Nº da amostra	Estado de Saúde	Tipo Toxinogênico	Haplótipo
AMB 16	Sedimento	1	Não se aplica	CpA	Hap1
AMB 18	Sedimento	2	Não se aplica	CpA	Hap2
AMB 20	Sedimento	3	Não se aplica	CpA	Hap3
AMB 22	Sedimento	4	Não se aplica	CpA	Hap4
AI 1a	Ração para frangos	5	Não se aplica	Indeterminado	Hap5
AI 2a	Fezes de frangos	6	Sadio	CpA/beta2	Hap6
AI 2b	Fezes de frangos	6	Sadio	CpA/beta2	Hap7
AI 3a	Fezes de frangos	7	Sadio	CpA	Hap8
AI 4a	Fezes de frangos	8	Sadio	CpA/beta2	Hap9
AV 1a	Fezes de frangos	9	Sadio	CpA/beta2	Hap10
AV 1b	Fezes de frangos	9	Sadio	CpA/beta2	Hap11
AV 3a	Serragem	10	Não se aplica	CpA	Hap12
AV 5a	Serragem	11	Não se aplica	CpA/beta2	Hap13
AV 5b	Serragem	11	Não se aplica	CpA/beta2	Hap14
B47*	Fezes de bovinos	12	Doente	CpA	Hap39
B59*	Fezes de bovinos	13	Doente	CpA	Hap26
B60*	Fezes de bovinos	14	Doente	CpA	Hap18
B64*	Fezes de bovinos	15	Doente	CpA	Hap18
B64-2*	Fezes de bovinos	15	Doente	CpA	Hap18
B66*	Fezes de bovinos	16	Doente	CpA	Hap18
BL 1a	Fezes de frangos	17	Sadio	CpA/beta2	Hap3
BL 2a	Fezes de frangos	18	Sadio	CpA	Hap15
BL 5a	Fezes de suínos	19	Sadio	Indeterminado	Hap10

BL 10a	Fezes de equínos	20	Sadio	CpA	Hap16
CAP1*	Fezes de caprinos	21	Doente	CpD	Hap40
CN 1a	Ração para frangos	22	Não se aplica	CpA/beta2	Hap17
CN 1b	Ração para frangos	22	Não se aplica	CpA/beta2	Hap18
CN 1c	Ração para frangos	22	Não se aplica	CpA	Hap19
CN 3a	Fezes de frangos	23	Sadio	Indeterminado	Hap20
CN 5a	Fezes de frangos	24	Sadio	CpA	Hap21
CN 5b	Fezes de frangos	24	Sadio	CpA/beta2	Hap21
CPC	Ref. ATCC 3628	25	Não se aplica	CpC	Hap22
CPD*	Ruminantes	26	Doente	CpD	Hap40
CW 2b	Fezes de frangos	27	Sadio	CpA/beta2	Hap23
CW 4a	Fezes de frangos	28	Sadio	CpA	Hap22
CW 4b	Fezes de frangos	28	Sadio	CpA/beta2	Hap24
CW 5a	Fezes de frangos	29	Sadio	CpA/beta2	Hap23
GJ 1a	Ração para frangos	30	Não se aplica	CpA/beta2	Hap18
GJ 2a	Fezes de frangos	31	Sadio	CpA/beta2	Hap9
GJ 2b	Fezes de frangos	31	Sadio	CpA/beta2	Hap9
GJ 4a	Fezes de frangos	32	Sadio	CpA	Hap25
IC11*	Fezes de aves	33	Sadio	CpA	Hap20
LF 1a	Ração para frangos	34	Não se aplica	CpA	Hap26
LF 1b	Ração para frangos	34	Não se aplica	CpA/beta2	Hap27
LF 1c	Ração para frangos	34	Não se aplica	CpA/beta2	Hap28
LF 2a	Fezes de frangos	35	Sadio	CpA/beta2	Hap29
LF 2b	Fezes de frangos	35	Sadio	CpA/beta2	Hap30
LF 2c	Fezes de frangos	35	Sadio	CpA/beta2	Hap21
LF 3a	Fezes de frangos	36	Sadio	CpA/beta2	Hap31
LF 3b	Fezes de frangos	36	Sadio	CpA/beta2	Hap23
LF 4a	Fezes de frangos	37	Sadio	CpA/beta2	Hap32
LF 4b	Fezes de frangos	37	Sadio	CpA/beta2	Hap25
LF 4c	Fezes de frangos	37	Sadio	CpA/beta2	Hap23
LF 4d	Fezes de frangos	37	Sadio	CpA/beta2	Hap33
LF 5a	Fezes de frangos	38	Sadio	CpA/beta2	Hap32
LF 5b	Fezes de frangos	38	Sadio	CpA/beta2	Hap32
RAN 9a	Fezes de cães	39	Sadio	CpA	Hap34
RAN 14a	Fezes de cães	40	Sadio	CpA/beta2	Hap10
RAN 14b	Fezes de cães	40	Sadio	CpA/beta2	Hap10
RAN 14c	Fezes de cães	40	Sadio	CpA/beta2	Hap17
RAN 21a	Fezes de coelhos	41	Sadio	CpA	Hap35
RAN 21b	Fezes de coelhos	41	Sadio	CpA/beta2	Hap36
RAN 21c	Fezes de coelhos	41	Sadio	Indeterminado	Hap37
RT23*	Fezes de tucanos	42	Doente	CpA/beta2	Hap38
RT40*	Fezes de tucanos	43	Sadio	CpA	Hap41
RT41*	Fezes de tucanos	44	Sadio	CpA	Hap38
RT50*	Fezes de tucanos	45	Sadio	CpA/beta2	Hap42
Z3*	Fezes de cães	46	Sadio	CpA	Hap43
Z23*	Fezes de cães	47	Sadio	CpA	Hap18
Z25*	Fezes de cães	48	Sadio	CpA	Hap41
Z32*	Fezes de cães	49	Sadio	CpA	Hap18
419/11-1*	Fezes de suínos	50	Doente	CpA	Hap38
419/11-2*	Fezes de suínos	51	Doente	CpA/beta2	Hap38

Nome dos isolados: AMB: amostra ambiental, sedimento de um lago no Parque Estadual do Rio Doce; AI: Aviário Imperador; AV: Aviário Viana; BL, Animais de uma fazenda em Barra Longa MG; CN: Granja Clara Nunes; CW: Casa Wilson; GJ: Granja Jacuí; LF: Loja do Frangão; RAN: amostras randômicas de animais de propriedades particulares. Para amostras coletadas em granjas, as iniciais se referem ao local/estabelecimento onde a amostra foi coletada, seguido do número da amostra, sendo a letra minúscula referente à colônia coletada.

Por exemplo, AI 1a: Aviário Imperador, amostra 1, colônia a. As amostras com asterisco (*) são provenientes de isolados cedidos pelo Profº Francisco Lobato, depositados no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa.

3.1.2. Extração de DNA dos isolados

Após o crescimento, as colônias coletadas individualmente em placas de Ágar SPS foram imersas em 100µL de solução de lise (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) e posteriormente foram adicionados o mesmo volume de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1mM de EDTA). As amostras foram fervidas durante cinco minutos e posteriormente purificadas com fenol e clorofórmio, segundo o protocolo modificado de Sambrook *et al.* (2001). Foi adicionado um volume de fenol e a mistura foi submetida a agitação por dois minutos. Em seguida, foi adicionado um volume de clorofórmio e mantido sob agitação por dois minutos. A solução foi centrifugada a 10.000 x g e a fase superior, que contém o DNA, foi transferida para outro tubo, o qual foi adicionado um volume de clorofórmio, mantido sob agitação por dois minutos e centrifugado como descrito anteriormente. A fase superior foi novamente recolhida e precipitada com 10% do volume de acetato de sódio a 3M e 2 volumes de etanol absoluto e incubadas a -20°C por 20 minutos. Após este período, centrifugou-se a 16.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%. O excesso de etanol foi retirado com a pipeta e o residual evaporado em temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de solução TE.

3.1.3. Tipificação toxigênica através de PCR multiplex

O isolados obtidos foram classificados quanto ao seu tipo toxigênico (Petit *et al.*, 1999) através da amplificação simultânea das principais toxinas produzidas por *C. perfringens*: alfa, beta, épsilon, iota, e ainda beta-2 e enterotoxina (Vieira *et al.*, 2008). As reações de PCR multiplex foram realizadas no Laboratório de Bacteriose e Pesquisa, da Escola de Veterinária da UFMG.

3.1.4. Amplificação do gene *plc* através de PCR

Para a amplificação de parte do gene *plc* foi priorizada a reação de *Nested* PCR, auxiliando, dessa forma, na obtenção de um grande número de moldes da toxina alfa. Essa técnica consiste em realizar duas reações de PCR consecutivas, na qual a segunda PCR é realizada com o produto de outra PCR, sendo a primeira realizada com iniciadores mais externos do que a segunda, otimizando assim os resultados obtidos.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: em um volume final de 25 µL foi adicionado 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada iniciador, tampão IVB, Taq polimerase (Phoneutria) e 20-50 ng de DNA genômico ou 1 µL do produto amplificado, no caso da *nested* PCR. Para a primeira rodada de amplificação foram selecionados os iniciadores F3 e R3 e para a segunda rodada F2 e R2 (Figura 5). Esses iniciadores foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer-BLAST, do NCBI. O programa de amplificação de ambas as etapas de PCR consistiu em uma desnaturação inicial de 94 °C por 1 minuto, seguido de 5 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1

minuto e 72 °C por 1 minuto, continuando com 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 52 °C por um minuto e 72 °C por 1 minuto. Por fim, houve uma extensão final a 72 °C por cinco minutos, finalizando com redução na temperatura a 4 °C.

```

TGAGGTTATGGTAATTATATGGTATAATTTTCAGTGCAAGTGTTAATCGTTATCAAAAAAGGGGAGATTAATACT
TGAAAAAATAACGGGGGATATAAAAAATGAAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTATTTGTGCTACGCTAGCA
ACTAGCCTATGGGCTGGGGCATCAACTAAAGTCTACGCT/TGGGATGGAAAGATTGATGGAAACAGGAACATCAT
GCTATGATTGTAACCAAGGGGTTCAATCTTAGAAAAATGATCTGTCCAAAAATGAACCAGAAAGTGTAAAGAA
AAAACCTAGAGATTTTAAAAGAGAACATGCATGAGCTTCAATTTAGGTTCTACTTATCCAGATTATGATAAGAAT
GCATATGATCTATATCAAGATCATTCTGGGATCCTGTACAGATAATAATTTCTCAAAGGATAATAGTTGGTA
TTAGCTTATTCTATACCTGACACAGGGGAATCACAAATAAGAAAATTTTCAGCATTAGCTAGATATGAATGGC
AAAGAGGAAACTATAACAAGCTACATTCTATCTTGGAGAGGCTATGCACTATTTTGGAGATATAGATACTCC
ATATCATCCTGCTAATGTACTGCCGTTGATAGCGCAGGACATGTTAAGTTTGAGACTTTTGCAGAGGAAAGAA
AAGAACAGTATAAAAAATAAACACAGCAGGTTGCAAAATAATGAGGATTTTATGCTGATATCTTAAAAAACAA
AGATTTTAATGCATGGTCAAAAGAATATGCAAGAGGTTTTGCTAAAACAGGAAAATCAATATACTATAGTCAT
GCTAGCATGAGTCATAGTTGGGATGATTGGGATTATGCAGCAAAGGTAACCTTAGCTAACTCTCAAAAAGGAA
CAGCAGGATATATTTATAGATTCTTACACGATGTATCAGAGGGTAATGATCCATCAGTTGGAAAGAATGTAAA
AGAAGTAGTAGCTTACATATCAACTAGTGGTGAGAAAGATGCTGGAACAGATGACTACATGTATTTTGGAAATC
AAAACAAAGGATGGAAAACTCAAGAAATGGGAAATGGACAACCCAGGAAATGATTTTATGACTGGAAAGTAAA
GACACTTATACTTTCAAATTAAGAGTGAATACTAAAAATTGATGATATACAAAATATGTGGATTAGAAAAA
GAAAATATACAGCATTCCCAGATGCTTATAAGCCAGAAAACATAAAGATAATAGCAAAATGGAAAAGTTGTAGT
AGACAAAGATATAAACGAGTGGATTTTCAGGAAATTCAACTTATAATATAAAAAATAAATAAAGTAAAAAATAA
TTATTTGGTTTTGGTGGTATTACAAATAAAAGCTTAGGAAAGATAAAGTCTTTCTTAAGCTTTTATTTACTTA
TTTTAGAGATTTAGGGATTACTTTAAGTAATA

```

F3: ACGCTAGCAACTAGCCTATGGGC, F2: AGCCTATGGGCTGGGGCATC, F1: CTGCCGTTGATAGCGCAGGA,
R3: CTTAAAGTAATAATCCCTAAATCTC, R2: TGTAAATACCACCAAAACCA, R1:
GTTTTGCAACCTGCTGTGTTT

FIGURA 5: Iniciadores desenhados para amplificação do gene da toxina alfa de *C. perfringens*; metionina inicial e códon de parada estão destacados em negro e sublinhados.

3.1.5. Purificação e seqüenciamento dos *amplicons* da toxina alfa

Após a confirmação da amplificação através de resolução eletroforética em agarose 1,5%, os produtos amplificados foram purificados em colunas contendo a resina Sephacril-S400 (GE Healthcare) conforme as recomendações do fabricante, permitindo que a reação de seqüenciamento fosse feita com melhor qualidade. Os seqüenciamentos bidirecionais foram feitos a partir desse produto purificado utilizando o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Para a realização da reação de seqüenciamento utilizou-se 5-20 ng do produto de PCR purificado, 0,5 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle da Applied Biosystems, 1,6 pmol de um iniciador (internos), 1,5 µL de Tampão de seqüenciamento BigDye Terminator v3.1 da Applied Biosystems e água suficiente para 10 µL. Essa reação foi submetida ao termociclador Veriti (Applied Biosystems) onde foi utilizado o programa padronizado para o sequenciador 3130 Genetic Analyzer da Applied Biosystems: 96 °C por 2 minutos, 44 ciclos a 96 °C por 30 segundos (rampa 1 °C/seg.), 50 °C por 15 segundos (rampa 1 °C/seg.) e 60 °C por 4 minutos, mantém 4 °C. Os iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento foram os mesmo iniciadores internos usados na reação de PCR.

Após a termociclagem, as reações foram precipitadas usando 1 µL EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol absoluto. A solução foi agitada e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida a reação foi centrifugada a 3.300 x g por 25 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 35 µL de etanol 70 % e novamente centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e posteriormente ressuscitado em 15 µL formamida de Hi-Di e aplicado no sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.1.6. Análise dos dados obtidos

A averiguação da qualidade dos seqüenciamentos e a obtenção de seqüências consenso foram realizadas através dos programas Phred v. 0.20425, Phrap v. 0.990319 (<http://www.phrap.org/>) e Consed 12.0 (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Cada eletroferograma foi inspecionado manualmente, no intuito de averiguar se os polimorfismos encontrados não poderiam ser erros no seqüenciamento. As seqüências consenso obtidas foram alinhadas pelo Clustal W (Higgins e Sharp, 1998), implementado no programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). No mesmo programa, foi realizada uma tradução *in silico* e as seqüências traduzidas foram alinhadas, no intuito de verificar a existência de polimorfismos não-sinônimos.

No intuito de obtermos um maior conhecimento acerca da diversidade genética existente no gene *plc* de *C. perfringens*, foram feitas comparações entre todas as seqüências depositadas no banco de dados *Nucleotide* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) até outubro de 2011. Para isso, foram utilizados como termo da busca "alpha toxin" e "phospholipase c" (Accession numbers: AF204209, AR067921, AY823400, D10248, D3123, D3124, D3126-D3128, D49968-D49969, DQ183930-DQ184176, DQ202275-DQ202276, EU839779-EU839835, GM037777, GM037779, GX290945-GX290946, GX290949-GX290950, GY318506-GY318507, GY318510-GY318511, L43545-L43548, M24904, X13608, X17300). Seqüências de fosfolipases C de outras espécies de *Clostridium* também foram obtidas nos bancos de dados "*Nucleotide*" e "*Protein*" do NCBI para serem utilizadas em inferências filogenéticas (Accession numbers: 1OLP_A-1OLP_D, AAN78416, AB162962, AY159815, BAD15292, AAK80447, ADZ21544, AEI32385, NP_349107, YP_004637156, AAM88377, P59026, ABN54388, ADU73820, EEU02478, EFB38339, YP_001039581, ZP_05428583, ZP_06247699, ADK15262, YP_003780364, EET86845, EFG88590, ZP_05392732, ZP_06854763, ZP_07631413, AB061869, BAB83265, AF072123, P20419, AEB75759, YP_004395756, EES91309, ZP_04862942, AEB77536, YP_004385808, EDS77236, D32125, ABK60388, Q46150, YP_877076, AB061868, Q8VUZ6, AA035577, NP_781640). Foram selecionados somente os arquivos que apresentavam toda a região codificante (*Complete coding sequences* - CDS), utilizando a região da toxina madura. Seqüências

idênticas foram removidas antes da análise filogenética, restando somente um representante de cada sequência ou de cada isoforma da toxina alfa.

Para todas as sequências analisadas, os haplótipos foram inferidos utilizando o DNAsp v.5.10.01 (Librado e Rozas, 2009) e a diversidade haplotípica calculada com o mesmo software. Análise filogenética foi realizada no programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando o método de *Neighbor-joining*, modelo evolutivo de Poisson e análise de *bootstrap* com 1000 repetições.

3.2. CLONAGEM E EXPRESSÃO DA TOXINA ALFA

Para a etapa de clonagem e expressão da toxina alfa recombinante foram selecionadas duas isoformas distintas (isoforma 7 e 11, maiores detalhes na seção dos resultados), provenientes dos isolados Z23 e AV1b (Tabelas 3 e 7). Ao longo do trabalho, essas isoformas clonadas serão referenciadas da seguinte forma: α AV1b e α Z23. Para isso, foram utilizadas as seguintes linhagens e vetores bacterianos:

LINHAGENS BACTERIANAS DE *E. coli*:

- **XL1-blue (Phonutria):** Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (TetR)]
- **BL21 DE3 (Phonutria):** F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
- **Rosetta DE3 (Novagen):** F⁻ ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm lacYI(DE3) pRARE6 (CmR)

VETORES BACTERIANOS UTILIZADOS:

- **pGEM-T Easy (Promega) (Figura 6):** É um vetor de clonagem linearizado que contém uma timidina em ambas extremidades 3'. Essa característica no sítio de inserção aumenta a eficiência da ligação dos produtos de PCR evitando a re-circularização do vetor. Além disso, proporciona uma extremidade compatível com os produtos de PCR gerados por algumas polimerases termoestáveis. É possível selecionar os clones que contém o inserto através do sistema IPTG/X-Gal, além da adição de ampicilina ao meio de cultura.
- **pMAL -c2E (New England Biolabs) (Figura 7):** O gene clonado nesse vetor de expressão é inserido logo após o gene malE, que codifica a "proteína de ligação a maltose" ("*Maltose-binding protein*", MBP), resultando na expressão da MBP fusionada à proteína de interesse. Essa construção utiliza o forte promotor "tac" e o sinais de tradução do malE resulta em um alto nível de expressão da sequência clonada, em geral, na forma solúvel. Para a purificação

da proteína fusionada a MBP, utiliza-se cromatografia de afinidade em resina de amilose, e em seguida é feita a clivagem através de proteases específica, liberando a MBP da proteína alvo.

- **pET-26b (Novagen) (Figura 8):** O vetores de expressão do sistema pET é derivado do plasmídeo pBR322 e possui altas taxas de expressão do gene alvo devido: a alta seletividade da RNA polimerase do bacteriófago T7 em reconhecer a sequência do promotor T7, ao alto nível de atividade da T7 polimerase e a eficiente tradução mediada pelos sinais de início da tradução de um gene específico (gene 10). Dentre vários vetores deste sistema, o vetor pET-26b possui um amplo sítio múltiplo de clonagem (MCS), gene de resistência ao antibiótico canamicina e duas origens de replicação (f1 e a origem do vetor pBR322). Além disso, ele apresenta um peptídeo sinal (*pelB leader*) como proteína de fusão capaz de direcionar a proteína fusionada a ele ao periplasma bacteriano. Para a purificação das proteínas recombinantes, este vetor possui uma cauda de histidina na porção C- terminal da proteína, permitindo a purificação em colunas de Níquel.

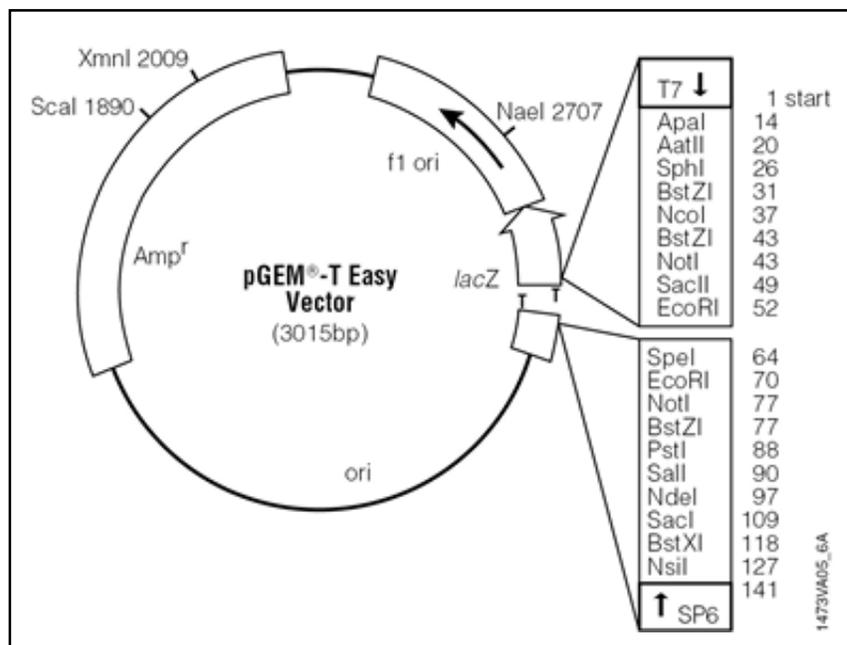


FIGURA 6: Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM-T easy. Em destaque o sítio múltiplo de clonagem.

Para a construção de cassetes de expressão contendo o gene *plc* foram adotadas duas estratégias: usando o vetor de expressão pMAL -c2E e o pET26b. Para isso, em ambas metodologias, o vetor de clonagem selecionado foi o pGEM-T easy. No próximo item (3.2.1) está descrito os procedimentos em comum para essas estratégias, ressaltando que a única diferença foi o desenho dos iniciadores com seus adaptadores.

3.2.1. Clonagem no vetor pGEM-T Easy

3.2.1.1. Amplificação do gene *plc* por PCR e purificação

Para a clonagem e expressão do gene *plc* em vetor de expressão, foi realizada inicialmente uma ligação do DNA de interesse em um vetor de fácil clonagem, o pGEM-T Easy. Visando a liberação do inserto para posterior subclonagem, para a construção em pMAL -c2E foi realizada uma amplificação com iniciadores contendo o sítio de restrição da enzima *HindIII*, que flanqueavam toda a porção da toxina alfa madura. E para a construção em pET26b os iniciadores apresentavam o sítio de restrição para *NcoI* (iniciador direto) e para *XhoI* (iniciador reverso) (Tabela 4), também abrangendo toda a toxina madura.

TABELA 4: Sequência dos iniciadores utilizados na amplificação do gene *plc* visando a clonagem da toxina alfa de *C. perfringens*. Em negrito, os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição usadas para cada construção, em itálico o códon de parada mais comum usado para as linhagens de *E. coli* utilizadas.

Construção	Sentido	Sequência do iniciador	Enzima de restrição
pMAL -c2E	Direto	5' AAGCTT GTGGGATGGAAAGATTGATG 3'	<i>HindIII</i>
pMAL -c2E	Reverso	5' AAGCTT TCAATTTATATTATAAGTTGAATTCCTG 3'	<i>HindIII</i>
pET26b	Direto	5' CCATGG ATTGGGATGGAAAGATTGATGGA 3'	<i>NcoI</i>
pET26b	Reverso	5' CTCGAG TTTTATATTATAAGTTGAATTCCTG 3'	<i>XhoI</i>

As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: em um volume final de 25µL foi adicionado 0,2mM de cada dNTP, 5pmol de cada iniciador, tampão IVB, Taq polimerase (Phoneutria) e 10ng/µL de DNA genômico. O programa de amplificação de ambas as etapas de PCR consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, continuando com 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, houve uma extensão final a 72°C por 5 minutos, finalizando com redução na temperatura a 4°C.

Os produtos amplificados foram visualizados após resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 1µg/mL e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. A banda foi excisada para purificação utilizando o kit "Wizard PCR Preps DNA Purification

System" da Promega, de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do produto purificado foi estimado através de uma nova resolução eletroforética em gel de agarose 1,5 %, conforme descrito anteriormente.

3.2.1.2. Ligação do produto purificado no vetor pGEM-T Easy

Para a ligação ao vetor utilizou-se 10 ng do produto purificado, 50 ng do vetor pGEM-T Easy (Figura 6), 1 µL de tampão de ligação 10x, 4 unidades de T4 ligase e água estéril suficiente para 10 µL de reação e incubação por 16 horas a 4 °C. O produto da ligação foi precipitado utilizando-se acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol 100%, deixando-o a uma temperatura de -20 °C por 20 minutos. Em seguida, houve centrifugação a 16000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Lavou-se o *pellet* acrescentando 200 µL de etanol 70%, centrifugando por mais cinco minutos a 16000 g, retirando o sobrenadante, acrescentando novamente 200 µL de etanol 70%, centrifugando por mais quatro minutos a 16000 g, retirando o sobrenadante e deixando a temperatura ambiente até todo o etanol evaporar. Os plasmídeos foram ressuspensos em 3 µL de água bidestilada (Phoneutria, BH, MG) e então preparados para a eletroporação.

3.2.1.3. Transformação do plasmídeos em *Escherichia coli* XL1-Blue eletrocompetentes e seleção dos transformantes

Os plasmídeos foram incubados com 100 µL de bactérias eletrocompetentes *E. coli*, linhagem XL1 Blue (Phoneutria, BH, MG) por 1 minuto no gelo e então transferidos para uma cubeta e submetidos a um choque de 1800mV no eletroporador de pulso Electroporator 2510 (Eppendorf). Após o choque, foi adicionado 1 mL de solução SOC (Phoneutria, BH, MG) (20 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose) e após a homogeneização incubou-se a 37 °C por 1 hora. Em placas contendo LB-ágar (10 g de NaCl, 10 g de bactotripton, 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, água destilada q.s.p. 1 L, pH 7,5) e ampicilina (100 µg/ml), foram acrescentados 30 µl de X-gal (50 mg/ml) e 4 µl de IPTG (0,6 mM). Nestas placas, foram distribuídos de 50 a 200 µl da suspensão de bactérias e foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 37 °C.

A seleção das bactérias contendo o vetor com a toxina alfa (pGEM:α) foi feito através do crescimento em meio contendo antibiótico e pelo sistema IPTG/X-gal. Esse sistema é utilizado para verificar quais colônias possuem o plasmídeo com o fragmento de DNA exógeno. Como o inserto é ligado ao plasmídeo dentro do gene *lacZ*, as colônias que receberem plasmídeos sem o inserto possuirão o gene ativo, que produzirá a β-galactosidase. Essa enzima cliva o substrato X-gal, liberando um produto insolúvel de coloração azul. Assim, as colônias que não possuem o inserto de interesse terão coloração azul. Por outro lado, as colônias com o inserto terão o gene *lacZ* inativo, que foi interrompido pelo fragmento de DNA exógeno, tendo assim coloração branca.

3.2.1.4. PCR de colônia

No intuito de identificar colônias contendo o vetor mais o inserto (pGEM: α), foi preparada uma PCR de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.1. Como molde para amplificação foi usado uma colônia isolada, após ser estriada em uma placa mapeada de LB-ágar com ampicilina. Para essa reação foram utilizados os iniciadores que anelam ao vetor (M13F: 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'; M13R: 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3') e o resultado visualizado em resolução eletroforética em agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo.

3.2.1.5. Extração e purificação do DNA plasmidial pGEM: α

Os clones positivos foram submetidos à extração de plasmídeo realizada segundo o método de lise alcalina-SDS (Sambrook *et al.*, 2001). Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio 2XYT (5 g de NaCl, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, água destilada q.s.p. 1 L, pH 7,5) com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), em um agitador a 180 rpm e à temperatura de 37 °C, durante 16 horas, em tubo de 50 mL.

Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos e centrifugada a 4500 g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 100 μL de solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0) gelada, transferido para um tubo de 1,5 mL e deixado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) e o conteúdo misturado cuidadosamente por inversão e deixado por 5 minutos no gelo. Foram adicionados 100 μL de solução III (acetato de potássio 3 M, 11,5% ácido acético glacial) e a mistura foi homogeneizada novamente por inversão. O tubo foi deixado no gelo por mais 5 minutos e centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo 1,5 ml e foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol 100%. O tubo foi deixado em repouso por 20 minutos no gelo e centrifugado novamente (12000 g por 15 minutos, à 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após evaporação do etanol residual, o *pellet* foi ressuscitado em 50 μL de TE pH 8,0 com RNase (20 $\mu\text{g/mL}$). O tubo foi deixado 1 hora a 37 °C para a enzima eliminar o RNA e posteriormente o material foi purificado com fenol-clorofórmio conforme descrito no item 3.1.2. Para quantificar os plasmídeos purificados, foi feita uma resolução eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.1.6. Sequenciamento dos plasmídeos positivos

Os plasmídeos positivos pGEM: α na PCR de colônia foram sequenciados conforme descrito no item 3.1.5. Foram utilizados 200 ng de plasmídeo e 1,6 pmol de cada iniciador do vetor (M13F e M13R) e os eletroferogramas analisados com o pacote phred phrap consed (ver 3.1.6).

3.2.1.7. Digestão enzimática do plasmídeo pGEM: α para liberação do inserto

O plasmídeo pGEM: α extraído (ver item 3.2.1.5) das colônias transformantes de *E. coli* XL1-Blue foi submetido a uma digestão enzimática com a enzima de restrição *HindIII* (Pharmacia Biotech) para a construção em pMAL -c2E e as enzimas *NcoI* e *XhoI* para a construção em pET26b. Foi utilizado 1 μ g de DNA, 2 μ L de tampão da enzima 10x, 1 unidade da enzima (0,1 μ L), e água bidestilada para completar o volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 37 °C durante 2 horas. Um controle com todos os reagentes exceto a enzima foi feito no intuito de averiguar a possibilidade de degradação do material.

3.2.2. Subclonagem da toxina alfa no vetor pMAL -c2e

3.2.2.1. Digestão enzimática do vetor pMAL -c2E modificado

O vetor pMAL -c2E foi previamente modificado pelo doutorando Anderson Oliveira Carmo, no intuito de adicionar ao vetor original um sítio de clivagem para a protease recombinante TEV ("*Tobacco Etch Virus*"). Essa construção se encontra disponível no banco de plasmídeos do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares. No intuito de linearizar esse vetor, foi realizada uma reação de digestão com a enzima de restrição *HindIII* de acordo com a descrição no item 3.2.1.7. Ambos os produtos digeridos foram visualizados após resolução eletroforética em agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e a banda foi excisada para purificação utilizando o kit "Wizard PCR Preps DNA Purification System" da Promega, de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do produto purificado foi estimado através de uma nova resolução eletroforética em gel de agarose 0,8 %.

3.2.2.2. Ligação do inserto no vetor de expressão

A ligação da ORF da toxina alfa madura ao vetor pMAL -c2E, ambos já purificados, foi realizada variando as quantidades do inserto, conforme detalhado na Tabela 5. Cada reação tinha um volume final de 10 μ L e os tubos foram incubados a 4 °C por 16 horas. Em seguida, as reações de ligação foram unidas em um único tubo e precipitadas com 10 % do volume de solução de acetato de sódio a 3 M e 2 volumes de etanol absoluto. O produto de ligação precipitado foi ressuscitado em 5 μ L de água bidestilada e eletrotransformados em *E. coli* XL1 Blue, como descrito no item 3.2.1.3. Entretanto, a seleção dos transformantes ocorreu pelo crescimento de colônias em placas LB-ágar com antibiótico.

TABELA 5: Reação de ligação da ORF da toxina alfa de *C. perfringens* ao vetor pMAL -c2E.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Vetor (100 ng/ μ L)	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Tampão 10X	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
150 u/ μ L de T4 DNA Ligase	0,1 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L
Inserto (50 ng/ μ L)	2 μ L	4 μ L	5 μ L	6 μ L
Água q.s.p.	4 μ L	2 μ L	1 μ L	0

3.2.2.3. Seleção de clones positivos (*pMAL: α*) e com a matriz de leitura correta

A identificação dos clones positivos *pMAL: α* foi feita através de PCR de colônia semelhante à detalhada no item 3.2.1.4, porém foram utilizados os primers que se anelam ao vetor (malE: 5' GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC 3'; e M13F). Os produtos amplificados foram visualizados após resolução eletroforética em agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Os clones que apresentavam o inserto, de acordo com o tamanho esperado da banda, foram submetidos a uma nova reação de PCR no intuito de verificar se a matriz de leitura estava correta. Para isso, foram utilizadas as seguintes combinações de iniciadores: A) iniciador direto do vetor (malE) e iniciador reverso do inserto (α R *HindIII*); e B) iniciador direto do inserto (α F *HindIII*) e iniciador reverso do vetor (M13F).

Os plasmídeos dos clones que amplificaram com ambas combinações de iniciadores descritas anteriormente foram submetidos a uma reação de sequenciamento conforme descrito no item 3.1.5. Foram utilizados 200ng de plasmídeo e 1,6 pmol de cada iniciador do vetor (malE e M13F) e os eletroferogramas analisados com o pacote phred phrap consed (ver 3.1.6).

3.2.2.4. Extração e purificação do DNA plasmidial *pMAL: α* e transformação em *BL21-DE3*

O mesmo protocolo de extração plasmidial descrito em 3.2.1.5 foi feito para posterior transformação desse plasmídeo em bactéria de expressão. A linhagem escolhida foi *E. coli* BL21-DE3 (Phoneutria) e a eletrotransformação foi realizada como descrito em 3.2.1.3.

3.2.2.5. Expressão piloto da toxina alfa em *pMAL -c2E* na linhagem *BL21-DE3*

Para identificar se os clones com *pMAL- α* em BL21-DE3 eram capazes de produzir a toxina alvo, foi realizada uma expressão piloto testando a indução por IPTG. Uma colônia dos clones obtidos em 3.2.2.3 foi inoculada em 10ml de meio 2XYT suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e a cultura foi incubada 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após esse período, 1ml dessa cultura foi inoculado em 100ml de meio 2XYT com ampicilina (100 μ g/mL) e a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir $DO_{600nm} = 0,5$. No momento em que a cultura atingiu essa densidade celular, foi feita a indução da expressão da proteína recombinante através da adição de

IPTG para a concentração final de 0,3 mM e a cultura foi novamente incubada durante 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Paralelamente, foi mantida uma cultura nas mesmas condições, porém sem indução com o IPTG. Um outro controle (negativo da expressão) foi realizado consistindo na expressão do plasmídeo pMAL sem inserto em *E. coli* BL21 (DE3).

3.2.2.6. SDS-PAGE da expressão da toxina alfa recombinante

A expressão da toxina alfa recombinante em pMAL -c2E foi verificada e comparada com o controle negativo da expressão e com o padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*) através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel de separação foi constituído de 12,5% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de PSA (persulfato de amônia) e 0,05 % (v/v) de TEMED (N'-N'-N'-N'-tetra metilenodiamina). O gel de concentração era constituído de 4 % (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); (PSA) 50 mM e TEMED 0,025% (v/v). O gel de separação foi preparado e colocado entre as placas de vidro (dimensão 10,0 x 8,0 x 0,8cm), e após se polimerizar foi adicionado o gel de concentração. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante 2x para SDS-PAGE (100 mM de Tris-HCl pH:6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de β-mercaptoetanol; 20% de Glicerol) com redução e fervidas durante 5 minutos e aplicadas ao sistema de eletroforese.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente em tampão Tris-glicina (1,5% de Tris-Base, 7,2% de glicina e 0,5% de SDS), à 100V, 24 mA, durante cerca de 2,5 horas. Após eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante (1,25 g de Comassie blue, 225 mL de metanol, 45 mL de ácido acético glacial e 225 mL de água destilada) por 45 minutos e lavados em solução descorante (45 mL de etanol, 90 mL de ácido acético glacial e 850 mL de água destilada) até o desaparecimento da coloração de fundo.

3.2.2.7. Padronização das condições de expressão e lise celular

Foram testadas diferentes condições de expressão da toxina alfa, no intuito de obtê-la na forma solúvel, facilitando os procedimentos de purificação posteriores. Dentre elas: tempo de indução com 0,3mM de IPTG (2, 4, 8 e 16 horas), temperatura (4 °C, 25 °C e 37 °C) e concentração de IPTG (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM e 0,3 mM). Para viabilizar o andamento dos experimentos, não foram testadas todas as combinações das variáveis citadas, priorizando as condições recomendadas pelo manual do vetor (New England Biolabs, 2003).

Os cultivos foram feitos a partir um pré-inóculo com 10ml de 2XYT com ampicilina (100 µg/mL), com crescimento *overnight* a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, foi adicionado 1ml do pré-inóculo a 100 ml de 2XYT com ampicilina (100 µg/mL) e o crescimento realizado de

acordo com as variáveis citadas acima. A indução da expressão com IPTG foi sempre realizada quando a cultura alcançava aproximadamente a $DO_{600nm} = 0,5$. Após o tempo de indução ser completado, a cultura era mantida em gelo por 5 minutos e em seguida centrifugada a 4500 rpm, 4 °C durante 15 minutos. O sobrenadante era descartado e o restante de meio removido com papel toalha. As células foram ressuspensas em *Column Buffer* (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA), tampão utilizado na purificação por cromatografia de afinidade sugerida pelo manual do vetor (New England Biolabs, 2003). As células foram congeladas a -20°C overnight e, no dia seguinte, descongeladas e mantidas em banho de gelo para sonicação (três pulsos de 20 segundos a 40% de amplitude por três vezes).

Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação a 10000 g, 4°C durante 30 minutos, no qual foram separados a porção solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). Essas alíquotas foram visualizadas em gel SDS-PAGE 12,5% como detalhado em 3.2.2.6.

Além do congelamento da célula seguido de sonicação, outros métodos de lise celular foram testados, afim de garantir o rompimento bacteriano. Dentre eles, a prensa francesa, método de lise física que utiliza alta pressão para o rompimento celular. Após centrifugação inicial, as bactérias foram ressuspensas em 20 mL de *column buffer* e submetidas à lise em prensa francesa por três vezes consecutivas, sob pressão de 2000 psi. O extrato bacteriano foi mantido em gelo após a lise, seguindo passo de centrifugação para obtenção das frações solúveis e insolúveis. Uma outra alternativa para lise foi ressuspender as células com tampão de lise (50 mM de Tris, 1mM EDTA, 50 mM de glicose pH 8,0) acrescido de 4 mg/ml de lisozima. O material permaneceu a 37 °C durante 15 minutos, para que a lisozima atuasse e, em seguida, foi congelado, descongelado e sonicado. Entretanto, o método de lise mais utilizado foi o congelamento seguido de sonicação.

3.2.2.8. Solubilização dos corpos de inclusão, purificação da alfa toxina recombinante e digestão com protease TEV

Para obter a toxina alfa recombinante solúvel foram testados alguns agentes desnaturantes. Assim, a fração insolúvel da proteína recombinante, contida em corpos de inclusão, foi solubilizada utilizando as seguintes substâncias: Uréia 6M, DMSO 100%, Acetato de Sódio 3M, Tween 20 1%, Triton X-100 1%. Após intensa homogeneização, com o auxílio de vórtex, a mistura contendo o *pellet* mais o agente foi centrifugada durante 5 minutos a 13000 rpm. A análise da solubilização dos corpos de inclusão foi feita através da verificação de formação de um novo *pellet* e em gel de poliacrilamida com SDS 12,5% (item 3.2.2.6).

A construção utilizada produz a toxina alfa recombinante fusionada a MBP. Para dissociação dessas proteínas, foi realizada uma digestão utilizando a protease TEV recombinante produzida pelo doutorando Anderson O. Carmo. Uma porção do *pellet* contendo a toxina alfa fusionada a MBP foi

primeiramente solubilizada em uréia 6M e a digestão foi realizada nas seguintes condições: 25ml das proteínas solubilizadas, 25ml de *column buffer* e 5ml da TEV recombinante foram homogeneizados e mantidos a 37°C sob agitação a 200rpm durante 16 horas.

Foi priorizado a cromatografia de afinidade para a purificação da alfa fusionada, já que a MBP possui afinidade com a amilose. Uma porção do *pellet* contendo as proteínas insolúveis foi ressuspenso em 2ml de *column buffer*. Uma coluna de vidro foi preparada com 15ml de resina de amilose (New England BioLabs) e acoplada a uma bomba peristáltica, mantendo um fluxo de 1ml/min. A amostra foi aplicada e os procedimentos de purificação foram realizados de acordo com instruções do fabricante (New England Biolabs, 2003).

3.2.3. Subclonagem da toxina alfa no vetor pET26b

Em geral, a mesma sequência da metodologia usada na subclonagem da toxina alfa no vetor pMAL -c2E foi adotada para a construção dos cassetes de expressão no vetor pET26b. Nos próximos itens serão detalhados somente as diferenças existentes entre ambas estratégias.

3.2.3.1. Digestão enzimática do vetor pET26b

A linearização desse vetor foi realizada a partir de uma reação de digestão usando as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* de acordo com a descrição no item 3.2.1.7.

3.2.3.2. Ligação do inserto no vetor de expressão

A ligação da ORF da toxina alfa madura ao vetor pET26b (pET26b: α) ocorreu da mesma forma descrita em 3.2.2.2, porém o antibiótico usado todos os meios de cultura para essa construção foi a Canamicina (50 μ g/mL).

3.2.3.3. Seleção de clones positivos (pET26b: α)

A identificação dos clones positivos pET26b: α foi feita através de PCR de colônia semelhante à detalhada no item 3.2.1.4, utilizando os iniciadores que se anelam ao vetor (T7F: 5' TAATACGACTCACTATAGG 3', e T7R: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'). Para essa construção não foi necessário uma nova PCR usando combinação de iniciadores do vetor e do inserto já que foram usadas duas enzimas de restrição diferentes, não sendo possível a ligação invertida da ORF. Os plasmídeos dos clones positivos foram submetidos a uma reação de sequenciamento conforme descrito no item 3.1.5, utilizando 200 ng de plasmídeo e 1,6 pmol de cada iniciador do vetor (T7F e T7R).

3.2.3.4. Extração e purificação do DNA plasmidial pET26b: α e transformação em linhagens de expressão

O plasmídeo pET26b: α extraído como descrito em 3.2.1.5 foi eletrotransformado nas linhagens *E. coli* BL21-DE3 (Phoneutria) e em *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen), já que a última possui tRNA para códons raros.

3.2.3.5. Expressão piloto da toxina alfa em pET26b em ambas linhagens

Foi feita uma triagem de qual clone e linhagem apresentava um maior nível de expressão. Para isso, foi realizada uma expressão piloto com indução por IPTG usando como pré-inóculo uma colônia dos clones obtidos em 3.2.3.3 inoculada em 10ml de meio 2XYT suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essa cultura foi incubada 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, 100 μL dessa cultura foi inoculada em 10ml de meio 2XYT com canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,5$, quando foi feita a indução da expressão com IPTG (0,6 mM). A cultura foi novamente incubada durante 16 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Foi feito um controle negativo da expressão consistindo na expressão do plasmídeo pET26b sem inserto em ambas linhagens de *E. coli*.

Após 16 horas de indução, as culturas foram centrifugadas a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C e uma pequena porção do precipitado foi ressuscitado em tampão de amostra desnaturante de SDS-PAGE. O resultado dessa expressão foi visualizado após resolução eletroforética em gel de SDS-PAGE, como detalhado em 3.2.2.6.

3.2.3.6 Padronização das condições de expressão, choque osmótico e lise celular

Para a construção pET26b: α , foram testados diferentes tempos de indução com 0,6mM de IPTG (2, 4, 6 e 16 horas), com um controle sem a adição de IPTG; e diferentes temperaturas (4°C, 25°C e 37°C). Inicialmente, os cultivos tiveram um volume final de 100ml, e originaram de 100 μL de um pré-inóculo de 10ml de 2XYT contendo os antibióticos.

Após o tempo de indução ser completado, a cultura era mantida em gelo por 5 minutos e em seguida centrifugada a 4500 rpm, 4 °C durante 15 minutos. O sobrenadante era descartado e o restante de meio removido com papel toalha. A partir dessas células centrifugadas, foi realizado um choque osmótico para avaliar se a proteína recombinante foi direcionada para o espaço periplasmático pelo *pelB leader*. Para isso, as células foram ressuscitadas em 30 ml de solução hipertônica (20% de sacarose, 30 mM de Tris-HCl, pH 8,0) e foi adicionado 60 μL de EDTA 0,5 M. As células foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente durante 10 minutos, centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em 30 mL de solução hipotônica (5 mM MgSO_4) gelada e mantido sob agitação em banho de gelo por 10 minutos. Durante

esse passo, as proteínas são liberadas no tampão. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos o sobrenadante foi armazenado. O resultado desse procedimento foi visualizado após resolução eletroforética em gel SDS-PAGE.

Visando a purificação da proteína recombinante em coluna de afinidade, outro procedimento de lise foi feito a partir da ressuspensão das células após centrifugação em tampão de ligação (Fosfato de Sódio 20mM, NaCl 500mM, Imidazol 30mM, Uréia 8M, pH 7,4). O sedimento foi ressuspensionado de forma vigorosa, objetivando a lise bacteriana e a solubilização dos corpos de inclusão. Esse material foi mantido a -20 °C overnight e, no dia seguinte, foi descongelado e re-congelado por três vezes. Em seguida, o extrato bacteriano foi submetido à sonicação em banho de gelo (três pulsos de 20 segundos a 40 % de amplitude por 3 vezes). Por fim, foi realizada uma nova centrifugação a 10.000 g, 4 °C durante 30 minutos, no qual na porção solúvel (sobrenadante) estava a proteína recombinante, uma vez que ela tinha sido solubilizada devido a presença de Uréia 8M no tampão. A partir desse ponto, procedeu-se a purificação do material em condições desnaturantes, como indicado na sessão seguinte.

3.2.3.7. Purificação das isoformas da toxina alfa recombinante

A estratégia utilizada para a clonagem e expressão das isoformas da alfa recombinante continha sequências de seis histidinas localizadas nas extremidades C- terminal. Desta forma, a cromatografia de afinidade com metal imobilizado (*Immobilized metal ion affinity chromatography* - IMAC) foi o método de purificação proteica adotado, utilizando a coluna pré-empacotada HisTrap™ HP (GE Healthcare). Essa coluna é composta por uma matriz de Sepharose com Níquel, metal que possui afinidade com a histidina, e apresenta uma alta capacidade de separação da toxina recombinante. A proteína é retida na matriz cromatográfica pelo metal imobilizado, sendo liberada na presença de altas concentrações de Imidazol.

A purificação das isoformas recombinantes foi realizada em sistema HPLC modelo Shimadzu Prominence (Shimadzu Co., Japan). A coluna HisTrap™ HP (GE Healthcare) usada era de 5ml com dimensões de 1,6 x 2,5 cm. A fase móvel consistiu no tampão de ligação (Fosfato de Sódio 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 30 mM, Uréia 8M, pH 7,4) e o fluxo foi mantido a 0,5 ml/min. Todas as soluções foram filtradas e a amostra centrifugada antes de ser aplicada ao sistema. As amostras foram monitoradas em absorvância de 280 nm. Alíquotas do material não ligado à coluna foram coletadas separadamente. Após 70 minutos, a fase móvel foi substituída para o tampão de eluição (Fosfato de Sódio 20mM, NaCl 500mM, Imidazol 500mM, Uréia 8M, pH 7,4) e a proteína de interesse foi desligada da coluna. Todas as frações obtidas foram visualizadas após resolução eletroforética em SDS-PAGE. A uréia e o imidazol foram removidos da amostra através de uma diálise realizada contra um solução de PBS.

3.3. CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DAS ISOFORMAS ALFA RECOMBINANTES

3.3.1. Dosagem das isoformas purificadas

Para estimar a quantidade das isoformas purificadas, foi utilizado a dosagem de proteína pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) e através do sistema de quantificação por intensidade de bandas em SDS-PAGE. Para o método de Lowry foram seguidas as especificações do fabricante (Bioagency) usando a albumina do soro bovino (BSA) para estabelecer a curva padrão.

Para estimativa através de SDS-PAGE, foram aplicadas em um gel 12,5% quantidades conhecidas da proteína BSA e diferentes volumes (quantidades desconhecidas) de cada isoforma, no intuito de correlacionar a intensidade das bandas de quantidade conhecida (BSA) com as bandas de quantidade desconhecida (alfa).

Dessa forma, foi aplicado em um gel SDS-PAGE 12,5 %:

- BSA: 1,4 µg, 4,2 µg, 7 µg, 14 µg e 28 µg.
- Isoformas da toxina alfa: 1 µL, 5 µL e 10 µL.

3.3.2. Produção de soro anti-alfa em coelhos

Para este experimento foram utilizados coelhos (fêmeas) da raça Nova Zelândia pesando aproximadamente 2 Kg e com cerca de 4 meses, provenientes da Fazenda da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, em ciclos de claro-escuro, com livre acesso a água e ração. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo 144/2012.

Para a imunização dos animais, foram estabelecidos os seguintes grupos: grupo 1- imunógeno α AV1b; grupo 2- imunógeno α Z23; grupo 3- imunógeno toxina alfa nativa (Sigma - P7633). Cada grupo era composto por 2 animais. Antes da primeira dose de imunógeno, foi feita uma sangria em todos os animais para obtenção do soro controle pré-imune. Após 5 dias da coleta do soro pré-imune, os coelhos receberam 25 µg de imunógeno homogeneizado em 1 ml de adjuvante completo de Freund's (Sigma). As injeções foram aplicadas por via subcutânea em 4 pontos diferentes no dorso do animal (dia 1). Nas doses seguintes, nos dias 15 e 30, o adjuvante completo foi substituído pelo incompleto e a quantidade de imunógeno foi 50 e 100 µg respectivamente. Quinze dias após a última dose, os coelhos foram sangrados e o soro foi titulado por ELISA. A Tabela 6 resume o calendário adotado para a imunização dos animais.

TABELA 6: Programa para obtenção de soro anti-toxina alfa de *C. perfringens*.

	Adjuvante de Freund's	Dose de Antígeno	Antígeno	Dia do Experimento	Dia da Sangria
1ª dose	Completo	25ug	α AV1b	0	15
	Completo	25ug	α Z23	0	15
	Completo	25ug	Nativa Sigma	0	15
2ª dose	Incompleto	50ug	α AV1b	15	30
	Incompleto	50ug	α Z23	15	30
	Incompleto	50ug	Nativa Sigma	15	30
3ª dose	Incompleto	100ug	α AV1b	30	45
	Incompleto	100ug	α Z23	30	45
	Incompleto	100ug	Nativa Sigma	30	45

Durante a sangria dos coelhos, uma das orelhas foi lavada com etanol a 70%. Um algodão embebido de Xilol foi colocado temporariamente na extremidade da orelha no intuito de estimular a circulação local. No momento em que a veia marginal teve seu calibre aumentado, foi feita uma pequena incisão nessa veia. Foram coletados 2 mL de sangue para obtenção de soro pré-imune, 2 mL de sangue após 1ª e 2ª doses e 20 mL de sangue após a 3ª dose, em um tubo de cônico plástico. Em seguida, o sangramento da orelha foi estancado por compressão no local. Não foi adicionado anticoagulante ao sangue coletado.

Para a preparação do soro, o sangue recém coletado foi mantido a 4 °C por 1 hora para total coagulação. Com o auxílio de uma haste de metal estéril, os coágulos foram descolados da parede do tubo e, em seguida, centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O soro, presente na fase superior líquida, foi transferido para outro frasco e centrifugado novamente em microtubos de 1,5 mL a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -20 °C.

3.3.3. Teste de ELISA indireto

Os soros obtidos com a imunização dos coelhos foram submetidos ao ELISA para verificar se a toxina alfa recombinante foi imunogênica e se os anticorpos produzidos pelas isoformas recombinantes apresentavam reatividade contra a toxina nativa com uma boa titulação. Os soros obtidos na imunização foram titulados a cada sangria, contra todos os antígenos (α Z23, α AV1b e alfa nativa), para que fosse acompanhada a produção de soro pelos coelhos. Todas as amostras foram feitas em duplicata. Como controle negativo, foi utilizado o soro pré-imune.

As placas de ELISA foram sensibilizadas com 5 μ g/mL de antígenos diluídos em tampão carbonato (15 mM de Na₂CO₃, 35 mM de NaHCO₃; pH 9,6) com volume final de 100 μ L por poço e incubado durante 16 horas a 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem para ELISA (0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20). A placa foi bloqueada com 100 μ L de solução de bloqueio (2% de caseína em tampão salina fosfato-PBS) e incubada a 37 °C por 1 hora. Após quatro lavagens com solução de lavagem, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora com soro imune e pré-imune com diluições seriadas (de 1:100 a 1: 25600) em tampão de incubação (0,2% de

caseína em PBS e 0,05% de Tween 20). A placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem e incubada a 37°C por 1 hora com conjugado anti-IgG de coelho ligado a peroxidase e diluído 1:10.000 em tampão de incubação. A placa foi novamente lavada quatro vezes e em seguida adicionados 100 µL por poço de solução de substrato [10 mL de tampão citrato (50 mM de Na₂HPO₄, 24 mM de ácido cítrico, pH da solução 5,0), 2 mg de Ortho-Phenylene-Diamina (OPD), 2 µL de peróxido de hidrogênio]. A placa foi mantida por 15 minutos no escuro e a reação foi interrompida com 20 µL por poço de H₂SO₄ diluído 1:20. Os valores de absorbância foram determinados no comprimento de onda de 490 nm em leitor de ELISA.

As placas de ELISA foram sensibilizadas, cada uma com um antígeno: com a recombinante αZ23, a recombinante αAV1b e com a alfa nativa (Sigma); a fim de se testar a capacidade de reconhecimento dos soros com cada um dos antígenos. Foram testados os soros pré-ímmune, anti-αZ23, anti-αAV1b e anti-alfa nativa.

3.3.4. Ensaio de atividade de lecitinase em emulsão de gema de ovo

Esse teste objetivou comparar se as duas recombinantes produzidas a partir da construção pET26b:α possuíam atividade de lecitinase, catalisando a hidrólise de lecitina (fosfatidilcolina) em fosforilcolina e 1,2 diacilglicerol. Para isso foi preparada a emulsão de gema de ovo da seguinte forma: a superfície dos ovos foram lavados com água e sabão e, após secos, os ovos foram imersos em etanol 70% durante cerca de 30 minutos. Os ovos foram novamente secados com gaze estéril e a casca quebrada de forma asséptica, com o auxílio de uma pinça flambada. Em seguida, separou-se a gema da clara, transferindo a gema para uma proveta estéril. Foi adicionado o mesmo volume de PBS, homogeneizando completamente a solução.

As placas contendo essa emulsão foram preparadas baseado no protocolo modificado de Titball *et al.* 1989, adicionando ao meio LB-ágar: 10% de emulsão de gema de ovo, canamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (34 µg/mL) e IPTG 0,6mM. Algumas placas foram produzidas sem o IPTG, testando a necessidade de indução para a expressão protéica.

Foram realizados dois experimentos para determinação de atividade de lecitinase. Primeiramente, colônias de *E. coli* Roseta (DE3) contendo os plasmídeos da construção pET26b:α foram estriadas em placas contendo LB-ágar/emulsão de gema de ovo suplementado com os antibióticos supracitados, na presença e na ausência de IPTG 0,6 mM. Como controle das proteínas bacterianas, foi estriado uma colônia de *E. coli* Roseta (DE3) contendo o vetor pet26b sem inserto. As placas foram incubadas durante 16 horas a 37 °C e a interpretação do resultado foi baseado na formação de zonas opacas onde houve o crescimento do microorganismo.

Outro experimento realizado teve como objetivo acompanhar a dinâmica da expressão da toxina alfa recombinante ao longo do tempo. Para isso, foi feita uma expressão com volume final de

100ml, conforme detalhado em 3.2.3.5, dos clones $\alpha Z23$, $\alpha AV1b$ e do controle de pET26b sem inserto. Após a indução com IPTG 0,6mM foram coletadas alíquotas de 700 μ L de cada cultura nos tempos 0, 2, 4, 17 e 24 horas. Cada alíquota foi centrifugada durante 5 minutos a 13000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi cuidadosamente removido e reservado. O *pellet* foi ressuspenso em PBS estéril, para lavar as células e, centrifugado nas mesmas condições anteriores. O novo sobrenadante foi descartado e o *pellet* novamente ressuspenso em PBS estéril. Três microlitros desse *pellet* e o sobrenadante reservado da primeira centrifugação foram aplicados sobre placas de LB-ágar/emulsão de gema de ovo suplementado com os antibióticos e IPTG 0,6mM e incubados a 37°C. O resultado foi determinado a partir da opacidade formada nas áreas aplicadas.

3.3.5. Ensaio de atividade hemolítica em ágar-sangue

Foi avaliada a atividade hemolítica em ágar sangue preparado com meio sólido de Mueller Hinton (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro. Foi também adicionado ao meio antibióticos (canamicina 50 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL) e IPTG 0,6mM. Colônias de *E. coli* Rosetta (DE3) contendo a construção pET26: α de ambas isoformas ($\alpha Z23$ e $\alpha AV1b$) e o controle negativo (*E. coli* com pET26 sem inserto) foram estriadas nessas placas e incubadas durante 16 horas a 37 °C. A leitura do resultado foi realizada após incubação a 4 °C.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOFORMAS DA TOXINA ALFA DE *C. PERFRINGENS*

4.1.1. Isolamento de *C. perfringens* a partir de amostras de fezes de animais e ambientais

Foi possível obter o isolamento primário de *C. perfringens* com sucesso na maioria das placas (Figura 9), e em apenas seis placas não houve crescimento de nenhuma colônia. Embora algumas vezes houvesse crescimento apenas de colônias brancas, e não enegrecidas conforme característica de crescimento de *C. perfringens* em Agar SPS, essas colônias atípicas foram coletadas e submetidas à identificação molecular através da amplificação do gene *plc* de *C. perfringens*. Em somente duas colônias atípicas houve a amplificação do gene *plc*. Este gene codifica a toxina alfa presente em todos os tipos de *C. perfringens*, sendo um controle positivo para a confirmação da existência deste microorganismo.

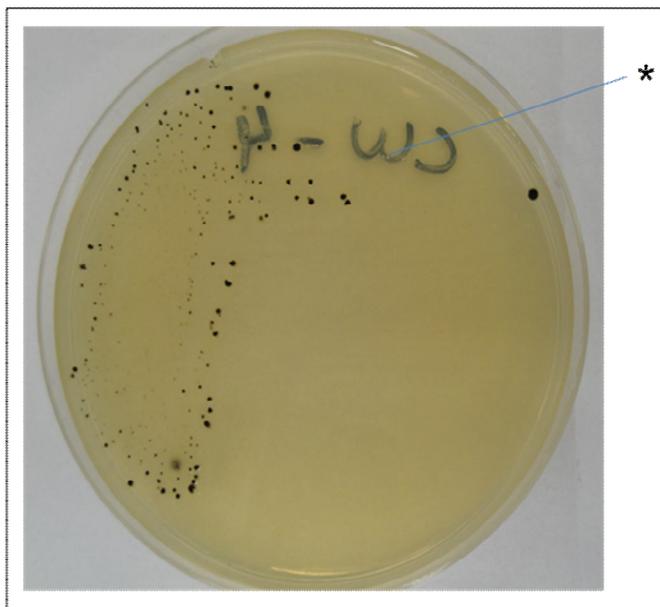


FIGURA 9: Placa de Ágar SPS ilustrando o isolamento de *C. perfringens*. A imagem mostra o aparecimento de colônias enegrecidas, após a redução do Sulfito. O asterisco destaca colônias brancas que também foram coletadas para confirmação molecular da espécie.

4.1.2. Amplificação do gene *plc*

Foi possível obter um resultado satisfatório nas amplificações por PCR da toxina alfa, confirmando a presença de *C. perfringens*. Foram coletadas 135 colônias que foram individualmente submetidas à extração de DNA e, algumas vezes, mais de uma colônia da mesma amostra. Foi obtido amplificação positiva de 73 isolados, que foram posteriormente sequenciados. Uma descrição completa desse isolados está presente na Tabela 3 (seção Material e Métodos, item 3.1.1), o qual

descreve a identificação do isolado, sua fonte, o estado de saúde do animal o qual a bactéria foi isolada, seu tipo toxigênico e seu haplótipo.

O protocolo utilizado para a extração do DNA descrito no item 3.1.2, ao contrário daqueles que utilizam proteinase K ou sílica, foi o que demonstrou melhor desempenho. Em geral, na primeira reação de PCR não houve amplificação visível no gel de agarose 1,5% corado. Por outro lado, na segunda reação, onde foi utilizado como molde o produto de PCR, foi possível visualizar a banda no tamanho esperado (1191pb; Figura 10).

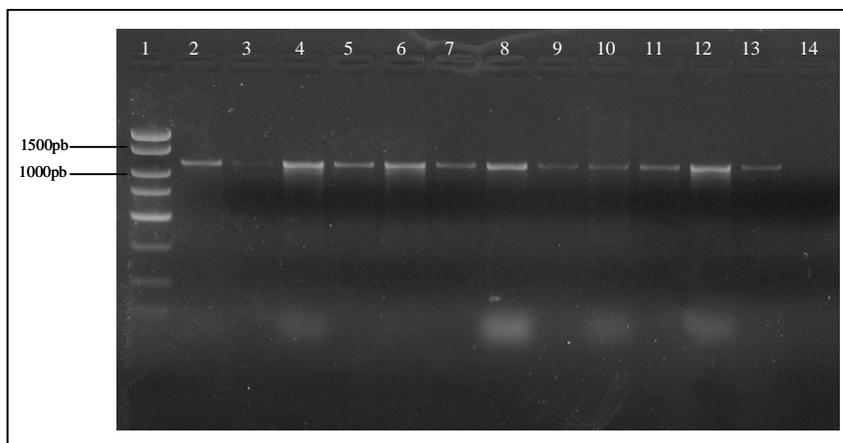


FIGURA 10: Resolução eletroforética do produto amplificado do gene *plc* em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo; Canaleta 1- Marcador de Peso Molecular "PCR Marker" (Amresco); 2 a 13- amostras obtidas nesse estudo; 14- Controle negativo.

4.1.3. Tipificação dos isolados

As amostras positivas para o gene *plc* foram submetidas a uma reação de PCR multiplex (Figura 11), amplificando simultaneamente o gene das principais toxinas de *C. perfringens*, no intuito de classificá-las de acordo com Petit *et al.* (1999). A maioria dos isolados (95%) foram classificados como *C. perfringens* tipo A, sendo que 56% deles possuíam o gene *cpb2*, que codifica a toxina beta-2 (Tabela 3). A linhagem de referência da ATCC 3628 foi confirmada como tipo C e somente dois isolados foram identificados sendo do tipo D (originado de um caprino e um bovino doente). Nenhuma linhagem possuiu o gene que codifica a enterotoxina (*cpe*). Somente em quatro isolados não foi possível a identificação do tipo toxigênico, devido a não amplificação seguindo as condições padronizadas.

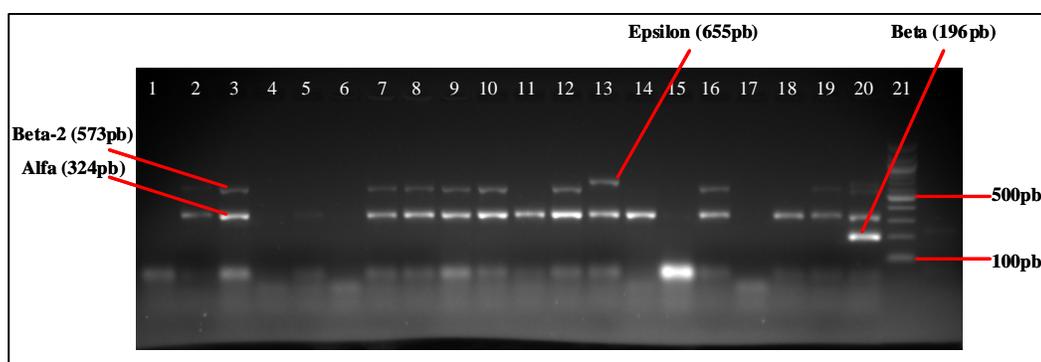


FIGURA 11: Resolução eletroforética da reação de PCR Multiplex em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, para classificação dos isolados obtidos quanto ao seu tipo toxigênico. Canaletas 1, 4, 6, 15, 17: amplificação não funcionou; 2-3, 7-10, 12, 16, 19: *Clostridium perfringens* tipo A/beta-2; 5, 11, 14, 18: *Clostridium perfringens* tipo A; 13- controle interno de *Clostridium perfringens* tipo D; 20: controle interno de *Clostridium perfringens* tipo B; 21- Marcador de Peso Molecular 100pb (Invitrogen).

4.1.4. Caracterização molecular do gene *plc*

Foram obtidos sequenciamentos bidirecionais de qualidade do gene codificante da toxina alfa de 73 isolados positivos, compreendendo toda a sequência da toxina madura. As sequências foram depositadas no GenBank com os números de acessos JQ071535–JQ071577. Dos 1113 nucleotídeos analisados, foram identificados 71 sítios polimórficos resultando em 43 haplótipos (Tabela 7). O haplótipo 18 foi o mais comum, presente em 8 isolados oriundos de cães saudáveis, bovinos doentes e ração de frango.

Após a tradução *in silico* das sequências nucleotídicas, foram identificadas 30 substituições de aminoácidos, correspondendo a 34 isoformas (Tabela 8). Analisando os resíduos alterados, verificou-se que em sete isoformas (17,6%) - sendo elas a 1, 3, 11, 12, 16, 19 e 26 - houve substituições de aminoácidos considerados essenciais para estrutura ou função da toxina (Naylor *et al.*, 1998; Eaton *et al.*, 2002). A isoforma 25 foi a que apresentou maior número de alterações (11), quando comparada a sequência referência (Número de Acesso: 1QM6). A isoforma 11 foi selecionada para clonagem e expressão por possuir uma alteração no resíduo 11 (H→Y), onde está um aminoácido essencial para a ligação do zinco e, conseqüentemente, para atividade enzimática. Outra isoforma escolhida para clonagem e expressão foi a isoforma 7, a mais prevalente na nossa amostragem, sem alterações em resíduos importantes.

TABELA 7: Haplótipos e sítios polimórficos com os nucleotídeos alterados.

Posição Alterada	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43									
12	G	A	.	A	.	A	A	A	A	A	.	A	A	A	A	A	A	.	A	A	.	A	A	.	.	A	.	A	A	.	A	.	A	.	A	A	.	A	A	A	.	.						
18	T	.	.	C	C	C	.	C						
31	C	T					
47	C	A					
54	G	A	A	A	T	T	.	A	.	T	T	A	.	A	T	.	.	A	.	.	A	A	T	.	.					
55	G	A	A	A	A	A	.	A	.	.	.	A	.	.	A	A	A	.	.					
60	A	G	.				
61	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
63	C	A			
74	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
76	A	C	C	C	C	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C					
81	C	.	A	.	T	.	.	T	T	.	.	T	A	.	.		
83	A	G	.	.	G		
86	A	G				
98	G			
110	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
129	G	T	T	T		
141	G	A			
165	A	T	.		
180	T	C	.	C	C	C	C	C	C	C	.	.	C	.	C	C	C	C	C	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C					
183	A	C	.	C	C	C	C	C	C	C	.	.	C	.	C	C	C	C	.	C	.	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C	.	C	C						
204	T	C	C	.		
215	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C					
223	G	
276	C	T			
309	A	G	G	.	.	G			
318	A	G	G			
333	A	.	.	.	G	G	G	G	G	G	.	.	.	G	.	.	G	.	.	G	G	.	.				
336	A	C			
361	C	A	.	.	.	A			
369	G			
380	A	G	.	.	.	G		
412	G	.	.	A		
426	C	T	.		
456	G	.	.	A	.	A	.	.	.	A	.	.	A	.	.	A	.	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.	A	.				
468	G	A	.	A	.	.	A	A	.	A		
491	T	C	C	C	C	.	C	.	.	C	.	C	.	C	C	C	.	.			
500	C	T	.		
520	G	.	.	A	.	A	.	.	.	A	.	.	A	.	.	A	A	.	
521	C	A	.	A	A	A	.	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
529	A	G	.	G	G	G	.	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G			
549	A	.	.	G	.	G	.	.	.	G	G	G	.	G
600	A	G		
612	C	.	.	.	T	.	T	T	T	T	.		
654	T	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	C	.		
658	G	T	.		
673	T	C	C	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C	.	C				
675	A	G		
699	A	G	.	.	.	G	.	G	G	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G				
756	A	C	.	
780	T	G	G		
801	A	G	.	.	G	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G	.	G	G			
816	A	G		
850	G	A			
884	C																																															

TABELA 8: Posição dos aminoácidos variáveis das isoformas caracterizadas.

Isoforma	Haplótipo	Resíduo																																	
		11*	16	19	21	25	26	28	29	33	37	43	72	75	121	127	138	164	167	174	177	220	284	295*	301	320	335	337*	345	360	364*				
1QM6 A Referência		H	T	V	I	D	L	K	N	S	N	E	P	D	L	Y	A	I	A	A	T	A	D	P	T	D	S	A	I	W	N				
Isoforma 1	H1	.	.	.	L	G	M	.	.	I	.	L	P	V	V	.	.				
Isoforma 2	H2	.	.	N	T	.	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 3	H3	T	P	V	V	.	.				
Isoforma 4	H4	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 5	H5	M	T	.	D	A	P				
Isoforma 6	H6	T	T	.	D	A	P				
Isoforma 7	H7, H18	.	.	I	N	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 8	H8	.	.	I				
Isoforma 9	H9	.	.	I	T	.	N	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 10	H10	D	A	P				
Isoforma 11	H11	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 12	H12	.	.	Y	D	A	.	Q	P	.	V	G	.				
Isoforma 13	H13, H17	T	.	D	A	P				
Isoforma 14	H14, H42	N	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 15	H15	M	.	.	.	D	.	I	C	.	.	T	.	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 16	H16	M	.	.	.	D	D	A	.	N	.	N	.	.	.	P	.	V	.	D				
Isoforma 17	H19	P				
Isoforma 18	H20	M	.	.	.	D	.	I	C	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 19	H21	D	A	.	Q	P	.	V	.	.				
Isoforma 20	H22	D	A	P	.	L	.	.				
Isoforma 21	H23	M	.	S	D	A	P				
Isoforma 22	H24	.	.	I	N	A	P				
Isoforma 23	H25, H36	T				
Isoforma 24	H26, H30, H33, H40	.	.	I	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 25	H27	M	.	I	.	D	.	N	V	D	A	A	N	P	.	V	.				
Isoforma 26	H28	P	V	V	.	.				
Isoforma 27	H29, H39	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 28	H31, H41	V	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 29	H32				
Isoforma 30	H34	.	.	I	V	D	A	P	.	V	.	.				
Isoforma 31	H35	P	.	V	.	.				
Isoforma 32	H37	T	P	.	V	.	.				
Isoforma 33	H38	R	D	A	S	P	.	V	.	.				
Isoforma 34	H43	R	D	A	P	.	V	.	.				

*Resíduos essenciais de acordo com Naylor et al., 1998; Eaton et al., 2002

Ao buscar as sequências contendo toda a toxina alfa madura de *C. perfringens* disponíveis no banco de dados do NCBI, foram obtidas 334 sequências. Destas, foi possível inferir 127 haplótipos a partir de 347 sítios polimórficos. A tradução *in silico* dessas sequências mostrou a alteração em 89 aminoácidos, resultando em 69 isoformas. Concatenando os dados obtidos no NCBI juntamente com as sequências geradas nesse trabalho, foi obtido um índice maior de diversidade haplotípica ($h=0,9807$), um número maior de sítios polimórficos (364) e de isoformas (91). Foram observados 11 haplótipos comuns entre as sequências desse trabalho e as do NCBI, resultando na descrição de 22 novas isoformas da toxina e de 15 novos sítios de mutação no gene *plc*. Outras informações de diversidade genética se encontram na Tabela 9.

TABELA 9: Diversidade genética no gene *plc* de *C. perfringens* nas sequências obtidas nesse trabalho, nas do banco de dados do NCBI e em ambos os grupos.

	Nº Sequências	Nº Haplótipos	Diversidade Haplótipica	Nº Isoformas	Nº sítios polimórficos	Nº substituição de aminoácidos
Este estudo	73	43	0,9760	34	71	30
Banco de dados NCBI	334*	127	0,9765	69	347	89
Este estudo + NCBI	407	159	0,9807	91	364	104

* Sequências com CDS completa, contemplando toda a toxina madura.

Outra estratégia de busca foi adotada no banco de dados do NCBI (*Nucleotide e Protein*), a procura de fosfolipases C de outras espécies de *Clostridium*. Como mencionado anteriormente, a toxina alfa de *C. perfringens* é também denominada fosfolipase C. Foram analisadas 48 seqüências com a porção codificante completa (CDS) das espécies: *C. acetobutylicum*, *C. sordelli*, *C. bifementans*, *C. haemolyticum*, *C. botulinum*, *C. novyi* e *C. sardiniense*. A árvore filogenética interespecífica construída através do método de *neighbor-joining* usando as seqüências de aminoácidos é mostrada na Figura 12.

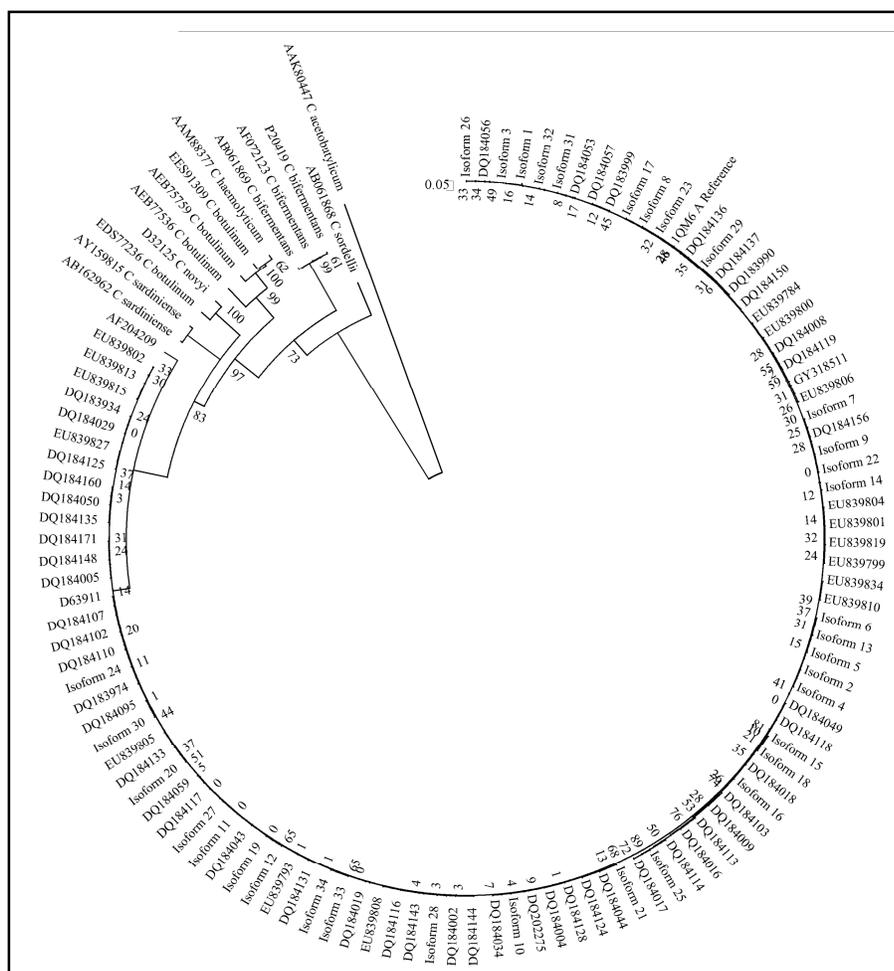


FIGURA 12: Árvore filogenética não enraizada inferida a partir das seqüências de aminoácidos de fosfolipase C de *C. perfringens* definidas nesse trabalho e de seqüências obtidas no banco de dados do NCBI. A árvore foi construída baseada no método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987) e desenhada em escala. O tamanho dos braços corresponde à distância evolutiva (0,5 substituições de aminoácidos por sítio). O valor de *bootstrap* (1000 réplicas) é mostrado junto aos ramos.

As seqüências de fosfolipases C de *C. perfringens* demonstraram ser proximamente relacionadas e formaram um grupo monofilético. As relações filogenéticas a partir de seqüências de aminoácidos dos isolados obtidos nesse estudo revelou a falta de correlação entre a origem do isolado e o estado de saúde do animal. Dessa forma, não houve correspondência entre um determinado grupo monofilético e o local de colonização ou estado de infecção do respectivo animal. A seqüência de

fosfolipase C de *C. perfringens* mais distante foi obtida no banco de dados (AF204209) e seu ramo foi suportado por um *bootstrap* de 83. Essa linhagem foi isolada por Justin *et al.*, (2002) a partir de um cisne doente.

Baseado nas sequências obtidas de *Clostridium sp.* de outras espécies, foi possível observar, em geral, a formação de clados intra-específicos. Assim, as espécies de *Clostridium* foram compreendidas em ramos filogenéticos separados. Uma exceção foram sequências de fosfolipase C de isolados de *C. botulinum* (AEB75759, EES91309) que foram mais próximos filogeneticamente de sequências de *C. haemolyticum* do que outras sequências de *C. botulinum* (AEB77536, EDS77236).

4.2. CLONAGEM DO GENE PLC NO VETOR PGEM-T EASY

A clonagem do gene *plc* no sistema pGEM-T Easy teve como objetivo inserir adaptadores flanqueando a sequência nucleotídica de interesse para a subclonagem no vetor de expressão. Como mencionado, esses adaptadores foram inseridos através dos iniciadores desenhados para a PCR, utilizada para isolamento e amplificação do gene da toxina alfa, e correspondem às sequências que são reconhecidas pela endonuclease de restrição *HindIII* (construção pMAL -c2E) e *NcoI* e *XhoI* (pET 26b). De modo geral, os resultados da clonagem em pGEM-T Easy foram satisfatórios para ambas estratégias para clonagem em vetor de expressão. Para facilitar a compreensão, a seguir serão descritos alguns desses passos, sem discriminar a construção.

4.2.1. Ligação ao vetor de clonagem, transformação de bactérias e seleção pelo sistema IPTG/X-gal

A amplificação por PCR do gene *plc* contendo adaptadores para posterior ligação em vetor de clonagem gerou um produto no tamanho esperado (1125pb), e a purificação deste ocorreu de forma satisfatória (Figura 13). Em seguida, o produto foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy e esse material foi eletroporado em *E. coli* XL1-Blue. Como ilustrado na Figura 14, pode-se observar que a ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foi bem sucedida, uma vez que após plaqueamento do material, obteve-se um número considerável de transformantes que receberam o vetor com o inserto (colônias brancas).

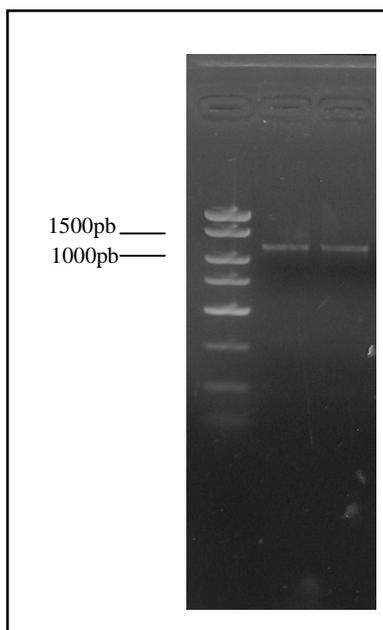


FIGURA 13: Purificação de banda para ligação do inserto em vetor pGEM-T Easy. Resolução eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Canaleta 1- Marcador de Peso Molecular "PCR Marker" (Amresco); 2- Amplicon purificado do isolado AV 1.2; 3- Amplicon purificado do isolado Z23.

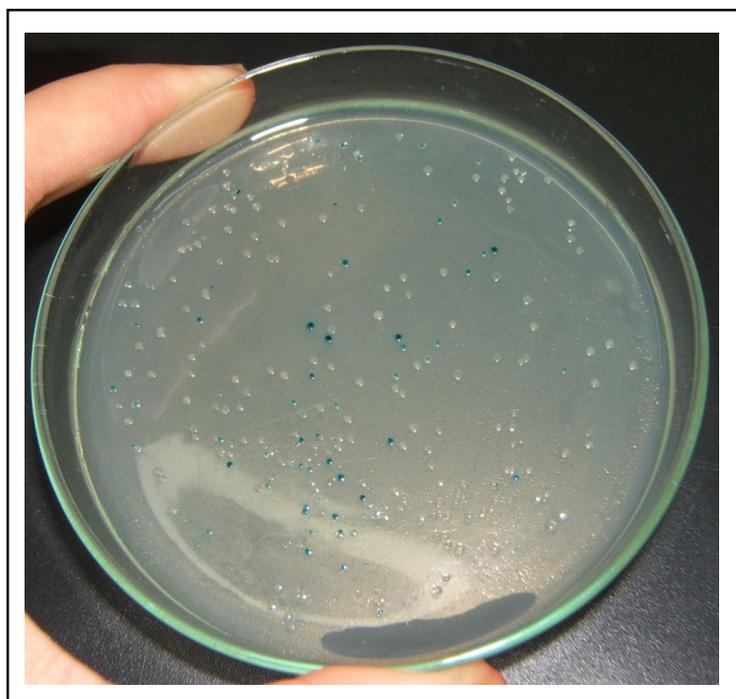


FIGURA 14: Seleção de colônias pelo sistema IPTG/X-gal. *E. Coli* XL1-Blue em placa de Petri contendo meio LB-ágar com ampicilina e sistema de seleção IPTG/X-gal, após eletroporação. As colônias brancas possuem o inserto (gene *plc*) interrompendo o gene *LacZ*.

4.2.2. Confirmação dos clones positivos, extração e purificação do DNA plasmidial pGEM: α e sequenciamento

As colônias brancas foram submetidas a uma PCR confirmatória quanto a presença do inserto, usando os iniciadores do vetor (M13 F e R). O molde para a amplificação foram as próprias colônias, sendo que a maioria possuía o gene *plc* demonstrado pela amplificação no tamanho esperado (cerca de 1200pb).

Os clones positivos foram submetidos a extração plasmidial por meio de lise alcalina. Foram obtidos plasmídeos pGEM: α puros, íntegros e com um bom rendimento (Figura 15). Esses foram submetidos ao sequenciamento onde mais uma vez foi confirmada a presença do inserto. As sequências geradas de cada clone foram conferidas cuidadosamente quanto a presença de mutações, afim de se evitar problemas na subclonagem. As sequências consenso foram submetidas ao programa BLASTn, no qual identificou alta similaridade com outras sequências da toxina alfa de *C. perfringens* (99% identidade, *e-value*=0).

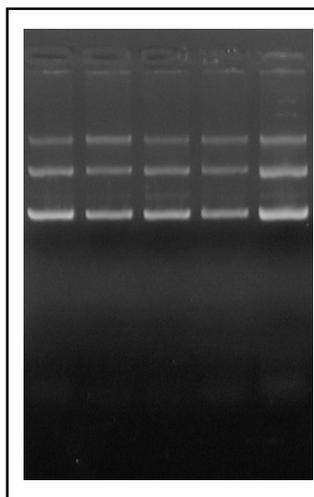


FIGURA 15: Plasmídeos pGEM: α extraídos a partir do método de lise alcalina. Resolução eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

4.2.3. Digestão enzimática pGEM: α para liberação do inserto

Após a caracterização do inserto *plc* proveniente dos isolados AV1b e Z23, os mesmos foram liberados do vetor pGEM-T Easy através de digestão com endonucleases de restrição. Os insertos foram liberados corretamente (Figura 16) e apresentaram as pontas coesivas que permitiram a ligação correta nos respectivos vetores de expressão.

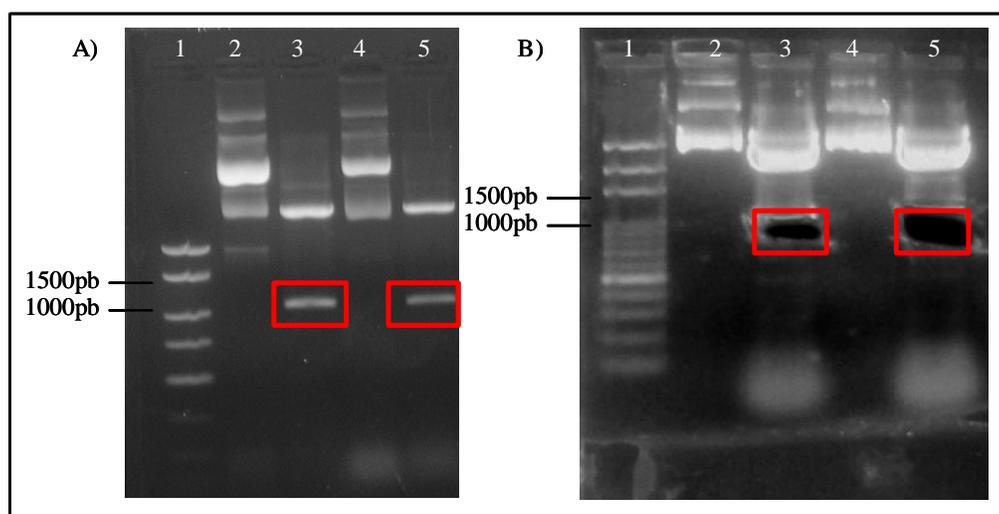


FIGURA 16: Resultado da digestão enzimática dos plasmídeos pGEM: α para liberação do inserto. Resolução eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Em A) Digestão com *HindIII* para ligação em pMAL -c2E: Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular "PCR Marker" (Amresco); 2 e 4: Plasmídeos não digeridos; 3 e 5: Plasmídeos digeridos com o inserto destacado. Em B) Digestão com *NcoI* e *XhoI* para ligação em pET 26b: Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular "100pb" (Amresco); 2 e 4: Plasmídeos não digeridos; 3 e 5: Plasmídeos digeridos com o inserto destacado. Nota-se que a banda contendo o inserto foi excisada para posterior purificação e ligação em pET26b.

4.3. SUBCLONAGEM DO GENE PLC NO VETOR PMAL -C2E

4.3.1. Obtenção dos plasmídeos pMAL: α

De posse do inserto purificado, o próximo passo foi trabalhar com o vetor de expressão pMAL -c2E. Foi utilizado um vetor modificado por Anderson O. Carmo o qual possui um sítio de reconhecimento da protease TEV ("*Tobacco Etch Virus*"). O objetivo dessa modificação foi utilizar uma protease recombinante trazendo economia nas reações de digestão para liberação da proteína fusionada MBP. Encontra-se disponível no banco de plasmídeos do LBMM o vetor pMAL -c2E modificado e a construção capaz de produzir a TEV recombinante. O vetor de expressão foi linearizado após digestão com a endonuclease *HindIII* e ligado aos insertos com êxito.

Os produtos da ligação foram eletrotransformados em *E. coli* XL1-Blue para seleção e propagação *in vivo* da construção pMAL: α . Foram obtidas várias colônias de transformantes, das quais algumas foram submetidas à PCR confirmatória quanto a presença do inserto. Para isso, foram utilizados os iniciadores do vetor (malE e M13F) e, através do tamanho do fragmento amplificado, foram identificados clones contendo o inserto (cerca de 1300pb) e sem o mesmo (cerca de 200pb) (Figura 17). Para cada construção (α Z23 e α AV1b) foram obtidos 6 clones positivos.

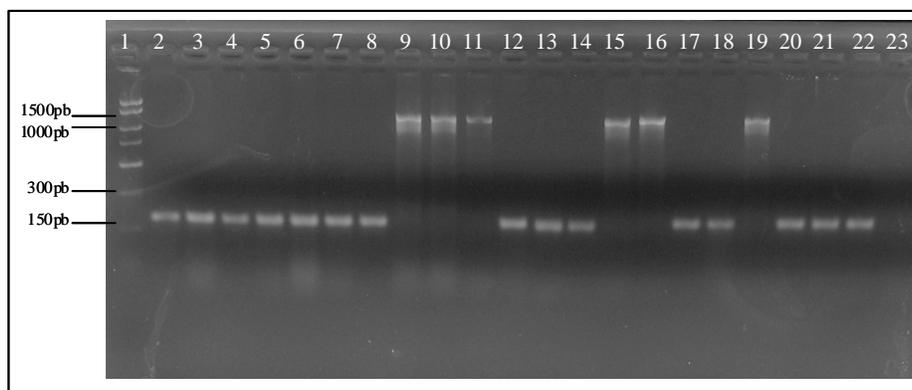


FIGURA 17: Resultado da PCR de colônia dos clones contendo a construção pMAL:α, isolado Z23. Resolução eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular "PCR Marker" (Amresco); Canaletas 2-8, 12-14, 17-18, 20-22: Clones sem o inserto; Canaletas 9-11, 15-16 e 19: clones contendo o inserto *plc*; Canaleta 23: Controle Negativo.

Para averiguar se os insertos foram ligados ao vetor na matriz de leitura correta, os 12 clones positivos foram submetidos a uma nova amplificação por PCR, agora usando as combinações de iniciadores: malE + AlfaR e AlfaF + M13F. Foram obtidos 2 clones para a construção αZ23 e 3 clones para αAV1b com amplificação em ambas reações. Esses clones tiveram seus plasmídeos extraídos, purificados, sequenciados e devidamente conferidos.

4.3.2. Determinação das condições de expressão da toxina alfa em pMAL -c2E

Os plasmídeos pMAL:α foram eletrotransformados em *E. coli* BL21 (DE3), uma linhagem bacteriana apropriada para expressão de cassetes heterólogos. Houve crescimento satisfatório dos clones contendo a construção pMAL:α e foram selecionados 3 clones de cada isolado (αZ23 e αAV1b) para triagem da produção da toxina de interesse, testando também a necessidade de indução por IPTG. Em uma expressão piloto de 16 horas de cultivo a 37 °C, foi possível verificar em gel de SDS-PAGE que todos os clones testados foram capazes de produzir a toxina alfa somente sob a indução com IPTG 0,3mM. O produto da expressão da construção pMAL:α, analisado no lisado celular, foi significativo quando comparado com o controle, com uma banda forte na altura próxima de 85 kDa, correspondendo a uma proteína fusionada com MBP (42,5 kDa) e toxina alfa (42,5 kDa) (Figura 18a).

Para determinar as condições de expressão da alfa recombinante de forma solúvel, foram testados alguns parâmetros que sabidamente influenciam o estado da molécula final. Proteínas recombinantes que se acumulam no espaço intracelular em *E. coli* frequentemente são depositadas como corpos de inclusão. Esses agregados protéicos insolúveis, em geral, compreendem moléculas sem atividade biológica e com enovelamento incorreto. Nesse sentido, foram testadas condições que evitassem a super-expressão da proteína alvo.

Inicialmente, variou-se o tempo de expressão após a indução com IPTG, coletando alíquotas após 2, 4, 8 e 16 horas de indução. Outro teste foi feito variando a temperatura de incubação, já que

em menores temperaturas o crescimento bacteriano ocorre mais lentamente, favorecendo um menor acúmulo da proteína produzida. Desse modo, foram testadas a incubação a 4°C, 25°C e 37°C. Por fim, foram testados também diferentes concentrações de IPTG (0,05mM, 0,1mM, 0,2mM e 0,3mM) para a indução da expressão protéica (Figura 18b). Após lise celular e separação das proteínas bacterianas solúveis e insolúveis em todos esses experimentos, foi observado que em todas as condições testadas a toxina alfa recombinante se apresentou na forma insolúvel. Embora a recombinante tenha sido produzida fusionada a MBP, o que facilitaria a solubilidade da proteína alvo, e houvesse um esforço na padronização das condições da expressão, não foi possível a obtenção de proteína solúvel.

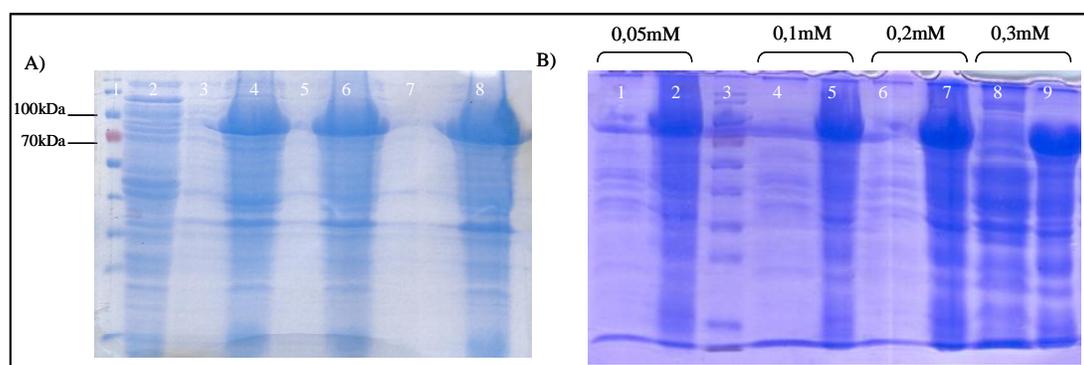


FIGURA 18: Expressão bacteriana do plasmídeo pMAL:α em E. coli BL21 (DE3). SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie. Em A): Expressão piloto para triagem de clones que expressam a toxina alfa em *E. coli* BL21 (DE3), com e sem indução por IPTG 0,3mM. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*); Canaleta 2: Controle de proteínas bacterianas; Canaletas 3, 5 e 7: alíquotas da expressão de 3 clones distintos onde não houve indução por IPTG; Canaletas 4, 6 e 8: alíquotas da expressão de 3 clones distintos onde houve indução, destacando uma banda forte entre as banda de 75 e 100 kDa, correspondendo a proteína alfa fusionada a MBP (85kDa). Em B): Variação na concentração de IPTG usada na indução da expressão. Canaleta 3: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*); Canaletas 1, 4, 6, 8: Sobrenadantes contendo fração solúvel; Canaletas 2, 5, 7 e 9: *Pellet* contendo a fração insolúvel, onde está presente a toxina alfa recombinante fusionada a MBP (85kDa).

4.3.3. Tentativa de purificação da toxina alfa recombinante e liberação da proteína fusionada MBP

De acordo com o manual do vetor (New England Biolabs, 2003), os protocolos de purificações das proteínas recombinantes requerem essas moléculas solúveis. Como isso não foi possível, recorreu-se a agentes desnaturantes como Uréia 6M, DMSO 100%, Acetato de Sódio 3M, Tween 20 1%, Triton X-100 1%. Uma porção do *pellet* foi adicionado a essas substâncias e, após intensa homogeneização, seguido de centrifugação, foi observada a formação de um novo *pellet* nos seguinte tubos: DMSO 100%, Acetato de Sódio 3M, Tween 20 1%, Triton X-100 1%, mostrando que não foi possível a solubilização dessas proteína. Houve solubilização completa somente com uréia 6M, não observando a formação de *pellet* após a centrifugação.

Uma das estratégias de purificação adotada foi liberar a MBP da toxina alfa em condições desnaturantes e, em seguida, realizar uma diálise, esperando que a MBP continuasse solúvel e a toxina alfa precipitasse. Para dissociar MBP da toxina alfa, foi realizada uma digestão utilizando a protease

TEV recombinante, como descrito no item 3.2.2.8. A protease TEV conseguiu agir mesmo em condições desnaturantes e foi possível separar a toxina alfa da MBP (Figura 19a). Como a toxina alfa de *C. perfringens* e a MBP possuem aproximadamente o mesmo peso molecular (42,5 kDa), o resultado da digestão é visto como uma única banda no gel de SDS-PAGE. Após exaustiva diálise contra PBS 1X, o material contido dentro da membrana de diálise foi centrifugado. O sobrenadante e o *pellet* foram visualizados em gel de SDS-PAGE, que revelou a precipitação de proteínas inespecíficas na porção insolúvel e uma banda de cerca de 43 kDa que provavelmente corresponde à MBP na fração solúvel (Figura 19b)

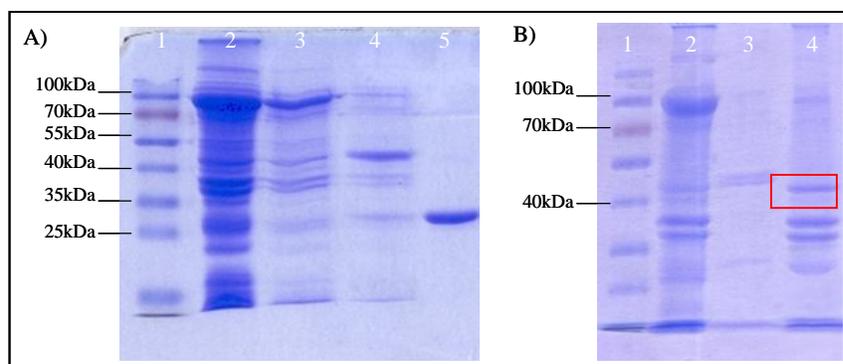


FIGURA 19: Tentativa de purificação da proteína alfa fusionada a MBP. SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie. Em A): Digestão de alfa fusionada a MBP pela protease TEV. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*); Canaleta 2: *Pellet* bruto da expressão pMAL: α ; Canaleta 3: *Pellet* da expressão pMAL: α solubilizado em uréia 6M não digerido; Canaleta 4: Produto digerido com destaque para a banca única de cerca de 43kDa, correspondendo a MBP e a alfa; Canaleta 5: TEV protease. Em B): *Pellet* e sobrenadante após diálise. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*); Canaleta 2: *Pellet* bruto da expressão pMAL: α ; Canaleta 3: Sobrenadante da diálise; Canaleta 4: *Pellet* da diálise com banda de cerca de 43 kDa (vermelho) que provavelmente corresponde a alfa toxina e com proteínas inespecíficas de menor peso.

Houve tentativa de purificação através de cromatografia de afinidade para a purificação da alfa fusionada, já que a MBP possui afinidade com a amilose. Uma porção do *pellet* contendo as proteínas insolúveis foi vigorosamente ressuspensionado no tampão da coluna. Porém, ao longo do processo, quando a amostra foi submetida à coluna, houve um entupimento da resina, inviabilizando a continuação do procedimento. Desse modo, os experimentos com a construção pMAL: α foram interrompidos.

4.4. SUBCLONAGEM DO GENE PLC NO VETOR PET-26B

4.4.1. Obtenção dos plasmídeos pET26b: α

A outra estratégia escolhida para a construção de cassetes de expressão contendo o gene *plc* de *C. perfringens* foi o uso do vetor pET26b. Esse sistema possui uma sequência sinal N- terminal (*pelB*), que transporta a proteína recombinante para o periplasma, local favorável para o enrolamento e a formação tridimensional da proteína. Além disso, este vetor possui uma sequência C- terminal, que

codifica uma cauda peptídica de seis histidinas, proporcionando uma facilidade no momento da purificação da proteína alvo.

A preparação do inserto com adaptadores e a linearização do vetor foi realizada utilizando-se duas endonucleases distintas (*NcoI* e *XhoI*). Desse modo, durante a reação de ligação houve uma menor chance de ocorrer a re-ligação do vetor sem o inserto, o que aumentou o número de clones positivos. O material ligado foi eletrotransformado em *E. coli* XL1-Blue para seleção e propagação da construção pET26b: α . Houve o crescimento de várias colônias transformantes e a PCR confirmatória (iniciadores T7F e T7R) quanto a presença do inserto gerou fragmentos de cerca de 1400pb (clones com inserto) e aproximadamente 320pb (clones sem inserto) (Figura 20). Para a construção α Z23 foram obtidos 30 clones positivos e da α AV1b foram obtidos 31 clones positivos, em 45 clones testados. Foram selecionados quatro clones de cada isolado para extração, purificação, sequenciamento e análise de seus plasmídeos.

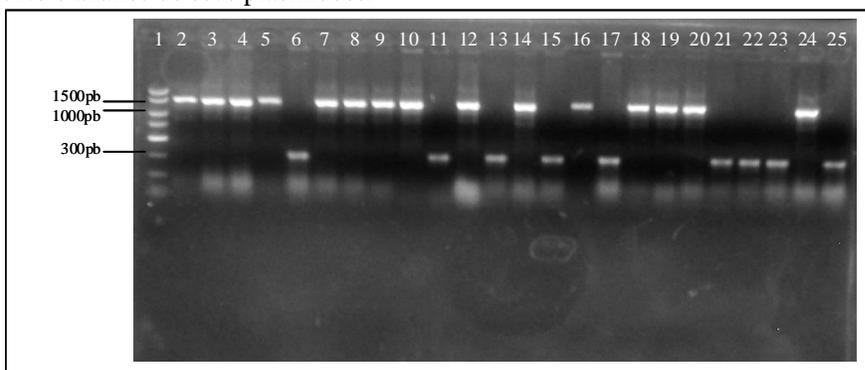


FIGURA 20: Resultado da PCR de colônia dos clones contendo a construção pET26b: α , isolado Z23. Resolução eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular "PCR Marker" (Amresco); Canaletas 2-5, 7-10, 12, 14, 16, 18-20, 24: clones contendo o inserto *plc*; Canaletas 6, 11, 13, 15, 17, 21-23 e 25: Clones sem o inserto.

4.4.2. Determinação das condições de expressão da toxina alfa em pET26b

Para essa construção, os plasmídeos pET26b: α foram eletrotransformados em duas linhagens de *E. coli*: BL21 (DE3) e Rosetta (DE3) (Novagen). Essa última linhagem, deriva-se da BL21 e possui um plasmídeo adicional (pRARE) que fornece tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, e GGA. Analisando a sequência da toxina alfa, cerca de 20% dos aminoácidos são codificados por esses códons raros (73 em 370 aminoácidos). Foi observada uma sutil diferença na expressão entre as duas linhagens, havendo uma maior expressão na linhagem Rosetta, a qual foi a escolhida para continuação dos experimentos.

Para uma triagem dos clones que expressam o gene *plc*, foram selecionados quatro clones de cada isoforma (α Z23 e α AV1b) e todos apresentaram uma banda na altura esperada para a construção pET26: α de 46 kDa (Figura 21a). Um clone de cada isoforma foi selecionado para determinar uma curva de expressão, testando diferentes tempos de expressão após a indução (2, 4, 6 e 16 horas), e a

necessidade da adição de IPTG (Figura 21b). Foi possível observar a síntese da toxina alfa somente após a indução, já iniciando após duas horas e tendo maior rendimento após as 16 horas de expressão (destaque em vermelho).

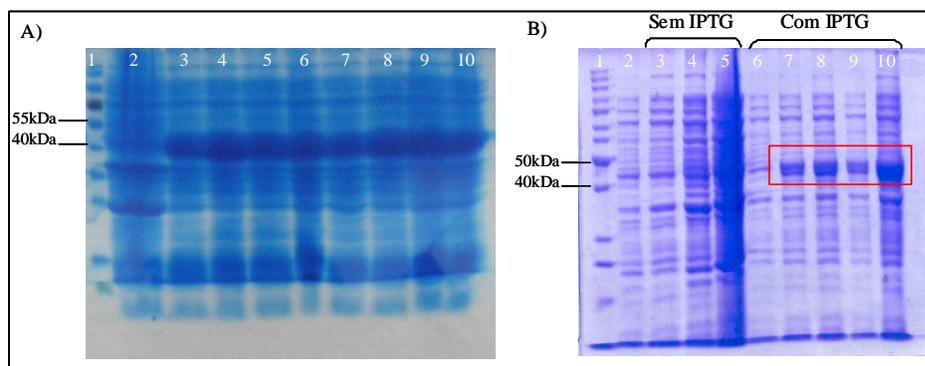


FIGURA 21: Expressão bacteriana do plasmídeo pET26b:α em E. coli Rosetta (DE3). SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie. Em A): Expressão piloto para triagem de clones que expressam a toxina alfa em *E. coli* Rosetta (DE3), após 16 horas de indução por IPTG 0,6mM. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaleta 2: Controle Negativo (*E. coli* com pet26b sem inserto); Canaletas 3-6: alíquotas da expressão de 4 clones distintos de αAV1b; Canaletas 7-10: alíquotas da expressão de 4 clones distintos de αZ23. Em B): Curva de expressão após indução com IPTG 0,6mM. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaleta 2: Controle Negativo (*E. coli* com pet26b sem inserto); Canaleta 3-5: alíquotas da expressão sem IPTG nos tempos 0, 2, 4, 6 e 16 horas, respectivamente. Canaleta 6-10: alíquotas da expressão com IPTG nos tempos 0, 2, 4, 6 e 16 horas, respectivamente. Em destaque (retângulo vermelho), a síntese da toxina alfa de *C. perfringens* somente após a indução por IPTG, representada por uma banda de cerca de 46 kDa que está ausente no controle negativo

Assim como na construção pMAL:α, a toxina alfa expressa em pET26b também se apresentou como corpos de inclusão. A expressão nas três temperaturas testadas (4 °C, 25 °C e 37 °C) não permitiram a solubilidade da proteína recombinante, estando essa presente, após lise e centrifugação, somente na fração insolúvel. A tentativa de caracterização das proteínas periplasmáticas através da lise por choque osmótico também revelou a toxina alfa recombinante somente no precipitado. Diante dessa situação, partiu-se para estratégias de purificação sob condições desnaturantes.

4.4.3. Purificação das isoformas recombinantes de pET26b:α

A técnica de purificação escolhida foi a cromatografia de afinidade com metal imobilizado, a qual espera-se que os seis resíduos de histidinas presentes na porção C-terminal da proteína recombinante se ligue de forma reversível ao níquel presente na matriz utilizada. O procedimento descrito no item 3.2.3.7 foi a condição na qual se obteve melhor resultado considerando a pureza e rendimento da proteína purificada, além do tempo de corrida (Figura 22a). Inicialmente, foi testada a purificação do extrato contendo a alfa recombinante com tampão de ligação e de eluição sem NaCl, porém a proteína de interesse foi obtida juntamente com outros contaminantes (Figura 22b). A partir daí, o NaCl foi adicionado na concentração de 500 mM em todas as soluções. Outra tentativa foi a remoção da uréia ainda durante a purificação, tentando o *refolding* da proteína ainda ligada à coluna. Após a aplicação da amostra no sistema e saída de todo material não ligado, foi feito um gradiente

para remoção da uréia no tampão de ligação. Em seguida, a eluição da proteína recombinante ocorreu em tampão sem uréia 8M. Durante esse processo, observou-se que o material proveniente da eluição estava visivelmente precipitado e o *refolding* provavelmente não estava acontecendo adequadamente. Optou-se, então, por manter todo o processo de purificação com uréia 8M, visando assim uma maior recuperação da toxina alfa recombinante (Figura 23).

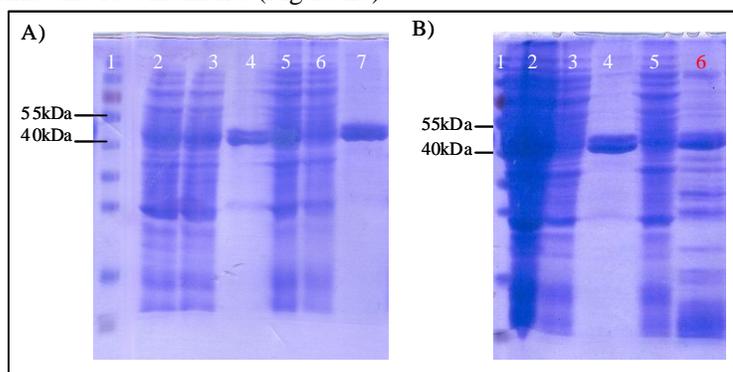


FIGURA 22: Purificação da toxina alfa recombinante em coluna HisTrap™ HP. SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie. Em A): Resultado da purificação das duas isoformas α AV1b e α Z23. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaleta 2: Extrato bacteriano de α Z23 ressuspensionado em tampão de ligação e aplicado à coluna; Canaleta 3: material não ligado a coluna de α Z23; Canaleta 4: material eluído da coluna contendo a α Z23 purificada; Canaleta 5: Extrato bacteriano de α AV1b ressuspensionado em tampão de ligação e aplicado à coluna; Canaleta 6: material não ligado a coluna de α AV1b; Canaleta 7: material eluído da coluna contendo a α AV1B. Em B): Purificação na presença e na ausência de 500mM de NaCl nos tampões. Canaleta 1: padrão de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); Canaleta 2: Extrato bacteriano de α AV1B ressuspensionado em tampão de ligação e aplicado à coluna; Canaleta 3: material não ligado a coluna de α AV1B com tampão contendo 500mM de NaCl; Canaleta 4: material eluído da coluna contendo a α AV1B com tampão contendo 500mM de NaCl; Canaleta 5: material não ligado a coluna de α AV1b com tampão sem NaCl; Canaleta 6: material eluído da coluna contendo a α AV1b com tampão sem NaCl. Nota-se na canaleta seis (vermelho) a grande quantidade de proteínas inespecíficas que se ligam à coluna na ausência de sal nos tampões.

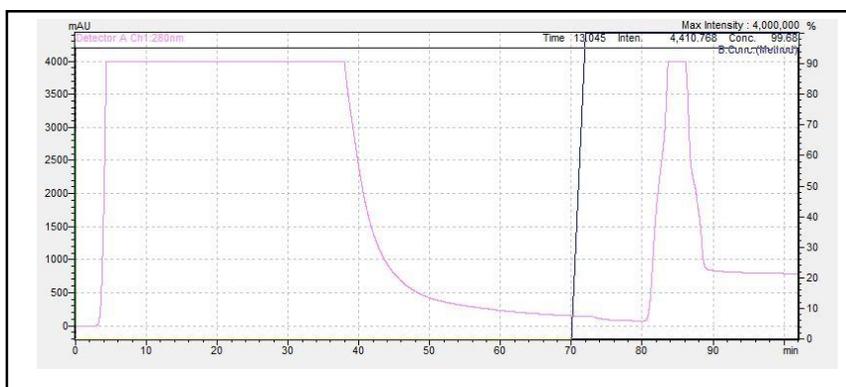


FIGURA 23: Perfil cromatográfico do extrato bacteriano contendo a toxina alfa recombinante em coluna HisTrap™ HP de 5ml. A fase móvel consistiu no tampão de ligação (Fosfato de Sódio 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 30 mM, Uréia 8M, pH 7,4) e o fluxo foi mantido a 0,5 ml/min. Após 70 minutos, a fase móvel foi substituída para o tampão de eluição (Fosfato de Sódio 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, Uréia 8M, pH 7,4) e a proteína de interesse foi desligada da coluna. As amostras foram monitoradas em absorvância de 280 nm.

4.5. CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DAS ISOFORMAS ALFA RECOMBINANTES

4.5.1. Dosagem das isoformas purificadas

Após a purificação das isoformas, o material obtido da eluição foi dialisado lentamente contra PBS. Ao final da diálise, foram observadas pequenas partículas em suspensão, indicando a precipitação do material. Esse foi centrifugado a 13000 rpm a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o *pellet* novamente ressuspensionado em PBS para a visualização do conteúdo de cada fração em SDS-PAGE. O gel revelou que havia toxina alfa recombinante presente em ambas as frações e, então, foi utilizado para a dosagem e para a imunização dos animais a fração solúvel (sobrenadante) oriunda da diálise.

A dosagem pelo método de Lowry da isoforma α AV1b revelou a quantificação de 0,36 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ao passo que a α Z23 estava a 0,81 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esses valores podem ser comparados com a estimativa realizada em gel de SDS-PAGE (Figura 24). A toxina alfa recombinante apresenta peso de 46 kDa e corresponde então as bandas de menor peso no gel. O BSA apresenta peso de 66,5 kDa e corresponde as bandas de maior peso com maior intensidade no gel. Observando a Figura 24a, pode-se concluir que para a isoforma α AV1b, as bandas que apresentaram maior correlação de intensidade foram as das canaletas 2 e 9 que correspondem a 4,2 μg de BSA e 10 μL de α AV1b respectivamente. Desse modo, a quantificação seria de 0,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para a isoforma α Z23 (Figura 24b), as bandas mais próximas quanto a intensidade foram as das canaletas 4 e 7 que correspondem a 7 μg de BSA e 10 μL de α Z23 respectivamente, sendo a quantificação 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os valores adotados para a imunização foram os estabelecidos pelo método de Lowry.

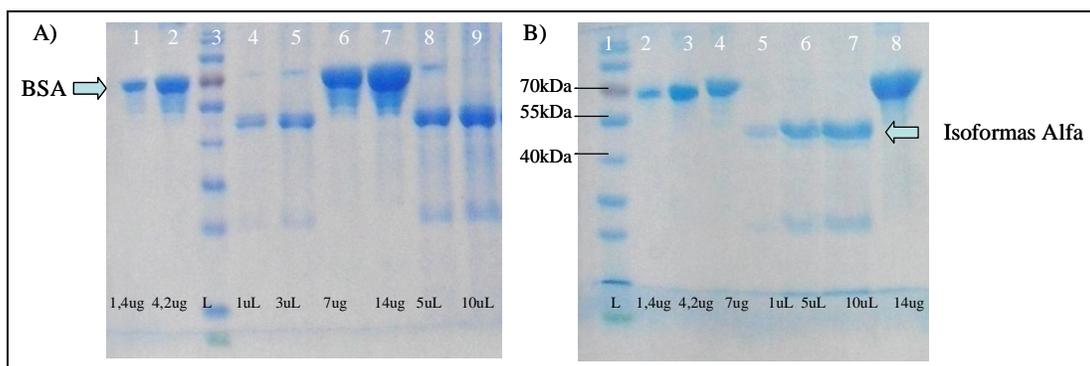


FIGURA 24: Quantificação das isoformas recombinantes. SDS-PAGE de proteínas em gel de poliacrilamida 12,5%, sob condições desnaturantes corado com azul de coomassie. Diferentes volumes das amostras da toxina alfa recombinante (Banda de menor peso) foram comparadas a valores conhecidos de BSA (banda de maior peso). Os volumes e as quantidades de cada amostra aplicada é mostrado na parte inferior do gel. Em A): Isoforma α AV1b; em B) isoforma α Z23.

4.5.2. Titulação e reatividade dos soros obtidos na imunização

Antes de preparar as amostras para a imunização, 3 μ L da isoforma α Z23 purificada e dialisada foram aplicados em placa LB-ágar contendo emulsão de gema de ovo, afim de se confirmar a atividade. Foi observado que após a diálise completa do material eluído e com a remoção da uréia, a α Z23 perdia a atividade de lecitinase. Foram testadas diferentes concentrações de uréia nessa amostra para que a atividade enzimática fosse restabelecida em quantidades pequenas de uréia. Assim, o antígeno α Z23 utilizado nas imunizações continha aproximadamente 2M de uréia e apresentava-se ativo.

Para acompanhar a produção de anticorpos no soro dos coelhos, os mesmos foram titulados a cada sangria, contra todos os antígenos. Foi possível observar que todos os coelhos imunizados já alcançaram título do soro adequado no 3º reforço. A Figura 25 ilustra a reatividade dos três soros produzidos contra a toxina alfa nativa ao longo das 3 doses. O soro anti-nativa (Figura 25a) apresentou um salto no reconhecimento após o segundo reforço, finalizando com título satisfatório. O soro anti-AV1b (Figura 25b) teve um reconhecimento contra a toxina nativa somente a partir do segundo reforço, finalizando a terceira dose com título alto, semelhante ao do soro anti-Z23. Por outro lado, o soro anti-Z23 (Figura 25c) desde o início da imunização mostrou um reconhecimento contra a toxina nativa bom apresentando um crescimento uniforme ao longo dos reforços.

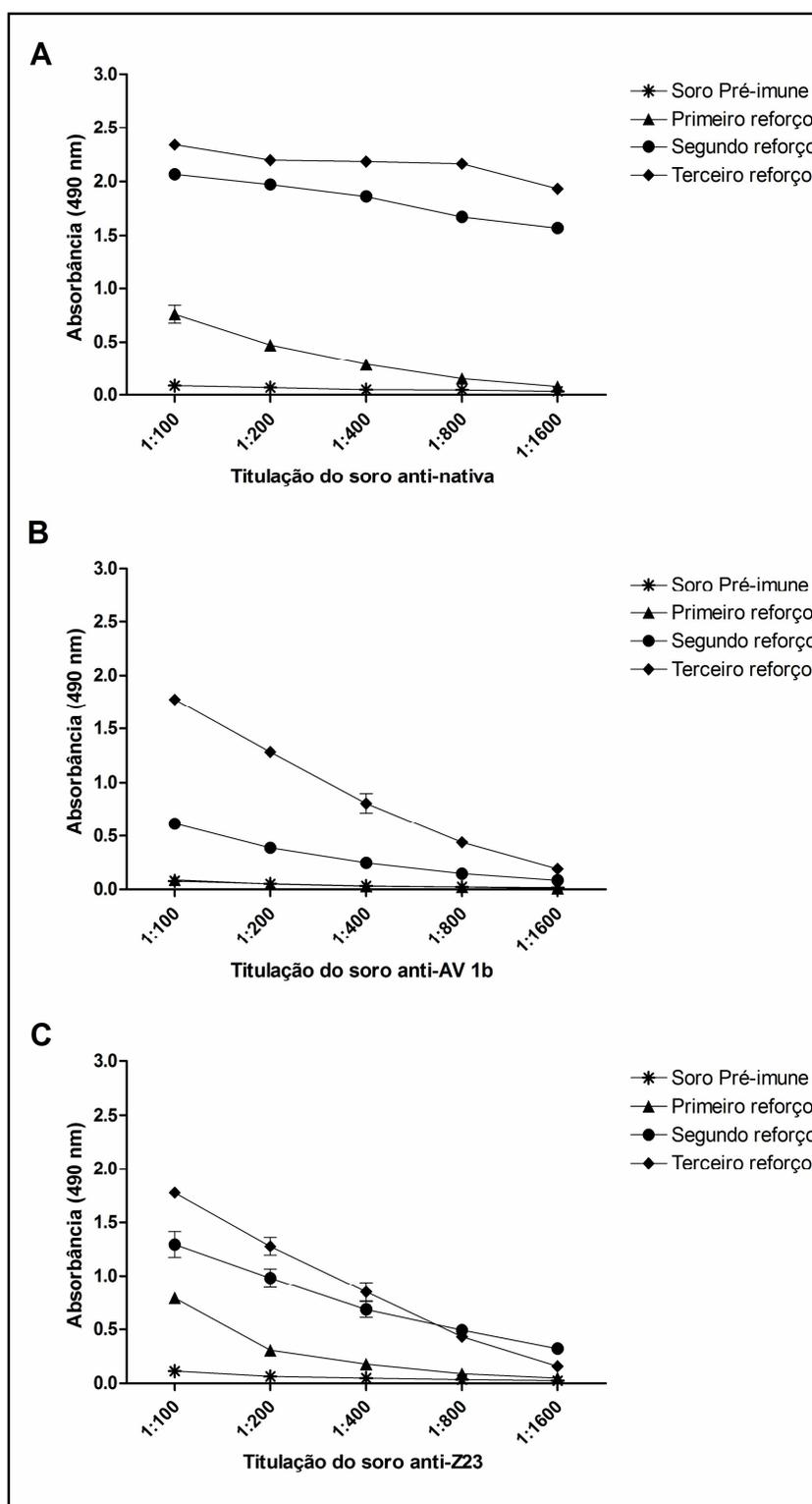


FIGURA 25: Reatividade e titulação do soro dos animais imunizados com a toxina alfa nativa e as duas isoformas recombinantes ao longo do programa de imunização. Para todos os gráficos as placas foram sensibilizadas com 0,5 µg por poço da toxina nativa. Os valores representam a média ± desvio padrão de dois experimentos. Foram titulados os soros anti-nativa (A), anti-AV1b (B) e anti-Z23 (C). É mostrado a reatividade dos soros pré-imune (*), do primeiro reforço (▲), do segundo reforço (●) e do terceiro reforço (◆). Os gráficos mostram a titulação dos soros dos coelhos com um intervalo de diluições de 1:100 a 1:1600.

Após a coleta do soro hiper-imune (3° reforço), a reatividade dos soros foi testada contra os diversos antígenos. Foram utilizadas três placas, cada uma sensibilizada com um antígeno, e todos os soros testados em cada placa. Os antígenos utilizados foram a toxina alfa nativa (Figura 26a), a isoforma recombinante α AV1b (Figura 26b) e a isoforma recombinante α Z23 (Figura 26c). Os soros utilizados foram anti-nativa, anti-AV1b, anti-Z23 e soro pré-imune.

Na placa sensibilizada com a toxina alfa nativa (Figura 26a) observou-se um alto reconhecimento do soro anti-nativa, com valores acima de 1,5 (absorbância 490nm) para diluições do soro de até 1:3200. Os soros de ambas isoformas recombinantes apresentaram o mesmo padrão de reconhecimento com valor próximo de 2 (absorbância 490 nm) para a diluição do soro 1:100. Não houve reconhecimento do soro pré imune.

As placas sensibilizadas com as isoformas recombinantes α AV1b (Figura 26b) e α Z23 (Figura 26c) mostraram que os soros, de forma geral, apresentaram o mesmo tipo de resposta contra esses imunógenos. Para ambos antígenos recombinantes, os soros anti-AV1b e anti-Z23 tiveram um alto reconhecimento para diluições do soro de até 1:12800. O soro anti-nativa reconheceu ambas recombinantes em uma menor proporção e novamente não houve reconhecimento do soro pré-imune.

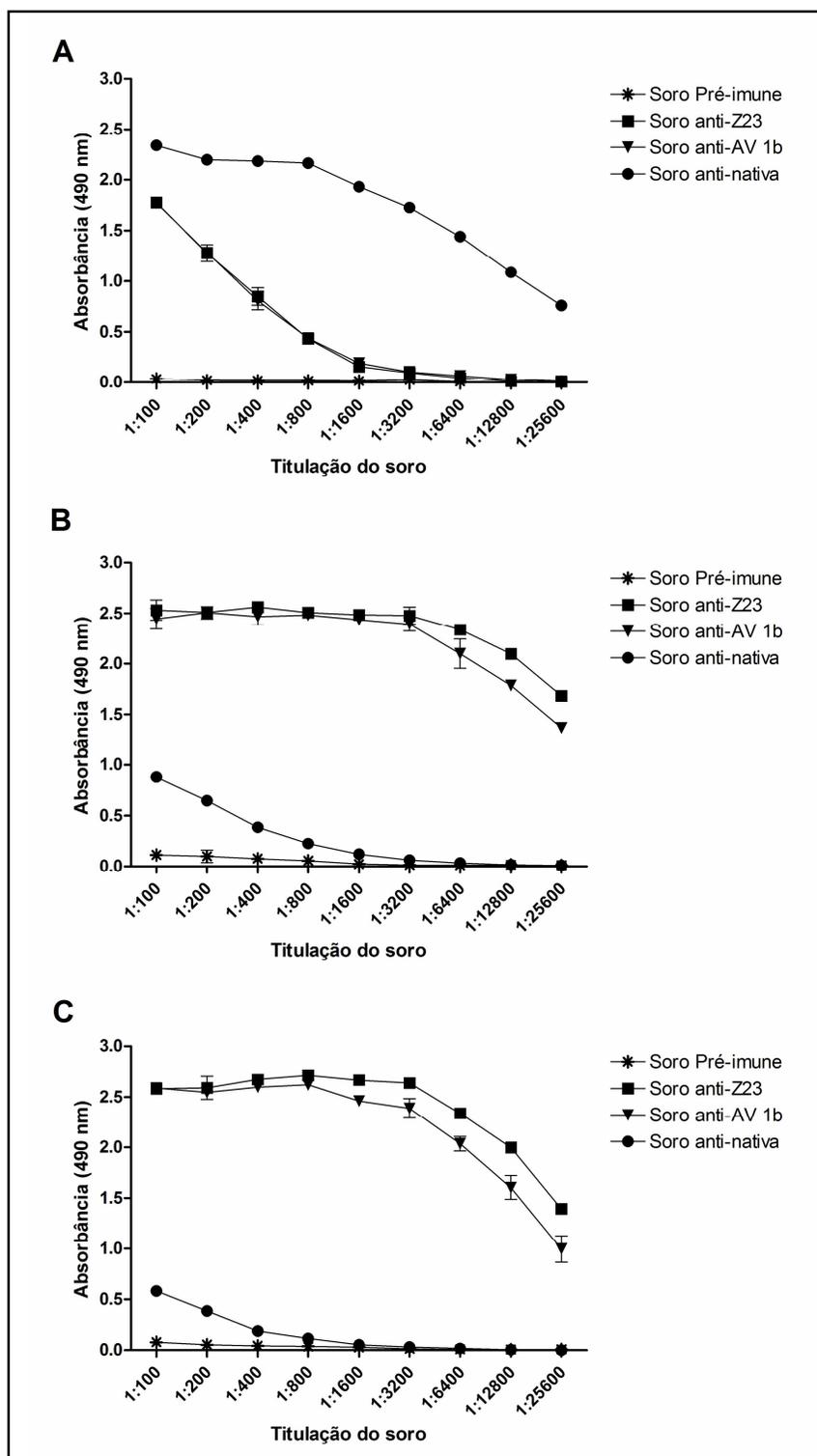


FIGURA 26: Titulação dos soros hiper-ímunes (3º reforço) dos coelhos imunizados com a toxina alfa nativa e as duas isoformas recombinantes. As placas foram sensibilizadas com 0,5 µg por poço da toxina nativa (A), da recombinante α AV1b (B) e da recombinante α Z23 (C). Os valores representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos. É mostrado a reatividade dos soros pré-imune (*), do soro anti-Z23 (■), do soro anti-AV1b (▼) e do soro anti-nativa (●). Os gráficos mostram a titulação do soros dos coelhos com um intervalo de diluições de 1:100 a 1:25600.

4.5.3. Atividade de lecitinase e hemolítica das isoformas alfa recombinantes

A isoforma $\alpha Z23$ apresentou atividade de lecitinase sob emulsão em gema de ovo. No experimento em placas as quais foram estriadas *E. coli* contendo as construções pET26b: α , foi possível identificar reação positiva somente na região da placa com IPTG 0,6mM onde foi inoculado o clone contendo a construção $\alpha Z23$ (Figura 27a). Nos demais pontos ($\alpha AV1b$ e pet26b) e na placa sem IPTG (Figura 27b) houve apenas o crescimento do microorganismo, não alterando a opacidade nessa região.

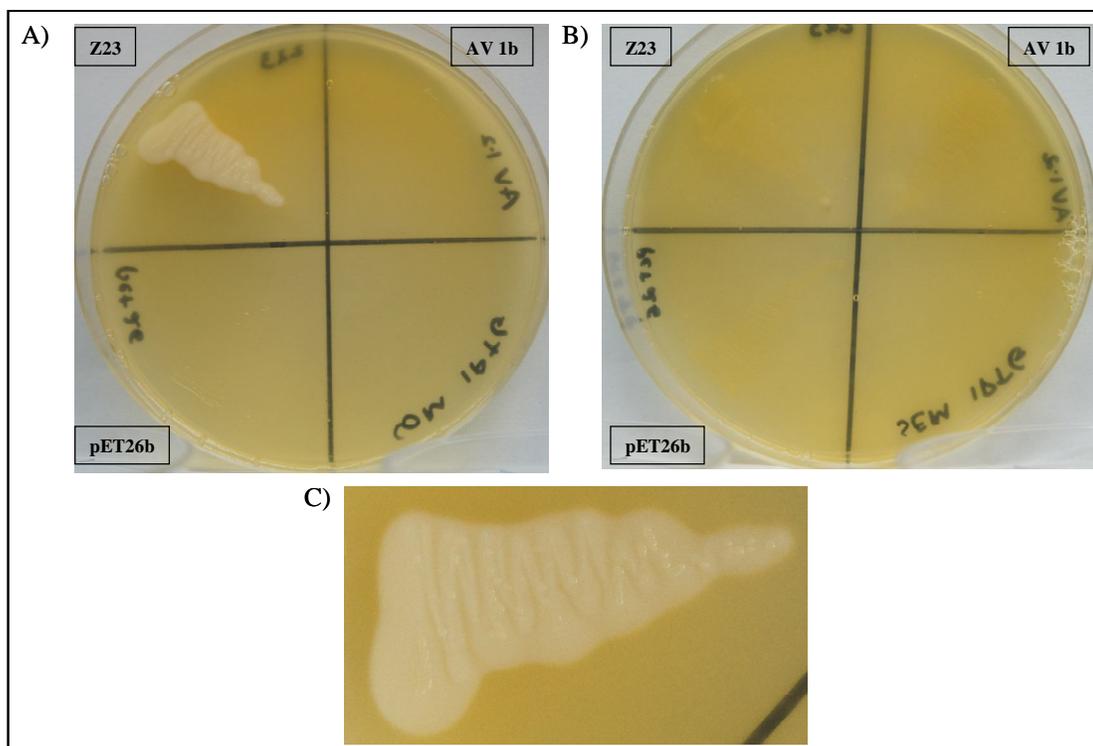


FIGURA 27: Teste de atividade de lecitinase das isoformas das toxinas alfa recombinantes. Colônias contendo as duas construções de pET26b: α , juntamente com o controle negativo (pET26b) foram estriadas em placas LB-ágar suplementado com 10% de gema de ovo. Em A) Placa com IPTG 0,6mM com reação positiva somente aonde houve o crescimento da $\alpha Z23$. Em B) Placa sem IPTG 0,6mM a qual não houve a formação de zonas opacas em nenhum dos pontos, embora tenha havido o crescimento normal dos microorganismos. Em C) Detalhe do crescimento de $\alpha Z23$, e da formação de um zona opaca ao redor desses microorganismos, demonstrando que essa recombinante está ativa.

O outro procedimento de atividade almejou acompanhar a expressão e a localização da toxina alfa recombinante ao longo do crescimento da cultura. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos após a indução por IPTG e o sobrenadante (material exportado pelo microorganismo) e o *pellet* (bactérias) dessa cultura foram aplicados às placas LB-ágar com emulsão de gema de ovo, antibióticos e IPTG. Novamente, só houve reação positiva nas alíquotas coletadas da cultura de $\alpha Z23$ (Figura 28a). No tempo zero, houve reação somente no *pellet*, e após 2 e 4 horas de indução houve reação tanto no *pellet* quanto no sobrenadante. Após 17 horas e 24 horas de indução, não houve reação de opacidade, havendo somente o crescimento do microorganismo. As alíquotas retiradas da cultura de $\alpha AV1b$

(Figura 28b) e de pET26b (Figura 28c) não tiveram atividade de lecitinase, e o crescimento das colônias ocorreu de forma normal.

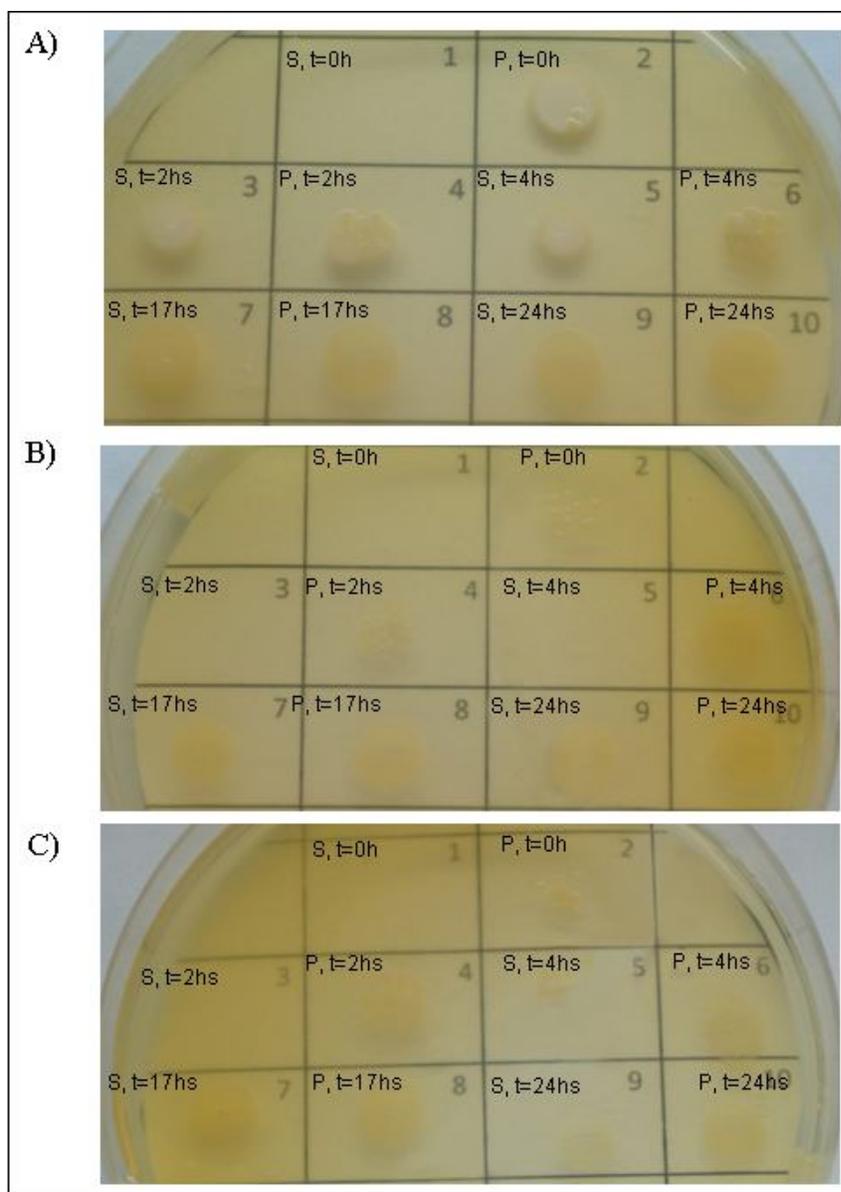


FIGURA 28: Dinâmica da expressão de isoformas das toxinas alfa recombinantes revelados através do teste de atividade de lecitinase. Alíquotas da cultura foram coletadas após 0, 2, 4, 17 e 24 horas de indução, e o sobrenadante e o *pellet* aplicados em placas LB-ágar suplementado com 10% de gema de ovo. Na figura, S = sobrenadante, P = *pellet* e os tempos são mostrados junto a essa sigla. Em A) Alíquotas retiradas da cultura de $\alpha Z23$, havendo reação nos pontos 2 a 6. Em B) Alíquotas retiradas da cultura de $\alpha AV1b$, sem alteração de opacidade em nenhum ponto. Em C) Alíquotas retiradas da cultura de pET26b, também sem reação.

No teste em ágar sangue foi observada hemólise somente na região periférica ao crescimento da *E. coli* contendo a construção da isoforma α Z23. Nas demais regiões onde houve o crescimento de α AV1b e pET26b (controle negativo) não foi observada lise dos eritrócitos no meio (Figura 29).

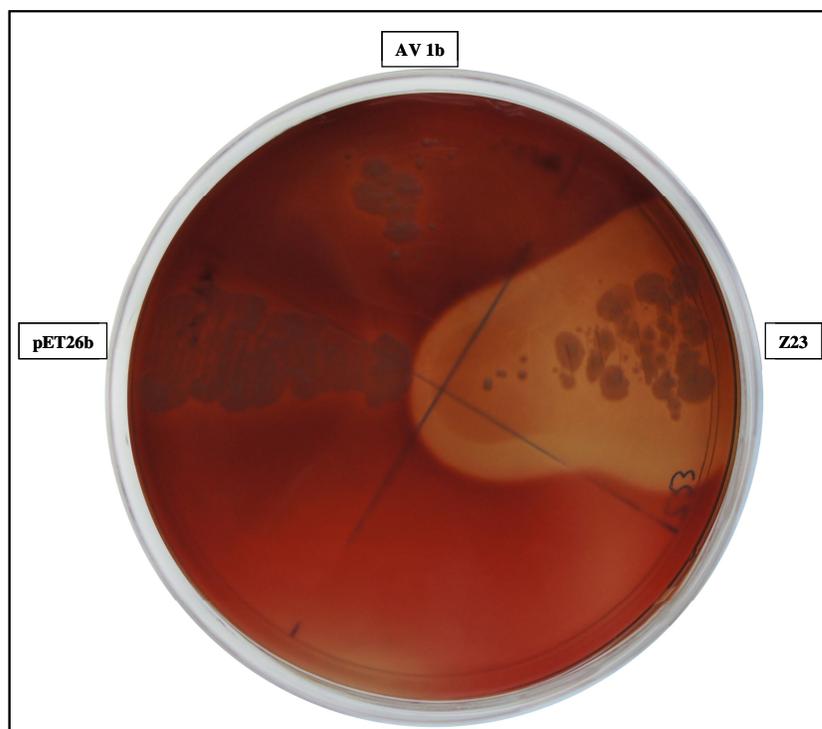


FIGURA 29: Atividade hemolítica das isoformas recombinantes da toxina alfa. Placas de ágar sangue com meio sólido de Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro. Também foram adicionados ao meio antibióticos (canamicina 50 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL) e IPTG 0,6mM. É possível observar a hemólise somente onde houve crescimento da *E. coli* contendo a construção α Z23.

5. DISCUSSÃO

C. perfringens é um dos principais patógenos envolvidos em doenças entéricas de animais domésticos (como p. ex. Enterite Necrótica em aves, bezerros, caprinos, ovinos e leitões; enterocolite em cavalos) e em quadros de toxinfecção alimentar em humanos (Songer, 2010). Além disso, essas bactérias estão associadas também a quadros de mionecroses, como a gangrena gasosa. Por ser um agente tão patogênico, *C. perfringens* e seus esporos estão sendo relacionados a armas biológicas e ao bioterrorismo (Titball, 2009).

O caráter agudo dessas infecções e inflamações, torna a imunização dos animais uma prioridade e preocupa produtores e o governo. A utilização de antibióticos na ração animal proporcionou uma redução dos casos de clostridioses em todo o mundo, porém seu uso indiscriminado como promotores de crescimento foi relacionado com o aumento de surtos provocados por linhagens resistentes, incluindo linhagens de *C. perfringens* (Johansson *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2004).

Dentre os vários fatores de virulência de *C. perfringens*, a toxina alfa (fosfolipase C) é considerada um importante fator para o desenvolvimento da gangrena gasosa e, até antes da descoberta da toxina netB, a principal responsável da enterite necrótica em aves (Keyburn *et al.*, 2006). Além de estar presente em todos os tipos de *C. perfringens*, a toxina alfa apresenta grande virulência e age na hidrólise da porção fosfolipídica da membrana, levando a lise celular. A atuação dessa proteínas depende do tecido atingido e é caracterizada por hemólise, ação necrosante, aumento da permeabilidade vascular e da agregação plaquetária (Titball *et al.*, 1999, Titball, 2005; Stevens, 1988; Sugahara, 1976; Ohsaka, 1978; Canard, 1989).

Este trabalho buscou identificar e descrever os polimorfismos existentes no gene da toxina alfa a partir de isolados de diferentes procedências. Com isso, pretendeu-se ter uma visão geral da variabilidade de formas que essa proteína possa apresentar na natureza. Para isso, foram coletadas UFCs individualizadas diferentes, dentro de uma mesma placa, ou seja, a partir de uma mesma amostra. A extração do material genético, seguido de purificação com fenol-clorofórmio foi priorizada, afim de se obter um DNA íntegro e puro por mais tempo no banco de DNA do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares. Entretanto, Baums *et al.* (2004) descreveram um método rápido e prático de extração de DNA de *C. perfringens* por aquecimento, porém, este não utiliza um passo de purificação.

Para amplificação de parte do gene *plc*, foi adotada a estratégia de *nested* PCR e para isso, foram desenhados alguns pares de iniciadores (Figura 5) permitindo o uso de um par externo na primeira reação e, para a segunda reação, um conjunto mais interno. Outros trabalhos utilizaram essa técnica no intuito de identificar *C. perfringens* enterotoxigênicos a partir de amostras com pouca quantidade desse microorganismos (Miwa *et al.*, 1996; Miwa *et al.*, 1997a; Miwa *et al.*, 1997b; Miwa *et al.*, 1998). Para o presente trabalho, essa estratégia foi essencial para que houvesse a amplificação

do gene *plc* a partir do DNA obtido dos isolados. Como a extração do DNA era feita a partir do isolamento primário de uma única colônia, sem uma propagação adicional, o rendimento do material genético obtido era pouco, sendo a amplificação consecutiva por *nested* PCR uma medida que contornou essa dificuldade.

A classificação dos isolados obtidos nesse estudo quanto ao tipo toxigênico revelou uma grande prevalência de *C. perfringens* do tipo A, sendo que a grande maioria (56%) apresentou o gene *cpb-2*, que codifica a toxina beta-2. É sabido que *C. perfringens* do tipo A é o tipo toxigênico mais abundante no ambiente e no trato gastrointestinal de humanos e animais (Rood, 1998; Florence *et al.*, 2011). Essa presença majoritária do tipo A também foi corroborada por outros trabalhos que realizaram a genotipagem de *C. perfringens* isolados de frangos (Gomes *et al.*, 2008), leitões (Ferreira, 2006; Vieira *et al.*, 2008) e bezerras (Ferrarezi, 2008) no Brasil e de outras espécies de animais no exterior (Gholamiandekhordi *et al.*, 2005; Heikinheimo *et al.*, 2005, Erol *et al.*, 2008; Gurjar *et al.*, 2008). A presença do gene *cpb-2* está vinculado às linhagens causadoras de eventos de diarreia em diferentes animais (Herholz *et al.*, 1999; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2001; Waters *et al.* 2003; Fisher *et al.* 2005). Entretanto, neste estudo, a sua presença não foi exclusiva de animais doentes e corroborou alguns estudos anteriores que encontraram a toxina beta-2 em diversas linhagens de *C. perfringens* isolados de animais sadios (van Asten *et al.*, 2010).

A compreensão das relações de parentesco genético entre linhagens distintas de *C. perfringens* tem sido realizada através de diferentes metodologias. A caracterização de plasmídeos, a ribotipagem, a eletroforese em gel campo pulsado (PFGE), o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e a PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) são alguns exemplos (Schalch *et al.* 1999; Engström *et al.* 2003; Gholamiandekhordi *et al.* 2006; Abildgaard *et al.* 2009; Karpowicz *et al.* 2009). O sequenciamento de genes importantes e inferências filogenéticas entre isolados é restrito a poucos trabalhos. Embora haja estudos que compararam sequências do gene *plc*, eles se baseiam em linhagens obtidas de origens específicas (Tsutsui 1995; Titball *et al.* 1999; Sheedy *et al.* 2004; Abildgaard *et al.* 2009; Karpowicz *et al.* 2010). Como mencionado, este trabalho buscou caracterizar o gene da toxina alfa a partir de amostras de origem e natureza diversas, buscando uma visão mais ampla dos polimorfismos possíveis nesse gene.

Além da análise das sequências do gene *plc* dos isolados obtidos, foi priorizada uma caracterização das sequências disponíveis no banco de dados do NCBI. Até onde se sabe, este foi o primeiro trabalho a realizar uma análise do gene da toxina alfa contemplando um grande número de sequências. Foi possível averiguar um alto nível de diversidade genética no gene *plc* (Tabela 9). Considerando somente as sequências produzidas neste trabalho, foram identificados 71 sítios polimórficos em 1113 pares de base analisados. Estes valores podem ser considerados altos quando comparado aos obtidos por Tsutsui *et al.* (1994), que registraram uma baixa a moderada taxa de

substituição de nucleotídeo (1-4%) para o gene completo. Entretanto, esses autores trabalharam somente com 10 linhagens de *C. perfringens*, o que é um número baixo comparado às 407 sequências apresentadas aqui. A análise da sequência traduzida revelou 30 substituições de aminoácidos comparado às 23 reportadas por Abildgaard *et al.* (2009). Dentre as 91 isoformas descritas neste estudo (incluindo as sequências do banco de dados), foram identificadas 22 novas isoformas da toxina alfa.

A relação filogenética interespecífica de fosfolipases C de *C. botulinum*, *C. novyi*, *C. sardiniense*, *C. sordellii*, *C. bifermentans*, *C. haemolyticum*, *C. thermocellum*, *C. tetani*, *C. carboxidivorans*, *C. ljungdahlii*, e *C. acetobutylicum*, juntamente com as sequências de *C. perfringens*, foi inferida através da construção de uma árvore (Figura 12) baseada nas sequências de aminoácidos. Não houve correlação entre a origem dos isolados ou o estado de saúde do animal na qual a linhagem foi obtida; e a formação de clados monofiléticos. Em geral, as sequências deste trabalho foram muito similares àquelas provenientes do banco de dados, reiterando, assim, a diversidade das formas da toxina alfa entre os mais variados isolados e linhagens. Karpowics *et al.* (2010) demonstraram a relação entre a procedência de seus isolados e a formação de clados específicos ao trabalhar com amostras de compostagem de diferentes idades. Existem poucas sequências de fosfolipase C das outras espécies de *Clostridium*, não sendo possível verificar a presença de polimorfismos e a diversidade genética entre elas. No entanto, a relação filogenética entre essas toxinas revelou similaridades genéticas já descritas anteriormente, por exemplo entre *C. haemolyticum* e *C. botulinum* (Nakamura *et al.*, 1983) e entre *C. sordellii* e *C. bifermentans* (Karasawa *et al.*, 2003).

A toxina alfa é uma das fosfolipases C bacterianas mais estudadas e já foram descritas diferentes formas estruturais (Naylor *et al.*, 1998; Eaton *et al.*, 2002; Justin *et al.*, 2002). Além disso, já foram identificados diversos resíduos de aminoácidos considerados essenciais para a estrutura e/ou função da proteína. Íons zinco são fundamentais para a atividade catalítica de fosfolipase C (Titball *et al.*, 1993) e são ligados à toxina pelos seguintes aminoácidos: Trp1, His11, Asp56, His68, Asp130, His136, His148 e Glu152 (Naylor *et al.*, 1998; Justin *et al.*, 2002; Titball and Basak, 2004). Nesse contexto, a isoforma 11 apresentou a substituição de His→Tyr no resíduo 11 e, por isso, foi selecionada para a clonagem e expressão em *E. coli*.

Cálcio é outro íon essencial para a atividade da toxina devido a sua participação na ligação da proteína à membrana (Moreau *et al.*, 1988). Os resíduos de aminoácidos que se ligam a esse íon são: Glu32, Asp269, Gly271, Thr272, Asp273, Asp293, Asn294, Gly296, Asn297, Asp298, Asp336 e Ala337 (Titball e Basak, 2004), sendo que uma alteração em uma dessas posições pode interferir na formação do complexo toxina-membrana. Três isoformas (1, 3 e 26) apresentaram a substituição Ala→Val na posição 337. Outra substituição de aminoácido importante foi observada no resíduo 364 (Asn→Asp), posição envolvida na interação da toxina à membrana (Naylor *et al.*, 1998). Existem

outros resíduos de aminoácidos considerados essenciais que não foram citados acima, mas não foram identificadas nenhuma alteração nas isoformas descritas aqui (Nagahama *et al.*, 1995; Guillouard *et al.*, 1996; Nagahama *et al.*, 1997; Eaton *et al.*, 2002).

Os resultados discutidos até aqui geraram uma publicação na *Veterinary Microbiology* (ISSN: 0378-1135, fator de impacto: 3,327), periódico importante da área: Siqueira FF, Almeida MO, Barroca TM, Horta CC, Carmo AO, Silva RO, Pires PS, Lobato FC, Kalapothakis E. Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity, *Vet Microbiol*, 159 (3-4), 397-405, 2012 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.012).

O próximo passo do trabalho foi produzir a toxina alfa recombinante de *C. perfringens*. Para isso, foram selecionadas duas isoformas descritas neste trabalho: a isoforma 7 que foi a mais prevalente e considerada como tipo selvagem; e a isoforma 11, com mutação importante no resíduo 11. A isoforma 7 estava presente em nove isolados, provenientes de fezes de um frango sadio, de bovinos doentes, de rações de frango e de fezes de um cão sadio. O DNA usado como molde para amplificação e clonagem foi o do isolado Z23, oriundo de um cão sadio. Essa isoforma não apresentava nenhuma mutação em resíduo importante e foi denominada α Z23. Já a isoforma 11 apresentava a mutação em um aminoácido onde se liga o íon zinco, considerado importante para atividade enzimática. O isolado que possui essa isoforma é proveniente das fezes de um frango sadio, e ela foi denominada α AV1b. É importante ressaltar que a descoberta desse mutante natural tem importância biológica e remete também à manutenção de linhagens de *C. perfringens* com patogenicidade reduzida, capazes de co-evoluir com seus hospedeiros.

As duas estratégias adotadas para a clonagem das toxinas recombinantes utilizaram proteínas de fusão afim de otimizar a obtenção de uma proteína ativa, solúvel e pura. A escolha do vetor pMAL-c2E se deu pela produção da proteína fusionada MBP, que pode ser capaz de funcionar como uma chaperona molecular e, no contexto de uma proteína de fusão, atua sequestrando agregados intermediários e impedindo a sua auto-associação (Fox e Waugh, 2003). Entretanto, mesmo após alterar sistematicamente as condições de expressão como tempo de indução, temperatura e concentração de IPTG, a toxina alfa recombinante se apresentou somente na porção insolúvel. Em outros trabalhos a MBP também não conseguiu solubilizar efetivamente a proteína recombinante fusionada a ela (Chen e Gouaux, 1996; Korepanova *et al.*, 2009; Fuellgrabe *et al.*, 2011).

As proteínas recombinantes podem acumular-se numa forma solúvel no citoplasma, precipitar e formar agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são depósitos protéicos, amorfos e densos, que podem ser encontrados tanto no citoplasma quanto no espaço periplasmático da bactéria e resultam da falha do enovelamento adequado das proteínas (Georgiou e Valax, 1999). Entre os fatores mais relevantes que influenciam a formação desses depósitos protéicos estão a taxa de expressão protéica, a presença de pontes dissulfetos e a

hidrofobicidade. Sabe-se que sequências hidrofóbicas não são adequadamente protegidas por chaperoninas e que interações intra-moleculares podem gerar agregados estáveis, reduzindo a solubilidade (Swartz, 2001).

A solubilização e a recuperação de moléculas bioativas a partir de corpos de inclusão é possível, e diversos protocolos tem sido propostos. Basicamente, esses consistem no isolamento inicial dos corpos de inclusão através de ultra-centrifugação, seguido da solubilização com agentes caotrópicos (Uréia 8M, por exemplo) e, por fim, o *refolding* buscando enovelar a proteína corretamente com o auxílio de aditivos (Arginina 0,5M, por exemplo). Entretanto, a padronização das condições adequadas é laboriosa e específica para cada proteína trabalhada (Singh e Panda, 2005)

A toxina alfa de *C. perfringens* apresenta regiões altamente hidrofóbicas, especialmente em sulcos na superfície da proteína, que permitem que a toxina ancore na membrana da célula, para atuar nos fosfolípidos (Naylor *et al.*, 1998). A hidrofobicidade inerente dessa proteína pode ter contribuído para a expressão da alfa recombinante sob a forma insolúvel em ambas construções (pMAL: α e pET26b: α). Além disso, a estratégia utilizando o vetor pMAL -c2E trouxe grandes dificuldades para a purificação. Por não ter obtido a recombinante solúvel, não foi possível adotar a coluna com resina de amilose para cromatografia por afinidade, já que ela é incompatível com agentes desnaturantes (Uréia e Guanidina-HCl). A toxina alfa apresenta peso molecular praticamente idêntico ao da MBP (42,5 kDa) e ponto isoelétrico muito próximo ($\alpha = 5,4$ e MBP = 4,9), o que inviabilizaria outras técnicas de purificação, como a gel filtração e a troca iônica, respectivamente.

A estratégia utilizando a construção pET26b: α apresentava a vantagem de produzir uma recombinante com cauda de seis resíduos de histidina. As proteínas com essa *tag* possuem um alta afinidade seletiva por Ni^{2+} e por outros íons metálicos que podem ser imobilizados em uma resina cromatográfica usando ligantes quelantes. Consequentemente, essas proteínas com cauda de histidina se ligam seletivamente ao íon imobilizado, ao passo que as demais proteínas celulares não se ligam, ou ligam fracamente. As caudas de histidina são pequenas e geralmente menos prejudiciais do que outras *tags* para a propriedade da proteína a qual ela está fusionada, sendo que a remoção dessas até mesmo desnecessária (GE Healthcare, 2007).

A coluna escolhida para a purificação da construção pET26b: α (HisTrap™ HP) é compatível com agentes desnaturantes, sendo viável a purificação dos corpos de inclusão em solução contendo uréia 8M. Vários trabalhos utilizaram com sucesso a purificação em condições desnaturantes com essa coluna (Wan *et al.*, 2006; Khurana *et al.*, 2011; Ejaz *et al.*, 2012). Houve a tentativa de realizar o *refolding* da toxina alfa recombinante ainda imobilizada na coluna. Para isso, é feita a remoção da uréia no tampão de ligação através da troca dos tampões no sistema antes de fazer a eluição da proteína ligada à coluna. Entretanto, foi observada a precipitação imediata da toxina recombinante após a eluição sem uréia 8M. Visando evitar a precipitação dessa proteína dentro da coluna,

aumentando a recuperação da recombinante, a uréia 8M foi mantida em todos os tampões utilizados na purificação (Tampão de ligação e de eluição).

A reação de lecitinase em LB-ágar suplementado com 10% de gema de ovo demonstrou ser um método adequado e prático para identificação de atividade enzimática das toxinas alfa recombinantes produzidas em *E. coli*, revelando alteração do meio pela hidrólise da lecitina. A atividade de lecitinase positiva foi identificada através do halo esbranquiçado em volta das colônias de *E. coli*, ou no local onde foi inoculado o extrato testado. Na primeira abordagem de atividade realizada, foram estriadas colônias de *E. coli* contendo os plasmídeos da construção pET26b: α de ambas as isoformas (α Z23 e α AV1b). Como controle negativo das proteínas bacterianas, foi estriada *E. coli* contendo o vetor pET26b sem o inserto. Houve reação positiva somente para a isoforma α Z23, em placas contendo IPTG 0,6mM, reiterando a necessidade deste indutor para a expressão da toxina alfa recombinante. O mesmo foi observado no teste em ágar sangue, o qual houve hemólise somente para a isoforma α Z23. Esses resultados sugerem que a mutação identificada no resíduo 11 da isoforma α AV1b foi fundamental extinguir a atividade hidrolítica e hemolítica dessa toxina, uma vez que não foi observada nenhuma alteração de opacidade/hemólise no local onde houve o crescimento de *E. coli* contendo essa construção.

A histidina é um aminoácido importante na ligação do centro ativo de proteínas com os seus substratos e portanto pode ser encontrada na maioria dos sítios ativos de enzimas. Cinco resíduos de histidina (11, 68, 126, 136 e 148) estão diretamente envolvidos no ancoramento do zinco no sítio catalítico da toxina alfa de *C. perfringens*. Através de mutagênese dirigida, Guillouard *et al.* (1996) demonstrou que a alteração destes aminoácidos por serina reduziu ou extinguiu a atividade de lecitinase, esfingomielinase e hemolítica. Para a substituição His11-Ser, foi determinado que um baixo, porém significativo, nível de atividade lecitinase foi retido. Embora a atividade lecitinase e hemolítica não tenha sido mensurada em números no presente trabalho, foi observado que a mutação de His11-Tyr aboliu a atividade enzimática da isoforma α AV1b em LB-ágar suplementado com gema de ovo e em ágar sangue. Tanto a serina, quanto a tirosina são aminoácidos polares neutros e se mostraram incapazes de manter a atividade catalítica das toxinas mutantes. Tal fato corrobora a idéia de que os aminoácidos essenciais, como o His11, são conservados evolutivamente, o que pode ser comprovado pela semelhança na estrutura do sítio ativo de outras fosfolipases como as de *C. bifementans* e *C. novyi*. e com fosfolipases de outras espécies como *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. As fosfolipases C dessas espécies são agrupadas e denominadas como metaloenzimas de zinco ("*zinc metalloenzymes*") (Jepson e Titball, 2000).

A outra abordagem utilizada com o teste de atividade lecitinase almejou verificar como ocorre a síntese da toxina alfa recombinante após a indução com IPTG 0,6mM. Para isso, alíquotas da expressão contendo a construção pET26b: α de ambas isoformas α Z23 e α AV1b e do controle negativo

(pET26b sem inserto) foram coletadas em diferentes tempos, verificando a reatividade do sobrenadante (proteínas exportadas) e do *pellet* (microorganismo). Novamente, houve reação positiva apenas nas alíquotas provenientes da expressão da isoforma $\alpha Z23$.

A atividade de lecitinase detectada no *pellet* do tempo zero pode ser explicada pelo fato da placa de LB-ágar com emulsão de gema de ovo conter também IPTG 0,6mM. Assim, a indução da expressão ocorreu devido a presença do indutor na placa. Outros pontos com atividade foram verificados nos tempos 2 e 4 horas após indução, tanto no sobrenadante, quanto no *pellet*. A atividade no sobrenadante foi inesperada, uma vez que a construção foi realizada sem o peptídeo sinal da toxina alfa de *C. perfringens*, abrangendo somente a toxina madura. Porém, a presença do *pelB leader* do vetor pET26b pode ter influenciado. Inicialmente, a inclusão dessas sequências sinais direcionam a proteína alvo para o espaço periplasmático. Entretanto, um fenômeno ainda não compreendido de "vazamento" das proteínas recombinantes periplasmáticas pode ocorrer, podendo encontrá-las no meio. Muitas vezes, a proteína alvo no meio é devido a dano ao envelope da célula ao invés de uma secreção verdadeira (Novagen, 2003).

Não foi observada atividade lecitinase após 17 e 24 horas de indução na expressão da isoforma $\alpha Z23$ em nenhuma das alíquotas (*pellet* e sobrenadante). É provável que após muito tempo de indução, a proteína recombinante tenha sido sintetizada em altas taxas, havendo a precipitação desses aglomerados protéicos no citoplasma bacteriano. Como já mencionado, a formação de corpos de inclusão é comum na expressão de proteínas recombinantes, gerando agregados insolúveis de proteínas enoveladas incorretamente, desprovidos de atividade biológica.

A produção de anti-corpos para a caracterização imunológica de proteínas em diferentes tipos de estudo pode ser realizada a partir de alguns métodos, tendo como antígenos proteínas recombinantes, peptídeos, ou utilizando a tecnologia de vacina de DNA. A estratégia adotada neste trabalho foi o uso de proteínas recombinantes e já foi aplicada para a produção de toxina alfa recombinante em diferentes sistemas de expressão (Hoang *et al.*, 2008; Zekarias *et al.*, 2008; Cooper *et al.*, 2009; Kulkarni *et al.*, 2010; de los Santos *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012). Todos estes trabalhos testaram a eficiência desses antígenos recombinantes contra a Enterite Necrótica em Aves (ENA), doença de grande prevalência e de importância econômica para criação de frangos de corte. Embora a toxina alfa de *C. perfringens* tenha sido até descartada como fator de virulência para essa doença (Keyburn *et al.*, 2006), seu papel ainda é debatido uma vez que foi constatado que a imunização com toxóides alfa fornece proteção substancial contra ENA (Cooper e Songer, 2009).

Devido sua importância também na patogênese da gangrena gasosa, o toxóide alfa de *C. perfringens* foi capaz de gerar proteção também contra outras fosfolipases C de *C. absonum* e *C. bifementans*, espécies que também têm sido isoladas de casos de mionecrose clostridial (Neeson *et al.*, 2007). Conforme revisado por Titball (2009), a preocupação com a elaboração de vacinas contra a

gangrena gasosa com a toxina alfa teve início no início dos anos de 1930, e atingiu o ápice durante a Segunda Guerra Mundial. Entretanto, a dificuldade no preparo de lotes eficientes dessas vacinas pode ter contribuído com a diminuição de trabalhos após esse período.

Com a elucidação da estrutura tridimensional dessa proteína e a caracterização funcional de seus domínios, algumas estratégias foram adotadas para a imunização de animais com a toxina alfa de *C. perfringens*. Conforme mencionado, o domínio N- terminal é responsável pela atividade de fosfolipase C. Este domínio foi produzido em *E. coli* e o polipeptídeo purificado manteve a atividade enzimática, embora tenha perdido a sua toxicidade e atividade citolítica em relação à holotoxina (Titball *et al.*, 1991). Por outro lado, o domínio C- terminal isolado não demonstrou atividade tóxica ou citolítica, mas quando ambos os domínios purificados foram reunidos em solução, foi restaurada a atividade hemolítica. Tais fatos confirmam que estes domínios devem estar associados para que esse peptídeo seja funcional (Titball *et al.*, 1993). Além disso, a resposta imunológica contra o domínio C- terminal fornece proteção contra um desafio de até 50 doses letais (DL) médias da toxina alfa purificada (Williamson e Titball, 1993). A imunização de camundongos com o domínio C- terminal também resultou na proteção contra a gangrena gasosa nesses animais experimentais (Williamson e Titball, 1993; Stevens *et al.*, 2004).

Sendo assim, duas abordagens para o desenvolvimento de vacinas com o toxóide alfa tem sido propostas: ou a expressão de fragmentos (ou domínios) não tóxicos; ou o uso de formas não tóxicas da holotoxina como imunógeno. O presente trabalho optou pela segunda estratégia, uma vez que foi identificado um mutante natural desprovido de atividade enzimática (α AV1b). Schoepe *et al.* (2001) produziram uma recombinante de variante da toxina alfa (denominada AT121A/91), também de ocorrência natural e sem atividade enzimática (fosfolipase C) e hemolítica. A imunização com essa construção gerou anticorpos que foram capazes de reduzir significativamente a atividade *in vitro* da toxina alfa nativa. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa verificou que a alteração no resíduo 212 dessa isoforma (Arg \rightarrow His) foi fundamental para a induzir uma proteção completa para camundongos contra a toxina nativa de *C. perfringens*. Sendo assim, os anticorpos produzidos com a isoforma AT121A/91, com sua sequência natural, não foi capaz de proteger os animais desafiados com a alfa nativa (Schoepe *et al.*, 2006). Titball (2009) afirma que a utilização do uso de isoformas inativas da toxina alfa é promissor, mas deve ser avaliado se toda a atividade tóxica foi eliminada e que a reversão da toxicidade total não é possível.

O teste de ELISA indireto é uma forma de mensurar a reatividade de um determinado anticorpo e suas diluições, e acompanhar a evolução da resposta imune durante a imunização. Assim, tem-se uma forma efetiva de determinar se o programa de imunização pode ser finalizado ou prorrogado. Após o ciclo de imunização dos coelhos, o sangue foi coletado e o soro titulado por ELISA, contra todos os antígenos utilizados. Todos os animais imunizados alcançaram título adequado

após três doses crescentes dos imunógenos (25, 50 e 100 µg). O reconhecimento dos soros anti-AV1b e anti-Z23 contra a toxina alfa nativa sugere que os epítomos funcionalmente importantes de ambas recombinantes foram apresentados de forma similar aos da toxina nativa.

Entretanto, o soro anti-Z23 apresentou uma resposta contra a toxina nativa consideravelmente alta desde o primeiro reforço (Figura 25c). Esta recombinante, por possuir atividade, pode ter estimulado mais o sistema imune do hospedeiro a partir de seu primeiro contato com o animal. Outra possível explicação para esse fato é que a uréia presente no preparo da amostra de α Z23 pode ter favorecido a exposição do determinante antigênico durante a resposta imune do hospedeiro. Não há muitos trabalhos que utilizam proteínas recombinantes solubilizadas em uréia para a imunização. Rothel *et al.* (1997) produziram um antígeno de *Taenia ovis* recombinante fusionado à GST (*glutathione-S-transferase*), denominada 45W-GST. Eles viram que, quando a recombinante era tratada com 9 M de uréia e 1 mM de DTT, havia um aumento da resposta imune contra a porção 45W (antígeno de interesse) em relação a GST, ao passo que a recombinante sem esses agentes desnaturantes e redutores tinha efeito oposto, aumentando a resposta contra a proteína de fusão (GST). Os autores propõem que os epítomos de 45W poderiam ser melhor apresentados ao sistema imune sob a conformação desnaturada, ou que ainda o *refolding* correto desse antígeno foi obtido após a diluição dos agentes solubilizantes durante a formulação da vacina ou após a injeção *in vivo* (Rothel *et al.*, 1997). Situação semelhante pode ter ocorrido nos primeiros reforços utilizados com o antígeno α Z23, em comparação com a resposta obtida com a outra recombinante α AV1b.

Porém, ao final do terceiro reforço os soros de ambas recombinantes apresentaram o mesmo perfil de reconhecimento pela toxina alfa nativa (Figura 26a). Tal fato pode ser explicado pela alto grau de similaridade entre as sequências na porção C-terminal dos três antígenos usados. Como mencionado, esse domínio da toxina alfa é o responsável pela ligação da proteína a membrana celular e mostrou ter grande importância imunogênica. Ambas isoformas recombinantes possuem a sequência do domínio C-terminal idênticas, havendo somente uma mutação em relação a toxina nativa (Sigma - proveniente de *C. perfringens*, estirpe 13; NC_003366) no resíduo 345 (Ile - Val). Tal resíduo não foi mencionado como essencial para a estrutura e função da toxina alfa (Nagahama *et al.*, 1995; Guillouard *et al.*, 1996; Nagahama *et al.*, 1997; Naylor *et al.* 1998; Naylor *et al.*, 1999; Justin *et al.*, 2002; Nagahama *et al.*, 2006).

O fato da isoforma α AV1b ser desprovida de atividade enzimática e gerar anticorpos que são reconhecidos pela toxina alfa nativa de *C. perfringens* a torna uma promissora candidata para ser utilizada em vacinas. O uso de toxóides purificados para imunização a partir de *C. perfringens* mostraram eficácia variada, levando MacLennan (1962) a concluir que seria impossível converter essa toxina em um toxóide e que a o potencial imunogênicos dessas preparações se devia a toxinas residuais não-desnaturadas. Portanto, vacinas alternativas se tornaram necessárias e surgiram as duas

estratégias já citadas para imunização utilizando a toxina alfa: o uso de fragmentos (ou domínios) não tóxicos; ou o uso de formas naturalmente inativas da toxina completa como imunógeno. Nesse sentido, faz-se necessário saber se os anticorpos gerados contra a isoforma α AV1b são neutralizantes. Para isso, posteriormente serão realizados ensaios de soroneutralização *in vitro*, através do teste de lecitinase e hemólise em ágar sangue; e *in vivo*, utilizando camundongos.

Confirmando, o potencial neutralizante dos anticorpos gerados neste estudo, o objetivo final será desenvolver uma vacina polivalente contra clostridioses. Para muitas vacinas, não há um controle oficial quanto a eficiência e inocuidade desses produtos, ficando os testes a critério dos laboratórios produtores (Lobato *et al.*, 2007b). Além disso, diversos trabalhos confirmaram a baixa qualidade e ineficiência de muitas vacinas clostridiais comercializados no país (Azevedo *et al.* 1998; Lobato *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2003; Lobato *et al.*, 2004; Lobato *et al.*, 2007b). Diante de um mercado carente, os resultados positivos alcançados pelo nosso grupo de pesquisa com a toxina recombinante épsilon (Lobato *et al.* 2010; Souza *et al.* 2010), com o aprimoramento dos resultados da beta recombinante (Almeida, 2010), e juntamente com os resultados gerados aqui, serão aperfeiçoados afim de se produzir um produto biotecnológico polivalente aplicado à saúde animal.

O conhecimento de polimorfismos no gene *plc* é fundamental para o melhor entendimento da estrutura da toxina e virulência de *C. perfringens*. Doenças causadas por esses organismos têm grande importância médica e veterinária uma vez que as infecções podem resultar em prejuízos econômicos significativos para os produtores. Essas enfermidades evoluem de maneira rápida, o que inviabiliza o seu tratamento, sendo a vacinação sistemática e o manejo adequado dos animais as principais medidas profiláticas a serem adotadas. Este trabalho buscou elucidar quais eram algumas das variantes dessa toxina tão importante de *C. perfringens* que estão presentes na natureza. O grande número de isoformas da toxina alfa mostrou que esse fator de virulência pode estar até mesmo sob a forma inativa, como demonstrado com a isoforma α AV1b. Esse fato, remete à importância de manutenção de linhagens com patogenicidade reduzida no meio ambiente. A utilização desse isolado, juntamente com uma isoforma ativa (α Z23), para a produção de toxina recombinantes, possibilitou caracterizar diferentes perfis de atividade enzimática e hemolítica, e padrões muito próximos em relação ao potencial imunogênico de ambas recombinantes. Ao testar o potencial de neutralização dos soros obtidos após a imunização com as isoformas recombinantes contra a toxina alfa, espera-se que a α AV1b seja um importante componente para vacina contra clostridioses.

6. CONCLUSÃO

O isolamento de *C. perfringens* a partir de amostras randômicas revelou que a toxina alfa possui grande diversidade genética. A caracterização molecular do gene *plc* dessa espécie, juntamente com dados disponíveis em banco de dados, mostrou a presença de várias mutações não-sinônimas sendo possível descrever diferentes isoformas. Dentre essas substituições de aminoácidos, houve alterações em resíduos considerados essenciais para a manutenção da estrutura e/ou função da toxina.

A clonagem e expressão dessa toxina em *E. coli* utilizando diferentes vetores de expressão mostrou que as duas isoformas alfa recombinantes (α AV1b e α Z23) se apresentavam sob a forma insolúvel. O vetor pET26b foi a melhor opção por possuir estratégias mais eficientes de purificação. A isoforma recombinante α Z23 apresentou atividade de lecitinase em ágar com emulsão de gema de ovo e ação hemolítica em ágar sangue. Por outro lado, a isoforma α AV1b não demonstrou atividade provavelmente devido a mutação His11-Tyr. Ambas isoformas recombinantes foram imunogênicas e seu anticorpos foram capazes de reconhecer a toxina alfa nativa de *C. perfringens*.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho trazem como principal perspectiva a utilização de uma isoforma recombinante da toxina alfa inativa, obtida a partir de um isolado natural, como componente de uma vacina contra clostridiose. A isoforma α AV1b gerou anti-corpos que apresentaram similaridade antigênica com a toxina alfa nativa. Basta saber se esse anticorpos serão capazes de neutralizar a atividade da toxina alfa. Para isso, serão realizados ensaios de soro-neutralização *in vitro*, através do teste de lecitinase em ágar gema de ovo e hemólise em ágar sangue. Pretende-se realizar também ensaio de soroneutralização cruzada em camundongos; bem como a avaliação da resposta imunológica das isoformas recombinantes nas principais espécies alvo – aves, caprinos, ovinos e bovinos.

Por fim, será elaborada uma vacina polivalente contra clostridioses contendo as toxinas recombinantes alfa, beta e épsilon de *C. perfringens*. Para isso, pretende-se aprimorar a produção das proteínas recombinantes visando um maior rendimento dessas moléculas após a purificação. Após a avaliação dessa vacina experimental, o processo de escalonamento da produção para utilização em escala comercial do produto se torna um passo laborioso mas essencial. Será realizado o pedido de proteção do produto gerado por meio de patente junto à Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica da UFMG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILDGAARD, L.; ENGBERG, R. M.; PEDERSEN, K.; SCHRAMM, H.; HOJBERG, O. Sequence variation in the α -toxin encoding *plc* gene of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased and healthy chickens. *Veterinary Microbiology*, v.136, p.293–299, 2009.

ALMEIDA, M. O. Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B e sua aplicação na imunização de animais. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 116p.

AZEVEDO, E. O.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; MAIA, J. D.; NASCIMENTO, R. A. P.; Avaliação de vacinas contra *Clostridium perfringens* tipos C e D. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.3, p.239-242, 1998.

BAUMS, C. G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.100, p.11–16, 2004.

BOKORI-BROWN, M.; SAVVA, C. G.; COSTA, S. P. F.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K.; TITBALL, R. W. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS Journal*, v. 278, p. 4589–4601, 2011.

BOSWRTH, T. J. On a new type of toxin produced by *Clostridium welchii*. *J. Comp. Pathol.*, v. 53, p. 245–255, 1943.

BUESCHEL, D. M.; JOST, B. H.; BILLINGTON, S.J.; TRINH, H.T.; SONGER, J.G. Prevalence of *cpb2* encoding beta2 toxin in *Clostridium perfringens* field isolates: a correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology* v. 94, p. 121–129, 2003.

CANARD, B.; COLE, S. T. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.86, p.6676-6680, 1989.

CHEN, G. Q.; GOUAUX, J. E. Overexpression of bacterioopsin in *Escherichia coli* as a water-soluble fusion to maltose-binding protein: Efficient regeneration of the fusion protein and selective cleavage with trypsin. *Protein Sci*, v.5, p.456–467, 1996.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*, v.15, p.55–60, 2009.

COOPER, K. K.; TRINH, H. T.; SONGER, J. G. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*, v.133 p.92–97, 2009.

CORREA, A.; OPPEZZO, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: Advantages of high-throughput screening. *Biotechnology Journal*, v.6, p.715–730, 2011.

DIFCO™ & BBL™ MANUAL. Manual of Microbiological Culture Media. ZIMBRO, M.J.; POWER, D. A.; MILLER, S. M.; WILSON, G. E.; JOHNSON, J.A. (eds.), 700p. 2009.

EATON, J. T.; NAYLOR, C. E.; HOWELLS, A. M.; MOSS, D. S.; TITBALL, R. W.; BASAK, A. K. Crystal structure of the *C. perfringens* alpha-toxin with the active site closed by a flexible loop region. *Journal of Molecular Biology*, v.319, p.275–281, 2002.

- EJAZ, A.; AMMANN, C. G.; WERNER, R.; HUBER, G.; OBERHAUSER, V. et al.** Targeting Viral Antigens to CD11c on Dendritic Cells Induces Retrovirus-Specific T Cell Responses. *PLoS ONE*, v.7,(9): e45102. 2012.
- ENGSTRÖM, B.E.; FERMÉR, C.; LINDBERG, A.; SAARINEN, E.; BAVERUD, V.; GUNNARSSON, A.** Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.225–235, 2003.
- EROL, I.; GONCUOGLU, M.; AYAZ, N.D.; ORMANCI, F. S. B.; HILDEBRANDT, G.** Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology*. v.47, p.31-34, 2008.
- EWING, B; GREEN P.** Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8, 3, 186-194, 1998.
- FERRAREZI, M. C.** Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de bezerros de corte com diarreia neonatal. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, UNESP, 2008. 40p.
- FERREIRA, T. S. P.** Caracterização genotípica de amostras de *Clostridium perfringens* provenientes de suínos através da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006. 69p.
- FISHER, J. D.; MIYAMOTO, K.; HARRISON, B.; AKIMOTO, S.; SERKER, M.R.; McCLANE, B.A.** Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene, *Molecular Microbiology*, v.56, p.747–762, 2005.
- FLORENCE, L. C. H.; HAKIM, S. L.; KAMALUDDIN, M. A.; THONG, K. L.** Determination of toxinotypes of environmental *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction. *Tropical Biomedicine* v.28(1), p.171–174, 2011.
- FOX, J. D.; WAUGH, D. S.** Maltose-Binding Protein as a Solubility Enhancer *E. coli* Gene Expression, *Protocols Methods in Molecular Biology*, v.205, p. 99-117, 2003.
- FUELLGRABE, M. W.; BOONROD, K.; JAMOUS, R.; MOSER, M.; SHIBOLETH, Y.; KRCZAL, G.; WASSENEGGER, M.** Expression, purification and functional characterization of recombinant Zucchini yellow mosaic virus HC-Pro. *Protein Expression and Purification*, v.75, p.40–45, 2011.
- FUJII, Y.; SAKURAI, J.** Contraction of the rat isolated aorta caused by *Clostridium perfringens* alpha toxin (phospholipase C): evidence for the involvement of arachidonic acid metabolism. *Br. J. Pharmacol.*, v.97, p.119–124, 1989.
- GE HEALTHCARE.** Purifying Challenging Proteins Principles and Methods. Disponível em: <http://www.gelifesciences.com>, 2007, 107pp.
- GE HEALTHCARE.** Recombinant Protein Purification Handbook Principles and Methods Disponível em: <http://www.gelifesciences.com/protein-purification>, 2009, 306pp.
- GEORGIU, G.; VALAX, P.** Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol.*, v.309, p.48-58, 1999.
- GHOLAMIANDEKHORDI, A. R.; DUCATELLE, R.; HEYNDRIKX, M.; HAESEBROUCK, F.; IMMERSEEL, F. V.** Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Veterinary Microbiology*, v.113, p.143–152, 2006.

- GIBERT, M.; JOLIVET-REYNAUD, C.; POPOFF, M. R.** Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, v.203, p.65–73, 1997.
- GKIOURTZIDIS, K.; FREY, J.; BOURTZI-HATZOPOLOU, E.; ILIADIS, N.; SARRIS, K.** PCR detection and prevalence of a-, b-, b2-, e-, i- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Veterinary Microbiology*, v.82, p.39–43, 2001.
- GOMES, M. J. P.** Gênero *Clostridium spp.* Microbiologia Clínica, LABACVET II, UFGS, 2007.
- GOMES, A. M.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. R. S.; ASSIS, R. A.** Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.1943-1947, 2008.
- GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P.** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, v.8(3), p.195-202, 1998.
- GUILLOUARD, I.; GARNIER, T.; COLE, S. T.** Use of site-directed mutagenesis to probe structure-function relationships of alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Infection and Immunity*, v.64 (7), p.2440–2444, 1996.
- GURJAR, A. A.; HEDGE, N.V. ; LOVE, B.C.; JAYARAO, B.M.** Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Molecular and Cellular Probes*, v.22, p.90–95, 2008.
- HATHEWAY, C. L.** Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiological Reviews*, v.3(1), p.66-98, 1990.
- HEIKINHEIMO, A.; KORKEALA, H.** Multiplex PCR assay for toxintyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology*, v.40, p.407–411, 2005.
- HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GIBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R.** Prevalence of b2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.358–361, 1999.
- HIGGINS DH; SHARP PM.** Clustal: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73, 237-244, 1998.
- HOANG, T. H.; HONG, H. A.; CLARK, G. C.; TITBALL, R. W.; CUTTING, S. M.** Recombinant *Bacillus subtilis* Expressing the *Clostridium perfringens* Alpha Toxoid Is a Candidate Orally Delivered Vaccine against Necrotic Enteritis. *Infection and Immunity*, v.76(11), p.5257–5265, 2008.
- HOMMA, A.; MARTINS, R. M.; JESSOUROUM, E.; OLIVA, O.** Desenvolvimento tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. *História, Ciências, Saúde- Manguinhos*, v.10, suppl.2, p.671-696, 2003.
- HUNTER, S. E. C.; CLARKE, I. N.; KELLY, D. C. ; TITBALL, R. W.** Cloning and Nucleotide Sequencing of the *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin Gene and Its Expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.60, n.1, p. 102-110, 1992.
- HUNTER, S. E. C.; BROWN, J. E., OYSTON, P.C.F.; SAKURAY, J.; TITBALL, R. W.** Molecular Genetic Analysis of Beta-Toxin of *Clostridium perfringens* Reveals Sequence Homology with Alpha-Toxin, Gamma-Toxin, and Leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v.61, n.9, p. 3958-3965, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em maio de 2010.

JANG, S. I.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S.-H.; LEEA, K. W.; LILLEHOJ, E. P.; HONG, Y. H.; AN, D.-J.; JEONG, W.; CHUN, J.-E.; BERTRAND, F.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S.; AROUS, J. B. Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide™ ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. *Vaccine*, v.30, p.5401–5406, 2012.

JANSEN, B. C. The beta toxin of *C. welchii* type B Wildosn, in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.28, n.4, p.495-549, 1961.

JEPSON, M.; TITBALL, R. Structure and function of clostridial phospholipases C. *Microbes and Infection*, v.2, p.1277–1284, 2000.

JOHANSSON, A. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.251-257, 2004.

JOHANSSON, A.; ASPAN, A.; KALDHUSDAL, M.; ENGSTRÖM, B. E. Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Veterinary Microbiology*, v.144, p.87–92, 2010.

JOHNSON, E. A. Clostridial toxins as therapeutics agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annual Review Microbiology*, v.53, p.551-575, 1999.

JUSTIN, N.; WALKER, N.; BULLIFENT, H. L.; SONGER, G.; BUESCHEL, D.M.; JOST, H.; NAYLOR, C.; MILLER, J.; MOSS, D. S.; TITBALL, R. W.; BASAK, A. K. The first strain of *Clostridium perfringens* isolated from an avian source has an Alpha-Toxin with divergent structural and kinetic properties. *Biochemistry*, v.41, p.6253-6262, 2002.

KANAKARAJ, R. ; HARRIS, D. L.; SONGER, J. G.; BOSWORTH B. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.29-38, 1998.

KARASAWA, T., WANG, X., MAEGAWA, T., MICHIIWA, Y., KITA, H., MIWA, K., NAKAMURA, S. *Clostridium sordellii* phospholipase C: gene cloning and comparison of enzymatic and biological activities with those of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifementans* phospholipase C. *Infection and Immunity*, v.71(2), p.641–646, 2003.

KARPOWICZ, E. ; NOVINSKAK, A.; BÄRLOCHER, F.; FILION, M. qPCR quantification and genetic characterization of *Clostridium perfringens* populations in biosolids composted for 2 years. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, p.571–581, 2010.

KATAHIRA, J.; INOUE, N.; HORIGUCHI, Y.; MATSUDA, M.; SUGIMOTO, N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *The Journal of Cell Biology*, v.136 (6), p.1239–1247, 1997.

KEYBURN, A. L.; SHEEDY, S. A.; FORD, M. E.; WILLIAMSON, M. M.; AWAD, M. M.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. Alpha-Toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in Necrotic Enteritis in Chickens. *Infection and Immunity*, v.74 (11), p.6496-6500, 2006.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D.; RUBBO, A. D.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*, v.4 (2), e26, 2008.

- KEYBURN, A. L.; YAN, X.; BANNAM, T. L.; VAN IMMERSEEL, F.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J.** Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet. Res.* v.41:21, 2010.
- KOREPANOVA, A.; MOORE, J. D.; NGUYE, H.; HUA, Y.; CROSS, T. A.; GAO, F.** Expression of membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* as fusions with maltose binding protein. *Protein Expression and Purification*, v.53(1), p.24–30, 2007.
- KHURANA, S.; LARKIN, C.; VERMA, S; JOSHI, M. B.; FONTANA, J.; STEVEN, A. C.; KING, L. R.; MANISCHEWITZ, J.; MCCORMICK, W.; GUPTA, R. K.; GOLDING H.** Recombinant HA1 produced in *E. coli* forms functional oligomers and generates strain-specific SRID potency antibodies for pandemic influenza vaccines. *Vaccine*, v.29 (34), p.5657–5665, 2011.
- KULKARNI, R. R.; PARREIRA, V. R.; JIANG, Y.-F.; PRESCOTT, J. F.** A Live Oral Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine expressing *Clostridium perfringens* antigens confers protection against Necrotic Enteritis in broiler chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.17 (2), p. 205–214, 2010.
- LEBRUN, M.; FILEE, P.; MOUSSET, B.; DESMECHT, D.; GALLEN, M.; MAINIL, J. G.; LINDEN, A.** The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Veterinary Microbiology*, v.120, p.151–157, 2007.
- LI, J.; MACCLANE, B. A.** Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and phinduced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.7620-7625, 2006.
- LIBRADO, P., ROZAS, J.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v.25, p.1451– 1452, 2009.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.** Controle e profilaxia das clostridioses. *A Hora Veterinária*, ano 19, n.113, p. 29-33, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R. A.; MARTINS, N. E.; GONÇALVES, L. C. B.** Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52 (4), p.313-318, 2000.
- LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A; BALSAMÃO, G. M.; ABREU, V. L. V., NASCIMENTO, R. A. P.; NEVES, R. D.** Eficácia de vacinas comerciais contra clostridioses frente ao desafio com *Clostridium sordellii*. *Ciência Rural*, v.34 (2), p.439-442, 2004.
- LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A.** Clostridioses dos pequenos ruminantes. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, v.102, (561-562), p.23-34, 2007a.
- LOBATO, F. C. F.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A.; LIMA, E. H. M.; LIMA, C. G. R. D.; SILVA, R. O. S.; PIRES, P. S.** Avaliação da potência de vacinas contra *Clostridium tetani* comercializadas no Brasil. *Ciência veterinária nos trópicos*, v.10 (2/3), p.74-78, 2007b.
- LOBATO, F. C. F.; DIAS, L. D.; SALVARANI, F. M.; MARTINS, N. E.; NASCIMENTO, R. A. P.; ASSIS, R. A.** Avaliação da potência de vacinas contra *Clostridium septicum* comercializadas no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, n.2, p.225-228, 2008.
- LOBATO, F. C.; LIMA, C. G.; ASSIS, R. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R.O.; SALVARANI F. M.; CARMO, A. O.; CONTIGLI, C.; KALAPOTHAKIS, E.** Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. *Vaccine*, v.28 (38), p.6125-6127, 2010.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- MACFARLANE, M. G.; KNIGHT, B. C. J. G.** The biochemistry of bacterial toxins. I. Lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochemical Journal*, v.35, p.884-902, 1941.
- MACLENNAN, J. D.** The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriological Reviews*, v.26, p.177-274, 1962.
- MANICH, M.; KNAPP, O.; GIBERT, M.; MAIER, E.; JOLIVET-REYNAUD, C.; GENY, B.; BENZ, R.; POPOFF, M. R.** *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and *Staphylococcus* Pore-Forming toxins, but shows functional differences. *PLoS ONE*, v.3 (11), e3764, 2008.
- MANTECA, C.; DAUBE, G.; JAUNIAUX, T.; LINDEN, A.; PIRSON, V.; DETILLEUX, J.; GINTER, A.; COPPE, P.; KAECKENBEECK, A.; MAINIL, J.G.** A role for the *Clostridium perfringens* beta2-toxin in bovine enterotoxaemia? *Veterinary Microbiology* v.86, p.191-202, 2002.
- MAPA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em maio de 2011.
- MAPA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022. *Assessoria de Gestão Estratégica*. 2012, 50pp.
- MARTEL, A.; DEVRIESE, L. A.; CAUWERTS, K.; DEGUSSEM, K.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F.** Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.*, v. 33 (1), p. 3-7, 2004.
- MCCLANE, B. A.; UZAL, F. A.; MIYAKAWA, M. F.; LYERLY, D.; WILKINS, T.** The enterotoxigenic clostridia, In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenburg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes*, vol. 4. Springer-Verlag, New York, NY. 2006. p.698-752.
- MDIC.** Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/>. Acesso em maio de 2010.
- MERIAL.** Merial Saúde Animal. Disponível em: <http://www.merial.com.br/>. Acesso em janeiro de 2013.
- MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; FUJIKURA, K.** Nested polymerase chain reaction for detection of low levels of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in animal feces and meat. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v.58, p.197-203, 1996.
- MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; ATSUMI, M.** Most probable number method combined with Nested polymerase chain reaction for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.59, p.89-92, 1997a.
- MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; HONDA, H.** Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.59, p.557-560, 1997b.
- MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; ATSUMI, M.; HONDA, H.** Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v.42, p.195-200, 1998.

- MOREAU, H.; PIERONI, G.; JOLIVET-REYNAUD, C.; ALOUF, J. E.; VERGER, R.** A new kinetic approach for studying phospholipase C (*Clostridium perfringens* a-toxin) activity on phospholipid monolayers. *Biochemistry*, v.27, p.2319–2323, 1988.
- MORRIS, W.E; DUNLEAVY, M. V.; DIODATI, J.; BERRA, G.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.** Effects of *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in the bovine gut. *Anaerobe*, v.18, p.143-147, 2012.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.** *Microbiologia Médica*. 5 ed. Elsevier, 2006, 979 p.
- MYERS, G. S. A.; RASKO, D. A.; CHEUNG, J. K.; et al.** Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Research*, v.16, p.1031-1040, 2006.
- NAGAHAMA, M.; OKAGAWA, Y.; NAKAYAMA, T.; NISHIOKA, E.; SAKURAI, J.** Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha toxin, *The Journal of Bacteriology*, v.177, p.1179– 1185, 1995.
- NAGAHAMA, M.; MICHIEUE, K.; SAKURAI, J.** Membrane damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1280, p.120-126, 1996.
- NAGAHAMA, M.; NAKAYAMA, T.; MICHIEUE, K.; SAKURAI, J.** Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infection and Immunity*, v.65, p.3489–3492, 1997.
- NAGAHAMA, M.; HAYASHI, S.; MORIMITSU, S.; SAKURAI, J.** Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.36934–41, 2003.
- NAGAHAMA, M.; OTSUKA, A.; SAKURAI, J.** Role of tyrosine-57 and -65 in membrane-damaging and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1762, p.110 – 114, 2006.
- NAKAMURA, S.; KIMURA, I.; YAMAKAWA, K.; NISHIDA, S.** Taxonomic relationships among *Clostridium novyi* types A and B, *Clostridium haemolyticum* and *Clostridium botulinum* type C. *Journal of General Microbiology*, v.129, p.1473–1479, 1983
- NASCIMENTO, R. A. P.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; MARTINS, N. E.; ASSIS, R. A.; CARVALHO FILHO M. B.** Avaliação de vacinas contra *Clostridium novyi* tipo B. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56 (1), p.1-6, 2004.
- NAYLOR, C. E.; EATON, J. T.; HOWELLS, A.; JUSTIN, N.; MOSS, D. S.; TITBALL, R. W.; BASAK, A. K.** Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nature Structural Biology*, v.5 (8), p.738-746, 1998.
- NAYLOR, C. E.; JEPSON, M.; CRANE, D.T .; TITBALL, R. W.; MILLER, J.; BASAK, A. K.; BOLGIANO, B.** Characterisation of the Calcium-binding C-terminal Domain of *Clostridium perfringens* Alpha-toxin. *Journal of Molecular Biology*, v.294, p.757-770, 1999.
- NCBI, National Center For Biotechnology Information.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em outubro 2011.

- NEESON, B.N.; CLARK, G.C.; ATKINS, H.S.; LINGARD, B.; TITBAL, R.W.** Analysis of protection afforded by a *Clostridium perfringens* alpha-toxoid against heterologous clostridial phospholipases C. *Microbial Pathogenesis*, v.43, p.161-165, 2007.
- NEW ENGLAND BIOLABS**, pMAL™ Protein Fusion and Purification System, 5 ed. 2003, 54p.
- NOWELL, V. J.; KROPINSKI, A. M.; SONGER, J. G.; MACINNES, J. I.; PARREIRA, V. R.; PRESCOTT, J. F.** Genome sequencing and analysis of a type A *Clostridium perfringens* isolate from a case of bovine clostridial abomasitis. *PLoS ONE*, v.7 (3), e32271, 2012.
- NOVAGEN**. pET System Manual, 10 ed., 2003, 68pp.
- OHSAKA, A., TSUCHIYA, M.; OSHIO, C.; MIYAIRI, M.; SUZUKI, K.; YAMAKAWA, Y.** Aggregation of platelets in the mesenteric microcirculation of the rat induced by α - toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Toxicon*, v.16, p.333-341, 1978.
- PATYAR, S.; JOSHI, R.; PRASAD BYRAV, D. S.; PRAKASH, A.; MEDHI, B.; DAS, B.K.** Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science*, v.17 (21), 2010.
- PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOQUET, P.; POPOFF M. R.** Characterization of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin Genes and Expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.61 (12), p. 5147-5156, 1993.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, v.7 (3), p.104-110, 1999.
- PHRED v. 0.20425, PHRAP v. 0.990319.** Disponível em: <http://www.phrap.org>
- PIVINICK, H.; HABEEB, A. F. S. A.; GORENSTEIN, B.** Effect of pH on toxigenesis by *C. perfringens* type D. *Canadian Journal Microbiology*, v.11 (1), p.45-55, 1964.
- PIVINICK, H.; HABEEB, A. F. S. A.; GORENSTEIN, B.** Effect of pH on toxigenesis by *C. perfringens* type C. *Canadian Journal Microbiology*, v.10 (3), p.329-344, 1965.
- POPOFF, M. R.; BOUVET, P.** Clostridial toxins. *Future Microbiology*, v.4.8, p.1021-1064 Oct. 2009.
- POPOFF, M. R.** Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS Journal*, v.278, p.4602-4615, 2011.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C.** *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Editora Artmed, Porto Alegre, 2005, 512p.
- ROOD, J. I.; COBE, S. T.** Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, v.55 (4), p.621-648, 1991.
- ROOD, J. I.; MCCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; RICHARD, W. T.** The clostridia: molecular biology and pathogenesis. San Diego, Calif.: Academic Press, 1997. 533 p.
- ROOD, J. I.** Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Reviews in Microbiology*, v.52, p.333-360, 1998.
- ROTHEL, J. S.; WOOD, P. R.; SEOW, H-F.; LIGHTOWLERS, M. W.** Urea/DTT solubilization of a recombinant *Taenia ovis* antigen, 45W, expressed as a GST fusion protein results in enhanced protective immune response to the 45W moiety. *Vaccine*, v.15 (5), p.469-472, 1997.

- SAITOU, N.; NEI, M.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.406-425, 1987.
- SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L.** Effect of carbohydrates and control of culture pH on beta toxin production by *C. perfringens* tipo C. *Microbiological Immunological*, v.23 (5), p.313-318, 1979.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M.** *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin: characterization and mode of action. *The Journal of Biochemistry*, v.136, p.569-574, 2004.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M.; TSUGE, H.; KOBAYASHI, K.** *Clostridium perfringens* Iota-Toxin: Structure and Function. *Toxins*, v.1, p.208-228, 2009.
- SAMBROOK J; RUSSEL DW.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 999 p.
- SAVVA, C. G.; DA COSTA, S. P. F.; BOKORI-BROWN, M.; NAYLOR, C. E.; COLE, A. R.; MOSS, D. S.; TITBALL, R. W.; BASAK, A. K.** Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *JBC*, Papers in Press, Manuscript M112.430223, 2012.
- SCHALCH, B.; SPERNER, B.; EISGRUBER, H.; STOLLE, A.** Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.24, p.281-286, 1999.
- SCHOEPE, H.; PACHE, C.; NEUBAUER, A.; POTSCHKA, H.; SCHLAPP, T.; WIELER, L. H.; BALJER, G.** Naturally occurring *Clostridium perfringens* nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin-associated diseases. *Infection and Immunity*, v.69 (11), p.7194-7196, 2001.
- SCHOEPE, H.; NEUBAUER, A.; SCHLAPP, T.; WIELER, L. H.; BALJER, G.** Immunization with an alphatoxin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alphatoxin. *Anaerobe*, v.12, p.44-48, 2006.
- STEINTHORSDDOTTIR, V.; HALLDORSSON, H; ANDRESSON, O.S.** *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, v.28, p.45-50, 2000.
- SHATURSKY, O.; BAYLES, R.; ROGERS, M.; JOST, B. H.; SONGER, J. G.; TWETEN, R.K.** *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent cation-selective channels in lipid bilayers. *Infection and Immunity*, v.68 (10), p.5546-5551, 2000.
- SHEEDY, S.A.; INGHAM, A.B.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J.** Highly conserved alpha-toxin sequences of avian isolates of *Clostridium perfringens*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42 (3), p.1345-1347, 2004.
- SHIMIZU, T.; OHTANI, K.; HIRAKAWA, H.; OHSHIMA, K.; YAMASHITA, A.; SHIBA, T.; OGASAWARA, N.; HATTORI, M.; KUHARA, S.; HAYASHI, H.** Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.99, n.2, p.996-1001, 2002.
- SINDAN.** Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal - Compêndio de produtos veterinários. Disponível em: <<http://www.cpvs.com.br/cpvs/index.html>>. Acesso em: Janeiro de 2013
- SINGH, S. M.; PANDA, A. K.** Solubilization and refoldins of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.99(4), p.303-310, 2005.

- SMITH, L. D. S.** Botulism: the organism, its toxins, the disease. Illinois, Charles C. Thomas, 1977. 236p.
- SMITH, L. D. S.** Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Infectious Diseases*, v.1 (2), p.254-262, 1979.
- SONGER, J. G.** Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.399-404, 2010.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K.** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, v.4:1, 2005.
- SOUZA, A. M.** Clonagem e expressão do gene da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D e sua aplicação na imunização de animais. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. 56p.
- SOUZA, A. M.; REIS, J. K.; ASSIS, R. A.; HORTA, C. C.; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S.; ALVARENGA, E. R.; CASTRO, C. S.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O.; PIRES, P. S.; CONTIGLI, C.; LOBATO, F.C.; KALAPOTHAKIS, E.** Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genetic Molecular Research*, v.9 (1), p.266-276, 2010.
- STEVENS, D. L.; TROYER, B. E.; MERRICK, D. T.; MITTEN, J. E.; OLSON, R. D.** Lethal and cardiovascular effects of purified alpha- and theta-toxins from *Clostridium perfringens*. *Journal of Infectious Diseases*, v.157, p.272-279, 1988.
- STEVENS, D. L.; TITBALL, R. W.; JEPSON, M.; BAYER, C. R.; HAYES-SCHROER, S. M.; BRYANT, A. E.** Immunization with the C-domain of α -toxin prevents lethal infection, localizes tissue injury, and promotes host response to challenge with *Clostridium perfringens*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.190, p.767-73, 2004.
- STILES, B. G.; WILKINS, T. D.** *Clostridium perfringens* iota toxin: synergism between two proteins. *Toxicon*, v.24 (8), p.767-773, 1986(a).
- STILES, B. G.; WILKINS, T. D.** Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two non linked proteins for biological activity. *Infection and Immunity*, v.54 (3), p.683-688, 1986(b).
- SUGAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; YAMAYA, S.; OHSAKA, A.** In vitro aggregation of platelets induced by α -toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, v.29, p.255-263, 1976.
- SWARTZ, J. R.** Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, v.12, p.195-201, 2001.
- TAMURA K; DUDLEY J; NEI M; KUMAR S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599, 2007.
- THIEDE, S.; GOETHE, R.; AMTSBERG, G.** Prevalence of b2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Veterinary Record*, v.149, p.273-274, 2001.
- TITBALL, R. W.; HUNTER, S. E. C.; MARTIN, K. L.; MORRIS, B. C.; SHUTTLEWORTH, A. D.; RUBIDGE, T.; ANDERSON, D. W.; KELLY, D. C.** Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Alpha-Toxin (Phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infection and Immunity*, v.57 (2), p. 367-376, 1989.

- TITBALL, R. W.; LESLIE, D. L.; HARVEY, S.; KELLY, D.** Hemolytic and Sphingomyelinase Activities of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin Are Dependent on a Domain Homologous to That of an Enzyme from the Human Arachidonic Acid Pathway. *Infection and Immunity*, v.59 (5), p. 1872-1874, 1991.
- TITBALL, R. W.** Bacterial phospholipases C. *Microbiology Reviews*, v.57, p.347–366, 1993.
- TITBALL, R. W.; FEARN, A. M.; WILLIAMSON, E. D.** Biochemical and immunological properties of the C-terminal domain of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters*, v.110 (1), p.45-50, 1993.
- TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K.** The *Clostridium perfringens* α -toxin. *Anaerobe*, v.5, p.51-64, 1999.
- TITBALL, R. W.; BASAK, A. K.** The bacterial zinc-metallophospholipases C. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* v.23, p.509–554, 2004.
- TITBALL, R. W.** Gas gangrene: an open and closed case. *Microbiology*, v.151, p.2821–2828, 2005.
- TITBALL, R. W.** *Clostridium perfringens* vaccines. *Vaccine*, v.27, D44–D47, 2009.
- TOLOOE, A.; SHOJADOOST, B.; PEIGHAMBARI, S. M.; TAMADDON, Y.** Prevalence of netB gene among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.10 (1), p.106-110, 2011.
- TSUTSUI, K.; MINAMI, J.; MATSUSHITA, O.; KATAYAMA, S.; TANIGUCHI, Y.; NAKAMURA, S.; NISHIOKA, M.; OKABE, A.** Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A to E and *Clostridium novyi*. *Journal of Bacteriology*, v.177 (24), p.7164–7170, 1995.
- URBINA, P.; FLORES-DIAZ, M.; ALAPE-GIRON, A.; ALONSO, A.; GONI, F. M.** Phospholipase C and sphingomyelinase activities of the *Clostridium perfringens* α -toxin *Chemistry and Physics of Lipids*, v.159, p.51–57, 2009.
- UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L.; KELLY, W.R.** PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in feces of goats. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.339-344, 1997.
- UZAL, F.A.; MCCLANE, B. A.** Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Veterinary Microbiology*, v.153 (1-2), p.37–43, 2011.
- VAN ASTEN, A.J.A.M.; NIKOLAOU, G.N.; GRÖNE, A.** The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the b2- toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *The Veterinary Journal*, v.183, p.135–140, 2010.
- VIEIRA, A. A. S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F.** Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. *Arquivos Instituto Biológico*, v.75 (4), p.513-516, 2008.
- WAN, L.; ZENG, L.; CHEN, L.; HUANG, Q.; LI, S.; LU, Y.; LI, Y.; CHENG, J.; LU, X.** Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin. *Protein Expression and Purification*, v.48, p.307–313, 2006.

WANG, G.; ZHOU, J.; ZHENG, F.; LIN, G.; CAO, X.; GONG, X.; QIU C. Detection of different genotypes of *Clostridium perfringens* in feces of healthy dairy cattle from china using real-time duplex PCR assay. *Pakistan Veterinary Journal*, v.31 (2), p.120-124, 2011.

WATERS, M.; SAVOIE, A.; GARMORY, H.S.; BUESCHEL, D.; POPOFF, M.; SONGER, J.G.; TITBALL, R.W.; McCLANE, B.; SARKER, M.R. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.3584–3591, 2003.

WELCH, W. H.; NUTTALL G. H. F. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus, nov, sepc.*) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, v.3, p.81–91, 1892.

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

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

ZEKARIAS, B.; MO, H.; CURTISS, R. Recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing the carboxy-terminal domain of alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces protective responses against necrotic enteritis in chickens. *Clinical And Vaccine Immunology*, v.15 (5), p.805–816, 2008.

ANEXOS

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS PELA ALUNA

Parte dos resultados apresentados neste documento foram publicados na revista *Veterinary Microbiology* em 2012. Além deste projeto, ao longo de seu doutorado, a aluna participou de outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, resultando na co-autoria de cinco artigos. Também nesse período, a aluna publicou dois artigos como primeira autora com os resultados obtidos durante o seu mestrado no mesmo programa de Pós-graduação, sob a orientação da Profª. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho. A aluna também ministrou aulas para a graduação durante o 1º e o 2º semestre de 2010 como professora substituta do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG. Nesse período, foram dadas aulas de Genética e Evolução para a turma de Medicina Veterinária (60hs/semestre) e de Genética para a turma de Farmácia (60hs/semestre).

ARTIGOS COMO PRIMEIRA AUTORA:

- **SIQUEIRA, F. F.; SANDES, S. H. C.; CAMPOS, S. H.; FONSECA, C.G.; MARTINS, R. P.; DRUMOND, M. A.; CARVALHO, M. R. S.** Análise filogenética do minhocaçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 (Glossoscolecidae: Annelida) baseada em sequências dos genes de rDNA 5.8S, do espaço interno transcrito (ITS1) e da subunidade I da citocromo C oxidase mitocondrial. *Acta Zoológica Mexicana*, v. n.s., p. 59-77, 2010.
- **SIQUEIRA, F. F.; ALMEIDA, M.O.; BARROCA, T.M.; HORTA, C.C.; CARMO, A.O.; SILVA, R.O.; PIRES, P.S.; LOBATO, F.C.; KALAPOTHAKIS, E.** Characterization of polymorphisms and isoforms of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene (*plc*) reveals high genetic diversity. *Vet Microbiol*, 159 (3-4), 397-405, 2012.
- **SIQUEIRA, F. F.; SANDES, S. H. C.; DRUMOND, M. A.; CAMPOS, S. H.; MARTINS, R. P.; FONSECA, C.G.; CARVALHO, M. R. S.** Genetic diversity and population genetic structure in giant earthworm *Rhinodrilus alatus* (Annelida: Clitellata: Glossoscolecidae). *Pedobiologia*, v. 56 (1), 15–21, 2013.

ARTIGOS COMO CO-AUTORA:

- **SOUZA, A.; REIS, J. K. P.; ASSIS, R. A.; HORTA, C. C. ; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S.; ALVARENGA, E.R.; CASTRO, C.S.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O. S.; PIRES, P. S.; CONTIGLI, C.; LOBATO, F. C. F.; KALAPOTHAKIS, E.** Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 266-276, 2010.
- **BARROCA, T. M.; ARANTES, F. P.; MAGALHÃES, B. F.; SIQUEIRA, F. F.; HORTA, C. C. R.; PENA, I. F.; DERGAM, J. A.; KALAPOTHAKIS, E.** Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the Paraopeba River, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil. *Open Journal of Genetics*, v. 2, p. 121-130, 2012.
- **ALVARENGA, E. R.; MENDES, T. M.; MAGALHÃES, B. F.; SIQUEIRA, F. F.; DANTAS, A. E.; BARROCA, T. M.; HORTA, C. C. R.; KALAPOTHAKIS,**

E. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics*, v.2, p. 210-220, 2012.

- **FACCHIN, S.; ALVES, P. D. D.; SIQUEIRA, F. F.; BARROCA, T. M.; VICTÓRIA, J. M. N.; KALAPOTHAKIS, E.** Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. *Open Journal of Ecology*, 2012. (Artigo aceito)
- **HORTA, C. C.; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; CARMO, A. O.; SIQUEIRA, F. F.; BARROCA, T. M.; LACERDA, S. M. S. N.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; FRANCA, L. R.; FERREIRA, R. L.; KALAPOTHAKIS, E.** Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *Loxosceles* spider venom. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013 (Artigo aceito).