

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXINA ÉPSILON DO *Clostridium*
perfringens EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS MDCK (MADIN-
DARBY CANINE KIDNEY CELL)**

Marina de Castro Ferrarezi Soares
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA**

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXINA ÉPSILON DO *Clostridium perfringens* EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS MDCK (MADIN-DARBY CANINE KIDNEY CELL)

Tese de Doutorado apresentada junto ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área Medicina Veterinária Preventiva, para obtenção do título de Doutor.

Marina de Castro Ferrarezi Soares
Orientadora: Tereza Cristina Cardoso Silva

Araçatuba – SP
2013

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Ferrarezi Soares, Marina de Castro

F374a

Avaliação do efeito da toxina épsilon do Clostridium perfringens em monocamadas de células MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) / Marina de Castro Ferrarezi Soares.

Araçatuba: [s.n], 2013
97f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva

1. Microorganismos - cultura de células
2. Clostridium perfringens
3. Toxina épsilon
4. Mitocôndrias
5. Morte celular
6. Citometria de fluxo acústica

CDD 571.63829

DADOS CURRICULARES

Marina de Castro Ferrarezi Soares – nascida no dia 15 de janeiro de 1983, no município de Valparaíso – SP, é médica veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Araçatuba (2006), foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante o período de setembro de 2003 a agosto de 2004 e realizou estágio supervisionado no California Animal Health & Food Safety Laboratory System (CAHFS) em San Bernardino, CA, USA. Na mesma instituição que graduou-se, concluiu o Mestrado (2008) em Ciência Animal, na área de Medicina Veterinária Preventiva, sob orientação do prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, titular da disciplina de Enfermidades Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP campus de Araçatuba, com apoio financeiro do CNPq (no. 474175/2007-3) para realização do projeto. Atuou profissionalmente na área de sua graduação em Campo Grande – MS, durante o período de outubro de 2008 a março de 2010, e como professora de ensino superior, nos cursos de medicina veterinária e biomedicina, da Faculdade Integrado de Campo Mourão - PR, no período de julho de 2010 a julho de 2011. Sentindo a necessidade de evoluir na carreira acadêmica e na área da pesquisa, retornou a Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP campus de Araçatuba, e ingressou no doutorado em março de 2011 no programa em Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva sob orientação da Prof^a Dr^a Tereza Cristina Cardoso Silva, docente responsável pelo Laboratório de Virologia da mesma. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), durante o doutorado, (bolsa DS) e desenvolveu parte da tese na Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines, Centre National de Référence pour les Bactéries Anaérobies, do Institut Pasteur, Paris, França, sob supervisão do Dr. Michel R. Popoff, durante os meses de janeiro a junho de 2012, com apoio financeiro da CAPES (Processo n^o. BEX 8442/11-8)

AGRADECIMENTOS

À Deus

Que sempre esteve ao meu lado para guiar meus passos e me conduzir com sabedoria e amor nos Seus caminhos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Tereza Cristina Cardoso Silva

Agradeço-a por sua confiança em meu trabalho, oportunidade e amizade, e por ter me ensinado conhecimentos teórico-práticos valiosos nesses anos ampliando meus horizontes científicos.

Ao meu supervisor Dr. Michel R. Popoff

Agradeço-o por ter me recebido em seu laboratório com tanta disposição e me ensinado com dedicação e paciência seus conhecimentos de uma vida longa de trabalho com as toxinas Clostridiais e o cultivo celular.

Ao pesquisador Dr. Serge Pauillac

Agradeço-o por seus ensinamentos, atenção e a amizade sincera que muito contribuíram para o meu aprendizado durante o período de “doutorado-sanduíche” no Institut Pasteur.

Ao meu marido Marcelo Alvim Soares

Por seu amor, seu incentivo aos meus estudos, e por sua compreensão, apoio e companheirismo sempre e, principalmente, durante os meses de “doutorado sanduíche”.

Aos meus pais, Luiz Antonio e Marta, meus irmãos Guilherme e Claudia e aos meus queridos avós Zezé e Yvone, por me incentivarem sempre, com muito amor, a continuar meus estudos e seguir na carreira acadêmica e na pesquisa.

A todos os meus familiares e todos amigos que me apoiaram e incentivaram.

Aos professores do curso de Medicina Veterinária e do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Campus de Araçatuba, pelos conhecimentos

compartilhados e em especial ao Prof. Dr. Mário Jefferson Q. Louzada, por me fornecer inestimáveis informações e amizade, desde a graduação.

Aos amigos do laboratório de virologia, Camila, Ana Carolina, Andréa, Talita, Sabrina, Flávio e à técnica Cilene, muito obrigada.

Aos amigos do curso de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP campus de Araçatuba, Heni, Ludmila, Guilherme, Heitor, Silmara, Fernanda, muito obrigada.

Aos amigos e pesquisadores da Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines, Centre National de Référence pour les Bactéries Anaérobies, e dos demais laboratórios do Institut Pasteur, Paris, com os quais eu convivi e que muito me ensinaram com sincera amizade, muito obrigada.

Aos amigos da Turma XIII, formados na FMVA, por estarmos sempre unidos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, Staepe, da Faculdade de Medicina Veterinária UNESP campus de Araçatuba, por toda ajuda para a finalização deste projeto.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista, FMVA, pela viabilidade de realização e execução desse projeto.

Ao Laboratório de Virologia do Instituto Biológico de São Paulo, por nos ceder as células Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK).

Ao Laboratório Nacional de Referência Agropecuária, LANAGRO, Pedro Leopoldo, MG, por ceder a prototoxina Épsilon de *Clostridium perfringens*, utilizada nesse estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no Brasil (bolsa DS) e no exterior (bolsa de doutorado sanduíche, processo nº. BEX 8442/11-8).

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXINA ÉPSILON DO *Clostridium*
perfringens EM MONOCAMADAS DE CÉLULAS MDCK (MADIN-DARBY
CANINE KIDNEY CELL)**

RESUMO – A toxina Épsilon (ETX) produzida pelo *Clostridium perfringens* tipos B e D é uma das mais potentes toxinas clostridiais superada apenas pelas neurotoxinas botulínica e tetânica. É responsável por quadros fatais de enterotoxemia em ovinos, caprinos e ocasionalmente em outros animais, caracterizados por edema em vários órgãos e aumento da permeabilidade vascular. Nos estudos “in vitro”, a linhagem de células “Madin-Darby canine kidney” (MDCK) é susceptível à ação da ETX, que se heptameriza nas membranas celulares formando um poro complexo que evolui para a lise celular. No presente estudo, foram avaliadas a morfologia e a viabilidade celular, a despolarização da membrana mitocondrial e a expressão de mediadores de morte celular programada (Bax e Bcl-2), após a exposição das células MDCK, com a ETX, a cada 24 horas, durante intervalo de 1 a 5 horas. Verificou-se o aparecimento de vacúolos no interior do citoplasma celular associados à perda de viabilidade celular, que evoluíram de forma progressiva, nos períodos de 1 a 5 horas pós-exposição. Foram realizadas análises por citometria de fluxo acústica para obtenção de uma visão mais aprofundada da patogenia causada pela ETX. Utilizando a citometria de fluxo acústica, considerada altamente sensível, as células MDCK expostas à ação da ETX, nos períodos de 1 a 5 horas, revelaram uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, seguido da expressão das proteínas Bax (25,48 %) e Bcl-2 (45,45 %) na fase de formação do pré-poro (1 hora pós exposição). Estes resultados, juntamente com alta citotoxicidade e visualização de vacúolos celulares, demonstra que a análise por citometria de fluxo acústico representa potencialmente uma ferramenta eficaz para estudar a patogênese da ETX.

Palavras-Chave: *Clostridium perfringens*, toxina Épsilon, mitocôndrias, morte celular, citometria de fluxo acústica.

EVALUATION OF *Clostridium perfringens* ÉPSILON TOXIN EFFECTS IN MONOLAYERS OF MDCK (MADIN-DARBY CANINE KIDNEY CELL) CELLS

SUMMARY - Epsilon toxin (ETX) produced by *Clostridium perfringens* types B and D is one of the most powerful clostridial toxins surpassed only by neurotoxins botulinum and tetanus. Studies blame the ETX by developing a fatal enterotoxemia in sheep, goats and occasionally in other animals, characterized by edema in multiple organs and increased vascular permeability. In "in vitro" toxicoinfection studies the "Madin-Darby canine kidney" (MDCK) cell line is susceptible to the action of ETX, which forms a heptamer in the cell membranes forming a pore complex that progresses to cell lysis. In the present study, we assessed cell viability and morphology, mitochondrial membrane depolarization and expression of programmed cell death mediators (Bax and Bcl-2) after exposure of MDCK cells with the ETX every 24 hours for range of 1 to 5 hours. Our results shows the appearance of vacuoles within the cytoplasm associated with loss of cell viability, which evolved gradually, in periods 1-5 hours after exposure. Analyzes were performed by acoustic flow cytometry to obtain further insight into the pathogenesis caused by ETX. Using acoustic flow cytometry, considered highly sensitive, MDCK cells exposed to the action of ETX, during 1 to 5 hours showed a decrease in mitochondrial membrane potential followed by the expression of Bax (25.48%) and Bcl-2 (45.45%) proteins at the pre-pore stage (1 hour post exposure). These results along with high cytotoxicity and visualization of cellular vacuoles, demonstrates that the flow cytometry analysis acoustic represents a potentially powerful tool for studying the pathogenesis of ETX.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Epsilon toxin, mitochondria, cell death, acoustic flow cytometry.

SUMÁRIO

CAPITULO I

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1	Gênero <i>CLOSTRIDIUM</i>	12
1.2	Toxina Épsilon (ETX)	19
1.3	Enterotoxemia, absorção intestinal da toxina épsilon e disseminação pela corrente sanguínea	29
1.4	Testes “in vitro” utilizando a toxina épsilon	31
1.5	As mitocôndrias e a ação da toxina épsilon	37
1.6	Processo de morte celular desencadeado pela toxina épsilon	41
2	OBJETIVOS	52
3	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO II

1	ARTIGO CIENTÍFICO	75
	ABSTRACT	76
	INTRODUCTION	77
	MATERIAL AND METHODS	80
	RESULTS	85
	DISCUSSION	87
	ACKNOWLEDGMENTS	94
	REFERENCES	95

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- Semelhanças estruturais entre a toxina épsilon e demais toxinas formadoras de poros nas membranas celulares. **23**

Figura 2- Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, retração celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas. **44**

Figura 3- As três subfamílias de proteínas relacionadas a Bcl-2. **49**

CAPÍTULO II

Figure 1- Epsilon-toxin-induced vacuolation in MDCK cells. A) MDCK cells exposed to prototoxin (PTX) at 1 to 5 h of observation; B) MDCK cells were incubated with 20 µg/ml of epsilon toxin (ETX) at 37°C during 1 to 2 h; C) from 3 to 5 h of observation. **90**

Figure 2- Effect of ETX on the viability of MDCK cells. Cell viability was determined via the MTT assay on exposed ETX and PTX MDCK cells. Data are shown as the mean ± standard deviation for three independent experiments. **91**

Figure 3- Acoustic focusing cytometer analysis performed on MDCK cells exposed to ETX at 1, 2, 3, 4, and 5 h of observation illustrated by dot-plot graphic. The x-axis corresponds to side scatter (SSC) which is indicative of granularity and structural complexity inside the cell cytoplasm. The y-axis corresponds to intensity of labeled MDCK cells that express the Bax and BCL-2 antigens. The flow rate of 1.000 µL/min with a stop gate of 500.000 total cells was considered for analysis. **92**

Figure 4- Acoustic focusing cytometer analysis performed on MDCK cells exposed to ETX at 1, 2, 3, 4 and 5 h of observation illustrated by density plot graphic. The x-axis corresponds to JC-1 probe detection (488 nm filter; BL1-A). The y-axis corresponds to side scatter (SSC) which is indicative of granularity and structural complexity inside the cell cytoplasm. The flow rate of 1.000 µL/min with a stop gate of 500.000 total cells was considered for analysis. **93**

LISTA DE ABREVIações

AIF = fator indutor de apoptose

Apaf 1 = “apoptotic protease activating factor 1”

ATP = adenosina trifosfato

BCA = “bicinchoninic acid”

CD50 = dose citotóxica 50

CDC = “Centre of Disease Control”

CMC = concentração micelar crítica

CPA = toxina alfa de *Clostridium perfringens*

CPB = toxina beta de *Clostridium perfringens*

Da = unidade de massa atômica, dalton

DMR = membrana resistente á ação de detergente

DNA = ácido desoxirribonucleico

ETX = toxina épsilon de *Clostridium perfringens*

FasL = proteína transmembrânica Faz ligante

FSC = “forward side scatter”

G-402 = “caucasian renal leiomioblastoma cells”

Ia = componente enzimático “a” da toxina iota de *Clostridium perfringens*

Ib = componente enzimático “b” da toxina iota de *Clostridium perfringens*

ITXA = toxina iota de *Clostridium perfringens*, fração “a”

ITXB = toxina iota de *Clostridium perfringens*, fração “b”

JC-1 = “5,5` ,6,6``-tetrachloro-1,1`,3,3`-tetrathylbenzimidazolyl-carbocycamine iodide”

kDa = unidade de massa atômica, quilo Dalton

MCP = morte celular programada

MDCK = “Madin-Darby canine kidney cell”

MIM = “mitochondrian inner membrane”

MOM = “mitochondrian outer membrane”

mpkCCDc14 = células do ducto coletor cortical de Murine

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

mV = milivolts

NetB = toxina NetB de *Clostridium perfringens*

PTX = prototoxina Épsilon de *Clostridium perfringens*

RRP = receptor de reconhecimento padrão

SDS = dodecil sulfato de sódio

SSC = “side scatter complexicity”

TNF = fator de necrose tumoral

CAPÍTULO I

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Gênero *CLOSTRIDIUM*

O gênero *Clostridium* compreende um grupo de microrganismos bacilos gram positivos, anaeróbios, formadores de esporos e produtores de toxinas que se encontram amplamente distribuídos no ambiente (BULLEN, 1952; ODENDAAL, 1994).

Esses microrganismos são encontrados no solo, água, pastagens, alimentos de origem animal e vegetal e, ainda, algumas espécies desse gênero podem estar presentes, em pequeno número ($<10^3$ bactérias/g), no trato gastrointestinal de diversas espécies animais e do homem, sem associação com doenças (BULLEN, 1952; ODENDAAL, 1994).

Cerca de 100 diferentes espécies de *Clostridium* foram caracterizadas e classificadas como do mesmo gênero, tendo como referência a sequência de DNA ribossomal 16S (GALMICHE; BOUQUET, 2006). O *Clostridium perfringens*, previamente denominado *Clostridium welchii*, é um importante representante desse gênero, o qual tem sido objeto de interesse científico por suas características biológicas e por sua importância biomédica (CANARD; COLE, 1989).

Esses microrganismos diferem-se dos demais clostrídios por apresentarem como bacilos relativamente espessos (0,6-2,4 X 1,3-9,0 μm) e encapsulados. As colônias são brancas, redondas, resplandecentes e circundadas por um halo completo de hemólise provocado pela toxina theta e outro halo incompleto de hemólise formado pela presença da toxina alfa. Nesse sentido são considerados imóveis e capazes de esporularem após crescimento em meios de cultura especiais e multiplicam-se rapidamente em meios enriquecidos por carboidratos (QUINN et al., 1994).

Após a multiplicação e fermentação, o *C. perfringens* produz grandes quantidades de hidrogênio e dióxido de carbono, que os ajudam a manter o ambiente anaeróbico desejado, apesar destes se apresentarem como tolerantes ao oxigênio. O microrganismo pode sobreviver em condições extremas por diferenciação, ou seja, a passagem da forma vegetativa para um formato extremamente resistente de endosporos latentes (ODENDAAL, 1994; QUINN et al., 1994; MORRIS; FERNANDEZ-MIYAKAWA, 2009).

Algumas das características relevantes aos *C. perfringens*, como sua relativa tolerância ao oxigênio, o rápido crescimento em meios de cultivos, e sua facilidade de serem manipulados geneticamente, favoreceram e possibilitou a obtenção do primeiro mapa genômico completo de uma bactéria gram positiva (CANARD; COLE, 1989).

Em condições favoráveis, o *C. perfringens* pode se proliferar ($>10^6$ bactérias/g, normalmente 10^8 a 10^9 bactérias/g), no trato gastrintestinal, mais

precisamente no intestino delgado, e produzir diferentes toxinas e enzimas hidrolíticas que causam diversas enfermidades entéricas (diarréias) e sistêmicas (enterotoxemias) em animais e no homem, muito embora todos os possíveis efeitos sinérgicos entre as toxinas não estão totalmente esclarecidos quanto a sua etiopatogenia (ODENDAAL, 1994; ROOD et al., 1997; SONGER, 2010).

Este gênero possui um cromossomo circular o qual apresenta variações quanto à diversidade entre os tipos isolados. Esta propriedade favorece o aumento de variabilidade genética dessa espécie, sendo responsável pela aquisição de elementos móveis (plasmídeos) transferidos horizontalmente com o ecossistema digestivo (MYERS et al., 2006).

Como o *Clostridium perfringens* pode ser isolado do conteúdo intestinal tanto de animais sadios, como também daqueles com quadros de diarreia. A simples detecção desta bactéria não a caracteriza como causadora de doença. A virulência do microrganismo decorre da sua habilidade de produzir uma ou mais toxinas e enzimas hidrolíticas que se diferenciam na potência de toxicidade e são as responsáveis pelas lesões e sintomas associados, visto que a bactéria não invade as células normais do organismo (PETIT et al., 1999; SIPOS et al., 2003; SAWIRES; SONGER, 2006).

Segundo Rood et al. (1997), o *Clostridium perfringens* é responsável pela síntese de aproximadamente 15 tipos de toxinas protéicas, dentre as quais quatro possuem maior importância como as toxinas alfa (CPA), beta (CPB),

épsilon (ETX) e iota (ITXA e ITXB), pois são patogênicas e utilizadas para a tipificação dessa bactéria entre os tipos A, B, C, D e E (Tabela 1) (ODENDAAL, 1994; PETIT et al., 1999).

Em associação à estas toxinas classificadas como "toxinas principais" esta bactéria também é capaz de produzir outras toxinas denominadas "toxinas menores" (teta, lambda, mu, kappa, beta 2, enterotoxin, NetB, etc), assim como, enzimas, neuraminidases e ureases, que podem corroborar para a patogenicidade da mesma, porém não são utilizadas para sua classificação e tipificação (ODENDAAL, 1994; GIBERT et al., 1997; ROOD, 1998; PETIT et al., 1999; KEYBURN et al., 2008).

Tabela 1- Classificação das principais toxinas produzidas pelo *Clostridium perfringens*, localização dos genes e enfermidades relacionadas.

Tipos	Principais toxinas produzidas	Genes e localização	Enfermidades associadas nos animais domésticos
A	alfa	plc / cromossomo	enterotoxemia em bovinos e ovinos, enterite necrótica em aves, mionecroses, colite em equinos
B	alfa beta épsilon	plc / cromossomo cpb1 / plasmídeo etxB / plasmídeo	disenteria, enterite crônica em caprinos, enterotoxemia em bovinos e equinos, enterite em bovinos
C	alfa beta	plc / cromossomo cpb1, cpb2 / plasmídeo	enterite necrótica em aves, enterotoxemia em ovinos, bovinos, equinos, suínos
D	alfa épsilon	plc / cromossomo etxD / plasmídeo	enterotoxemia em caprinos, bezerros e bovinos
E	alfa iota	plc / cromossomo iap, ibp / cromossomo	enterotoxemia em bovinos e ovinos, enterite em coelhos

Fonte: SONGER, 1996.

Todas as toxinas e enzimas hidrolíticas produzidas são secretadas durante a fase de crescimento exponencial da bactéria, com exceção da enterotoxina que é liberada após lise bacteriana, e são associadas a uma doença em particular, quer seja humana ou animal (PETIT et al., 1999).

Com exceção da toxina iota, que tem ação intracelular, as demais toxinas do *C. perfringens* interagem com a membrana celular, provocando uma ruptura ou a formação de poros que acarretarão em alterações na permeabilidade da mesma (PETIT et al., 1999). A toxina alfa é uma fosfolipase C comumente produzida por todos os cinco tipos de *C. perfringens*, e predominante no tipo A, sendo responsável por desencadear hemólises nas membranas fosfolipídicas dos eritrócitos, plaquetas, leucócitos e de células endoteliais e musculares, resultando em lises (SONGER, 1996). Esta toxina possui como características principais como: a ação hemolítica, dermonecrótica, necrotizante e potencialmente letal. Os principais efeitos letais associados a essa toxina são as gangrenas gasosas nos humanos e as enterites necróticas e enterotoxemias nos animais (HATHEWAY, 1990).

A toxina beta é uma proteína altamente sensível à ação da tripsina (SAKURAI; DUNCAN, 1977), produzida pelos tipos B e C de *C. perfringens*, é composta por uma cadeia simples de polipeptídeo de aproximadamente 40 kDa. Esta é responsável por provocar necroses nas mucosas e por agir no sistema nervoso central (HUNTER et al., 1993). Está associada aos casos de enterites necróticas nos humanos e enterotoxemias nos animais (SONGER, 1996).

Os estudos realizados por Gibert et al. (1997), relataram a presença da toxina beta 2, uma nova toxina isolada de *C. perfringens* tipo C de leitões com enterites necróticas. Segundo Petit et al. (1999), a toxina beta 2 também pode

ser produzida por alguns *C. perfringens* tipo A. A mesma é necrotizante, possui 15% de identidade genética e pequeno nível de reação imunológica cruzada com a toxina beta (PETIT et al., 1999).

A toxina épsilon (ETX) é uma proteína com peso molecular de 33 kDa. Sintetizada e secretada como uma prototoxina produzida pelos tipos B e D de *C. perfringens*. É necrotizante e letal, sendo responsável por uma enterotoxemia severa e fatal nos animais que acarreta grandes prejuízos econômicos (HATHEWAY, 1990; ODENDAAL, 1994; BASAK et al., 2006).

A toxina iota está presente somente no *C. perfringens* tipo E, também é produzida e secretada como uma prototoxina. Basicamente é constituída por dois componentes, ou seja, duas proteínas independentes, que são: um componente ligante (Ib) e um componente enzimático (Ia). Em conjunto, ambos são necessários para a eficaz ação deletéria da toxina. O componente “Ib” é responsável por reconhecer o receptor específico na superfície da membrana celular, e assim, os dois componentes da toxina são internalizados na célula, com isso, a fração “Ia” pode entrar em ação provocando uma desordem na formação do citoesqueleto de actina celular (PETIT et al., 1999). Essa toxina desencadeia um aumento na permeabilidade vascular, é dermonecrótica e letal (CRAIG; MILES, 1961), e também está associada aos casos de enterotoxemia em bezerros e cabritos (HATHEWAY, 1990).

Além dessas toxinas principais, outras toxinas também sintetizadas pelas estirpes de *C. perfringens* podem ter participação em várias doenças,

como por exemplo, a enterotoxina produzida pelo *C. perfringens* tipo A, que tem grande importância nas diarreias nos humanos e nos animais (ODENDAAL, 1994).

1.2 Toxina Épsilon (ETX)

A toxina épsilon (ETX), produzida pelo *C. perfringens* dos tipos B e D, é uma das mais potentes toxinas clostridiais superada apenas pelas neurotoxinas botulínica e tetânica (PAYNE et al., 1994). Devido ao fato desta toxina ser potencialmente ativa em humanos, o *National Institutes of Health and the Centers of Disease Control (CDC)* classifica-a como agente biológico de categoria B e potencial em bioterrorismo (BASAK et al., 2006).

A ETX corrobora com a ação da toxina beta, produzida pelo *C. perfringens* tipo B, para desencadear os mecanismos de patogênese deste. E é a principal responsável pelos sintomas e lesões envolvidos nas enfermidades causadas pelo *C. perfringens* tipo D (POPOFF, 2011; SAYEED et al., 2005).

O gene da toxina épsilon está alojado em diferentes plasmídeos inseridos no *Clostridium perfringens*, assim como os outros genes das demais toxinas, como a beta e iota, as quais são utilizadas para a tipificação da bactéria em seus cinco tipos (A - E) (POPOFF, 2011).

Ao menos cinco plasmídeos, de 48 a 110 kbp, já foram descritos contendo o gene da toxina épsilon nas espécies de *C. perfringens* tipo D e um plasmídeo de 65 kbp foi descrito no *C. perfringens* tipo B (SAYEED et al., 2007; 2010).

Um único tipo de *C. perfringens* pode conter diversos plasmídeos com genes capazes de sintetizar toxinas distintas (SAYEED et al., 2007; 2010). Assim sendo, de acordo com Sayeed et al. (2007; 2010), a maior parte dos *C. perfringens* do tipo B possuem um plasmídeo referente à ETX (65 kpb), um plasmídeo da toxina beta (90 kbp) e um terceiro plasmídeo com o gene da protease lambda. Da mesma forma, estirpes de *C. perfringens* do tipo D apresentaram um plasmídeo para a ETX e um, de menor tamanho, com o gene da toxina beta 2. Foi relatado também por Sayeed et al. (2007; 2010), a presença de um único plasmídeo em bactérias *C. perfringens* do tipo D que continha os genes de três toxinas diferentes (ETX, enterotoxina e toxina beta 2).

Outros genes importantes para a adaptação da bactéria em nichos ecológicos específicos ou capazes de sintetizar fatores de virulência, como as adesinas ou proteases, também podem estar presentes nesses plasmídeos maiores. Segundo Hughes et al. (2007), determinados plasmídeos com o gene da toxina épsilon oriundos de *C. perfringens* tipo D possuem o locus *tcp* conjugativo, o qual pode ser transferido para outros tipos de *C. perfringens*, como por exemplo, para o tipo A.

A ocorrência desses genes das toxinas de *C. perfringens* inseridos em plasmídeos ocasiona um aumento na variabilidade genética desses microrganismos, uma vez que, esses plasmídeos podem ser adquiridos, transferidos, alterados ou perdidos (HUGHES et al., 2007).

A toxina épsilon pertence à família das toxinas formadoras de poros, das aerolisinas, muito embora, seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido. É normalmente sintetizada durante a fase exponencial de multiplicação do *C. perfringens* e secretada como uma proteína simples (prototoxina), inativada e não tóxica, com massa molecular de 32.981 Da (KNAPP et al., 2010).

A ativação da prototoxina pode ser realizada após hidrólises proteolíticas, alterações conformacionais, estruturais e tratamentos com proteases como tripsinas, alfa-quimiotripsinas e proteases (lambda protease) produzidas pelos *C. perfringens* dos tipos B e D. A ativação ocorrida pela lambda protease é semelhante à realizada pela tripsina associada a alfa-quimiotripsina, visto que a protease remove os resíduos dos aminoácidos 11 N-terminal e 29 C-terminal, enquanto que a ação da tripsina associada a alfa-quimiotripsina cliva os resíduos dos aminoácidos 13 N-Terminal e o mesmo 29 C-Terminal. Após essa alteração conformacional e estrutural da prototoxina, com redução do seu tamanho, a mesma torna-se citotóxica e ativa, com massa molecular de aproximadamente 30 kDa (28,6 kDa) (BHOWN; HABEEB,

1977, HUNTER et al., 1992; MINAMI et al., 1997; BASAK et al., 2006; POPOFF, 2011).

A estrutura da toxina épsilon é caracterizada por apresentar uma forma alongada e conter três domínios os quais são compostos, principalmente, de folhas beta pregueadas. Estrutura esta que, em geral, encontra-se intimamente relacionada com a estrutura das toxinas formadora de poros, das aerolisinas, produzida por espécies de *Aeromonas sp* e com o modelo da toxina alfa produzida pelo *Clostridium septicum*, conforme apresentado na Figura 1 (KNAPP et al., 2009).

A principal característica que diferencia essas toxinas é o fato de que o domínio 1 da aerolisina, envolvido na interação primária da toxina com as células, é perdido na ETX (POPOFF, 2011), diferindo com isso, o seu mecanismo de ação. Segundo Cole (2003), o domínio 1 da ETX consiste em uma ampla alfa hélice seguida de uma alça e três alfa hélices menores, e é similar ao domínio 2 da aerolisina, que é responsável pela interação com o glicosil- fosfatidilinositol que dão suporte às proteínas da membrana plasmática celular. Este domínio da ETX provavelmente tem uma função semelhante com a ligação aos receptores. O domínio 2 é formado por folhas beta pregueadas que possuem uma sequência anfipática, estruturalmente relacionado com o domínio 3 da aerolisina. É provavelmente o domínio responsável pela formação de canais, ou poros complexos, nas membranas celulares (COLE, 2003; KNAPP et al., 2010).

A estrutura do domínio 3 também é composta por folhas beta pregueadas, análogo ao domínio 4 da aerolisina, e contém o sítio de clivagem para a ativação da toxina. Após a remoção dos peptídeos C-Terminais, o domínio 3 é, provavelmente, envolvido na interação monômero-monômero necessária para a oligomerização da toxina na membrana celular (COLE, 2003; KNAPP et al., 2010).

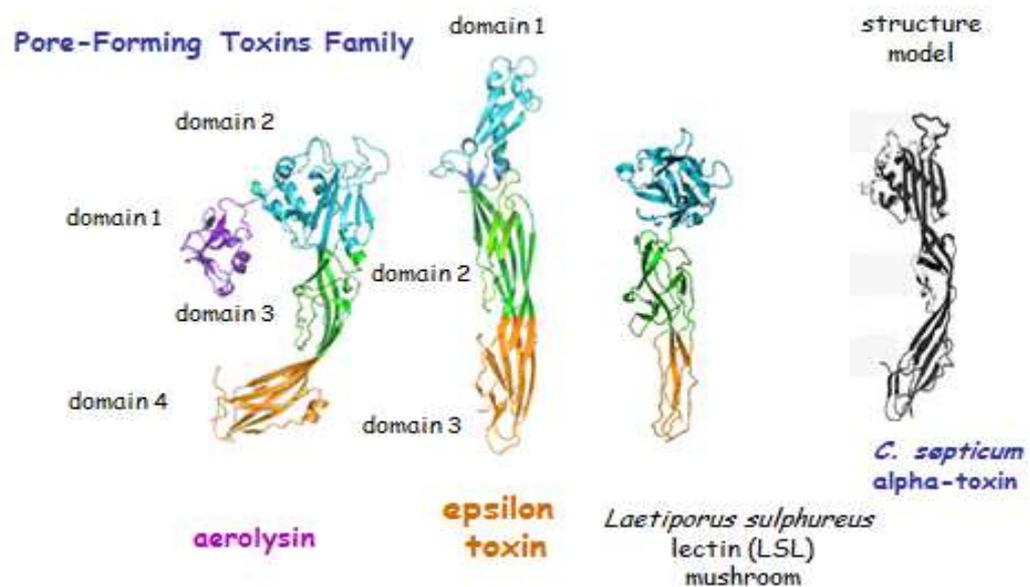


FIGURA 1- Semelhanças estruturais entre a toxina épsilon e demais toxinas formadoras de poros nas membranas celulares.

Fonte: POPOFF, 2011.

Alguns fatores de virulência tem se mostrado importantes para a compreensão do mecanismo de ação da toxina épsilon. As sialidases (neuraminidases) produzidas por bactérias patogênicas, por exemplo, podem estar envolvidas nesse processo (BOKORI-BROWN et al., 2011).

Após o sequenciamento do genoma de estirpes de *C. perfringens*, foi possível detectar a presença de três genes para a produção de sialidases, denominados *nanH*, *nanI* e *nanJ*, os quais estão localizados em uma região conservada do cromossomo bacteriano (BOKORI-BROWN et al., 2011; SHIMIZU et al., 2002). Estas enzimas podem contribuir com a patogenicidade bacteriana de diversas maneiras, por exemplo, expondo os sítios das células do hospedeiro que facilitam a ligação de toxinas ou a adesão bacteriana (LI et al., 2011).

Os estudos de Li et al. (2011), indicaram que a sialidase NanI aumentou a sensibilidade das células MDCK a ação da toxina épsilon e a ligação da toxina às células, sugerindo que a sialidase NanI expõe receptores adicionais da ETX na superfície celular.

Esse aumento da ligação da ETX às células MDCK tratadas com a sialidase NanI acarretou na formação de mais poros nas membranas celulares resultando em um aumento de citotoxicidade e intensificação da morte celular após o tratamento prévio das células MDCK com sialidase NanI, antes da toxicoinfecção com a ETX.

Assim, se tais eventos ocorrerem de maneira semelhante nas células intestinais de um hospedeiro, com a ativação da sialidase NanI, estas células tornar-se-ão mais susceptíveis à ação da toxina, pela exposição de mais receptores de superfície que facilitarão a aderência da mesma. Podendo ainda agravar a enfermidade após colonização intestinal pelas estirpes do tipo D, prolongar a ação deletéria da toxina e em algumas espécies potencializar a ligação da ETX às células intestinais (LI et al., 2011).

Outro fator capaz de influenciar a susceptibilidade das células do hospedeiro à ação da toxina épsilon é a presença de certos tipos de lipídeos (esfingolipídeos) na superfície celular (PETIT et al., 1997; MIYATA et al., 2002; CHASSIN et al., 2007; FENNESSEY et al., 2012).

Grande parte das células dos mamíferos possuem, pelo menos, dois tipos discretamente distintos de microdomínios lipídicos, os “rafts lipídeos” e os lipídeos do tipo “caveolae”, os quais também são conhecidos como “membranas resistentes à ação de detergentes” (DMR's). Estes são formados por uniões ou arranjos distintos de esfingolipídeos e colesterol que formam uma fase líquida ordenada e distinta (separada), inserida na matrix líquida desordenada da membrana lipídica (HARDER, 2003; LINGWOOD; SIMONS, 2010).

A presença desta formação lipídica na membrana plasmática celular pode agir, corroborando para a segregação favorável de algumas classes de proteínas, como por exemplo, as proteínas que são suportadas ou ancoradas

em glicosil-fosfatidilinositol (GPI), proteínas transmembrânicas e proteínas sinalizadoras diaciladas; além de também serem utilizadas como porta de entrada celular, por alguns patógenos ou suas toxinas (LINGWOOD; SIMONS, 2010).

Dentre essas toxinas capazes de utilizar as DMR's como sítio de ligação na membrana celular do hospedeiro, encontram-se as toxinas formadoras de poros, como a aerolisina (*Aeromonas hydrophila*), perfringolisina O (*C. perfringens*) e a Cry1A (*Bacillus thuringiensis*) (MIYATA et al., 2002).

Os estudos de Miyata et al. (2002), mostraram que a toxina épsilon de *C. perfringens*, assim como outras toxinas formadoras de poros na membrana celular, foi capaz de heptamerizar-se exclusivamente nas DMR's, das células MDCK susceptíveis, ou seja, a ETX reconheceu as “membranas resistentes à ação de detergentes” como um local apropriado (um possível receptor) para a formação completa do poro de membrana (heptamerização) responsável por desencadear os efeitos deletérios da toxina nessas células.

Miyata et al. (2002), ainda sugerem em seus estudos que a ligação da ETX na superfície celular das MDCK ocorre, na maioria das vezes, em locais formados predominantemente por lipídeos do tipo DMR's e que todo o seu processo de ação, desde a ligação até formação completa do poro na membrana celular (oligomerização e heptamerização), ocorre no mesmo local de DMR's.

Essa característica diferencia o mecanismo de ação da ETX se comparada ao da aerolisina, a qual precisa que seu precursor seja ativado em um sítio específico na membrana celular para só então mover-se para um local composto pelas DMR's. A ação dos detergentes, após o contato com a superfície celular, pode acarretar um aumento na disponibilidade de receptores nas células susceptíveis à ação da toxina. Desta maneira, os detergentes poderiam ocluir a apresentação de receptores, que não estivessem expostos na superfície celular, tornando-os acessíveis para seu respectivo ligante, no caso, a ETX (MIYATA et al., 2002).

Os resultados obtidos em estudos que utilizaram o tratamento prévio das células com detergentes ressaltam a importância de um adequado ambiente lipídico para preservarem a capacidade das células MDCK à ligação e posterior ação da toxina épsilon (DORCA-ARÉVALO et al., 2012).

O tratamento das células MDCK com detergentes de alta concentração micelar crítica (CMC) poderia aumentar a capacidade de ligação dessas células quando comparadas com células tratadas com detergentes de baixa CMC. Outra variável capaz de alterar a ligação da toxina épsilon às células MDCK é a temperatura na qual as reações ocorrem durante o período de incubação. Isto poderia ser devido, possivelmente, às alterações na característica fluida da membrana plasmática celular associada às propriedades dos detergentes em diferentes temperaturas (DORCA-ARÉVALO et al., 2012).

Assim, os efeitos citotóxicos distintos da ETX têm sido descritos, de forma semelhante, porém com certa variabilidade dependendo da dose utilizada, do tempo de exposição das células frente à ação da ETX e do tipo de célula que a mesma é exposta, susceptível ou não (CHASSIN et al., 2007; NAGAHAMA et al., 2011).

O completo mecanismo de ação da toxina épsilon ainda não está claramente descrito, porém estudos comprovam que a ligação da mesma a receptores específicos na membrana celular, com heptamerização, seguido da formação de um poro complexo na membrana, são estágios críticos no processo de intoxicação celular (LI et al., 2011).

Estudos caracterizaram a ETX como responsável pelo desenvolvimento de quadros fatais de enterotoxemia em ovinos, caprinos, bovinos e ocasionalmente em outros animais domésticos (SONGER et al., 1996; UZAL; KELLY, 1997; UZAL et al., 2002). As ações específicas da atividade da toxina épsilon também tem sido observada em cultivos celulares (PETIT et al., 1997; SHORTT et al., 2000; BORRMANN et al., 2001; BEAL et al., 2003; CHASSIN et al., 2007).

1.3 Enterotoxemia, absorção intestinal da toxina épsilon e disseminação pela corrente sanguínea

Em caprinos e ovinos a enterotoxemia pode ocorrer após o crescimento exponencial do *C. perfringens* tipo D e produção da toxina épsilon, a qual é absorvida no trato intestinal de animais (SONGER et al., 1996; UZAL; KELLY, 1997; UZAL et al., 2002).

Para isto ocorrer, é necessário que alguns fatores prováveis tenham afetado o ambiente intestinal tais como: a diminuição do trânsito intestinal, alterações bruscas na dieta alimentar, mudanças de pastagens pobres para ricas em proteínas, alimentação com diversos tipos de grãos e forragens (trigo, alfafa), dietas muito ricas em proteínas e/ou energia, aumento no conteúdo de carboidratos fermentáveis na ração, associados a um aumento na ingestão dos mesmos, sempre ocorridos sem a prévia adaptação dos animais (SEIFERT; BÖHNEL, 1994; SMITH; SHERMAN, 1994).

A enfermidade é caracterizada como uma toxemia não transmissível, e ocorre sem a invasão bacteriana nos tecidos (NILO, 1980; SONGER et al., 1996; UZAL; KELLY, 1997; UZAL et al., 2002). O crescimento e a proliferação do *C. perfringens* no ambiente intestinal, estão associados à liberação de grandes quantidades de prototoxina épsilon (PTX) que sofrem alterações estruturais, passam a ser citotóxicas (ETX) e são absorvidas durante a dispersão, principalmente pelo intestino delgado, e caem na corrente

sanguínea da onde são difundidas para os demais órgãos (SAKURAI et al., 1983; SONGER, 1996).

Após a absorção da toxina épsilon pela mucosa intestinal e sua disseminação em vários órgãos pela corrente sanguínea, a mesma parece ter predileção por determinados órgãos, e acumular-se no cérebro e rins e provocar elevação da pressão arterial (SAKURAI et al., 1983; NAGAHAMA et al., 1993), aumento da permeabilidade vascular (GOLDSTEIN et al., 2009), edemas e lesões em vários órgãos, incluindo coração, pulmão, rins, intestinos e cérebro (SAKURAI et al., 1983; NAGAHAMA et al., 1993; SONGER, 1996; SOLER-JOVER et al., 2007; MORRIS et al., 2012).

Ao atravessar a barreira hematoencefálica, a ETX causa edemas perivasculares, danos neuronais e liberação excessiva de glutamato pelos neurônios do hipocampo (MIYAMOTO et al., 2000; DORCA-ARÉVALO et al., 2008; LONCHAMP et al., 2010) o que culmina com os sintomas de distúrbios neurológicos, convulsões, opistótono, levando o animal ao óbito (FINNIE, 2004; SMEDLEY et al., 2004).

A patogenia da enterotoxemia provocada pela toxina épsilon ainda não está completamente esclarecida. Os efeitos citotóxicos ocasionados pela toxina são geralmente correlacionados com a ligação da mesma em receptores específicos na membrana celular, formando um poro complexo na membrana com aproximadamente 155 kDa, que interfere na manutenção da adequada permeabilidade da membrana epitelial, com concomitante diminuição do K^+

intracelular por efluxo e aumento significativo de Cl^- , Na^+ , e Ca^{2+} , por influxo, com ou sem a entrada da toxina no citosol (PETIT et al., 1997; 2001; 2003; KNAPP et al., 2009; NAGAHAMA et al., 2011). Muito embora, outros efeitos citotóxicos distintos da toxina épsilon têm sido descritos, dependendo do tipo de célula que a mesma é exposta (CHASSIN et al., 2007).

1.4 Testes “in vitro” utilizando a toxina épsilon

Diferentes espécies de animais têm sido utilizadas como modelos biológicos na tentativa de elucidar os aspectos citotóxicos e neurotóxicos da toxina épsilon “in vivo” (UZAL; KELLY, 1997; UZAL et al., 2002; FERNANDEZ-MIYAKAWA et al., 2007; SOLER-JOVER et al., 2007; LOSADA-EATON et al., 2008). Atualmente, esses ensaios com animais são questionados quanto à bioética e questões relacionadas ao bem estar animal.

Segundo Duell et al. (2011), o uso das culturas celulares é essencial para reproduzir, após infecção, as respostas apresentadas pelos hospedeiros, frente às moléculas estranhas, moléculas de sinalização celular e antígenos. Com o intuito de diminuir as dificuldades e a complexidade presentes nos estudos “in vivo”, o uso de modelos de culturas celulares para performances de testes “in vitro” será necessário para o desenvolvimento de métodos mais acurados de avaliação da cinética nas infecções.

Esses modelos de estudos oferecem uma ampla variedade de técnicas e possibilidades para experimentação e avaliação “in vitro” que proporcionam bases para a comparação com os estudos com aplicações clínicas (DUELL et al., 2011). Nesse contexto, os testes “in vitro” com culturas de diferentes linhagens de células têm sido amplamente desenvolvidos para avaliar a sensibilidade das mesmas para uso nos estudos da patogenicidade da toxina épsilon de *C. perfringens*, como alternativa sensível, específica, confiável, apresentando resultados mais rápidos com menor custo e redução substancial no número de animais sacrificados (BORRMANN et al., 2001; DUELL et al., 2011).

Dentre as várias linhagens de células testadas para a sensibilidade aos efeitos ocasionados pelo uso da toxina épsilon, as que apresentaram maior susceptibilidade “in vitro” foram as células epiteliais “Madin-Darby Canine Kidney Cells” (MDCK), células do ducto coletor cortical de Murine (mpkCCD_{c14}) e, com menor ação, a “Caucasian Renal Leiomioblastoma (G-402)” (PAYNE et al., 1994; BORRMANN et al., 2001; DORCA-ARÉVALO et al., 2008; 2012).

As culturas de MDCK são usadas com ampla frequência como modelos para estudos que requerem células epiteliais, uma vez que estas possuem polaridade basolateral e apical, junções celulares bem definidas, rápida taxa de crescimento e proliferação em condições adequadas, é apropriada para visualização na microscopia confocal e podem desenvolver-se muito bem tanto em cultivos 2D quanto 3D (DUKES et al., 2011).

A ETX liga-se a superfície celular das células MDCK preferencialmente no lado apical, onde reconhece um receptor de membrana específico para a mesma, o qual não está presente nas células insensíveis à ação da toxina. Essa ligação da toxina ao seu receptor leva ao surgimento de uma formação complexa na membrana celular, a qual é muito estável quando a incubação ocorre a 37° C, e que posteriormente acarreta no aparecimento de um poro na mesma (PETIT et al., 1997).

Se, no entanto, após a exposição das células MDCK frente à ação da ETX, a incubação ocorrer à temperatura de 4° C, a ligação da toxina épsilon e a formação do complexo e dos poros consequentes, pode ser dissociada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS) ou com o aquecimento da reação. Essa característica da ligação da ETX às células MDCK sugere um processo de maturação, com a formação de um complexo na membrana celular dependente do desenvolvimento de um pré-poro o qual posteriormente resultará na formação do poro definitivo na membrana celular (PETIT et al., 1997; 2003).

O complexo formado pela ETX nas membranas celulares corresponde a heptamerização das moléculas de toxina com a superfície celular e posterior formação do poro (oligomerização) na mesma (MIYATA et al., 2002).

O processo de oligomerização ocorre decorrente da interação da toxina épsilon ativa quando em contato com a superfície celular. Se, essa interação com a superfície celular ocorrer com a prototoxina (toxina épsilon inativada) a

ligação entre ambas poderá ocorrer, porém sem a posterior oligomerização entre as moléculas e a superfície celular (PETIT et al., 1997).

É necessário que ocorra inicialmente a remoção do “resíduo”, o peptídeo 29 C-terminal da prototoxina para que a mesma se torne ativa e assim possa, após interação com a superfície celular, formar um poro no local de ligação com a membrana (MIYATA et al., 2002).

A ligação da toxina na superfície celular provavelmente deve estar relacionada à presença de um receptor específico e de características estruturais protéica, uma vez que, estudos comprovaram a não ocorrência desta ligação após o tratamento das respectivas células susceptíveis com proteases, diferentemente do ocorrido após tratamento com fosfolipases C, glicosidases ou neuraminidases que permitiram a formação do poro na membrana (DORCA-ARÉVALO et al., 2008; 2012; POPOFF; POULAIN, 2010).

É possível que o receptor específico para a ETX nas células MDCK seja uma proteína ou glicoproteína de 34 ou 46 kDa. Enquanto que nas células cerebrais de ratos, o receptor específico para a ETX pode estar relacionado com uma glicoproteína de 26 kDa (NAGAHAMA; SAKURAI, 1992). Os efeitos citotóxicos causados pela toxina épsilon nas células MDCK são descritos como específicos, de surgimento rápido, dependentes da dose da toxina que foi utilizada e do tempo de exposição das células frente a ETX (SHORTT et al., 2000; BORRMANN et al., 2001; BEAL et al., 2003; PETIT et al., 2003; CHASSIN et al., 2007).

Borrmann et al. (2001), confirmaram que em células MDCK, a toxina épsilon de *C. perfringens*, provoca uma diminuição significativa no número de células, com redução na capacidade de divisão e diferenciação, um aumento no volume celular e no número de mitocôndrias e fagossomos, além de alterações no ciclo de distribuição celular, 24 horas após a exposição das mesmas com a toxina.

Nas etapas iniciais após intoxicação foi observado um aumento do tamanho celular (inchaço), seguido pelo desaparecimento mitocondrial, formação de poros na membrana celular com o rompimento posterior da mesma. As alterações ultra-estruturais foram verificadas e indicaram o efeito cariotóxico da toxina, uma vez que a mitose é bloqueada ainda nos estágios iniciais, e o cromossomo permanece irregularmente agrupado no núcleo (BORRMANN et al., 2001; CHASSIN et al., 2007).

A condensação do nucléolo descrita por Hambrook et al. (1994), indica uma inibição na atividade de síntese celular. As alterações nas mitocôndrias e finalmente, seu completo desaparecimento resulta na queda do suprimento de energia para a célula.

Esses efeitos segundo Petit et al. (2003), são consequências da ligação da toxina a receptores específicos na membrana plasmática celular e não nas organelas intracelulares. A toxina épsilon também induz rapidamente a morte celular, sem alterar a permeabilidade das junções comunicantes, o arranjo de actina no citoesqueleto ou os processos endocitóticos.

Chassin et al. (2007), observaram que os danos causados pela toxina épsilon em linhagens de células corticais renais altamente diferenciadas e coletadas do ducto principal de Murine (CCD, mpkCCD_{c14}) induziram rapidamente uma depleção no ATP celular, alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, além da translocação mitocondrial do fator indutor de apoptose (AIF), um potente causador de morte celular independente de caspases, condensação da cromatina e redução nuclear que resultaram em necrose celular.

A citotoxicidade celular provocada pela ação da toxina épsilon pode ser monitorada com o uso de um indicador de integridade lisossomal (“neutral red”) ou de integridade mitocondrial. Tais mecanismos de morte celular diferem dos demais descritos em toxinas que formam um poro (complexo) na membrana plasmática da célula e aparecem como alterações distintas das que são relacionadas à permeabilidade da membrana (CHASSIN et al., 2007).

Segundo Petit et al. (1997), a endocitose e internalização da ETX nas células não foram observados durante a toxicoinfecção e, durante todo esse processo, a toxina permaneceu associada à membrana celular.

No entanto, no estudo apresentado por Nagahama et al. (2011), a toxina épsilon, após heptamerização e oligomerização, foi internalizada no citosol celular, sempre envolta em endossomos, com posterior formação de vacúolos no citoplasma de células MDCK. A formação desses vacúolos no interior das células foi seguida pela perda da viabilidade celular. A ligação da toxina à

membrana plasmática, com a formação do poro na mesma, resulta em alterações na permeabilidade seletiva da célula indica não ser o único pré-requisito para os efeitos tóxicos da ETX que levam à morte celular.

Os estudos direcionados aos efeitos diretamente causados pela ETX em organelas essenciais ao funcionamento adequado da célula são restritos. Dentre essas organelas primordiais, a mitocôndria é a estrutura celular responsável pela produção da totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular (NAGAHAMA et al., 2011).

1.5 As mitocôndrias e a ação da toxina épsilon

As mitocôndrias são organelas celulares móveis, envoltas por membranas, presentes em todas as células animais e que possuem seu próprio genoma. Este genoma consiste em um DNA circular de aproximadamente 16,5 Kb presente na matriz mitocondrial (GALMICHE; BOUQUET, 2006).

São frequentemente descritas apresentando formato de bastão ou ovaladas, porém muito embora a aparência dessas organelas pode ser diferente de um tipo celular para outro (GALMICHE; BOUQUET, 2006).

Estas organelas são dinâmicas e compostas de dupla membrana, são responsáveis e participam de vários processos celulares, como geração de

ATP, homeostase do cálcio, biossíntese de aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos, além de estar presente nos momentos de morte celular programada (MCP) (OHTA; NISHIYAMA, 2011). Em estudos anteriores, indícios de sua participação também na resposta imune inata, mais precisamente na sinalização de receptores de reconhecimento padrão (RRP), foram demonstrados (SCOTT, 2010).

A mitocôndria também participa, de forma crucial, durante a toxicoinfecção celular, no que diz respeito à produção de energia e no seu metabolismo de oxidação. Uma de suas funções primárias é a redução do oxigênio à água durante a fosforilação oxidativa a fim de produzir adenosina trifosfato (ATP). Até as pequenas alterações nos níveis de oxigênio são detectadas pelas mitocôndrias e comunicados a célula através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (OHTA; NISHIYAMA, 2011).

Segundo descrito por Yaffe (1999), com o uso de técnicas modernas para a análise de imagens, essas organelas formam um retículo intracelular composto por duas membranas, das quais, uma membrana mitocondrial externa (“mitochondrial outer membrane”, MOM) e uma membrana mitocondrial interna (“mitochondrial inner membrane”, MIM), de composição e propriedades físicas distintas, que criam um espaço intermembranas e a matriz mitocondrial. As propriedades da MOM não estão totalmente esclarecidas, porém a mesma apresenta-se como permeável a alguns solutos devido à presença de proteínas mitocondriais (porinas).

Na membrana mitocondrial interna estão presentes várias dobras (pregas), denominadas cristas mitocondriais, as quais aumentam a área de superfície e podem ser visualizadas na microscopia eletrônica como túbulos ou vesículas internas na matriz mitocondrial ou no espaço inter-membranas. Esta membrana é composta por uma quantidade significativa de lipídeos que forma uma barreira impermeável aos solutos e pelas proteínas da cadeia respiratória. Também, possui gradiente de voltagem, expresso como um potencial transmembrana em milivoltes (mV), que representa um fator essencial na fisiologia mitocondrial e celular (YAFFE, 1999).

Essas organelas participam na regulação do metabolismo e energética celular uma vez que, em condições fisiológicas, são responsáveis pelo transporte de elétrons e principais produtoras de energia celular através da utilização das moléculas de adenosina trifosfato (ATP), no processo denominado de oxidação fosforilativa (SCOTT, 2010).

Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH₂, são transferidos ao O₂ reduzindo-o a H₂O (respiração mitocondrial), e a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP (fosforilação oxidativa) (MITCHELL, 1961).

Quando a membrana mitocondrial torna-se permeável a H⁺ (por exemplo, pela ação de protonóforos) ocorre dissipação do potencial de membrana aumentando a velocidade de respiração; sob essas condições, a capacidade da mitocôndria de sintetizar ATP é comprometida (MITCHELL,

1961; NICHOLLS, 1982). Da mesma forma, a mitocôndria participa na regulação de vários aspectos da biologia celular e vias metabólicas, tais como produção de energia, estado redox, metabolismo molecular, controle da liberação de alguns aminoácidos e lipídeos, metabolismo do ferro, homeostase de Ca^{2+} e morte celular programada, ou apoptose (YAFFE, 1999).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas, agentes virais, bem como as toxinas bacterianas. Os efeitos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e ou indiretos, levando às disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP e morte celular, na maioria das vezes, por apoptose (UYEMURA et al., 1997; PIGOSO et al., 1998; MINGATTO et al., 2000; DORTA et al., 2003).

Os estudos que relatam a contribuição das mitocôndrias para o controle do metabolismo celular foram despertados quando os pesquisadores observaram a participação dessas organelas na regulação da apoptose celular (KROEMER; REED, 2000).

1.6 Processo de morte celular desencadeado pela toxina épsilon

Estudos comprovam que após a exposição das células susceptíveis à ação da toxina épsilon de *C. perfringens*, estas sofrem alterações morfológicas características que culminam com a morte celular semelhante as que ocorrem por necrose (PAYNE et al., 1994; MIYAMOTO et al., 2000; SHORTT et al., 2000; PETIT et al., 2001; 2003; CHASSIN et al., 2007).

Este processo de morte celular é caracterizado morfológicamente pela rápida liberação do conteúdo citoplasmático celular no ambiente em que as células se encontram e, esta liberação, resulta em uma reação inflamatória massiva no ambiente fisiológico que envolve as células mortas (DANIAL; KORSMEYER, 2004; HAN et al., 2008).

A despeito dos efeitos significativos que ocorrem durante a morte celular por necrose, em condições patológicas, os mecanismos moleculares que o acompanham não estão claramente entendidos e descritos. Ocasionalmente, um meio aceitável para caracterizar a morte celular por necrose é através da ausência de características apoptóticas apresentadas (HAN et al., 2008).

Uma possível causa para a escassez de estudos voltados aos mecanismos moleculares que acompanham a morte celular por necrose, pode ser devido ao fato de a mesma ser caracterizada como uma forma incontrolável e passiva de morte celular. No entanto, os estudos recentes tem demonstrado a existência não apenas da necrose acidental, como também, normal e

fisiológica e necrose programada (KANDUC et al., 2002; PROSKURYAKOV et al., 2002; KIM et al., 2003).

A forma de necrose regulada pela transição da permeabilidade mitocondrial pode ser estimulada por diferentes estímulos, incluindo danos no DNA, ativação do fator de necrose tumoral, contração e contato entre células. Além disso, tem sido descritos casos de necrose dependentes da ativação de caspases e associados à persistência da síntese de proteínas importantes que se mantem durante esse processo (HETZ et al., 2002; PROSKURYAKOV et al., 2002; KIM et al., 2003)

Segundo o estudo apresentado por Lemasters (1999), determinados eventos de morte celular mesclam características semelhantes ao mecanismo de morte celular por apoptose e por necrose, processo esse denominado de “necrapoptose”. Esses estudos demonstram a existência de pontos comuns responsáveis pela indução tanto da via de morte celular por apoptose quanto pela necrose, o que indica a presença de uma via de sinalização cruzada e modulada.

O mecanismo que leva a morte celular pode ser alterado de um processo de apoptose para a necrose programada, e vice-versa, o que reforça o conceito de que o mecanismo de morte celular pode ser programado e controlado (LEMASTERS, 1999).

Segundo descrito por Kerr et al. (1972), o termo apoptose refere-se a uma forma morfológica de morte celular, muito embora alguns componentes do conceito de apoptose já haviam sido descritos anteriormente.

A morte celular programada (MCP) é um processo que ocorre nos organismos multicelulares para o descarte de células indesejadas (SCOTT, 2010). O processo possui papel importante durante todo desenvolvimento, como na homeostase tecidual, regeneração, organogênese, hematopoiese normal e patológica, eliminação de células após dano por agentes genotóxicos, e principalmente na resposta inflamatória e durante a infecção viral (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993; SCOTT, 2010).

Este mecanismo de morte celular programada (MCP) é essencial no processo fisiológico de renovação celular, para o funcionamento adequado do sistema imune e hormonal, embriogênese, para a homeostasia tecidual (ELMORE, 2007).

Segundo Elmore (2007), existe uma variedade de estímulos e condições celulares, ambas fisiológicas ou patológicas, que podem ser responsáveis pelo início do processo de apoptose, muito embora nem todas as células vão, necessariamente, morrer após esses estímulos.

O processo de apoptose, um tipo de MCP característico, desenvolve-se através de eventos como a redução do volume celular, cromatina condensada, seguido da formação de prolongamentos na membrana celular, acompanhados

da desintegração do núcleo e presença de fragmentos envoltos pela membrana nuclear, além da desintegração celular em vesículas chamadas “corpos apoptóticos” também denominados de apoptossomas como ilustra a Figura 2 (SCOTT, 2010).

Os corpos apoptóticos resultantes de um processo de MCP são rapidamente fagocitados por macrófagos, como consequência, a célula desaparece sem nenhum fenômeno inflamatório decorrente (SCOTT, 2010).

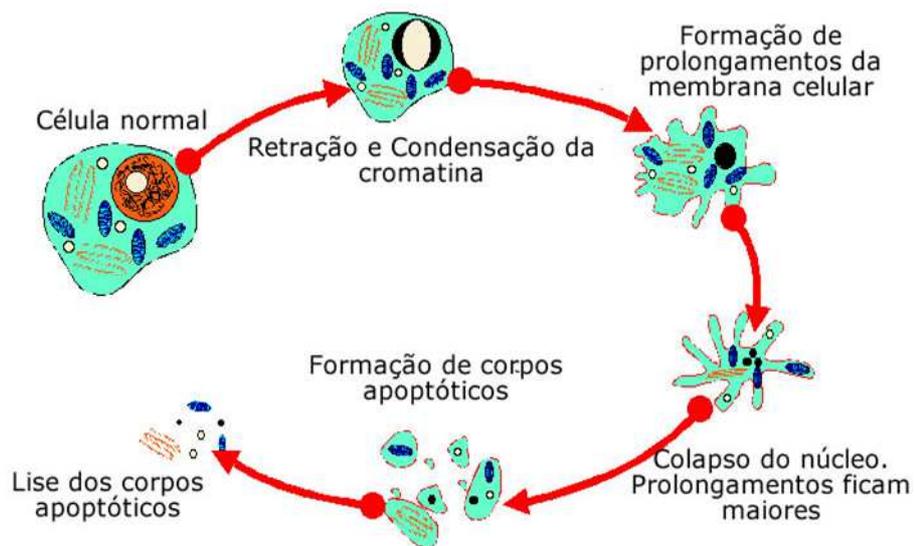


FIGURA 2- Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

Fonte: domínio público

Duas grandes vias metabólicas distintas, porém que envolvem o consumo de energia, a ativação de um grupo de cisteínas proteases, denominadas de caspases e a clivagem de diversos substratos intracelulares em cascata, são estudadas para a compreensão dos mecanismos de ativação da apoptose (BRENNER; MAK, 2009).

Essas são denominadas de via metabólica extrínsecas, com ativação de receptores de morte celular, e a via metabólica intrínseca ou mitocondrial. Entretanto estudos comprovam que essas duas vias se interligam e que moléculas de uma via influenciam o desenvolvimento da outra via. Existem outros mecanismos de ativação e início da apoptose, como por ação de citotoxicidade mediada por células T e através da liberação de granzimas e perforinas (ELMORE, 2007).

A via metabólica extrínseca é desencadeada através da ativação dos membros da família de receptores denominada fator de necrose tumoral (TNF), os receptores de morte celular (PETER; KRAMMER, 2003; BRENNER; MAK, 2009). Sendo assim, para que ocorra a ativação da via extrínseca, receptores de superfície celular são estimulados, e acarretam a transmissão de sinais por proteínas ligantes específicas (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993; CHANG et al., 2007; ELMORE, 2007; XU, 2012).

A proteína denominada Fas ligante (*FasL*) posiciona-se com uma fração da molécula interiorizada na membrana celular e outra, localizada no lado externo da mesma (CHANG et al., 2007). Essa fração da molécula localizada externamente possui a propriedade de ligar-se a outro receptor na membrana celular dos linfócitos T citotóxicos iniciando o reconhecimento da célula-alvo, a molécula *FasL*, une-se à *Fas* e altera a forma da parte externa dessa última molécula. Essa alteração estrutural faz com que a parte interna ative a caspase 8, iniciando a cascata de caspases que darão continuidade ao processo de morte celular programado (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993; CHANG et al., 2007; ELMORE, 2007; XU, 2012).

Demais sinalizadores como o CD95 ou Apaf-1 e TNF- α (receptor fator de necrose tumoral) também participam da ativação da via extrínseca de MCP, por ativação de receptores da membrana celular. Estímulo este, responsável pelo recrutamento e ativação proteolítica da pró-caspase 8, ativando as caspases 3, 6 e 7, consideradas como efetoras da MCP (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993).

Outra via que desencadearia o processo de morte celular programada, seria a via intrínseca (mitocondrial), dependente da ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Este grupo é composto por proteínas pró e anti-apoptóticas, que previnem a ativação das caspases através da preservação da membrana mitocondrial (OHTA; NISHIYAMA, 2011).

O processo de apoptose pode ser então, ativado, pela via metabólica intrínseca seguido da liberação pelas mitocôndrias, de citocromo *c* no citosol (LIU et al., 1996). Após observação desses eventos iniciais, foi possível constatar que as mitocôndrias possuem vários outros fatores que, após serem liberados no citosol, corroboram com o início da apoptose, como os fatores indutores de apoptose (AIF), as proteínas Smac/Diablo, a protease serina HtrA2/Omi, entre outros (NEWMEYER; FERGUSON-MILLER, 2003).

A atividade das proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas, como Bax e Bak é antagonizada através de proteínas BH3-únicas. Em resposta ao estímulo apoptótico, as BH3-únicas translocam para mitocôndria onde agem de forma contrária a ação das Bcl-2 e ativam Bax e Bak, proteínas pró-apoptóticas (NEWMEYER; FERGUSON-MILLER, 2003; BRAS et al., 2005; ELMORE, 2007). Estas proteínas mudam a sua conformação e aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa (OHTA; NISHIYAMA, 2011). Este ato leva a liberação do citocromo *c* no citosol celular e, conseqüente ativação das caspases efetoras (NEWMEYER; FERGUSON-MILLER, 2003). A ativação das caspases efetoras leva a associação ao fator apoptose 1 (Apaf-1) e às pró-caspases 9 (LIU et al., 1996; BRAS et al., 2005).

Em condições normais, o citocromo *c* encontra-se presente no espaço mitocondrial intermembranas. Sua liberação no citosol é responsável pela liberação de um complexo de proteínas, denominado apoptossomo, capaz de ativar proteases e fatores apoptóticos da família das caspases, o que resulta

nas alterações morfológicas pertinentes ao processo de apoptose celular (NEWMAYER; FERGUSON-MILLER, 2003).

Kroemer (2003) relata que as alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial constitui um dos fatores essenciais para o início dos processos de apoptose. Os fatores que levam à permeabilização da membrana mitocondrial e ao colapso do potencial transmembrana são os principais responsáveis pelo ponto decisivo que dá início a um processo irreversível de morte celular (MARCHETTI et al., 1996).

Determinados fármacos, conhecidos como inibidores de permeabilidade da membrana mitocondrial, são capazes de agir na prevenção do início da apoptose. Deste mesmo modo, inibidores endógenos, como proteínas da família Bcl-2 e Bcl-XL, possuem atividade anti-apoptose e quando são liberados agem diminuindo a permeabilidade da membrana mitocondrial (KLUCK et al., 1997; YANG et al., 1997).

Nos mamíferos foram descritos, pelo menos, 20 proteínas que compõem a família Bcl-2 as quais são classificadas de acordo com sua função como, pró ou anti-apoptose. Essas proteínas dividem, ao menos, um domínio com homologia conservada Bcl-2 (BH), dentre os quatro domínios existentes (BH1-BH4) (KLUCK et al., 1997), conforme exemplificado na Figura 3 (CORY; ADAMS, 2002).

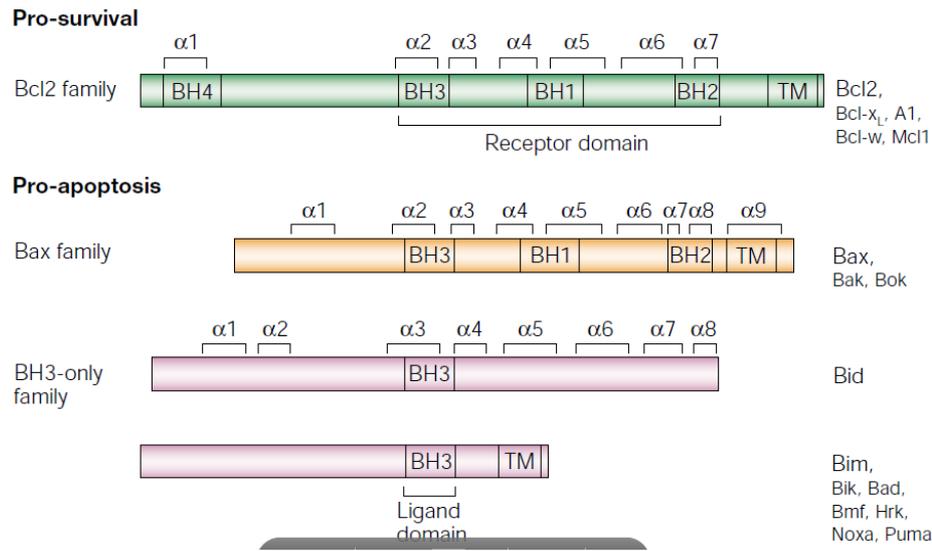


FIGURA 3- As três subfamílias de proteínas relacionadas à Bcl-2.

Fonte: CORY; ADAMS, 2002.

Como membros da categoria anti-apoptose (ou pró-sobrevivência), as proteínas Bcl-XL localizam-se, predominantemente, na membrana mitocondrial externa, enquanto que BCL-2 tem uma distribuição mais ampla, sendo encontrada tanto na membrana como no retículo endoplasmático e membrana nuclear, e são capazes de se ligarem diretamente impedindo a ação das proteínas da família pró-apoptose (KLUCK et al., 1997; YANG et al., 1997).

Os componentes da família pró-apoptose são descritos como uma subfamília do domínio BH3, dos quais fazem parte o Bad, Bid, Bim, Bmf, Noxa, Puma, Bax e Bak (CORY; ADAMS, 2002). Estes comportam-se como proteínas sentinelas responsáveis por detectar alterações pertinentes à morte celular ou

danos intracelulares. Em células saudáveis são controlados de diversas maneiras (podem permanecer sequestrados no citoesqueleto, serem fosforilados ou passarem por proteólises, entre outras), enquanto que se ativados pelos sinais de morte celular estes são alterados com a inserção do domínio BH3 (FESTJENS et al., 2004).

Para o início do processo de apoptose é necessária a ação tanto das proteínas Bax quanto Bak, porém o mecanismo de ativação das mesmas e de contenção pela BCL-2 não está claramente descrito. Durante a apoptose, Bax e Bak se oligomerizam na membrana mitocondrial externa, provavelmente por consequência da reorganização dos lipídeos da MOM, e assim provocam a liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo *c* que permite a ativação da caspase 9, após a ruptura da integridade da membrana (CORY; ADAMS, 2002).

As proteínas da família Bcl-2 anti-apoptose agem prevenindo a liberação do citocromo *c* e, conseqüentemente, a ativação da caspase 9, independente do dano mitocondrial (CORY; ADAMS, 2002). O envolvimento dessas proteínas, que participam da regulação e execução da apoptose, no controle de várias funções não apoptóticas, tem fornecido informações adicionais significativas no entendimento do complexo mecanismo de morte celular.

Um exemplo são as proteínas da família Bcl-2 que podem, inicialmente, estar envolvidas à uma resposta aos casos de estresse celular, e

posteriormente, adquirir a capacidade de regular a morte após severos danos sofridos pelas células (LEMASTERS, 1999).

2 OBJETIVOS

- ✓ Padronizar o cultivo das células “Madin-Darby Canine Kidney Cell” (MDCK), e quantificar a toxina Épsilon de *Clostridium perfringens* presente, por titulação da mesma;

- ✓ Caracterizar os efeitos da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* na morfologia e citotoxicidade em células MDCK, a cada 24 horas, durante um intervalo de 1 a 5 horas, pós exposição;

- ✓ Avaliar os efeitos da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* na despolarização da membrana mitocondrial, em células MDCK, a cada 24 horas, durante um intervalo de 1 a 5 horas pós exposição, por citometria de fluxo acústica;

- ✓ Avaliar os efeitos da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* na liberação dos fatores associados à morte celular programada, em células MDCK, a cada 24 horas, durante um intervalo de 1 a 5 horas pós exposição, por citometria de fluxo acústica.

3 CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível a padronização do cultivo das células “Madin-Darby Canine Kidney Cell” (MDCK) e a quantificação da toxina presente, por titulação, realizadas em conformidade ao descrito na literatura;

- ✓ Os efeitos da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* na morfologia das células MDCK foram visualizados por microscopia invertida e a citotoxicidade (perda de viabilidade celular) foi comprovada com o teste de MTT e, ambos confirmaram-se como eventos progressivos que evoluíram de 1 a 5 horas pós-exposição, quando comparados com o controle (MDCK + PTX);

- ✓ A citometria de fluxo acústica foi eficaz na avaliação dos parâmetros e comprovou a existência de uma correlação positiva ($p \leq 0,001$) entre o aumento da granulosidade citoplasmática (vacúolos citoplasmáticos) e a despolarização da membrana mitocondrial (agregação do JC-1), após exposição das células MDCK, nos períodos de 1 a 5 horas pós toxicoinfecção com a ETX;

- ✓ A citometria de fluxo acústica foi eficaz na mensuração da expressão dos mediadores associados à morte celular programada (Bax e BCL-2), após exposição das células MDCK, nos períodos de 1 a 5 horas, com a ETX. Com a citometria de fluxo acústica foi possível mensurar uma expressão inicialmente maior, das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, seguido de uma equivalência e posteriormente, a maior expressão das proteínas pró-apoptóticas, Bax, nos períodos de 1 a 5 horas pós-exposição das células MDCK com a ETX.

REFERÊNCIAS

BASAK, A. K.; POPOFF, M. R.; TITBALL, R. W.; COLE, A. *Clostridium perfringens* epsilon toxin. In: ALOUF, J. E.; POPOFF, M. R. **The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins**. London: Elsevier, 3a ed., 2006. Cap 35.

BEAL, D. R.; TITBALL, R. W.; LINDSAY, C. D. The development of tolerance to *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin in MDCK and G-402 cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, p. 593-605, 2003.

BHOWN, A. S.; HABEEB, A. F. S. A. Structural studies on epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* type D. Localisation of the site of tryptic scission necessary for activation of epsilon-toxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 73, p. 889-896, 1977.

BOKORI-BROWN, M.; SAVVA, C. G.; FERNANDES, S. P. C.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K.; TITBALL, R. W. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4589-4601, 2011.

BORRMANN, E.; GÜNTHER, H.; KÖHLER, H. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin on MDCK cells. **FEMS Immunology And Medical Microbiology**, v. 31, p. 85-92, 2001.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRENNER, D.; MAK, T. W. Mitochondrial cell death effectors. **Cell Biology**, v. 21, p. 871-877, 2009.

BULLEN, J. J. Enterotoxaemia of sheep: *Clostridium welchii* type D in the alimentary tract of normal animals. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 64, p. 201-206, 1952.

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

CHANG, H. W.; JENG, C. R.; LIN, C. M.; LIU, J. J.; CHANG, C. C.; TSAI, Y. C.; CHIA, M. Y.; PANG, V. F. The involvement of Fas/FasL interaction in porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-inoculation-associated lymphocyte apoptosis in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 72-82, 2007.

CHASSIN, C.; BENS, M.; BARRY, J.; COURJARET, R.; BOSSU, J. L.; CLUZZEAUD, F.; BEN MKADDEM, S.; GIBERT, M.; POULAIN, B.; POPOFF, M.

R.; VANDEWALLE, A. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. **American Journal of Physiology, Renal Physiology**, v. 293, p. 927-937, 2007.

COLE, A. Structural studies on epsilon toxin from *Clostridium perfringens*. In: DUCHENESNES C., MAINIL, J.; POPOFF, M. R.; TITBALL, R. W. **Protein toxins of the genus *Clostridium* and vaccination**. Liège: Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire, 2003, p.95.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews of Cancer**, v. 2, p. 647-656, 2002.

CRAIG, J. P.; MILES, A. A. Some properties of the iota toxin of *Clostridium welchii* including its action on capillary permeability. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 81, p. 481-493, 1961.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-219, 2004.

DORCA-ARÉVALO, J.; SOLER-JOVER, A.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R.; MARTÍN-SATUÉ, M.; BLASI, J. Binding of epsilon-toxin from *Clostridium*

perfringens in the nervous system. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 14-25, 2008.

DORCA-ARÉVALO, J.; MARTÍN-SATUÉ, M.; BLASI J. Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* to the renal system. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 179-189, 2012.

DORTA, D. J.; LEITE, S.; DE MARCO, K. C.; PRADO, I. M. R.; RODRIGUES, T.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 251-257, 2003.

DUELL, B. L.; CRIPPS, A. W.; SCHEMBRI, M. A.; ULETT, G. C. Epithelial cell coculture models for studying infectious diseases: benefits and limitations. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.1-10, 2011.

DUKES, J. D.; WHITLEY, P.; CHALMERS, A. D. The MDCK variety pack: choosing the right strain. **BMC Cell Biology**, v. 12, n. 43, p. 1- 4, 2011.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FENNESSEY, C. M.; SHENG, J.; RUBIN, D. H.; MCCLAIN, M. S. Oligomerization of *Clostridium perfringens* epsilon toxin is dependent upon caveolins 1 and 2. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1-8, 2012.

FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; SAYEED, S.; FISHER, D. J.; POON, R.; ADAMS, V.; ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SAPUTO, J.; UZAL, F. A. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4282-4288, 2007.

FESTJENS, N.; GURP, M. V.; LOO, G. V.; SAELENS, X.; VANDENABEELE, P. Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. **Acta Haematologica**, v. 111, p. 7-27, 2004.

FINNIE, J. W. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **Anaerobe**, v. 10, p. 145-150, 2004.

GALMICHE, A.; BOUQUET, P. Bacterial toxins and mitochondria. In: ALOUF, J. E.; POPOFF, M. R. **The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins**. London: Elsevier, 3a ed., 2006. Cap 10.

GIBERT, M.; RENAUD, C. J.; POPOFF, M. R. Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. **Gene**, v. 203, p. 65- 73, 1997.

GOLDSTEIN, J.; MORRIS, W. E.; LOIDL, C. F.; TIRONI-FARINATTI, C.; McCLANE, B. A.; UZAL, F. A.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases the small intestinal permeability in mice and rats. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009.

HAMBROOK, J. L.; LINDSAY, C. D.; HUGHES, N. Morphological alterations in MDCK cells induced by exposure to *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Biochemical Society Transactions**, v. 23, 1995.

HAN, S. I.; KIM, Y. S.; KIM, T. H. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. **BMB Reports**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2008.

HARDER, T. Formation of functional cell membrane domains: the interplay of lipid- and protein-mediated interactions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 358, p. 863–868, 2003.

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

HETZ, C. A.; HUNN, M.; ROJAS, P.; TORRES, V.; LEYTON, L.; QUEST, A. F. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 4671 - 4683, 2002.

HUGHES, M. L.; POON, R.; ADAMS, V.; SAYEED, S.; SAPUTO, J.; UZAL, F. A.; MCCLANE, B. A.; ROOD, J. I. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7531-7538, 2007.

HUNTER, S. E.; 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, p. 102-110, 1992.

HUNTER, S. E.; BROWN, J. E.; OYSTON, P. C. F.; SAKURAI, J.; TITBALL, R. W. Molecular genetic analysis of beta toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 3958– 3965, 1993.

KANDUC, D.; MITTELMAN, A.; SERPICO, R.; SINIGAGLIA, E.; SINHA, A. A.; NATALE, C.; SANTACROCE, R.; DI CORCIA, M. G.; LUCCHESI, A.; DINI, L.; PANI, P.; SANTACROCE, S.; SIMONE, S.; BUCCI, R.; FARBER, E. Cell death:

apoptosis versus necrosis (review). **International Journal of Oncology**, v. 21, p. 165-170, 2002.

KERR, J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v. 471, n. 4, p.181-182, 2002.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D.; RUBBO, A.; 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, n. 2, ed. 26, 2008.

KIM, J. S.; HE, L.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 463-470, 2003.

KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, p. 1132-1136, 1997.

KNAPP, O.; MAIER, E.; BENZ, R.; GENY, B.; POPOFF, M. R. Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin (ETX). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, p. 2584-2591, 2009.

KNAPP, O.; STILES, B. G.; POPOFF, M. R. The aerolysin-like toxin family of cytolytic, pore-forming toxins. **Open Toxicology Journal**, v. 3, p. 53-68, 2010.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, v. 427, p. 461-465, 2000.

LEMASTERS, J. J. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, v. 276, G1-6, 1999.

LI, J.; SAYEED, S.; ROBERTSON, S.; CHEN, J.; MCCLANE, B. A. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, n. 46, 2010.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996.

LONCHAMP, E.; DUPONT, J. C.; WIOLAND, L.; COURJARET, R. I.; MBEBI-LIEGEOIS, C.; JOVER, E.; DOUSSAU, F.; POPOFF, M. R.; BOSSU, J. L.; BARRY, J.; POULAIN, B. *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1-15, 2010.

LOSADA-EATON, D. M.; UZAL, F. A.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; *Clostridium perfringens* Epsilon-toxin is absorbed from different intestinal segments of mice. **Toxicon**, v. 51, p. 1207-1213, 2008.

MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; HAEFFNER, A.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 1155-1160, 1996.

MINAMI, J.; KATAYAMA, S.; MATSUSHITA, C.; OKABE, A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C- terminal peptides. **Microbiology and Immunology**, v. 41, p. 527-535, 1997.

MINGATTO, F. E.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 6, p. 1154-1160, 2000.

MINGATTO, F. E.; SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A.; JORDANI, M. C.; CURTI, C. *In vitro* interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 342, n. 2, p. 231-235, 1996.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p.144-148, 1961.

MIYAMOTO, O.; SUMITANI, K.; NAKAMURA, T.; YAMAGAMI, S.; MIYATA, S.; ITANO, T.; OKABE, A. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 109-113, 2000.

MIYATA, S.; MINAMI, J.; TAMAI, E.; MATSUSHITA, O.; SHIMAMOTO, S.; OKABE, A. *Clostridium perfringens* e-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby Canine Kidney cells and rat

synaptosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39463–39468, 2002.

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.

MORRIS, W. E.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E. Toxinas de *Clostridium perfringens*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 41, p. 251-260, 2009.

MYERS, G. S.; RASKO, D. A.; CHEUNG, J. K.; RAVEL, J.; SESHADRI, R.; DEBOY, R. T.; REN, Q.; VARGA, J.; AWAD, M. M.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; HAFT, D. H.; DODSON, R. J.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; ROSOVITZ, M. J.; SULLIVAN, S. A.; KHOURI H.; DIMITROV, G. I.; WATKINS, K. L.; MULLIGAN, S.; BENTON, J.; RADUNE, D.; FISHER, D. J.; ATKINS, H. S.; HISCOX, T.; JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J.; SONGER, G. J.; MCCLANE, B. A.; TITBALL, R. W.; ROOD, J. I.; MELVILLE, S. B.; PAULSEN, I. T. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. **Genome Research**, v. 16, p. 1031-1040, 2006.

NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 3, p. 1237-1240, 1992.

NAGAHAMA, M.; LIDA, M.; SAKURAI, J. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on rat isolated aorta. **Microbiology and Immunology**, v. 37, p. 447-450, 1993.

NAGAHAMA, M.; ITOAYASHI, Y.; HARA, H.; HIGASHIHARA, M.; FUKATANI, Y.; TAKAGISH, T.; ODA, M.; KOBAYASHI, K.; NAKAGAWA, I.; SAKURAI, J. Cellular vacuolization induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. **FEBS Journal**, v. 278, 2011.

NEWMAYER, D. D.; FERGUSON-MILLER, S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. **Cell**, v. 112, p. 481-490, 2003.

NICHOLLS, D.G. In: Bioenergetics. **An introduction to the chemiosmotic theory**, 1^o ed., London: Academic Press, p. 25-96, 1982.

NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 5, 1980.

ODENDAAL, M. W. *Clostridium perfringens* group. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford: Oxford University, 1994. v. 2, p. 1290-1298.

OHTA, A.; NISHIYAMA, Y. Mitochondria and viruses. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

PAYNE, D. W.; WILLIAMSON, E. D.; HAVARD, H.; MODI, N.; BROWN, J. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 116, p. 161-168, 1994.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 26-35, 2003.

PETIT, L.; GIBERT, M.; GILLET, D.; WINTER, C. L.; BOQUET, P.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 20, p. 6480-6487, 1997.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, 1999.

PETIT, L.; MAIERS, E.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, 2001.

PETIT, L.; GIBERT, M.; GOURCH, A.; BENS, M.; VANDEWALLE, A.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin rapidly decrease membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 155-164, 2003.

PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, T.; MINGATTO, F. E.; CURTI, C. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of mechanisms involved. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.30, p. 961-965, 1998.

POPOFF, M. R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4602-4615, 2011.

POPOFF, M. R.; POULAIN, B. Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. **Toxins**, v. 2, p. 683-737, 2010.

PROSKURYAKOV, S. Y.; GABAI, V. L.; KONOPLYANNIKOV, A. G. Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. **Biochemistry**, v. 67, p. 387-408, 2002.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Clostridium* species. In: **Clinical veterinary microbiology**, London Wolfe, p. 191-208, 1994.

ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 333-360, 1998.

ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis**. London: Academic Press, 533 p., 1997.

SAKURAI, J.; DUNCAN, C. L. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 741-745, 1977.

SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; FUJII, Y. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. **Infection and Immunity**, v. 42, p. 1183-1186, 1983.

SAYEED, S.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; FISHER, D. J.; ADAMS, V.; POON, R.; ROOD, J. I.; UZAL, F. A.; MCCLANE, B. A. Epsilon-toxin is required for most *Clostridium perfringens* type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7413–7421, 2005.

SAYEED, S.; LI, J.; MCCLANE, B. A. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2391-2398, 2007.

SAYEED, S.; LI, J.; MCCLANE, B. A. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 495-504, 2010.

SAWIRES, Y. S.; SONGER, J. G. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. **Anaerobe**, v. 12, p. 23–43, 2006.

SCHWARTZMAN, R. A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: molecular biology of programmed cell death. **Endocrinology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 133-151, 1993.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 316-320, 2010.

SEIFERT, H.; BÖHNEL, H. Clostridiosen. In: **HANBUCH der bakteriellen infektionen bei Tieren**. Band II / 4. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p. 1-222, 1994.

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 Sciences, USA**, v. 99, n. 2, p. 996–1001, 2002.

SHORTT, S. J.; TITBALL, R. W.; LINDSAY, C. H. An assessment of the *in vitro* toxicology of *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin in human and animal cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 19, p. 108-116, 2000.

SIPOS, W.; FISCHER, L.; SCHINDLER, M.; SCHMOLL, F. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from domestic and exotic ruminants and swine. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 50, p. 360- 362, 2003.

SMEDLEY, J. G.; FISHER, D. J.; SAYEED, S.; CHAKRABARTI, G.; McCLANE, B. A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 152, p. 183-204, 2004.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Enterotoxemia. In: SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat medicine**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1994. p. 289-305.

SOLER-JOVER, A.; DORCA, J.; POPOFF, M. R.; GIBERT, M.; SAURA, J.; TUSELL, J. M.; SERRATOSA, J.; BLASI, J.; MARTÍN-SATUÉ, M. Distribution of

Clostridium perfringens epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells. **Toxicon**, v. 50, p. 530-540, 2007.

SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 216- 234, 1996.

SONGER, J. G. Clostridia as agents of zoonotic disease. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 399-404, 2010.

UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; MINGATTO, F. E.; JORDANI, M. C.; CURTI, C. Diclofenac sodium and mefenamic acid: potent inducers of the membrane permeability transition in renal cortex mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.342, p.231-235, 1997.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R. Effects on the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. **Journal of Comparative Pathology**, v.116, p. 63-71, 1997.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; MORRIS, W. E.; ASSIS, R. A. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, p.71-75, 2002.

XU, X.; ZHANG, K.; HUANG, Y.; DING, L.; CHEN, G.; ZHANG, H.; TONG, D. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. **Virology Journal**, v. 9, p. 202-213, 2012.

YAFFE, M. P. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. **Science**, v. 283, p. 1493-1497, 1999.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T. I.; JONES, D. P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, p.1129-1132, 1997.

CAPÍTULO II

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Cellular vacuolation and mitochondrial-associated factors induced by *Clostridium perfringens* epsilon toxin detected using acoustic flow cytometry

Marina C. Ferrarezi¹, Vera C.L.M. Curci², Tereza C. Cardoso^{1*}

1 University of São Paulo State, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793, Araçatuba, 16050-680, São Paulo State, Brazil

2 Agência Paulista Tecnologia Agropecuária, APTA, Araçatuba, São Paulo.

*** Corresponding author:**

Tereza C. Cardoso

Departamento de Apoio

Produção e Saúde Animal, University of São Paulo State

Rua Clóvis Pestana, 793, Araçatuba, 16050-680, São Paulo State, Brazil

Tel.: + 55 18 36361379

Fax + 55 18 36232581

E-mail address: tcardoso@fmva.unesp.br

Abstract

Epsilon toxin (ETX) produced by *Clostridium perfringens* types B and D is a potent toxin that is responsible for fatal enterotoxaemia. In vitro, ETX, which is considered a pore-forming toxin, forms a heptamer in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell membranes, which is considered to be a pre-pore stage. After binding of the ETX, vacuoles inside cell cytoplasm are produced. ETX causes decreased levels of essential coenzymes required for host cell energy. Here, we optimized and applied acoustic flow cytometry analysis in order to gain further insight into ETX-pathogenesis. Using acoustic flow cytometer analysis, which considered highly sensitive, ETX-exposed MDCK cells revealed mitochondrial membrane decreases followed by 25.48% and 45.45% of the exposed cells expressing the Bax and BCL-2 proteins at a pre-pore stage, respectively. These results together with high cytotoxicity and visualization of cell vacuoles, demonstrates that acoustic flow cytometry analysis potentially represents an effective tool to study ETX pathogenesis.

Keywords: Mitochondria, mitochondrion, *C. perfringens*, necrosis, in vitro assay

1 Introduction

Over 25% of bacterial protein toxins belong to the pore-forming group of toxins, the largest category of bacterial virulence factors [1,2]. The *Clostridium perfringens* epsilon-toxin (ETX) is an important toxin and structurally similar to other pore-forming toxins [3,4].

ETX is the most potent toxin produced by these bacteria and it is also considered a category B toxin by United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for its potential role in bioterrorism when produced as an inactive prototoxin (PTX) [1].

The action of ETX appears at first to be relatively simple. The toxin forms unregulated pores in the plasma membrane of sensitive cells, leading to deregulated ion homeostasis, and ultimately cell death [5-9]. ETX action has been studied in renal tissues from sensitive animal models (cow, sheep and goat) [1]. In spite of ETX being a member of the aerolysin pore-forming toxin family, its exact mode of action, related to high toxicity, remains elusive [9].

ETX toxin is cytotoxic, and Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells have been shown to be the most susceptible lineage for in vitro studies [10]. It has been demonstrated that ETX induces swelling, blebbing, and lysis of MDCK cells and that the toxin does not enter the cytosol and remains associated with the cell membrane by forming a large complex [11].

The cytotoxic activity has been associated with the formation of a large membrane complex and an efflux of K⁺, causing rapid cell death by necrosis. This is characterized by marked reduction in the size of the nucleus without DNA fragmentation [9-12]. In addition, ETX causes a rapid decrease of transepithelial resistance of MDCK cell monolayers [7].

However, it has recently been demonstrated that internalized toxin is transported from early endosomes to late endosomes and lysosomes and then distributed to vacuolar membranes [12]. This is in contradiction to what has been demonstrated in previous studies. Therefore, the importance of ETX internalization remains an area of ongoing research [7,9].

Cytometry is the measurement of physical or chemical characteristics of cells or particles. Flow cytometry and cell sorting are important tools that help address many complex biological questions [13]. Hydrodynamic focusing used for conventional flow cytometry uses relatively high volumetric sheath flow and concentrated samples.

Additionally, as the sample is entrained into the sheath, fluid shear forces are created that can disrupt fragile cells (i.e., apoptotic cells) [14]. The acoustic focusing cytometer is a method that uses acoustic radiation pressure to confine the cells or particles in a sample solution into a single, focused line along the central axis of the flow channel [15].

The advantages of acoustic focusing are a high sensitivity based on slowing cell/particle transit times, a 20-100X slower speed than conventional systems, dilute samples are easily analyzed at high rates, and there is an improved resolution due to slow streams without particle stream degradation within the flow chamber [16].

In the present study, we characterized the effects of the ETX pore-forming toxin on MDCK morphology, cytotoxicity, mitochondrial membrane depolarization, and associated-apoptotic factors using acoustic flow cytometry. These parameters were evaluated at 1, 2, 3, 4, and 5 h post ETX and PTX exposure.

2 Materials and methods

2.1 Cell culture and toxin

Madin Darby canine kidney (MDCK) cells were obtained from Instituto Biologico bank São Paulo, Brazil, purchased from the ATTC (Atlanta, GA, USA). MDCK cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Advanced-DMEM™, Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) containing 2 mM L-glutamine, 110 mg/l sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 25 mg/ml Amphotericin, and supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Semi-purified (ultrafiltrated) epsilon proto-toxin (PTX) was purified and lyophilized from overnight grown of *Clostridium perfringens* type-D culture (LANAGRO, Laboratório Nacional Referência Agropecuária, Pedro Leopoldo, MG, Brasil, NCTC 8346). Prior to its use, epsilon PTX was reconstituted in ultrapure RNA/DNase free water (Invitrogen) and activated by incubation at 37°C for 30 min with 0.1 % trypsin (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) in order to obtain activated epsilon toxin (ETX).

2.2 Exposure of MDCK cells to ETX and PTX

The effects of ETX and PTX on MDCK cells were determined by exposure of 20 µg/ml, which corresponds to cytotoxic dose (CD50) initially performed on 2×10^3 cells/ml. MDCK cells were exposed to ETX at 1, 2, 3, 4 and 5 h post-exposure periods at 37°C in a 5 % CO₂ incubator. Protein quantification was performed using the BCA assay (Bio-Rad[®], USA) and MDCK cells were cultured in 25 cm² culture flasks (Falcon, Benton Dickson[®], USA). At all appropriated post-exposure periods, both the attached and supernatant cells were harvested for the cytotoxic assay, flow cytometric analysis, and mitochondrial evaluation.

2.3 Light microscopy

For light microscopy, MDCK cells were grown on 24-well plates (Falcon, BD[®]) at 2×10^3 cells/ml and exposed to 20 µg/ml of toxin during 1, 2, 3, 4, and 5 post-exposure periods at 37°C in a 5% CO₂ incubation atmosphere. ETX and PTX exposed cells were examined under phase-contrast microscopy (IX70 Olympus microscopy[®], Tokyo, Japan) and images were documented.

2.4 Toxicity assay

Cell toxicity analysis was performed using an In Vitro Toxicology Assay Kit, an MTT-based assay in ETX and PTX exposed cells at 1, 2, 3, 4, and 5 h post-exposure periods (TOXI-1 Kit; Sigma-Aldrich®). For each post-exposure time the culture supernatant was removed and 2 ml MTT (tetrazolium salts) was added following the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich®). Absorbance was measured at 600 nm using a Biophotometer™ (Eppendorf®, Hamburg, Germany). All reported values are means of triplicated samples.

2.5 Acoustic Flow Cytometer analysis

Following ETX and PTX exposure, MDCK cells at 2×10^3 cells/ml were harvested after being detached using 0.25% trypsin (Sigma-Aldrich®). The cells were washed with PBS, permeabilized in 4% paraformaldehyde, and incubated for 18 h at 4°C with monoclonal antibodies anti-BCL-2 (Sigma-Aldrich®, cat # B9804) and anti-Bax (Sigma-Aldrich®, cat # B8429) in 1% Triton X-100 and 0.5% bovine serum albumin (BSA). After incubation with the primary antibodies, the cells were washed with PBS plus 0.1% Triton X-100 in triplicate. Next, a 1:50 dilution of the secondary antibody was added to 100 µl of the cell suspension and was incubated at 37°C for 30 min. The cell suspension was washed as previously described, and after the final wash the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Data were acquired via an Attune™ acoustic

focusing cytometer system (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) and at least 50,000 events were counted.

The negative pattern was examined by applying the same cell suspension with the initial incubation with dog IgG and IgM isotypes. Results were included on the global compensation to exclude auto-fluorescence. A BL1-A (488 nm) filter was used in each analysis. The parameter side scatters complexity (SSC) and BL1-A were analyzed in order to detect, in the same sample, incidence of cytoplasmic vacuoles and emission of Bax/BCL-2 signals.

The parameters used were as follows: 799 events/seconds, flow rate of 1,000 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a stop gate of 500,000 total cells, BL1-A voltage of a 488 laser and SSC threshold of 300.

2.6 Mitochondrial membrane potential analysis

JC-1 (5,5',6,6''-tetrachloro-1,1',3,3'-tetrathylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (Molecular Probes, Eugene[®], OR) is a mitochondria-specific probe. In its monomeric form, the probe emits at 527 nm (red) after excitation at 490 nm (green). Depending on mitochondrial membrane potential, JC-1 forms aggregates that are associated with large shifts in emission and the color dye changes reversibly from red to green as mitochondrial membranes become depolarized. To perform this assay, 2×10^3 of exposed and unexposed, trypsinized and washed MDCK cells were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of JC-1 for

10 min at 37°C in the dark. After this period, cells were immediately analyzed by acoustic flow cytometry under BL1-A (488 nm) and BL2-A (575 nm) filters.

Data were acquired via the Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®). The parameters such as side scatter complexity (SSC) and BL1-A were analyzed in order to detect, at the same sample, incidence of cytoplasmatic granularity (vacuoles) and emission of the JC-1 complex.

2.7 Statistical analysis

All of the experiments were performed at a minimum of in triplicate. Results of representative experiments are presented. Descriptive statistics include the mean \pm standard deviation (s.d). Overall, p-values \leq 0.001 were considered significantly significant.

3 Results

3.1 Morphologic damage and cytotoxicity in MDCK cells exposed to ETX

A concentration of 20 µg/ml measured in ETX and a PTX suspension was determined by CD 50 (data not shown). Cells exposed to ETX at 37°C under 5% CO₂ at 1 h contained a considerable number of vacuoles in comparison to those not exposed (Fig. 1A and B). Vacuoles formed within 2-5 h post-exposure and were less visible due to cell damage (Fig, 1C). The current study confirmed the toxicity of ETX in MDCK cells as a progressive event initiating 1 to 5 h post-exposure, when compared to control cells (MDCK + PTX).

The viability assay showed loss of viable cells from 1 to 5 h post ETX exposure. The differences between MDCK + ETX and MDCK + PTX cell viability were considered significant at all post-exposure time points ($p \leq 0.001$), as demonstrated in Figure 2.

3.2 Effect of ETX exposure on MDCK Bax/BCL-2 phenotype

In order to investigate the possible mechanism responsible for the rapid loss of cell viability, the detection of MDCK cells that express Bax/BCL-2 phenotype induced by ETX was performed by measuring SSC and intensity of

the BL1-A emission signal. Acoustic flow cytometry analysis was used to determine the rate of MDCK + ETX that expressed Bax/BCL-2 surface antigens (Figure 3). Using values $\geq 10^3$ as positive, SSC (side scatter complexity) and BL1-A (488 nm) signals at the same time, a total of 25.48 % and 45.45 % of ETX exposed cells expressed the Bax/BCL-2 phenotype at 1 h post-exposure, respectively. At 2-3 h post ETX exposure, cytometry analysis revealed that cell cytoplasm granularity is associated to Bax/BCL-2 release at 30.19 % and 34.05%, respectively. In the last time of observation, 4-5 h, MDCK + ETX cells expressed Bax/BCL-2, 63.92 % and 72.57 %, respectively. Although the release of pro-and-anti- Bax/BCL-2 apoptotic proteins is considered in some cases to be a physiological mechanism, among MDCK cells not exposed to ETX or PTX no event was detected at any interval studied (data not shown).

3.3 Mitochondrial membrane depolarization

The JC-1 probe emission is illustrated in Figure 4. The MDCK + PTX cells from 1 to 5 h post-exposure were also analyzed and no changes were observed (data not shown). At 1 h post exposure, 85.29 % of cells were positive for JC-1 (488 nm; green), demonstrating mitochondrial membrane depolarization. However, from this time, the mitochondrial depolarization dropped to 50.41 % to 43.73 % in MDCK+ETX at 2, 3, 4 and 5 h post toxin exposure. We discovered a positive correlation between SSC values and BL1-A emission ($p \leq 0.001$).

4 Discussion

In this study, we have shown that ETX causes a significant decrease in cell viability positively correlated to a significant increase in cytoplasm granularity and mitochondrial membrane depolarization, as measured by acoustic focusing flow cytometry analysis. Several previous reports have been published on the same cytotoxic effect of ETX on MDCK monolayers [1-4].

In summary, all of the evidence indicates that *Clostridium perfringens* ETX intoxicates cells by forming pores in susceptible cell membranes and differs markedly from other pore-forming toxins, especially because of its remarkable potency and its specificity for cell types [10].

In a recent study, a pre-pore stage was described and well-documented to occur at 60 min post toxin exposure [11]. Moreover, this pre-pore stage can be blocked at 4°C [1,11]. However, at 37°C ETX binds to an uncharacterized receptor and then oligomerizes to form a pre-pore intermediate on the membrane surface [17]. Another recent study described vacuols formation in cytoplasm carrying ETX inside of cells [12]. Previous studies in combination with our results presented here illustrate that the acoustic flow cytometer was able to confirm cell granularity at 1 h post-exposure, which is considered to be a pre-pore stage.

At the same pre-pore stage, most MDCK+ETX cells, in this study, were expressing Bax/BCL-2 proteins at the same rate, which are closely related to

the balance of apoptosis and anti-apoptosis phenomena related to cell injury [18]. Studies have demonstrated that a variety of pore-forming toxins induce cell death through programmed necrosis, a process widely associated with ischemia/reperfusion injuries and neuronal cytotoxicity [9].

Similar to apoptosis, programmed necrosis is the result of a concerted series of intracellular signaling and biochemical events leading to cell death [19]. Whereas apoptosis is characterized by activation of executioner caspases (caspases-3, 6 and 7) resulting in a minimal decrease in ATP levels, programmed necrosis is characterized as being insensitive to caspase inhibitors and depletion of cellular ATP [20].

In accordance with our findings, it has been observed that mitochondrial membrane potential decreases at the pre-pore stage [21]. It is well known that ETX induces changes in metabolites, thus indicating cell death process including disruption of mitochondrial activity [20-24].

All results presented in this study are in accordance to what was previously reported: Pore-forming toxins lead to diminished ATP levels and cell death [17]. In a proteomic study, energy metabolism has been implicated as a main phenomenon for cell survival related to ETX exposure [25].

Upregulation of proteins related to energy metabolism could possibly be an adaptive host response to keep up with the energy demand during cellular stress conditions caused by the effects of ETX [23-25].

Finally, by using acoustic flow cytometry analysis, it was possible to verify cytoplasm granularity, a mitochondrial membrane potential decrease, and we were able to accurately determine the Bax/BCL-2 rates, even during a pre-pore stage of ETX action. It is important to emphasize that this new methodology is unique and capable of analyzing one cell 20-100 times slower than conventional systems. This ability maximizes photon collection leading to higher sensitivity measurements, thus improving resolution.

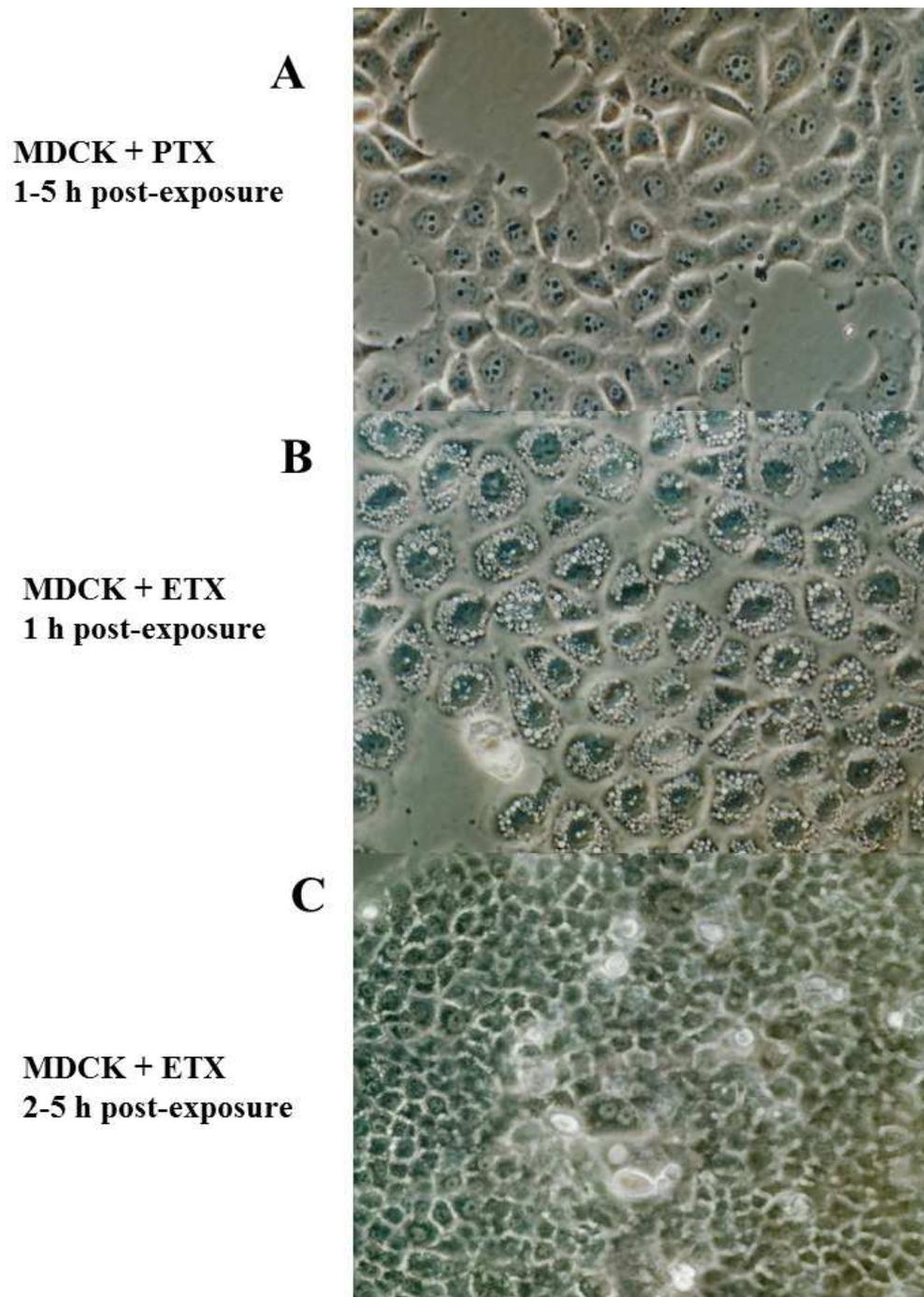


Figure 1- Epsilon-toxin-induced vacuolation in MDCK cells. A) MDCK cells exposed to prototoxin (PTX) at 1 to 5 h of observation; B) MDCK cells were incubated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of epsilon toxin (ETX) at 37°C during 1 to 2 h; C) from 3 to 5 h of observation, magnification 40x.

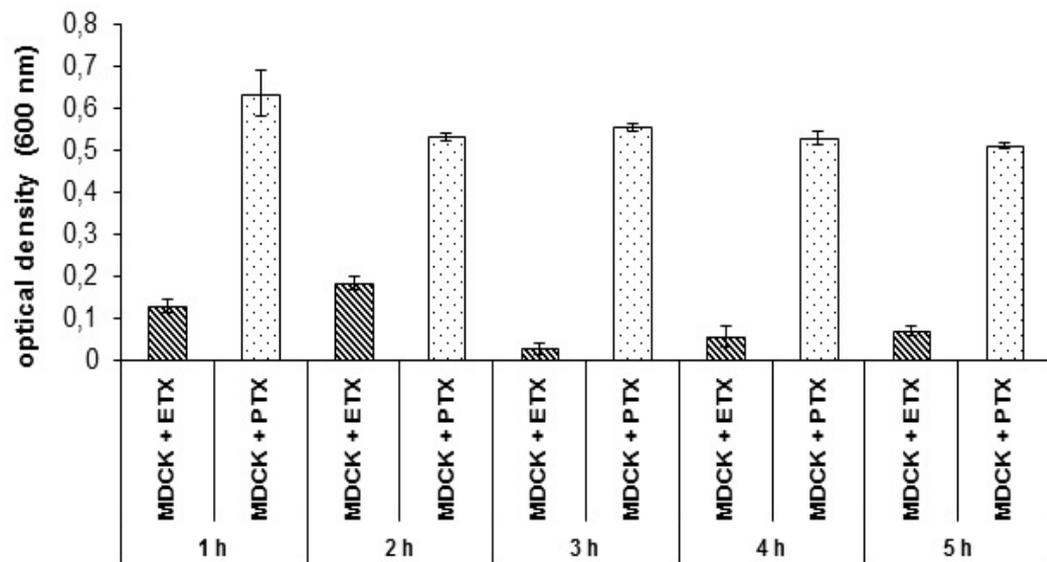


Figure 2- Effect of ETX on the viability of MDCK cells. Cell viability was determined via the MTT assay on exposed ETX and PTX MDCK cells. Data are shown as the mean \pm standard deviation for three independent experiments ($p < 0.01$).

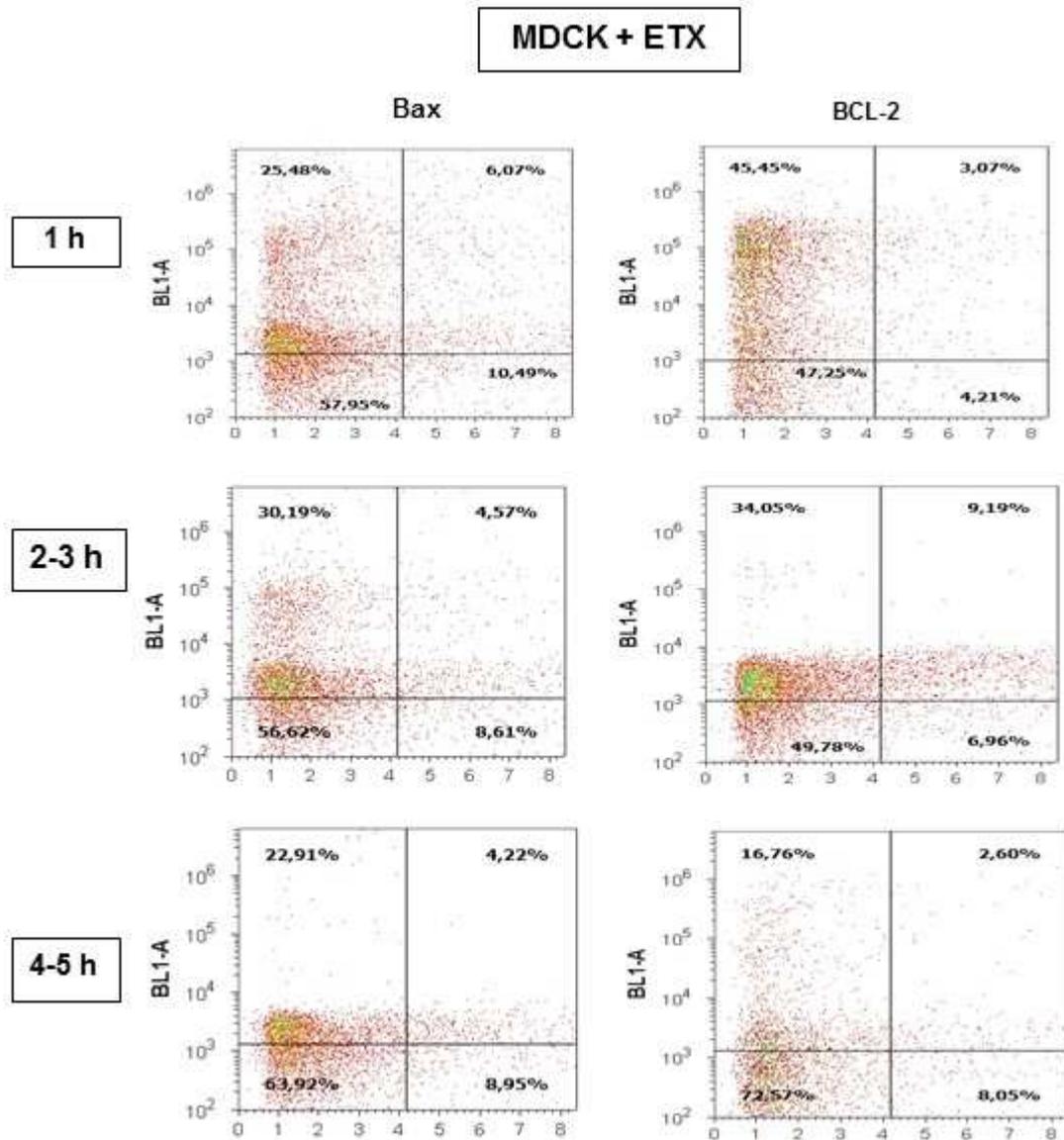


Figure 3- Acoustic focusing cytometer analysis performed on MDCK cells exposed to ETX at 1, 2, 3, 4, and 5 h of observation illustrated by dot-plot graphic. The x-axis corresponds to side scatter (SSC) which is indicative of granularity and structural complexity inside the cell cytoplasm. The y-axis corresponds to intensity of labeled MDCK cells that express the Bax and BCL-2 antigens. The flow rate of 1.000 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a stop gate of 500.000 total cells was considered for analysis.

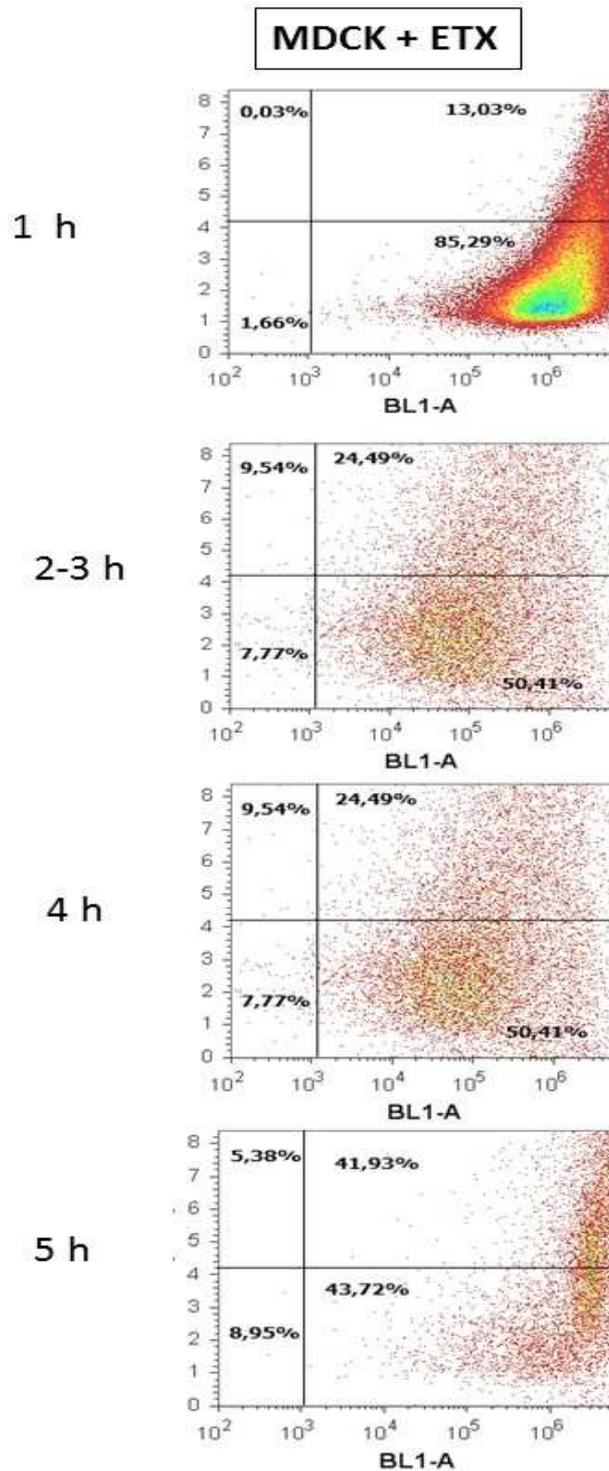


Figure 4- Acoustic focusing cytometer analysis performed on MDCK cells exposed to ETX at 1, 2, 3, 4 and 5 h of observation illustrated by density plot graphic. The x-axis corresponds to JC-1 probe detection (488 nm filter; BL1-A).

The y-axis corresponds to side scatter (SSC) which is indicative of granularity and structural complexity inside the cell cytoplasm. The flow rate of 1.000 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a stop gate of 500.000 total cells was considered for analysis.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Grants 2009/17635-3 and 2010/50782-7).

TC Cardoso is recipient of funding from the CNPq (Brazilian Council for Research).

Marina C Ferrarezi is recipient of funding from CAPES Foundation (Ministry of Education of Brazil, Brasília – DF 70.040-020, Brazil. Proc. n^o. BEX 8442/11-8 and DS).

The authors are grateful to Biological Institute of São Paulo State for the MDCK cells donation and to LANAGRO (Laboratório Nacional de Referência Agropecuária, Pedro Leopoldo, MG, Brasil) for the PTX donation.

References

- [1] Popoff MR. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS Journal* 2011;278:4602-4615.
- [2] Sawires YS, Songer JG. *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 2006;12:23-43.
- [3] Knapp O, Maier E, Benz R, Geny B, Popoff MR. Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin (ETX). *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1788:2584-2593.
- [4] Chassin C, Bens M, Barry J, Courjaret R, Bossu JI, Chuzeaud F, Mkaddem SB, Gilbert M, Poulain B, Popoff MR, Vanderwalle A. *American Journal Renal Physiology* 2007;293:1927-1937.
- [5] Morris WE, Dunleavy MV, Diodati J, Berra G, Fernandez-Miyakawa, ME. Effects of *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in the bovine gut. *Anaerobe* 2012;18:143-147.
- [6] Fernandez-Miyakawa, ME, Zabal O, Silberstein C. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is cytotoxic for human renal tubular epithelial cells. *Human and Experimental Toxicology* 2010;30:275-282.
- [7] Petit L, Maier E, Gilbert M, Popoff MR, Benz R. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:15736-15740.
- [8] Lonchamp E, Dupont JL, Wioland L, Courjaret R, Mbebi-Liegeois C, Jover E, Doussau F, Popoff MR, Bossu JL, Barry J, Poulain B. *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PLoSone* 2010;5:e13046.

- [9] Knapp O, Maier E, Mkaddem B, Benz R, Bens M, Chenal A, Geny B, Vandewalle A, Popoff MR. *Clostridium septicum* alpha-toxin forms pores and induces rapid cell necrosis. *Toxicon* 2010;55:61-72.
- [10] Borrmann E, Günther H, Köhler H. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2001;31:85-92.
- [11] Robertson SL, Li J, Uzal FA, McClane BA. Evidence for a prepore stage in the action of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *PLoSone* 2011; 6:e22053.
- [12] Nagahama M, Itoayashi Y, Hara H, Higashihara M, Fukatani Y, Takagish T, Oda M, Kobayashi K, Nakagawa I, Sakurai J. Cellular vacuolization induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *FEBS Journal* 2011;278:33953407.
- [13] Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods* 2011;699:1-29.
- [14] Nolan JP, Duggan E, Liu E, Condello D, Dave I, Stoner SA. Single cell analysis using surface enhanced Raman scattering (SERS) tags. *Methods* 2012; 57:272-279.
- [15] Goddard GR, Sanders CK, Martin JC, Kaduchak G, Graves SW. Analytical performance of an ultrasonic particle focusing flow cytometer. *Anal Chemistry* 2007;79:8740-8746.
- [16] Goddard G, Martin JC, Graves SW, Kaduchack G. Ultrasonic particle-concentration for sheathless focusing of particles for analysis in a flow cytometer. *Cytometry A* 2005; 69:66-74.
- [17] Fennessey C, Ivie SE, McClain MS. Coenzyme depletion by members of the aerolysin family of pore-forming toxins leads to diminished ATP levels and cell death. *Molecular Biosystems* 2012; doi:10.1039/c2mb25142f.

- [18] Ueda N, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *American Journal Medicine* 2000;108:403-415.
- [19] Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cells death. *Nature Medicine* 2000;6:513-519.
- [20] Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry* 2005;70:231-239.
- [21] Smiley S, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Jr GDS, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings National Academic Science* 1991;88:3671-3675.
- [22] Ying S, Häcker G. Apoptosis induced by direct triggering of mitochondrial apoptosis proceeds in the near absence of some apoptotic markers. *Apoptosis* 2007;12:2003-2011.
- [23] Arrigo AP, Firdaus WJJ, Mellier G, Moulin M, Paul C, Diaz-Iatoug C, Kretzremy C. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods* 2005;35:126-138.
- [24] Dorca-Arévalo J, Martín-Satué M, Blasi J. Characterization of the high affinity binding of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* to the renal system. *Veterinary Microbiology* 2012; 157:179-189.
- [25] Kumar B, Alam SI, Kumar O. Host response to intravenous injection of epsilon toxin in mouse model: A proteomic view. *Proteomics* 2013; 13:89-107.