

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA
RESIDUAL DE UMA CEPA MUTANTE DE *Brucella abortus***

**“DEVELOPMENT AND EVALUATION OF RESIDUAL
VIRULENCE OF A MUTANT STRAIN OF *Brucella abortus*”**

Fabiane Gonçalves de Souza

CAMPO GRANDE

MATO GROSSO DO SUL - BRASIL

FEVEREIRO DE 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA
RESIDUAL DE UMA CEPA MUTANTE DE *Brucella abortus***
**“DEVELOPMENT AND EVALUATION OF RESIDUAL
VIRULENCE OF A MUTANT STRAIN OF *Brucella abortus*”**

Fabiane Gonçalves de Souza

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Alves Rosa Osório

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Grácia Maria Soares Rosinha

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE

MATO GROSSO DO SUL - BRASIL

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

S729d

Souza, Fabiane Gonçalves de.

Desenvolvimento e avaliação da virulência residual de uma cepa mutante de *Brucella abortus* / Fabiane Gonçalves de Souza. -- Campo Grande, MS, 2009.

68 f. ; 30 cm.

Orientador: Ana Luiza Alves Rosa Osório.

Co-orientador: Grácia Maria Soares Rosinha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. *Brucella abortus*. 2. Brucelose. 3. Rato como animal de laboratório. I. Osório, Ana Luiza Alves Rosa. II. Rosinha, Grácia Maria Soares. III. Título.

CDD (22) – 636.0896957

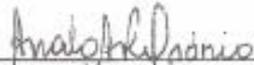
FABIANE GONÇALVES DE SOUZA

“Desenvolvimento e avaliação da virulência residual de uma cepa mutante de
Brucella abortus”

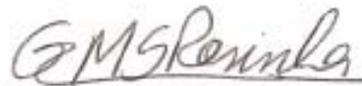
“Development and evaluation of residual virulence of a mutant strain of
Brucella abortus”

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
parte dos requisitos do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal para
obtenção do título de Mestre. Área de
concentração: Saúde Animal

APROVADA: 19/02/2009



Dr^a. Ana Luiza Alves Rosa Osório
Orientadora



Dr^a. Grácia Maria Soares Rosinha
Co-orientadora



Dr^a. Lenita Ramires Santos



Dr^a. Carina Elisei de Oliveira

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

(Louis Pasteur)

Aos meus pais com carinho...

...A todos aqueles que sofrem com as conseqüências da brucelose; seja por prejuízos econômicos, seja por prejuízos a saúde dos animais e dos seres humanos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela dádiva da vida e oportunidade de sempre aprender. Pela paciência nos momentos difíceis, força nos momentos de dor, alegria nos momentos de cansaço... Por ter iluminado meus passos, meus pensamentos e meus sentimentos... Por ter sido o meu suporte na busca de soluções para o que parecia impossível... Pela esperança, amor e fé...

Aos meus pais, Maira e Roseni, que me apoiaram incondicionalmente com seu amor e carinho,

A minha orientadora, Professora Doutora Ana Luíza Alves Rosa Osório pelo exemplo pessoal e profissional,

A minha co-orientadora, Doutora Grácia Maria Soares Rosinha pelos ensinamentos e confiança,

Ao Programa de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade. Aos professores pelo conhecimento que compartilharam,

A Embrapa Gado de Corte onde as atividades experimentais puderam ser desenvolvidas. Aos pesquisadores e estagiários que tanto me auxiliaram e, em especial as doutoras Carina Elisei de Oliveira, Maribel Funes Huaca e Lenita Ramires Santos.

A FUNDECT/MS pela bolsa de mestrado,

Aos colegas de mestrado e laboratório, especialmente chamados de amigos, que com companheirismo e alegria me proporcionaram importante suporte nesta caminhada,

Em especial a minha amiga Bárbara G. Csordas que esteve comigo em todos os momentos. Pela motivação e oportunidade de convivência,

Aos amigos que tive a oportunidade de conviver no mestrado... Entre eles Graziela, Silvia, Cristiane, Ana Paula... Assim como aos amigos de laboratório... Rafael, Cristiano, Cleber, Eduardo, Danilo, Marrielen, Carina, Mariana... Muitos que sempre me apoiaram!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Histórico.....	15
1.2 Taxonomia.....	15
1.3 Prevalência.....	17
1.4 Patogênese.....	18
1.5 Resposta imune.....	20
1.6 Vacinas.....	21
1.6.1 Vacinas vivas atenuadas ou de primeira geração.....	22
1.6.2 Vacinas de DNA.....	23
1.6.3 Vacinas vivas <i>knockout</i>	24
1.7 Fatores de virulência de <i>Brucella</i>	25
1.7.1 Sistema de secreção do tipo IV.....	26
REFERÊNCIAS.....	29
ARTIGO CIENTÍFICO.....	40

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Cepas bacterianas e vetores usados neste estudo..... 62
- Quadro 2. Recuperação bacteriana no baço de camundongos BALB/c inoculados com a cepa mutante $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus*, a cepa virulenta S2308 e as cepas vacinais RB-51 e S19. Valores expressos como a média do log de ufc \pm desvio padrão..... 63
- Quadro 3. Peso esplênico dos grupos de camundongos BALB/c inoculados com a cepa mutante $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus*, a cepa virulenta S2308 e as cepas vacinais RB-51 e S19. Valores expressos como a média do log de ufc \pm desvio padrão..... 64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática do plasmídeo suicida pBlue:*virB10* contendo o gene de canamicina interrompendo o gene *virB10*. 65
- Figura 2: Caracterização de *B. abortus* Δ *virB10* pela análise de *Southern Blot*.. 66
- Figura 3: Tendência de recuperação das cepas *Brucella abortus* S2308 selvagem, cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa mutante Δ *virB10* de *B. abortus* S2308 no baço de camundongos BALB/c infectados uma, três e seis semanas após a inoculação..... 67
- Figura 4: Tendência de peso esplênico das cepas *Brucella abortus* S2308 selvagem, cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa mutante Δ *virB10* de *B. abortus* S2308 no baço de camundongos BALB/c infectados uma, três e seis semanas após a inoculação..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

BB – *Brucella broth*

BCV – Vacúolo contendo *Brucella*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

FIH – Fator de integração ao hospedeiro

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GMP – Guanosina monofosfato

IAGRO – Agência Estadual de Defesa Sanitária Vegetal e Animal

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INF- γ - Interferon γ

LB – *Luria Bertani*

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

ORF – Janela aberta de leitura

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose

RNA – Ácido ribonucléico

SOD – Superóxido dismutase

TFSS – Sistema de secreção do tipo IV

TLR – *Toll-like receptor*

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

UFC – Unidade formadora de colônia

USP – Universidade de São Paulo

VPS – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

INTRODUÇÃO

O controle de doenças infecciosas de animais no Brasil requer melhorias para atingir os padrões internacionais e aumentar a produção animal. Algumas dessas doenças, além de por em risco a saúde do rebanho, podem representar um problema de saúde pública, como é o caso da brucelose que é causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella*.

A brucelose, também conhecida como febre de Malta, é uma zoonose que se caracteriza por causar no ser humano febre crônica, desordens neurológicas, endocardite, complicações osteoarticulares e febre ondulante (SIEIRA et al., 2000; HARTIGH et al., 2004). Bovinos, caprinos e ovinos são afetados e, como consequência da colonização da placenta, dos tecidos fetais e órgãos sexuais ocorre aborto em fêmeas prenhes e esterilidade em machos (SIEIRA et al., 2000). As diferentes espécies de *Brucella* exibem preferências por hospedeiros e diferem quanto à gravidade da doença causada. Susceptibilidade a corante e a fagocitose juntamente com as características bioquímicas, sorológicas e de cultura, são utilizadas para diferenciação entre as espécies (WALKER, 2003). São reconhecidas oito espécies de *Brucella* (CORBEL; BRINLEY-MORGAN 1984; FOSTER et al., 2007). A associação patógeno-hospedeiro é a mais comum na natureza, porém infecções cruzadas podem ocorrer entre alguns sorotipos e os hospedeiros habituais. Em bovinos, a brucelose é causada por *Brucella melitensis*, biovar Abortus (= *Brucella abortus*) (VERGUER et al., 1985).

De acordo com notificações oficiais mais recentes, a prevalência da brucelose no Brasil encontrava-se em torno de 4 a 5% de animais soropositivos, no período de 1989 a 1998. A brucelose bovina é responsável por perdas econômicas à bovinocultura brasileira estimadas em 32 milhões de dólares anuais (POESTER et al., 2002), prejuízos estes que justificam esforços na busca de soluções efetivas de controle, o qual tem por estratégia de maior importância a vacinação.

No Brasil, desde a década de setenta, o controle da brucelose era realizado de forma muito limitada e sem estratégia populacional, ou seja, com enfoque em rebanhos e nos indivíduos e não na população bovina. Desde o ano 2000, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) reconheceu a necessidade de definir uma estratégia de controle da brucelose e da tuberculose. Para tratar deste assunto foi constituído um grupo de trabalho que elaborou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT). Dois focos principais fundamentam o PNCEBT com relação à

brucelose bovina: o diagnóstico, baseado até o momento em técnicas sorológicas, e a vacinação (BRASIL, 2001).

A prevenção contra infecções causadas por *Brucella* é feita por meio da administração de vacinas das cepas lisas atenuadas S19 de *B. abortus* e Rev.1 de *B. melitensis*, sendo que esta última não é utilizada no Brasil devido a não ocorrência desta espécie no país. A cepa rugosa RB51 de *B. abortus* tem sido utilizada por países como EUA, Chile e Uruguai (WHO, 1998) e atualmente foi também testada e aprovada para uso no Brasil (BRASIL, 2007; POESTER, 2006).

A cepa S19 de *B. abortus* é efetiva contra a infecção por *B. abortus* em bovinos e a cepa Rev.1 de *B. melitensis* é efetiva contra a infecção por *B. melitensis* e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Porém, ambas as vacinas possuem três grandes desvantagens: (i) essas preparações são patogênicas para seres humanos; (ii) podem causar aborto quando administradas a fêmeas gestantes e (iii) essas vacinas induzem a produção de anticorpos em animais imunizados que interferem nos testes de diagnóstico sorológico de populações infectadas a campo (CHEVILLE et al., 1993).

Grandes são os investimentos e esforços na busca de uma nova vacina contra brucelose. O objetivo tem sido produzir uma vacina viva atenuada, segura aos manipuladores e aos animais vacinados e principalmente que o seu uso não interfira nos testes de diagnóstico. Grupos de pesquisadores têm produzido organismos mutantes pela deleção de genes essenciais ao metabolismo ou replicação de *B. abortus*, com a intenção de obter um sistema de imunização alternativo mais eficiente (ROSINHA, 2002a).

Dentre os genes estudados com esta finalidade estão os fatores de virulência *virB*, pertencentes ao sistema de secreção tipo IV (que atua no transporte de moléculas efetoras) (BOSCHIROLLI et al., 2002a). O *operon virB* é essencial para a sobrevivência e multiplicação de *B. suis*, *B. abortus* e *B. melitensis* (DELRUE et al., 2001; FOULONGNE et al., 2000; O'CALLAGHAN et al., 1999). Apesar da existência de diversos trabalhos demonstrando o efeito da deleção de genes *virB* na capacidade infectante de *Brucella*, não há relatos da utilização de mutantes *virB* de *B. abortus* como potenciais imunógenos.

Este estudo teve como objetivo deletar o gene *virB10* do genoma de *B. abortus*, determinar e avaliar a virulência conferida por este mutante, em camundongos BALB/c. A escolha deste gene deve-se ao fato da ausência deste no genoma de *B. abortus* impossibilitar cepas mutantes de replicar em macrófagos e sobreviver em camundongos (SIEIRA et al., 2000).

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

Exames de restos mortais de residentes romanos de Ercolano mortos em uma erupção vulcânica catastrófica do Monte Vesúvio em agosto do ano 79 depois de Cristo revelaram, em mais de 17% dos moradores, lesões típicas de brucelose no esqueleto vertebral. Uma explicação provável para a alta incidência da doença foi obtida após escaneamento utilizando microscopia eletrônica. Queijo carbonizado feito de leite de ovelhas e encontrado enterrado com os ossos humanos revelou a presença de formas coco-bacilares morfológicamente similares à *Brucella* spp. (CAPASSO, 2002).

Em 1887, dezoito séculos atrás, David Bruce isolou *Micrococcus melitensis* de um soldado britânico que morreu de Febre de Malta em Malta, uma ilha não muito distante de Ercolano (GODFROID et al., 2005). Em homenagem a Bruce, aquela espécie foi renomeada *Brucella melitensis*. A natureza zoonótica da brucelose foi demonstrada em 1905 pelo isolamento de *Brucella melitensis* do leite de cabras em Malta (GODFROID et al., 2005). Em 1897, Bang fez o primeiro relato sobre o isolamento de *Brucella abortus*, descrita a partir de vacas que apresentaram aborto (BANG, 1897).

1.2 Taxonomia

Brucella é um pequeno cocobacilo gram-negativo, imóvel, que não esporula e não encapsula (CORBEL; MORGAN, 1984); os cocobacilos medem 0,6 a 1,5 μm por 0,5 a 0,7 μm de dimensão (WALKER, 2003).

As bactérias do gênero *Brucella* possuem uma membrana celular externa composta principalmente de lipopolissacarídeo (LPS), o qual é considerado um dos principais fatores de virulência deste gênero (MARTIN; HANCOCK, 1990). Seu crescimento é aeróbico, mas algumas espécies requerem uma atmosfera com adição de 5 a 10 % de CO_2 . Crescem bem a 37 °C, em meios ricos com pH entre 6,6 e 7,4. As colônias de *Brucella* tornam-se visíveis em meio sólido em dois ou três dias, podendo apresentar-se sob a forma lisa ou rugosa, dependendo da cepa (ALTON et al., 1988).

As diferentes espécies de *Brucella* exibem preferências por hospedeiros e diferem quanto à gravidade da doença causada. Susceptibilidade a corante e a fagocitose juntamente com as características bioquímicas, sorológicas e de cultura, são utilizadas para diferenciação entre as espécies (WALKER, 2003). São reconhecidas oito espécies de *Brucella* classificadas da seguinte forma: *Brucella melitensis* em caprinos (podendo infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos); *Brucella abortus* em bovinos (podendo infectar bubalinos, cervídeos, canídeos e seres humanos); *Brucella ovis* em ovinos, *Brucella suis* em suínos (podendo infectar seres humanos), *Brucella neotomae* em ratos do deserto, *Brucella canis* em canídeos (podendo infectar seres humanos) (CORBEL; BRINLEY-MORGAN 1984), *Brucella ceti* em golfinhos e baleias e *Brucella pinnipedialis* em focas e leões marinhos (FOSTER et al., 2007). Dessas oito espécies, três apresentam risco de infecção para humanos: *B. melitensis*, *B. suis* e *B. abortus*. Apesar de *B. melitensis* ser a mais patogênica, *B. abortus* é a principal fonte de infecção, por ser a espécie mais difundida no mundo (CORBEL, 1997). *Brucella canis* também pode infectar o homem, contudo a sua incidência é relativamente baixa (CARMICHAEL, 1990).

Bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas e as rugosas. A morfologia das colônias lisas e rugosas das principais linhagens de *Brucella* é dependente do lipopolissacarídeo (LPS). Quando a molécula de LPS possui os dois domínios, a porção antigênica cadeia O e a porção tóxica lipídeo A, ela é completa. A molécula completa de LPS está presente nas colônias lisas de *Brucella* mas não nas colônias rugosas. Estas não apresentam o antígeno-O e a molécula de LPS é incompleta. A sobrevivência e replicação das bactérias de linhagens lisas no interior de macrófagos nos animais infectados acontecem de forma mais eficiente do que das linhagens rugosas. Acredita-se que este fato ocorra devido à presença do antígeno-O nas linhagens lisas, o qual é descrito como importante fator de virulência (SMITH; FICHT 1990).

O sequenciamento do rRNA *16S* tem auxiliado na definição de relações filogenéticas de *Brucella*. Baseado na análise destas seqüências, que diferem em menos de 7% nas suas regiões do rRNA *16S*, o gênero *Brucella* está classificado na subclasse α -2 da classe Proteobactéria, próximo a bactérias patogênicas simbióticas de vegetais, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium meliloti*; bactérias fotossintéticas, como *Rhodobacter sphaeroides*; e patógenos intracelulares obrigatórios, como os representantes do gênero *Rickettsia* (UGALDE, 1999).

1.3 Prevalência

O Brasil detém hoje o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 207,2 milhões de cabeças. A maior parte está concentrada na região Centro-Oeste, principalmente no estado de Mato Grosso do Sul, o qual possui, segundo dados do IBGE, o segundo maior rebanho nacional com cerca de 24,5 milhões de cabeças, sendo inferior apenas ao rebanho do estado de Mato Grosso que é formado por 26,6 milhões de cabeças (BRASIL, 2008). As distintas condições geográficas, econômicas e sociais encontradas no país indicam a existência de níveis também variados de sistemas de criações. Estas características exercem também uma importante influência na forma de controle da brucelose bovina, gerando grandes diferenças na prevalência da patologia entre as regiões, os estados e mesmo diferenças regionais dentro destes (BRASIL 1977, 2000).

Em 1977, um estudo epidemiológico sobre a brucelose bovina no Brasil apontou as seguintes prevalências de bovinos soropositivos: Norte com 4,1%; Nordeste com 2,5%; Centro-Oeste com 6,8%; Sudeste com 7,5% e Sul com 4,0% (BRASIL, 1977).

Posteriormente, outros levantamentos sorológicos por amostragem, realizados em alguns estados, revelaram pequenas alterações na prevalência de brucelose: no Rio Grande do Sul a prevalência passou para 0,3% em 1986; em Santa Catarina para 0,6% em 1996; no Mato Grosso do Sul a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3% e em Minas Gerais passou para 6,7% em 1980. Em 2002 novo levantamento da situação da brucelose em Minas Gerais revelou prevalência próxima a 1% de animais positivos, demonstrando a eficácia de um programa de vacinação bem conduzido. No Paraná, a prevalência estimada foi de 4,6% de bovinos positivos em 1989. Os dados de notificações oficiais indicam que a prevalência de animais positivos se manteve entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998 (BRASIL, 2001). Segundo relatório parcial, publicado em 2007, sobre a situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil, atividade integrante do PNCEBT e do termo de cooperação técnica celebrado entre o MAPA e o VPS-FMVZ-USP, a prevalência aparente de fêmeas com idade superior a 24 meses soropositivas para brucelose bovina e bubalina até agosto de 2006 foi de 0,06% para o estado de Santa Catarina e de 10,25% para o estado de Mato Grosso, refletindo a menor e maior prevalência respectivamente, dentre os estados considerados no estudo (MAPA/USP, 2006). Nos anos de 2003-2004, a Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO) realizou um levantamento de brucelose bovina na região denominada de estrato 1 no estado de Mato Grosso do Sul (MS) e estimou prevalências de

5,6% e 37,3%, em animais e rebanhos respectivamente. Esse estrato, com 22 municípios, faz parte da estratificação realizada pela coordenação estadual do PNCEBT, em quatro estratos distintos, com número de rebanhos equivalentes. O estrato considerado abrange municípios pertencentes a três das quatro mesorregiões geográficas do estado: centro-norte, leste e sudoeste, os quais possuem propriedades dedicadas à exploração pecuária de corte e ou leite. Constitui uma área de 70.214,1 km², que representa 19,7 % de MS. O rebanho bovino da região estudada era naquela ocasião de aproximadamente 5,7 milhões de cabeças, correspondentes a 23 % do rebanho total do estado (IAGRO 2003, IBGE 2002, MONTEIRO et al. 2006, OSÓRIO; MONTEIRO, 2006).

A prevalência desta doença no rebanho nacional gera barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal, além de custos diretos e indiretos, voltados à amenização de seus efeitos, por tratar-se de uma doença de extrema importância na área veterinária e saúde pública.

1.4 Patogênese

A infecção com *Brucella* ocorre quando a bactéria penetra na mucosa dos orifícios nasal, oral ou conjutival. Após a penetração, a bactéria é transportada livre ou dentro de células fagocíticas para os linfonodos regionais, onde ocorre hiperplasia e inflamação e, podem permanecer por semanas a meses (BATHKE, 1988; BISHOP et al., 1994). A multiplicação e conseqüente disseminação da bactéria para os linfonodos, baço, fígado, ocorre via corrente sanguínea e linfática, onde os granulomas são formados (ALTON; FORSYTH, 1999). Vários períodos de bacteremia podem ocorrer, acarretando alterações inflamatórias e anátomo-patológicas caracterizadas por granulomas difusos levando à esplenomegalia, hepatomegalia e, às vezes, hiperplasia linfóide (BISHOP et al.,1994). Microorganismos do gênero *Brucella* têm a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (JONES; WINTER, 1992) e não fagocíticas (DETILLEUX et al., 1990). Contudo, os macrófagos são considerados como as principais células de residência no hospedeiro para este patógeno (CORBEL, 1997).

Os órgãos de predileção são aqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, como eritritol (álcool polihídrico de quatro carbonos), que

está presente no útero gravídico, tecidos mamários e ósteos articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER, 1991). A partir do quinto mês de gestação, a concentração de eritritol eleva-se atingindo níveis máximos próximo ao parto, estimulando a multiplicação da bactéria de forma crescente (BISHOP et al., 1994).

A patogenicidade é devido a habilidade da bactéria de adaptar-se as condições do ambiente no seu nicho replicativo incluindo baixos níveis de nutrientes e oxigênio, pH ácido e reatividade de intermediários do oxigênio (KOHLENER et al., 2002). Cepas lisas inibem a apoptose de células do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência intracelular bacteriana pelo escape da resposta imune do hospedeiro. Experimentos com mutantes rugosas de *Brucella* spp. mostram que estas cepas induzem a necrose de macrófagos (PEI, et al., 2006). Contudo, os mecanismos e fatores de virulência que medeiam a morte celular de macrófagos não estão bem identificados.

Após a entrada nos macrófagos via faixas lipídicas, o vacúolo contendo *Brucella* (BCV, do inglês, *Brucella-containing vacuole*) não opsonizada evita a fusão com os fagossomos (CELLI et al., 2005) e segue o tráfego intracelular. O BCV interage com o retículo endoplasmático, permitindo a formação de um vacúolo especializado no qual a bactéria se multiplica (KOHLENER et al., 2002). O BCV interage com sítios de exportação do retículo endoplasmático gerando uma organela intracelular derivada deste, que permite a replicação intracelular. A aquisição de membranas do retículo endoplasmático depende de um sistema funcional de secreção do tipo IV (*virB*) e um fator do hospedeiro Sar1 (CELLI et al., 2003). Em contraste, *B. abortus* opsonizada demonstra ampla replicação intracelular em fagossomos que mostra associação não esclarecida com componentes do retículo endoplasmático em células THP-1 (linhagem monocítica humana) (BELLAIRE et al., 2005).

Em contraste com outros patógenos bacterianos, fatores clássicos de virulência como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fimbrias, plasmídeos, fagos lisogênicos, formas resistentes a medicamentos, variação antigênica, não são descritos em *Brucella* (MORENO; MORIYON, 2002).

As principais fontes de exposição a *B. abortus* em bovinos e *B. melitensis* em ovinos e caprinos são fetos abortados, a placenta e líquidos uterinos após aborto. Líquidos e tecidos eliminados durante o aborto também são um meio comum de transmissão de *B. suis* e *B. canis* (WALKER, 2003).

A brucelose é uma zoonose adquirida principalmente pelo contato com animais infectados ou mais freqüentemente, pelo consumo de leite e seus derivados contaminados

(NICOLETTI, 1989). Em humanos, a brucelose causa febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto nos animais domésticos os órgãos reprodutivos são principalmente afetados, causando aborto e infertilidade temporária (YOUNG, 1983, 1988).

1.5 Resposta Imune

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus* envolve tanto a imunidade inata como a adquirida. No que se refere à resposta imune específica, esta envolve tanto a ativação das células T CD4+ e CD8+, como a resposta humoral; citocinas do tipo Th-1 como interferon (INF)- γ e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)- α e, macrófagos ativados e células dendríticas (GOLDING et al., 2001). A maioria dos estudos realizados para o entendimento da imunobiologia da infecção por *Brucella* utilizaram essencialmente camundongos, principalmente BALB/c e C57BL/6. O critério usado para medir a proteção nos camundongos imunizados é a redução do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Brucella*, recuperadas do baço ou fígado, após o desafio com cepa virulenta (WHO, 1998).

Uma família de receptores presente na superfície das células de mamíferos, chamada *Toll-like receptors* (TLRs), foi identificada e, o papel desses receptores no reconhecimento de componentes microbicidas tem sido estudado (TAKEDA; AKIRA, 2001). Moléculas associadas à superfície de patógenos, como o LPS presente em bactérias gram-negativas, são as primeiras moléculas a serem reconhecidas pelos TLRs, os quais enviam sinais para ativar os macrófagos facilitando a fagocitose da bactéria e aumentando a eficiência da apresentação antigênica (GOLDING et al., 2001). A ativação do sistema imune inato por meio de TLRs leva então ao desenvolvimento de uma imunidade antígeno-específica, facilitando a transcrição de genes que regulam a resposta imune adquirida, incluindo citocinas e moléculas co-estimulatórias (THOMA-USZYNSKI, et al., 2001).

Experimentos realizados por Campos et al. (2004), indicaram que os receptores TLR4 tem participação na resistência contra a infecção por *B. abortus*. Berguer et al. (2006) mostraram que a enzima lumazine sintase de *Brucella* spp. estimula a maturação de células dendríticas por meio da interação com moléculas TLR4. Experimentos sugerem que TLR4 coopera com TLR9 na detecção da bactéria (COPIN et al., 2007). A resposta imune inata é

dependente de TLR4 durante o *clearance in vivo* enquanto que, TLR9 tem se mostrado o TLR de função mais importante durante a infecção direcionando resposta do tipo Th-1 por citocinas (HUANG et al., 2005; MACEDO et al., 2008). Foi proposto que TLR2 está envolvido na indução de TNF- α , secreção de interleucina (IL)-6, IL-12 e IL-10 por macrófagos peritoneais quando estimulados por lipoproteínas de *B. abortus*, como Omp16 e Omp19, nas suas formas lipídicas (GIAMBARTOLOMEI et al., 2004). Contudo, TLR2 não tem função no controle da infecção por *Brucella in vivo* (CAMPOS et al., 2004).

A imunidade adquirida contra a infecção de *B. abortus* em camundongos é mediada principalmente por linfócitos T e suas citocinas. Os anticorpos, por sua vez, têm o papel de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (CHEERS; HO, 1983), tornando-o mais eficiente à fagocitose pelos macrófagos (WINTER et al., 1989). Porém, os anticorpos não reduzem a taxa de crescimento intracelular de *B. abortus in vivo* e não conferem resistência a camundongos susceptíveis. A habilidade da bactéria de sobreviver e replicar dentro do macrófago e outras células do hospedeiro torna-a inacessível a mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS; HO, 1983). Apesar dos anticorpos terem a sua função na imunidade adquirida contra *Brucella*, a proteção efetiva contra a infecção é dependente da imunidade mediada por células T (MACKANESS, 1964). A imunidade celular contra *B. abortus* é dependente de linfócitos T CD4+ do tipo Th1 e de linfócitos T CD8+ (ARAYA, et al., 1989).

Evidências indicam que anticorpos contra *Brucella* possuem um papel tanto protetor quanto nocivo. Anticorpos IgM, que aparecem inicialmente após infecção, e baixos níveis de IgG irão causar a lise de *Brucella* mediada pelo complemento. Entretanto, níveis elevados de anticorpos IgG parecem agir como anticorpos bloqueadores que modulam negativamente a capacidade do complexo de ataque da membrana do complemento de lisar as células. Isto pode ser responsável por resistência a lise mediada pelo complemento apesar de níveis elevados de anticorpos específicos e da falta de correlação entre proteção e títulos elevados de anticorpos. Anticorpos bloqueadores promovem opsonização e captação por fagócitos onde *Brucella* desenvolveu mecanismos de sobrevivência e proliferação (WALKER, 2003).

1.6 Vacinas

1.6.1 Vacinas vivas atenuadas ou de primeira geração

As vacinas vivas atenuadas têm se mostrado, até o momento, superiores às vacinas mortas para a prevenção da brucelose animal. Estudos recentes usando cepas de *B. abortus* S19 viva ou morta pelo calor foram realizados com o objetivo de testá-las quanto à capacidade de induzir a produção das citocinas IL-12 e IFN- γ , indispensáveis ao controle da infecção por *Brucella*. Os resultados mostraram que somente a bactéria viva leva à produção de níveis consideráveis de IL-12, capazes de induzir uma imunidade mediada por células, responsáveis pelo controle da infecção por *B. abortus* (ZHAN; CHEERS, 1998).

A cepa S19 de *B. abortus* é efetiva contra a infecção por *B. abortus* em bovinos e a cepa Rev.1 da *B. melitensis* é efetiva contra a infecção por *B. melitensis* e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Porém, estas vacinas possuem desvantagens, como: são patogênicas para humanos; podem causar aborto quando administrada à fêmeas gestantes e induzir a produção de anticorpos em animais imunizados, o que interfere no diagnóstico de populações infectadas (CHEVILLE et al., 1993).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a vacina viva ideal contra *B. abortus* não deve provocar doença nos indivíduos vacinados, deve prevenir a infecção em ambos os sexos, prevenir aborto e esterilidade, promover proteção contra infecção por um longo tempo com uma simples dose, não induzir a produção de anticorpos persistentes os quais interferem no sorodiagnóstico de infecções de campo, ser biologicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vitro* e *in vivo*, não ser patogênica para humanos, e ser facilmente produzida em grande escala (ADAMS, 1990). A vacina viva ideal deveria também conter marcadores fenotípicos ou genotípicos, que permitissem uma fácil diferenciação dos isolados de campo.

A vacinação contra infecções causadas por *Brucella* é feita pela administração das cepas lisas atenuadas S19 de *B. abortus* e Rev.1 de *B. melitensis*. A cepa rugosa RB51 de *B. abortus* tem sido introduzida em alguns países como EUA, Chile e Uruguai (WHO, 1998).

A fim de produzir uma vacina viva atenuada com o máximo das características acima citadas, grandes são os investimentos e os estudos nesta área. O melhor resultado obtido até o momento, foi o desenvolvimento da cepa rugosa *B. abortus* RB51. Uma cepa mutante derivada da cepa lisa e virulenta S2308 de *B. abortus* (SCHURIG et al., 1991). Esta, quando usada em dose única, produz um efeito protetor em bovinos similar à cepa S19, com a vantagem de, aparentemente, não ser patogênica para os seres humanos e poder ser

diferenciada de isolados de campo pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e gel de eletroforese de campo pulsátil. Porém, esta cepa tem a desvantagem de ser resistente a rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (WHO, 1998). De acordo com a instrução normativa SDA nº33, de 24 agosto de 2007, publicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Brasil, a vacinação de fêmeas bovinas é recomendada nos seguintes casos: (1) idade superior a oito meses e que não foram vacinadas com a amostra S19 entre 3 e 8 meses de idade; ou (2) fêmeas adultas, não reagentes aos testes diagnósticos, em estabelecimentos de criação com focos de brucelose (BRASIL, 2007).

Na última década, os avanços na tecnologia de desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos imunógenos. Entre estas estão as vacinas de subunidades, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo recombinantes. Porém, essas vacinas conferem principalmente uma resposta humoral e não ativam linfócitos T CD8+ citotóxicos (HANLON; ARGYLE, 2001).

1.6.2 Vacinas de DNA

Vacinas gênicas ou de terceira geração são aquelas em que um gene, o qual codifica um antígeno potencialmente imunogênico, é clonado em um vetor de expressão eucariótico e introduzido em um animal. A proteína de interesse vai ser produzida *in vivo*, mimetizando a apresentação antigênica como ocorre na infecção natural.

A imunização com vacina de DNA produz uma resposta imune de longa duração ativando linfócitos T CD4+ e CD8+, além de linfócitos B para a produção de anticorpos (ULMER et al., 1996). No entanto, de acordo com a rota de administração utilizada (injeção ou biobalística) a resposta imune pode ser direcionada para o perfil Th1 ou Th2. Estudos recentes vêm mostrando que a injeção intramuscular induz, principalmente, uma resposta imune do tipo Th1, enquanto a imunização via biobalística, estimula uma resposta do tipo Th0 ou Th2 (OLIVEIRA et al., 1999).

Para o controle da brucelose, a vacina de DNA pode ser uma estratégia efetiva na prevenção da infecção, como indicaram os experimentos com a vacina de DNA L7/L12

(KURAR; SPLITTER, 1997) e GAPDH associada à produção da citocina IL-12 (ROSINHA et al., 2002b).

Recentemente, muitos relatos descrevem a aplicação de vacinas de DNA para avaliar o potencial de proteção em camundongos de várias proteínas de *Brucella* (AL-MARIRI et al., 2001; VELIKOWSKY et al., 2002; OÑATE et al., 2003; CASSATARO et al., 2007). Foi demonstrado que vacinas de RNA baseadas em partículas virais de recombinante *Semliki Forest* (SFV) que expressam a proteína SOD (superóxido dismutase) foi capaz de induzir resposta imune e proteção em camundongos BALB/c (OÑATE et al., 2005).

Sáez et al. (2008) realizaram o primeiro estudo para avaliar uma vacina genética contra *Brucella* em bovinos. Os resultados demonstraram que a inoculação de DNA plasmidial contendo o gene SOD Cu-Zn, induz baixos níveis de anticorpos e resposta celular específica em bovinos e, a imunização com a vacina de RNA somente gera resposta imune celular de células T semelhante àquela gerada em camundongos (OÑATE et al., 2003; OÑATE et al., 2005). Os resultados sugerem o uso potencial de pcDNA-SOD ou SFV-SOD para induzir resposta imune celular em gado contra o antígeno de *Brucella*.

Novos antígenos de *Brucella*, que induzam uma resposta celular mais eficaz e conseqüentemente proteção, necessitam ser identificados.

1.6.3 Vacinas vivas *knockout*

Dentre as possíveis formas de vacinas estudadas contra *B. abortus*, a estratégia que vem sendo amplamente utilizada é a obtenção de cepas geneticamente atenuadas, pela deleção de genes supostamente envolvidos na virulência. A vacina viva *knockout* possui a vantagem, em relação às outras formas de vacinas, de produzir um forte estímulo para as citocinas mais importantes no controle da infecção bacteriana, como por exemplo, IL-12 e IFN- γ . Para atingir este fim, podem ser utilizadas varias técnicas, sendo a mais difundida, a utilização da recombinação homóloga dupla como recurso genético para obtenção destes mutantes.

O desenvolvimento de vacinas vivas *knockout* tem sido avaliado para *Brucella* (ROSINHA et al., 2002a). A cepa mutante $\Delta znuA$ foi atenuada em camundongos BALB/c. O gene *znuA* expressa uma proteína relacionada ao sistema de transporte de Zn^{+2} , que é um mineral essencial para a bactéria com função estrutural e como cofator catalítico (YANG et al., 2006). Mutantes de *B. abortus* e *B. melitensis* para o gene *virB2* foram atenuados, mas de

forma moderada quando comparados à cepa virulenta S2308 (KAHL-MCDONAGH; FICHT, 2006).

Vacinas vivas *knockout* foram avaliadas para muitos outros patógenos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (PAVELKA; JACOBS, 1999) , *Salmonella typhimurium* (VAN DER STRAATEN et al., 2001) e *Shigella flexneri* (KOTLOFF et al., 2004).

1.7 Fatores de Virulência de *Brucella*

A clonagem, caracterização e identificação de genes de *B. abortus* envolvidos em virulência são muito importantes para o entendimento da patogênese molecular deste microorganismo intracelular no desenvolvimento de novas vacinas vivas, além de ajudar na identificação de novos antígenos úteis para o desenvolvimento de testes de diagnósticos.

Uma das estratégias mais utilizadas para identificar e caracterizar genes envolvidos na virulência é por meio de estudos mutacionais e de complementação. A habilidade de transformar *Brucella* com plasmídeos suicidas (LAI et al., 1990), para introduzir *transposons* ou genes de resistência à antibióticos é uma importante estratégia molecular para desvendar a base genética dos determinantes da virulência (MCQUISTON et al., 1995).

A capacidade de modular a expressão gênica para adaptar-se ao meio intracelular é o componente chave da virulência bacteriana. Vários mecanismos têm sido propostos como contribuintes para a sobrevivência de *B. abortus* no interior das células fagocíticas do hospedeiro: (1) produção de enzimas que a defendem contra a destruição oxidativa, (2) produção de enzimas que inibem a fusão fagossomo/lisossomo e (3) a secreção de 5'-guanosina monofosfato (GMP) e adenosina, inibindo a ação bactericida da mieloperoxidase- H_2O_2 (TATUM et al., 1992).

A habilidade de *Brucella* em invadir e replicar dentro das células do hospedeiro, bloqueando a fusão fagossomo/lisossomo consiste de um mecanismo de virulência e escape do sistema imune do hospedeiro desenvolvido por esta bactéria. Porém, pouco é o conhecimento a respeito da base genética da patogênese da brucelose. A identificação dos genes responsáveis pelos diferentes mecanismos de virulência e patogenicidade utilizados por este microorganismo é fundamental para o entendimento de como este patógeno causa a doença (UGALDE, 1999).

1.7.1 Sistema de Secreção do tipo IV

Muitos patógenos microbianos têm a capacidade de penetrar e sobreviver nas células de seus hospedeiros, modificando os seus processos naturais para criar um ambiente favorável à sobrevivência e multiplicação. A subversão dos hospedeiros eucarióticos por patógenos bacterianos requer sistemas especializados de secreção de macromoléculas, liberando fatores de virulência no ambiente e/ou diretamente dentro das células hospedeiras. O transporte de macromoléculas pelas barreiras das membranas das bactérias e da célula eucariótica é um processo complexo, que requer componentes múltiplos de uma maquinaria que transpõe a parede celular bacteriana (BOSCHIROLI et al., 2002b).

Três principais vias de secreção de macromoléculas foram identificadas e designadas como tipos I, II e III (HUECK, 1998). Vias de exportação evolutivamente e funcionalmente relacionadas englobando sistemas conjugativos de transferência de DNA e vários sistemas de secreção relacionados à patogenicidade foram classificados como sistema de secreção tipo IV (TFSS, do inglês, *Type IV secretion system*) (CHRISTIE; VOGEL, 2000; HUECK, 1998).

O sistema de secreção do tipo IV é uma família de complexos multiproteicos responsáveis pela secreção de moléculas bacterianas e proteínas através do envelope celular bacteriano (CASCALES; CHRISTIE, 2003). É composto por diversas proteínas associadas à membrana, que provavelmente medeiam o contato intercelular e translocação de proteínas ou complexos proteína-DNA (CHRISTIE, 2001).

O TFSS de *Agrobacterium tumefaciens*, aplicado à transferência de genes para plantas, é o modelo mais bem estudado. Nesta espécie, o TFSS é composto por 12 componentes, *virB1* a *virB11* e *virD4*, sendo codificados por dois *operons* no plasmídeo *Tumour-inducing* (Ti, do inglês, *Tumour-inducing*) (ZUPAN et al., 2000). Organizações genéticas similares dos genes de TFSS têm sido descobertas em outras bactérias.

Em organismos intracelulares obrigatórios, sistemas de secreção tipo IV foram identificados em *Rickettsia prowazekii*, agente do tifo epidêmico (ANDERSSON et al., 1998); *Rickettsia conorii*, agente da febre maculosa do Mediterrâneo (OGATA et al., 2001); *Wolbachia* spp., simbionte de artrópodes (MASUI et al., 2000); *Ehrlichia canis*, agente da erliquiose canina (FELEK et al., 2003); *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophila*, agentes da erliquiose monocítica e granulocítica humanas, respectivamente (OHASHI et al., 2002).

Em *R. prowazekii* e *R. conorii* 16 genes *vir* (1 *virB3*, 2 *virB4*, 5 *virB6*, 1 *virB7*, 2 *virB8*, 2 *virB9*, 1 *virB10*, 1 *virB11* e 1 *virD4*) foram identificados pelo sequenciamento do genoma e análises posteriores (ANDERSSON et al., 1998; OGATA et al., 2001), mas as atividades transcricionais destes genes não foram examinadas.

Em *Wolbachia* spp., cinco genes *vir* (*virB8*, *-B9*, *-B10*, *-B11* e *-D4*) foram identificados e estes genes são policistronicamente transcritos (MASUI et al., 2000); entretanto, outros genes *vir* não foram relatados e o promotor para o transcrito *virB8-D4* não foi determinado.

Em *E. canis* o gene *virB9* foi clonado e expresso, sendo conservado em seis diferentes isolados e sendo transcrito em organismos provenientes de cães, carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e de cultura celular. Soros de cães infectados reagiram com a proteína VirB9 recombinante, indicando que a proteína era antigênica. A análise da seqüência protéica predita de VirB9 continha domínios que a caracterizavam como proteína de membrana externa, o que explica o seu reconhecimento por soros de cães infectados. Apresentou ainda sete epitopos T preditos (FELEK et al., 2003).

Em *A. phagocytophila* e *E. chaffeensis* foram identificados oito genes *virB* e *virD* em cada genoma bacteriano. Nestes organismos, embora a ordem e orientação dos genes tenha sido similar às de outras bactérias, os mesmos estavam agrupados em dois diferentes *locus* em cada genoma. Cinco dos genes (*virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* e *virD4*) estavam localizados após o gene *ribA* e foram transcritos policistronicamente. Os três genes restantes (*virB3*, *virB4* e *virB6*) estavam arranjados após um gene *sodB* e foram co-transcritos com este gene (OHASHI et al., 2002).

Em *Brucella*, esse sistema é tipificado por um operon *virB* que codifica 12 proteínas que apresentam homologia significativa para outros sistemas de secreção do tipo IV (DELRUE et al., 2001; HONG et al., 2000; O'CALLAGHAN et al., 1999). A similaridade com *Agrobacterium tumefaciens*, um patógeno de planta bastante estudado, sugere que *Brucella* usa este sistema para a translocação de fatores de virulência em células de mamíferos (CASCALES; CHRISTIE, 2003; CELLI, et al., 2003; CELLI; GORVEL, 2004; CHRISTIE, 2004; CHRISTIE, et al., 2005; O'CALLAGHAN, et al., 1999). Acredita-se que a expressão do operon *virB* seja regulada por um regulador VjbR (DELRUE, et al., 2005).

O *locus* VirB, responsável pelo sistema de secreção do tipo IV de *Brucella*, tem sido identificado nas principais espécies deste gênero. Primeiramente foi identificado em *B. suis*

(O'CALLAGHAN et al., 1999), seguido da identificação em *B. abortus* (SIEIRA et al., 2000) e finalmente em *B. melitensis* (DELVECCHIO et al., 2002).

Conforme descrito em diferentes trabalhos, *Brucella* spp. *knockout* para diferentes genes *virB* foram incapazes de formar membranas no retículo endoplasmático, perderam a habilidade de multiplicação em células do tipo *HeLa* e não foram recuperadas do baço de camundongos BALB/c infectados (SIEIRA et al., 2000).

O gênero *Brucella* não contém plasmídeos naturalmente, portanto, é provável que as proteínas codificadas pelos genes *virB* estejam envolvidas na secreção de proteínas ao invés da conjugação. Uma possível função na virulência está ligada à injeção de moléculas efetoras, as quais ajudam no estabelecimento do nicho de replicação dentro das células do hospedeiro. A bactéria pode necessitar deste sistema de injeção e das moléculas efetoras por um período limitado durante o processo infeccioso e a sua expressão é provável que seja bem regulada. Segundo experimentos realizados por Boschioli et al. (2002a), o *operon virB* de *Brucella*, diferente de outros sistemas de secreção do tipo IV que são expressos extracelularmente, são induzidos especificamente dentro dos macrófagos e a acidificação do fagossomo é o sinal intracelular fundamental para a indução da expressão deste *operon*.

A região *virB* no genoma de *B. abortus* e *B. suis* é constituído por 12 janelas abertas de leitura (ORF, do inglês, *Open Reading Frame*), estruturadas em um *operon*. Por RT-PCR, foi demonstrado que a região *virB* de *B. suis* é transcrita como um mRNA policistrônico, enquanto experimentos com *Northern blot* evidenciaram que não há promotores secundários (BOSCHIOLI et al., 2002a; O'CALLAGHAN et al., 1999).

Os substratos translocados não são ainda conhecidos, mas como não há plasmídeos descritos em *Brucella*, é provável que o TFSS esteja envolvido na secreção de proteínas e não em processos de conjugação (BOSCHIOLI et al., 2002a).

Recentemente, uma proteína reguladora da transcrição do *operon virB* de *Brucella* foi descrita. Esta proteína é homóloga ao fator de integração ao hospedeiro (FIH). Um mutante com substituição de um fragmento de 20 pb do sítio de ligação do FIH não ativou o *operon virB* durante os estágios iniciais da infecção ao macrófago, provocando diversos defeitos na multiplicação intracelular (SIEIRA et al., 2004).

Dentro da região *virB* de *Brucella*, existem genes já caracterizados como componentes essenciais (WATARAI et al., 2002) e não essenciais (SUN et al., 2005) à virulência desta bactéria dentro das células do hospedeiro infectado. Entretanto, Apesar da existência de diversos trabalhos demonstrando o efeito da deleção de genes *virB* na capacidade infectante

de *Brucella*, não há relatos da utilização de cepas *knockout* para os genes *virB* de *B. abortus* como uso de vacinas vivas geneticamente modificadas em análises de imunoproteção.

VirB10 é um membro do aparato de transporte que tem homólogos em sistemas de secreção do tipo IV de diversos microorganismos (CHRISTIE, 1997; COVACCI et al., 1999). As onze proteínas VirB de *A. tumefaciens* formam um complexo em membrana que medeia o movimento de DNA de bactérias para células de plantas. Ward Júnior et al. (1990) identificaram a proteína VirB10 agregada a membrana de *A. tumefaciens*.

Homólogos de VirB10 são proteínas de 400 resíduos, exceto em *Helicobacter pylori*, HP0527 (1.819 resíduos compostos de motivos de seqüências repetitivas). Somente a região C-terminal hidrofóbica de 150 resíduos está bem conservada. Acredita-se que VirB10, juntamente com VirB8 e VirB9, façam parte do núcleo da maquinaria de transferência possibilitando a formação de poros atravessando duas membranas (BEAUPRÉ et al., 1997; DAS; XIE, 1998; DING et al., 2002; FINBER et al., 1995; KRALL et al., 2002). O gene *virB10* codifica uma proteína de membrana que tem um domínio periplasmático C-terminal, como mostrado em experimentos de fusão de PhoA (DAS; XIE, 1998).

Cepa *knockout* de *B. abortus* obtida por deleção do gene *virB10* de seu genoma apresentou sobrevivência intracelular diminuída em células do tipo *HeLa*; os resultados obtidos também indicam que *virB10* e seqüências posteriores (*virB11*-ORF 12-ORF13) são essenciais para a patogênese de *Brucella* em camundongos e sugerem que a integridade do operon *virB* é requerida para virulência do tipo selvagem. Estudos com este gene mostraram que a ausência deste no genoma de *B. abortus* impossibilita cepas *knockouts* de replicar em macrófagos e sobreviver em camundongos (SIEIRA et al., 2000).

REFERÊNCIAS

ADAMS, L. G. Development of live *Brucella* vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed.); **Advances in brucellosis research**. Texas A & M University Press, 1990. p. 250-276.

ALTON, G. G et al. **Techniques for the brucellosis laboratory**. INRA, Paris, 1988.

ALTON, G. G. & FORSYTH, J. R. L.. *Brucella*. Disponível em(<http://129.109.112.248/microbook/ch028.htm>). Acesso em: 20 de outubro de 1999.

AL-MARIRI, A. et al. Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA Vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* v. 69, p. 6264-6270. Oct. 2001.

ANDERSSON, S. G. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.*, v. 396, n. 6707, p. 133-140. Nov. 1998.

ARAYA, L. M. et al. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.*, v. 143, p. 3330-3337. Nov. 1989.

BANG, B. The etiology of epizootic abortion. *J. Comp. Pathol.* v. 10, p. 125-149. 1897.

BATHKE, W. **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose.** São Paulo: Roca, 1988 .v. 2., p.144-160.

BEAUPRÉ, C. E. et al. Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* v. 179, n. 1, p. 78-89. Jan. 1997.

BELLAIRE, B. H.; ROOP II, R. M.; CARDELLI, J. A. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 6, p. 3702-3713. Feb. 2005.

BERGUER, P. M. et al. A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J. Immunol.* v. 176, p. 2366-2372. Feb. 2006.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious diseases of livestock.** Texas: University Press, College Station, 1994. v. 2, p. 1053 – 1066.

BOSCHIROLI, M. L. et al. The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 3, p. 1544-1549. Feb. 2002a.

BOSCHIROLI, M. L. et al. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1-4, p. 341-348. Dec. 2002b.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília, 1977. 525-602 p.

BRASIL. **Brucelose bovina**. Boletim da Defesa Sanitária Animal, Brasília, v. 29, n. 1-4, p. 41-47, 1996. Edição 2000.

BRASIL. Ministério da Pecuária Agricultura e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Brasília, 2001. Disponível em (<http://www.agricultura.gov.br/>). Acesso em: 22 de outubro de 2008.

BRASIL. Instrução normativa SDA n° 33, de 24 de agosto de 2007. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br/>). Acesso em: 22 de outubro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Brasil: Rebanho bovino – efetivo por Unidade da Federação**. Brasília. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br/>). Acesso em: 22 de outubro de 2008.

CAMPOS, M. A. et al. Role of Toll-Like Receptor 4 in Induction of Cell-Mediated Immunity and Resistance to *Brucella abortus* Infection in Mice. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 1, p. 176-186. Jan. 2004.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **J. Infect.**, v. 45, n. 2, p. 122-127. Aug. 2002.

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis**. CRC Press. Inc.; 1990. p. 335-350.

CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4 ed. Philadelphia: London, 1991. p.196-201.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nat. Vet. Microbiol.**, v. 1, n. 2, p. 137-149. Nov. 2003.

CASSATARO, J. et al. A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. **Vaccine**. v. 25, p. 5958-5967. Aug. 2007.

CELLI, J. et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. **J. Exp. Méd.**, v. 198, n. 4, p. 545-556. Aug. 2003.

CELLI, J.; GORVEL J. P. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 93-97. Feb. 2004.

CELLI, J. et al. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 5, p. 1673-1678. Feb. 2005.

CHEERS, C.; HO, M. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 34, n. 4, p. 299-309. Oct. 1983.

CHEVILLE, N. F. et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 10, p. 1591-1597. Oct. 1993.

CHRISTIE, P. J. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. **J. Bacteriol.** v. 179, n. 10, p. 3085-3094. May 1997.

CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 294-305. Apr. 2001.

_____. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, n. 1-3, p. 219-234. Nov. 2004.

CHRISTIE, P. J. et al. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 59, p. 451-485. July. 2005.

CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends. Microbiol.**, v. 8, n. 8, p. 354-360. Aug. 2000.

COPIN, R. et al. MyD88 dependent activation of B220⁻CD11⁺LY⁻6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. **J. Immunol.** v. 178, p. 5182-5191. Apr. 2007.

CORBEL, M. J.; MORGAN, W. J. B. Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173AL. In: HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 1984. p. 377-388.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 213-221. Apr-June 1997.

COVACCI, A. et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**. v. 284, n. 5418, p. 1328-1333. May 1999.

DAS, A.; XIE, Y. H. Construction of transposon Tn3PHOa: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. **Mol. Microbiol.** v. 27, n. 02, p. 405-414. Feb. 1998.

_____. The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9 and VirB10 interact with one another. **J. Bacteriol.** v. 182, n. 3, p. 758-763. Feb. 2000.

DELRUE, R. M. et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. **Cell. Microbiol.**, v. 3, n. 7, p. 487-497. July 2001.

DELRUE, R. M. et al. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 8, p. 1151-1161. Aug. 2005.

DELVECCHIO, V. G. et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 1, p. 443-448. Jan. 2002.

DETILLEUX, P. G. et al. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 7, p. 2320-2328. July 1990.

DING, Z. et al. A novel cytology-based, two-hybrid screen for bacteria applied to protein-protein interaction studies of a type IV secretion system. **J. Bacteriol.** v. 184, n. 20, p. 5572-5582. Oct. 2002.

FELEK, S. et al. Sequence and expression analysis of *virB9* of the type IV secretion system of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs, and cultured cells. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 10, p. 6063-6067. Oct. 2003.

FINBERG, K. E. et al. Interactions of VirB9, -10, and -11 with the membrane fraction of *Agrobacterium tumefaciens*: solubility studies provide evidence for tight associations. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 4881-4889. Sep. 1995.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**, v. 57, n. 11, p. 2688–2693. Nov. 2007

FOULONGNE, V. et al. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1297-1303. Mar. 2000.

GIAMBARTOLOMEI, G. H. et al. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. **J. Immunol.** v. 173, p. 4635-4642. Oct. 2004.

GODFROID, J. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Vet. Res.**, v. 36, n. 3, p. 313-326. May-June 2005.

GOLDING, B. et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 1, p. 43-48. Jan. 2001.

HANLON, L.; ARGYLE, D. J. The science of DNA vaccination. **Infect. Dis. Rev.**, v. 3, p. 2-12. 2001.

HARTIGH, A. B. DEN et al. Differential Requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* Infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 9, p. 5143-5149. Sept. 2004.

HONG, P. C. et al. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 7, p. 4102-4107. July 2000.

HUANG, L. Y. et al. Th-1 like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. **J. Immunol.** v. 175, p. 3964-3970. Sep. 2005.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 2, p. 379-433. June 1998.

IAGRO. Informe da Campanha de Vacinação contra a Febre Aftosa. Consolidado das regiões de Planalto e Pantanal, etapa novembro de 2003. Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2003

IBGE. Resolução PR-051, de 31.7.1989. Divisão de Pesquisa no Estado de Mato Grosso do Sul, Setor de Documentação e Disseminação de Informações, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Campo Grande, MS. 2002

JONES, S. M.; WINTER, A. J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 7, p. 3011-3014. July 1992.

KAHL-MCDONAGH, M. M.; FICHT, T. A. Evaluation of Protection Afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Unmarked Deletion Mutants Exhibiting Different Rates of Clearance in BALB/c. **Infect. Immun.** v. 74, p. 4048-4057. July 2006.

KOHLER, S. et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 24, p. 15711-15716. Nov. 2002.

KOTLOFF, K. L. et al. Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase I trial of CVD I204 and CVD I208. **J. Infect. Dis.** v. 190, p. 1745-1754. Nov. 2004.

KRALL, L. Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 17, p. 11405-11410. Aug. 2002.

KURAR, E.; SPLITTER, G. A. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal *L7/L12* gene elicits immune response. **Vaccine**, v. 15, n. 17-18, p. 1851-1857. Dec. 1997.

LAI, F. et al. Electroporation of a suicide plasmid bearing a transposon into *Brucella abortus*. **Microb. Pathog.**, v. 9, n. 5, p. 363-368. Nov. 1990.

MACEDO, G. C. et al. Central role of MyD88-dependent Dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **J. Immunol.** v. 180, p. 1080-1087. Jan. 2008.

MACKANESS, G. B. The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. **J. Exp. Med.**, v. 120, p. 105-20. July 1964.

MARTIN, N. L.; HANCOCK, R. E. W. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria. In: ADAMS, G. (Ed). **Advances in Brucellosis research**. Texas A and M-University Press. College Station, 1990. p. 55-75.

MASUI, S. et al. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 22, p. 6529-6531. Nov. 2000.

MCQUISTON, J. R. et al. Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids. **Methods Mol. Biol.**, v. 47, p. 143-148. June 1995.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. **Primeiro Relatório Parcial**: Situação Epidemiológica da Brucelose Bovina e Bubalina no Brasil. São Paulo: 2006, 83 p.

MONTEIRO, L. A. R. C. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras. [online]**, v. 26, n. 4, p. 217-222. 2006.

MORENO, E.; MORIYON, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 1, p.1-3. Jan. 2002.

NICOLETTI, P.L. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG, E. J.; CORBEL, M. J. (Eds). **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Flórida, 1989. p. 41-51.

O'CALLAGHAN, D. et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 1210-1220. Sep. 1999.

OGATA, H. et al. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. **Science**, v. 293, n. 5537, p. 2093-2098. Sep. 2001.

OHASHI, N. et al. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 4, p. 2128-2138. Apr. 2002.

OLIVEIRA, S.C. et al. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 207-214. Feb. 1999

OÑATE, A. et al. A DNA vaccine encoding Cu-Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Infect. Immun.** v. 71, p. 4857-4861. Sep. 2003.

OÑATE, A. et al. A RNA vaccine based on recombinant Semliki Forest virus particles expressing Cu-Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. **Infect. Immun.** v. 73, p. 3294-3300. June 2005

OSÓRIO, A. L. A. R.; MONTEIRO, L. A. R. C. Brucelose bovina. In: LEMOS, R. A. A. **Brucelose bovina, tuberculose bovina.** 1ª ed. Editora UFMS, 2006. p. 9-57.

PAVELKA JUNIOR, M. S.; JACOBS JUNIOR, W. R. Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin*, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 16, p.4780-4789. Aug. 1999.

PEI, J. et al. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2667-2675. May 2006.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 90, n. 1-4, p. 55-62. Dec. 2002.

POESTER, F. P. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine.** v. 24, p. 5327-5334. Apr. 2006.

ROSINHA, G. M. et al. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5036-5044. Sep. 2002a.

ROSINHA, G. M. et al. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, n. 8, p. 661-671. Aug. 2002b.

SÁEZ, D. et al. Evaluation of *Brucella abortus* DNA and RNA vaccines expressing Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) gene in cattle. **Vet. Microbiol.** v. 129, p. 396-403. June 2008.

SCHURIG, G. G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Vet. Microbiol.**, v. 28, n. 2, p. 171-188. July 1991.

SIEIRA, R. et al. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 17, p. 4849-4855. Sep. 2000.

SIEIRA, R. et al. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* *virB* operon. **Mol. Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 808-822. Nov. 2004.

SMITH, L. D.; FICHT, T..A. Pathogenesis of *Brucella*. **Critic. Rev. Microbiol.** v. 17, n. 3, p. 209-230. Mar. 1990.

SUN, Y. H. et al. *Brucella abortus* *virB12* is expressed during infection but is not an essential component of the type IV secretion system. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6048-6054. Sep. 2005.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. **Genes Cells**, v. 6, n. 9, p. 733-742. Sep. 2001.

TATUM, F. M. et al. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 7, p. 2863-2869. July 1992.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 291, n. 5508, p. 1544-1547. Feb. 2001.

UGALDE, R. A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 14, p.1211-1219. Dec. 1999.

ULMER, J. B. et al. DNA vaccines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 531-536. Aug. 1996.

VAN DER STRAATEN, T. et al. Novel *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 12, p. 7413-7418. Dec. 2001.

VELIKOWSKY, C. A. et al. A DNA vaccine encoding luminase synthase from *Brucella abortus* induce protective immunity in BALB/c mice. **Infect. Immun.** v. 70, p. 2507-2511. May 2002.

VERGER, J. M. et al. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 35, n. 3, p. 292-295. July 1985.

WALKER, R. L. *Brucella*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro. 2003. p. 185-191.

WARD JÚNIOR, J. E. et al. Identification of a VirB10 Protein Aggregate in the Inner Membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 9, p. 5200-5210. Sept. 1990.

WATARAI, M. et al. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 5, p. 1439-1446. May 2002.

WINTER, A. J. et al. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 11, p. 3438-44. Nov. 1989.

World Health Organization Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. **The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines**: Report of a WHO Meeting, Geneva. 1998.

YANG, X.; BECKER, T.; WALTERS, N.; PASCUAL, D. W. Deletion of *znuA* Virulence Factor Attenuates *Brucella abortus* and Confers Protection against Wild-Type Challenge. **Infect. Immun.** v. 74, p. 3874-3879. July 2006.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 5, n. 5, p. 821-842. Sep-Oct. 1983.

_____. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. **APMIS Suppl.**, v. 3, p. 17-20. 1988.

ZHAN, Y.; CHEERS, C. Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. **J. Immunol.**, v. 161, n. 3, p. 1447-1453. Aug. 1998.

ZUPAN, J. et al. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **Plant J.**, v. 23, n. 1, p. 11-28. July 2000.

ARTIGO CIENTÍFICO

Desenvolvimento e avaliação de uma cepa *knockout* de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*^{*}

Fabiane G. de Souza¹, Ana L.A.R. Osório¹, Bárbara G. Csordas¹, Rafael Q. Prado², Carina Elisei², Cleber O. Soares², Flávio R. Araújo², Stênio P. Fragoso³, Grácia M.S. Rosinha^b

ABSTRACT.- Souza, F.G., Osório, A.L.A.R., Csordas, B.G., Prado, R.Q., Soares, C.O., Araújo, F.R., Fragoso, S.P., Rosinha, G.M.S. **Development and evaluation of a strain of *Brucella abortus* gotten by the knockout of the *virB10* gene.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(x):xx-xx. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) Campo Grande, MS. * Autor(a) para correspondência: fabicientista@gmail.com

Brucella spp. is an intracellular facultative gram-negative bacteria which is pathogenic for many species of mammals, causing brucellosis, a worldwide spread zoonosis. Therefore the search for more efficient alternatives of control, as the development of new strains that can be tested as potential immunogens, is necessary. In this study, we knocked out *virB10* from *Brucella abortus* S2308 strain, generating a mutant strain probably incapable to produce the corresponding native protein. The gene *virB10* is part of an operon that codifies

* Normas da revista "Pesquisa Veterinária Brasileira"

¹ Programa de Pós-Graduação, mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Felinto Muller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS, CEP 79070-900, Brasil. E-mail: fabicientista@gmail.com

² Embrapa Gado de Corte, BR 262 km 4 - Caixa Postal 154, Campo Grande, MS, CEP 79002-970, Brasil.

³ Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, Cidade Industrial de Curitiba – CIC, Curitiba, PR, CEP 81350-010, Brasil.

for type IV secretion system, which is essential for the intracellular survival and multiplication of the bacteria in host cells. The knockout was carried through by the construction of the suicidal plasmid pBlue: *virB10*: *kan* and eletroporation in eletrocompetent cells of *B. abortus* S2308, leading to the exchange of the wild gene for the interrupted gene, containing the gene of resistance to kanamycin, for double homologous recombination. BALB/c mice were inoculated with S19, RB-51, Δ *virB10* strains of *B. abortus* and S2308 wild strain. The evaluation of the persistence of the strains showed that *virB10* is essential for the maintenance of the virulence. These results support other studies concerning the immunogenic potential of this mutant strain.

INDEX TERMS: *Brucella abortus*, *virB10* gene, knockout, virulence

RESUMO.- [Desenvolvimento e avaliação de uma cepa knockout de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*]. *Brucella* spp. são bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas que são patogênicas para muitas espécies de mamíferos causando a brucelose, uma zoonose difundida mundialmente. Por isso a busca de alternativas de controle mais eficientes se faz necessário como o desenvolvimento de novas cepas que possam ser testadas como potenciais imunógenos. Neste estudo realizou-se a deleção do gene *virB10* da cepa S2308 de *Brucella abortus* gerando uma cepa *knockout* provavelmente incapaz de produzir a proteína nativa correspondente. O gene *virB10* faz parte de um *operon* que codifica para um sistema de secreção do tipo IV, essencial para a sobrevivência intracelular e multiplicação da bactéria em células hospedeiras. A deleção foi realizada pela construção do plasmídeo suicida pBlue:*virB10*:*kan* e eletroporação deste em células eletrocompetentes de *B. abortus* S2308, ocorrendo a troca do gene selvagem pelo gene interrompido, com o gene de resistência a canamicina, por recombinação homóloga dupla. Camundongos BALB/c foram inoculados com as cepas S19, RB-51, Δ *virB10* de *B. abortus* e *B. abortus* S2308 selvagem e a

avaliação da persistência revelou que o gene *virB10* é essencial para a manutenção da virulência da bactéria. Os resultados obtidos possibilitarão que outras pesquisas sejam realizadas avaliando o potencial imunogênico desta cepa mutante.

TERMOS DE INDEXAÇÃO : *Brucella abortus*, gene *virB10*, deleção, virulência

INTRODUÇÃO

Brucella spp. são bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas que são patogênicas para muitas espécies de mamíferos incluindo o homem e que causam uma doença infecciosa crônica conhecida como brucelose, importante zoonose difundida mundialmente (Corbel 1997). Em humanos, a brucelose é uma doença debilitante caracterizada por diversas manifestações patológicas como febre ondulante, complicações osteoarticulares, endocardites e desordens neurológicas severas. Em animais domésticos como bovinos, caprinos e ovinos a manifestação patológica proeminente é o aborto em fêmeas prenhes, devido a colonização da placenta, tecidos fetais e órgãos sexuais, e esterilidade em machos (Nicoletti 1989). Em bovinos a brucelose é causada por *Brucella melitensis*, biovar Abortus (= *Brucella abortus*) (Verguer et al. 1985). Em *Brucella* spp. a virulência está associada com a capacidade de multiplicação dentro das células hospedeiras. A sobrevivência e a multiplicação de *Brucella* dependem eficientemente de evitar a fusão do fagossomo contendo a bactéria com o lisossomo, e a replicação ocorre em vesículas do retículo endoplasmático. Os produtos gênicos que permitem *Brucella* spp. evadir e alcançar um nicho de replicação intracelular apropriado têm sido identificados (Pizarro-Cerdá et al. 1998).

As medidas de controle contra esta enfermidade baseiam-se no diagnóstico, eliminação dos animais infectados e vacinação. A vacinação contra infecções causadas por *Brucella* é feita pela administração das cepas lisas atenuadas S19 de *B. abortus* e Rev.1 de *B. melitensis*. A cepa rugosa RB51 de *B. abortus* utilizada por EUA, Chile e Uruguai, atualmente foi também testada e aprovada para uso no Brasil. Porém esta cepa tem a desvantagem de ser resistente a rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (Poester et al. 2006). A cepa S19 de *B. abortus* é efetiva contra a infecção por *B. abortus* em

bovinos e a cepa Rev.1 de *B. melitensis* é efetiva contra a infecção por *B. melitensis* e *B. ovis* em cabras e ovelhas, respectivamente. Porém, ambas as vacinas possuem desvantagens (Cheville et al. 1993). Em função dos fatos expostos, grupos de pesquisadores têm produzido organismos mutantes pela deleção de genes essenciais ao metabolismo ou replicação de *B. abortus*, com a intenção de obter um sistema de imunização alternativo mais eficiente (Canavessi et al. 2004, Miyoshi et al. 2007).

O sistema de secreção do tipo IV é um dos cinco principais sistemas que são capazes de exportar moléculas relacionadas à virulência através da membrana de bactérias gram-negativas. *Brucella* possui um sistema de secreção do tipo IV codificado por um *operon virB* o qual é essencial para a sobrevivência e multiplicação dentro das células hospedeiras (O'Collaghan et al. 1999). A região *virB* no genoma de *B. abortus* e *B. suis* é constituída por 12 janelas abertas de leitura (ORF, do inglês, *Open Reading Frame*) estruturadas em um *operon*, que é uma unidade genética de expressão coordenada (Boschioli et al. 2002).

Cepas *knockouts* de *Brucella*, que apresentam deleções de genes os quais codificam um sistema de secreção do tipo IV, perdem a habilidade de sobreviver e multiplicar em macrófagos e células epiteliais (O'Collaghan et al. 1999, Foulongne et al. 2000). Em diferentes estudos, cepas *knockouts* para genes *virB* de *B. abortus* mostram ser incapazes de estabelecer uma infecção crônica em modelos com camundongos; resultados similares são encontrados em experimentos com *B. suis* (Boschioli et al. 2002, Hong et al. 2000). Apesar da existência de diversos trabalhos demonstrando o efeito da deleção de genes *virB* na capacidade infectante de *Brucella*, não há relatos da utilização de mutantes *virB* de *B. abortus* como potenciais imunógenos.

A escolha do gene *virB10* como objeto de estudo ocorre pelo fato da ausência deste no genoma de *B. abortus* diminuir a capacidade de replicação de cepas mutantes em macrófagos e, de sobrevivência em camundongos (Sieira et al. 2000).

Neste estudo realizou-se o *knockout* do gene *virB10* do genoma de *B. abortus* e foi avaliada a virulência desta cepa em camundongos BALB/c comparando-a com a obtida pelas cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa selvagem S2308 de *B. abortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo - As cepas bacterianas e os plasmídeos utilizados neste estudo estão listados na tabela 1. As cepas de *Brucella abortus* foram cultivadas em meio *Brucella Broth* (DIFCO) por três dias a 37 °C. Quando necessário o meio foi suplementado com ampicilina ou canamicina nas concentrações de 100 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. *Escherichia coli* XL1-Blue foi cultivada a 37 °C em meio *Luria-Bertani* (DIFCO) contendo canamicina a 50 µg/mL ou ampicilina a 100 µg/mL quando necessário. Para o preparo de meios sólidos utilizou-se a suplementação com 1,5% de ágar bacteriológico. Quando necessário foi adicionado eritritol ao meio *Brucella Broth* (BB) ágar na concentração final de 0,1%.

Construção do plasmídeo suicida para o knockout do gene *virB10* de *Brucella abortus* - O plasmídeo suicida utilizado para a troca do gene selvagem *virB10* de *B. abortus* pelo gene mutado foi obtido da maneira como se segue. O gene *virB10*, de 1167 pares de bases, foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico de *B. abortus* S2308; os *primers* utilizados foram: *virB10EcoF* (5' – GGC GAA TCC ATG ACA CAG GAA AAC ATT – 3') e *virB10HindR* (5' – GGC AAG CTT TCA CTT CGG TTT GAC ATC – 3'). O gene *virB10* amplificado foi então digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HindIII* e ligado no

vetor pBlueScript[®]KS (Stratagene) previamente digerido com as mesmas enzimas; resultando em pBlue:*virB10* (Tabela 1). Para a realização do procedimento de subclonagem o plasmídeo pBlue:*virB10* foi digerido com a endonuclease de restrição *MfeI*, que após o corte gera um fragmento de DNA com uma extremidade compatível a gerada pela enzima *EcoRI*. O plasmídeo pUC4K foi digerido com a enzima *EcoRI* liberando um fragmento de aproximadamente 1,3 kb correspondente ao gene de resistência a canamicina. Este fragmento foi ligado ao plasmídeo pBlue:*virB10*, previamente digerido, resultando no plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* (Tabela 1).

Obtenção dos mutantes de Brucella abortus por recombinação homóloga dupla -

Visando a obtenção de mutantes de *B. abortus* foram preparadas células eletrocompetentes de *B. abortus* S2308; com essa finalidade essa cepa de *Brucella* foi cultivada em 200 mL de meio *Brucella Broth* por aproximadamente seis horas a 37 °C até atingir a fase log de crescimento (densidade óptica de 600 nm, 0,4-0,6). As células bacterianas foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos, o *pellet* obtido foi lavado três vezes com água bi-destilada refrigerada contendo 10% de glicerol e ressuspenso em 0,65 mL desta mesma solução. Por fim, alíquotas de 0,05 mL foram estocadas imediatamente a – 80 °C. Cinco microgramas do plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* foram adicionadas a 50 µL de células eletrocompetentes de *B. abortus* em cubetas estéreis para eletroporação de 0,2 cm (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA*), e a eletroporação foi realizada com o aparato de transfecção *Micro Pulser II* (*Bio Rad Laboratories*) a 25µF, 2,5 kV, e 400Ω. Um mililitro de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM de glicose) foi adicionado, e as células foram colocadas para crescer a 37 °C sob agitação constante por 16 horas e plaqueadas em meio BB ágar contendo 25 µg/ml de canamicina. Após cinco dias de incubação a 37 °C, as colônias crescidas foram repicadas em

placas contendo meio de cultivo BB ágar acrescido de 25 µg/mL de canamicina e 25 µg/mL de ampicilina.

Análise por Southern blot de *Brucella abortus* mutante - Com o intuito de comprovar geneticamente a troca ocorrida entre o gene *virB10* da cepa selvagem de *B. abortus* (S2308) e o gene *virB10* interrompido com o gene de canamicina, 10 µg do DNA genômico isolado das cepas mutantes e selvagens de *B. abortus* foram digeridos com a enzima *EcoRV* e então colocados para migrar em gel de agarose a 1% para a realização da técnica de *Southern blot*. O DNA genômico foi transferido para uma membrana de nitrocelulose pelo sistema de transferência por capilaridade *over night* em tampão SSC 20X. A membrana foi exposta por duas horas a 80 °C para que ocorresse a fixação do DNA e então pré-hibridizada a 65 °C por uma hora e 10 mL de solução de pré-hibridização (6X SSC, 0,2% SDS, solução de *Denhardt* 10X, 100 µg/mL de esperma de salmão e 50% de formamida). Os genes *virB10*, *kan^R* e *amp^R* foram usados como sondas e foram marcadas com (α -³²P) dCTP usando o *kit* de marcação *Random-Prime DNA labeling (GE Healthcare)*, sendo o ³²P removido utilizando uma coluna de cromatografia Sephadex G-50. A hibridização foi conduzida a 65 °C por 16 horas com a mesma solução utilizada no processo de pré-hibridização. As membranas foram lavadas três vezes com 2 X SSC/SDS 0,1% a 65 °C por 30 minutos. Após a última lavagem, a membrana foi submetida à autoradiografia *over night* à temperatura ambiente.

Avaliação da virulência da cepa mutante em camundongos BALB/c - A virulência da cepa mutante obtida foi determinada pela quantificação desta no baço de camundongos previamente infectados e pela avaliação da presença de alteração no peso dos baços. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade foram divididos em quatro grupos de oito camundongos cada, e infectados na região intraperitoneal com 1×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) com as cepas S19, RB-51, S2308, Δ *virB10* (mutante para o gene *virB10*), separadamente. Uma, três e seis semanas após a infecção, os animais de cada

grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus baços foram removidos, pesados e macerados em tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, *Phosphate Buffered Saline* - 137 mM NaCl, 10 mM Fosfato, 2,7 mM KCl e pH de 7,4), com o auxílio de uma peneira de aço. As diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueadas em meio BB canamicina para o grupo do mutante e em BB sem suplementações para o restante dos grupos. Três dias após a incubação em estufa a 37°C, o número de UFC de cada grupo foi determinado para cada animal. Os resultados foram expressos como a média do log de UFC de cada cepa de *B. abortus* utilizada.

Análise Estatística - As análises estatísticas deste estudo foram realizadas por meio de ANOVA e do teste t de *Student*, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS 2005).

RESULTADOS

Caracterização de *Brucella abortus* mutante obtida pela deleção do gene *virB10* - Cinco clones de ambos os fenótipos canamicina resistente (Kan^{R}) e ampicilina sensível (Amp^{S}) ou canamicina resistente (Kan^{R}) e ampicilina resistente (Amp^{R}) foram selecionados como colônias que sofreram recombinação homóloga dupla e simples, respectivamente. Deste modo foi obtida uma cepa mutante de *Brucella abortus* a partir da deleção do gene *virB10* da cepa selvagem *B. abortus* S2308. A mutação foi obtida por recombinação homóloga por troca do gene cromossomal utilizando o plasmídeo suicida pBlue:*virB10:kan* (Fig. 1). O DNA cromossomal digerido com a enzima de restrição *EcoRV* quando hibridizado com a sonda *virB10* produziu um fragmento de aproximadamente 4,1 kb para *B. abortus* 2308 (coluna 6) e uma banda de 5,4 kb para as colônias mutantes $\text{kan}^{\text{R}} \text{amp}^{\text{S}}$ (coluna 1, 2 e 3) (Fig. 2A). A diferença de 1,3 kb observada entre o fragmento hibridizado *virB10* presente nos mutantes

kan^R amp^S (coluna 1, 2 e 3) quando comparados com *B. abortus* 2308 (coluna 6) foi de acordo com o tamanho correspondente a inserção do gene de canamicina dentro do gene *virB10*. Este perfil observado indica que houve recombinação homóloga dupla entre o gene *virB10* interrompido pelo gene de resistência à canamicina do plasmídeo suicida com o gene selvagem do DNA cromossomal da bactéria. Um evento de recombinação homóloga simples ocorreu com os clones (coluna 4 e 5) que mostraram um fragmento de aproximadamente 8,3 kb que corresponde ao gene selvagem *virB10* mais o gene da deleção plasmidial. Este resultado foi confirmado quando a sonda amp^R hibridizou somente os fragmentos correspondentes a integração da deleção plasmidial (pBlue:*virb10:kan*) no cromossomo (Fig. 2B). Quando o gene de canamicina foi usado como sonda houve hibridização para os clones kan^R amp^S e kan^R amp^R mas não para o DNA genômico da cepa selvagem *B. abortus* S2308 utilizado neste caso como um controle negativo (Fig. 2C). A diferença de tamanho observada entre os fragmentos dos clones kan^R amp^S e kan^R amp^R, na Fig. 2C, foi devido a integração da deleção plasmidial (pBlue:*virb10:kan*) no cromossomo da bactéria.

Virulência da cepa mutante em camundongos BALB/c - A virulência da cepa mutante Δ *virB10* S2308 de *B. abortus* foi estudada em camundongos BALB/c e comparada à virulência da cepa selvagem S2308 e cepas vacinais S19 e RB-51. O número de bactérias sobreviventes no baço dos animais infectados foi avaliado e os valores correspondentes à média de recuperação bacteriana em cada grupo podem ser observados no quadro 2.

Conforme descrito na metodologia os camundongos tiveram seus baços pesados e os resultados obtidos foram avaliados (Quadro 3). Foi observada esplenomegalia nos animais que foram inoculados com a cepa virulenta S2308 de *B. abortus*.

Quando avaliados recuperação bacteriana e peso esplênico em função do tempo pós inoculação observou-se que os grupos apresentaram linhas de tendência diferenciadas. Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 1×10^6 UFC de cada inóculo já

mencionado. As linhas de tendência expressas correspondem à média do log de UFC para cada grupo (n=8) $P < 0,05$ (Figura 3) e à média do peso dos baços (g) para cada grupo (n=8) $P < 0,05$ (Figura 4).

DISCUSSÃO

As proteínas VirB, envolvidas no processo de replicação intracelular, são consideradas um fator de virulência em *Brucella* e fazem parte do sistema de secreção do tipo IV que, aliado ao LPS, é o principal fator de virulência (Ding et al. 2003, Lapaque et al. 2005). Para que ocorra a sobrevivência intracelular e a multiplicação de *B. suis*, *B. abortus* e *B. melitensis* foi demonstrada a essencialidade da região *virB* (Boschiroli et al. 2002, Wu et al. 2006), a qual está envolvida no amadurecimento dos vacúolos parasitóforos, possibilitando sua interação estável com o retículo endoplasmático rugoso e o escape da via de degradação, gerada pela fusão com lisossomos (Comercie et al. 2001, Celli e Gorvel 2004). Mutantes em diferentes genes *virB* já foram atenuados, sendo a virulência restabelecida com plasmídeo contendo toda a região *virB* (O'Collaghan et al. 1999).

Dentre as possíveis formas de vacinas estudadas contra *B. abortus*, a estratégia que vem sendo amplamente utilizada é a obtenção de cepas geneticamente modificadas, por meio da deleção de genes supostamente envolvidos na virulência. Para atingir este fim, podem ser utilizadas várias técnicas, sendo a mais difundida, a utilização da recombinação homóloga dupla como recurso genético para obtenção destes mutantes. O desenvolvimento de vacinas vivas deletadas tem sido avaliado para *Brucella* (Canavessi et al. 2004, Miyoshi et al. 2007) e muitos outros patógenos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (Pavelka et al. 1999).

Neste estudo o gene *virB10* de *Brucella abortus* foi deletado por meio da construção de um plasmídeo suicida contendo o gene interrompido, incapaz de expressar o gene, o qual foi introduzido na cepa selvagem S2308 de *B. abortus* e por recombinação homóloga foi gerada uma cepa mutante desta bactéria. VirB10 é um membro do aparato de transporte que tem homólogos em sistemas de secreção do tipo IV de diversos microorganismos (Christie 1997, Covacci et al. 1999). Este gene codifica uma proteína de membrana que tem um domínio periplasmático C-terminal, como mostrado em experimentos de fusão de PhoA (Das e Xie 1998). Cepa *knockout* de *B. abortus* obtida por deleção do gene *virB10* de seu genoma apresentou sobrevivência intracelular diminuída em células do tipo *HeLa*; os resultados obtidos também indicam que *virB10* e seqüências posteriores (*virB11*-ORF 12-ORF13) são essenciais para a patogênese de *Brucella* em camundongos e sugerem que a integridade do *operon virB* é requerida para virulência do tipo selvagem. Estudos com este gene mostraram que a ausência deste no genoma de *B. abortus* impossibilita cepas *knockouts* de replicar em macrófagos e sobreviver em camundongos (Sieira et al. 2000).

Em experimento realizado utilizando mutantes para os genes *virB1* e *virB2* de *B. abortus* observou-se que VirB1 e VirB2 são essenciais para a replicação intracelular em macrófagos do tipo J774 (Hartigh et al. 2004). Em estudos com mutantes para o gene *virB4* de *B. abortus* foi verificado que este possui importante função no crescimento intracelular e na virulência em camundongos (Watarai et al. 2002).

Uma cepa mutante *B. abortus* para o gene *vacB*, um gene envolvido na expressão de genes *vir*, foi avaliada quanto a virulência em camundongos BALB/c e foram encontrados números reduzidos de UFC em comparação com os valores obtidos da cepa virulenta selvagem, porém esses resultados não foram significativos estatisticamente (Miyoshi et al. 2007).

Por todas as descobertas que mostram a relação dos genes *virB*, de *Brucella* spp., na virulência desta bactéria, comprova-se a sua importância nos mecanismos de

desenvolvimento da brucelose; assim como a possibilidade de serem utilizados como potenciais imunógenos. Neste trabalho foi possível a obtenção de uma cepa mutante de *Brucella abortus* pela deleção do gene *virB10*. Esta cepa foi avaliada quanto à virulência em camundongos BALB/c e os resultados foram comparados a aqueles das cepas vacinais S19, RB-51 e a cepa selvagem S2308 de *B. abortus*. O número de bactérias sobreviventes no baço dos animais infectados foi avaliado uma, três e seis semanas pós-infecção. Este intervalo de tempo foi escolhido baseando-se no conhecimento de que a proteção contra bactérias intracelulares é mediada por ativação de macrófagos, também foram levados em consideração estudos os quais comprovam que a imunidade celular gerada pela ativação de macrófagos, durante a infecção por *Brucella*, declina de três a quatro semanas após a infecção (Baldwin 2002). Em trabalhos já realizados, intervalos de tempo similares foram adotados.

Uma semana após a infecção, comparando as cepas, Δ *virB10* S2308 de *B. abortus* e RB-51 apresentaram diferença estatística quando comparadas entre si e à cepa selvagem S2308. A recuperação da cepa S19 mostrou-se semelhante estatisticamente, ao nível de significância de 5%, à cepa selvagem S2308 e diferente dos outros grupos ($p = 0,9261$). O mesmo padrão de recuperação foi observado três semanas após a infecção. Sieira et al. (2000) em seu trabalho com Δ *virB10* 2308 de *B. abortus* observou que o número de bactérias recuperadas do baço de camundongos inoculados com mutantes apolares de *virB10* foi significativamente mais baixo ($p < 0,05$) do que o número recuperado de camundongos inoculados com a cepa selvagem, o que está de acordo com o encontrado em nossos resultados sendo o mutante Δ *virB10* S2308 também apolar.

Hartigh et al. (2004) visando determinar o modo como os genes *virB1* e *virB2* são necessários para a persistência de *B. abortus in vivo* testaram a habilidade de estabelecimento da infecção e persistência em camundongos BALB/c de mutantes polares e apolares para estes genes. A recuperação de UFC bacteriana foi observada uma, três e oito semanas após a

inoculação. Uma semana após a infecção a cepa virulenta S2308 foi recuperada em números seis a oito vezes maiores que os mutantes polares para *virB1* e *virB2* e, mutante apolar *virB2*. Números duas vezes maiores foram encontrados quando comparados aqueles do mutante apolar para *virB1*. Três semanas após a infecção um padrão semelhante, ao da primeira semana, de recuperação foi observado. Oito semanas após a infecção os números de UFC de mutantes polares para *virB1* e *virB2* e, mutante apolar *virB2* foram três a quatro log menores do que aqueles da cepa virulenta selvagem S2308 e mutante apolar para *virB1*. Este trabalho sugere que *VirB2* é essencial para a sobrevivência *in vivo*, enquanto *VirB1* é dispensável para a persistência da infecção em camundongos.

No estudo presente, na sexta semana após a infecção, a diferença observada foi significativa quando os grupos infectados com $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus*, S19 e RB-51 foram comparados ao grupo infectado com a cepa selvagem S2308 (a comparação entre as cepas mutante e selvagem apresentou $p < 0,0001$). Os grupos S19 e RB-51 diferiram estatisticamente ($p = 0,0005$). Por outro lado o grupo infectado com a cepa mutante apresentou semelhança ao grupo S19 ($p = 0,4302$) e diferença estatística quando comparado ao grupo RB-51 ($p = 0,0063$). Esses resultados de *clearance* estão de acordo com resultados obtidos em experimentos com outros genes relacionados a virulência de *Brucella* (Hartigh et al. 2004). Yang et al. (2006) relataram que a cepa mutante $\Delta znuA$ foi atenuada em camundongos BALB/c. O gene *znuA* expressa uma proteína relacionada ao sistema de transporte de Zn^{+2} , que é um mineral essencial para a bactéria com função estrutural e como cofator catalítico. Kahl-McDonagh e Ficht (2006), em experimentos com mutantes, observaram que mutantes de *B. abortus* e *B. melitensis* para o gene *virB2* foram atenuados, mas de forma moderada quando comparados à cepa virulenta S2308, uma vez que outros mutantes no mesmo experimento apresentaram mais rápido *clearance*. Paulley et al. (2007) para avaliar a função potencial do gene *bhuA*, que expressa um transportador de grupo heme, na patogênese e no

transporte de grupo heme durante a permanência em hospedeiros mamíferos avaliou as propriedades de virulência de mutantes para este gene em cultura de macrófagos murinos e também em camundongos BALB/c. Tanto em macrófagos quanto em camundongos os mutantes *bhuA* exibiram significativa atenuação quando comparados a cepa virulenta selvagem S2308.

De acordo com os dados obtidos, o grupo infectado com $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus* não apresentou esplenomegalia, esta que foi observada no grupo infectado com a cepa selvagem S2308; isto está em concordância aparente com os dados obtidos de recuperação bacteriana. Bactérias do gênero *Brucella*, ao difundir-se para tecidos dos hospedeiro, colonizam principalmente órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, quais sejam, baço, fígado e linfonodos, onde podem acarretar alterações inflamatórias e anatomo-patológicas caracterizadas por granulomas difusos levando à esplenomegalia, hepatomegalia e, às vezes, hiperplasia linfóide (Bishop et al. 1994).

O grupo inoculado com a cepa S19, quanto à recuperação bacteriana, apresentou queda mais rápida de persistência quando comparado aos demais grupos. Contudo esse comportamento não foi o mesmo para a média dos pesos dos baços dos animais inoculados, neste caso o grupo inoculado com a cepa selvagem S2308 foi o que apresentou linha de tendência com queda mais rápida (Fig. 3). Em ambos os casos, e com maior precisão para o peso esplênico, o grupo inoculado com $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus* apresentou linha de tendência com comportamento semelhante ao inoculado com a cepa vacinal RB-51.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível a obtenção de cepas mutantes de *Brucella abortus* pelo *knockout* do gene *virB10* e a avaliação desta cepa em camundongos BALB/c comparando-a

com a obtida pelas cepas vacinais S19 e RB-51 e, também com a cepa selvagem S2308 de *B. abortus* revelou que o gene *virB10* é essencial para a manutenção da virulência da bactéria. Esta cepa Δ *virB10* S2308 de *B. abortus* futuramente poderá ser testada como nova cepa vacinal na busca de alternativas mais eficientes no controle da brucelose.

Agradecimentos - Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos ao Dr. Roberto Torres, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, pelo suporte na análise dos resultados.

REFERÊNCIAS

- Baldwin C.L. 2002. Immune response overview. *Vet. Microbiol.* 90: 365-366.
- Bishop G.C., Bosman P.P. & Herr S. 1994. Bovine Brucellosis. In: Coetzer J.A.N., Thomson G.R., Tustin R.C. *Infectious diseases of livestock*. Texas: University Press, College Station. 2: 1053 – 1066.
- Boschioli M.L. , Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevieille C., Liautard J.P., Ramuz M. & O'Collaghan D. 2002. The

- Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 1544-1549.
- Canavessi A.M.O., Jerome H., Gatti N.L. & Splitter G.A. 2004. The role of integrase/recombinase *xerD* and monofunctional biosynthesis peptidoglycan transglycosylase genes in the pathogenicity of *Brucella abortus* infection *in vitro* and *in vivo*. Microb Pathog. 37: 241-251.
- Celli J. & Gorvel J. 2004. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Microbiol. 7: 93-97.
- Chevillat N.F., Stevens M.G., Jesen A.E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutants strains of *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 54: 1591-1597.
- Christie P.J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. J. Bacteriol. 179: 3085-3094.
- Comerci D.J., Martinez-Lorenzo M.J., Sieira R., Gorvel J.P. & Ugalde R.A. 2001. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. Cell. Microbiol. 3: 159-168.
- Corbel M.J. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3: 213-221.
- Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J. & Rappuoli R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science. 284:1328-1333.

Das A. & Xie Y.H. 1998. Construction of transposon Tn3PHOa: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol. Microbiol.* 14: 405-414.

Ding Z., Atmakuri K. & Christie P.J. 2003. The outers and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* 11: 527-535.

Foulongne V., Bourg G., Cazevielle C., Michaux-Charachon S. & O'Collaghan D. 2000. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* 68: 1297-1303.

Hartigh A.B. Den, Sun Y-H, Sondervan D., Heuvelmans N., Reinders M.O., Ficht T.A., Tsolis R.M. 2004. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 72: 5143-5149.

Hong P.C., Tsolis R.M. & Ficht T.A. 2000. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.* 68: 4102-4107.

Kahl-McDonagh M.M. & Ficht T.A. 2006. Evaluation of Protection Afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Unmarked Deletion Mutants Exhibiting Different Rates of Clearance in BALB/c. *Infect. Immun.* 74: 4048-4057.

Lapaque N., Moryon I., Moreno E. & Gorvel J-P. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 60-66.

Miyoshi A., Rosinha G.M.S., Camargo I.L.B.C., Trant C.M.C., Cardoso F.C., Azevedo V. & Oliveira S.C. 2007. The role of the *vacB* gene in the pathogenesis of *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 9: 375-381.

Nicoletti P.L. 1989. Relationship between animal and human disease. In: E.J., Young; M.J. Corbel. (Eds). *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1989, p.41-51.

O'Collaghan D., Cazevielle C., Allardet-Servent A., Boschioli M.L., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y. & Ramuz M. 1999. A homologue of *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33: 1210-1220.

Paulley J.T., Anderson E.S. & Roop II R.M. 2007. *Brucella abortus* Requires the Heme Transporter BhuA for Maintenance of Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 75: 5248-5254.

Pavelka M.S., JR W.R.J.R. & Jacobs. 1999. Comparasion of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-Guerin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J. Bacteriol.* 181: 4780-4789.

- Pizarro-Cerdá J., Méresse S., Parton R.G., Goot G., Aola-Landa A., Lopez-Goñi I., Moreno E. & Gorvel J.P. 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non professional phagocytes. *Infect. Immun.* 66: 5711-5724.
- Poester F.P., Gonçalves V.S.P., Paixão T.A., Santos R.L., Olsen S.C., Schurig G.G. & Lage A.P. 2006. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine.* 24: 5327-5334.
- SAS Institute Inc. Statistical Analysis System User's Guide. 2005. Version 9 ed. Cary: SAS Institute, USA.
- Sieira R., Comerci D.J., Sánchez D.O. & Ugalde R.A. 2000. A homologue of operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.* 182: 4849-4855.
- Verguer J.M., Grimont F., Grimont P.A.D. & Grayon M. 1985. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 292-295.
- Watarai M., Makino S. & Shirahata T. 2002. Na essencial virulence protein of *Brucella abortus*, *virB4*, required na intact nucleoside-triphosphate-binding domain. *Microbiol.* 148: 1439-1446.
- Wu Q., Jianwu P., Turse C. & Ficht T.A. 2006. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival, *BMC. Microbiology.* 102.

Yang X., Becker T., Walters N. & Pascual D. W. 2006. Deletion of *znuA* Virulence Factor Attenuates *Brucella abortus* and Confers Protection against Wild-Type Challenge. *Infect. Immun.* 74: 3874-3879.

Quadro 1. Cepas bacterianas e vetores usados neste estudo.

Cepas e plasmídeos	Características	Fonte
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene
Cepas de <i>Brucella</i>		
<i>B. abortus</i> 2308	Cepa selvagem, lisa, virulenta	Estoque do laboratório
<i>B. abortus</i> Δ <i>virB10</i>	<i>kan^r</i> , mutante <i>virB10</i> de 2308	Este estudo
Plasmídeos		
pBlueScript® KS		Stratagene
pUC4K	ColE1, <i>Amp^r</i> , <i>kan^r</i>	
GE Healthcare		
pBlue: <i>virB10</i>	pBlueScript® KS contendo o gene <i>virB10</i>	Este estudo
pBlue: <i>virB10:kan</i>	pBlue: <i>virB10</i> contendo o gene de canamicina	Este estudo

Quadro 2. Recuperação bacteriana no baço de camundongos BALB/c inoculados com a cepa mutante *ΔvirB10* S2308 de *B. abortus*, a cepa virulenta S2308 e as cepas vacinais RB-51 e S19. Valores expressos como a média do log de UFC \pm desvio padrão.

	1ª semana	3ª semana	6ª semana
S2308	7,34 \pm 0,12	6,37 \pm 0,37	4,44 \pm 1,97
S19	7,39 \pm 0,21	6,12 \pm 0,17	1,83 \pm 2,54
RB-51	3,95 \pm 0,45	2,98 \pm 0,26	0,00 \pm 0,00
<i>ΔvirB10</i> S2308	6,29 \pm 0,24	4,42 \pm 0,24	1,43 \pm 1,25

Quadro 3. Peso esplênico dos grupos de camundongos BALB/c inoculados com a cepa mutante *ΔvirB10* S2308 de *B. abortus*, a cepa virulenta S2308 e as cepas vacinais RB-51 e S19. Valores expressos como a média do log de UFC \pm desvio padrão.

	1 ^a semana	3 ^a semana	6 ^a semana
S2308	0,70 \pm 0,09	1,06 \pm 0,15	0,44 \pm 0,11
S19	0,33 \pm 0,07	0,87 \pm 0,23	0,31 \pm 0,04
RB-51	0,15 \pm 0,01	0,19 \pm 0,03	0,20 \pm 0,01
<i>ΔvirB10</i> S2308	0,18 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,19 \pm 0,03

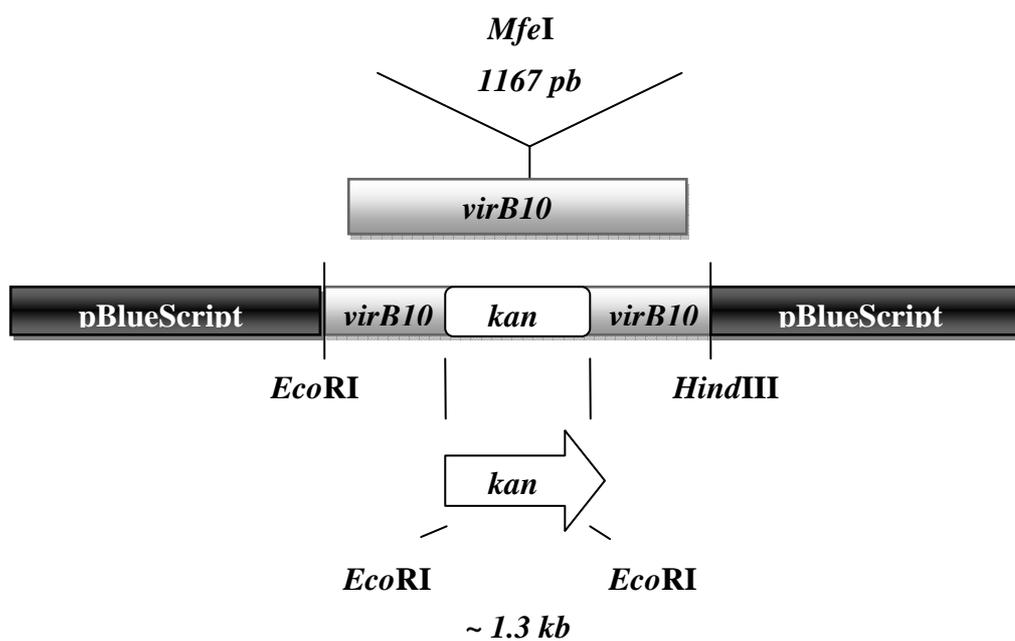


Figura 1: Representação esquemática do plasmídeo suicida pBlue:*virB10* contendo o gene de canamicina interrompendo o gene *virB10*.

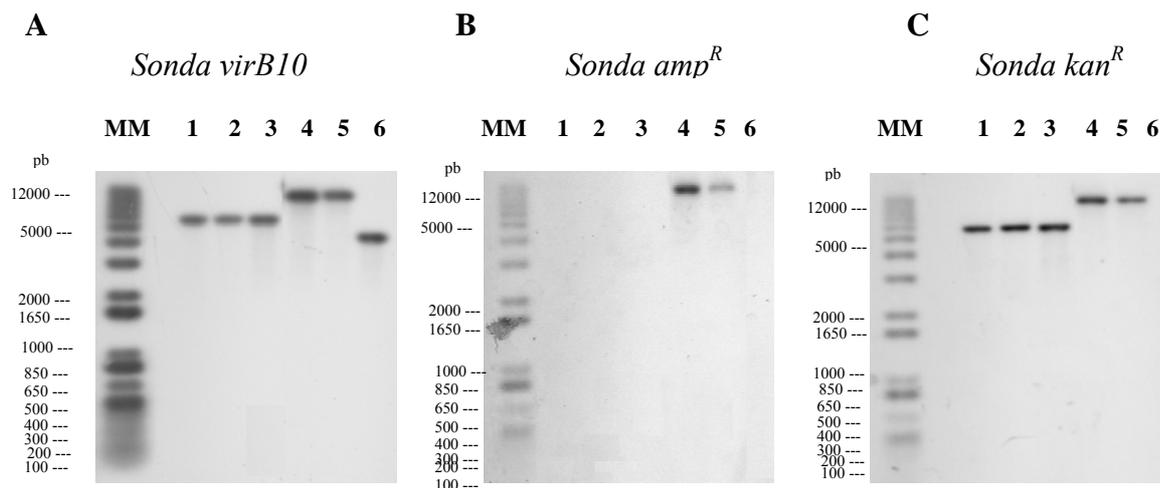


Figura 2: Caracterização de *B. abortus* $\Delta virB10$ pela análise de *Southern blot*. O DNA genômico das cepas S2308 e $\Delta virB10$ S2308 de *B. abortus* foi hibridizado com as sondas para os genes *virB10* (A), *amp^R* (B) e *kan^R* (C). Coluna MM corresponde ao marcador molecular de pares de base (1 Kb plus DNA Ladder, Invitrogen); colunas 1, 2 e 3 correspondem aos clones *B. abortus* $\Delta virB10$; colunas 4 e 5 correspondem aos clones que passaram por recombinação homóloga simples; coluna 6 corresponde a *B. abortus* S2308.

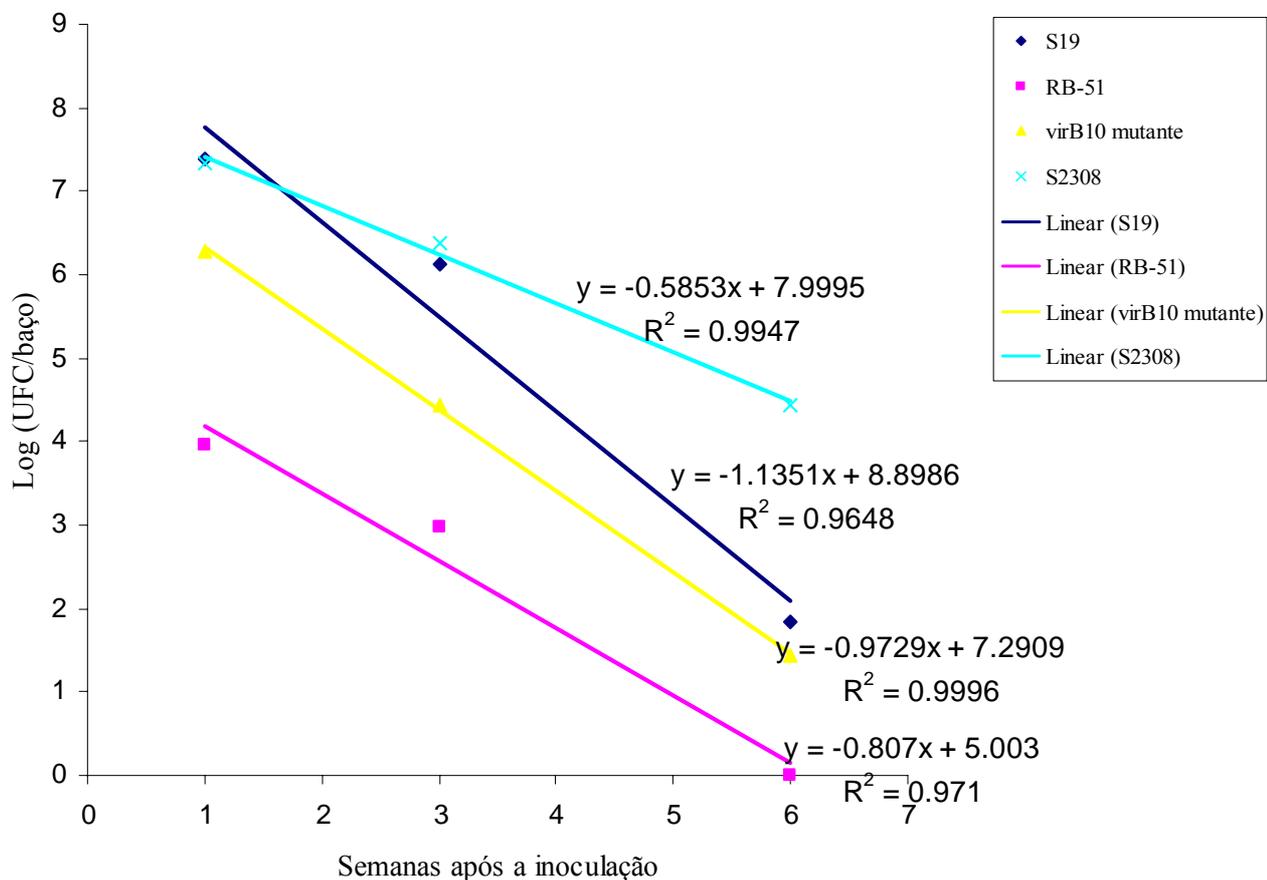


Figura 3: Tendência de recuperação das cepas *Brucella abortus* 2308 selvagem, cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa mutante $\Delta virB10$ de *B. abortus* S2308 no baço de camundongos BALB/c infectados uma, três e seis semanas após a inoculação. Os pontos no gráfico correspondem as médias dos grupos em cada intervalo de tempo analisado.

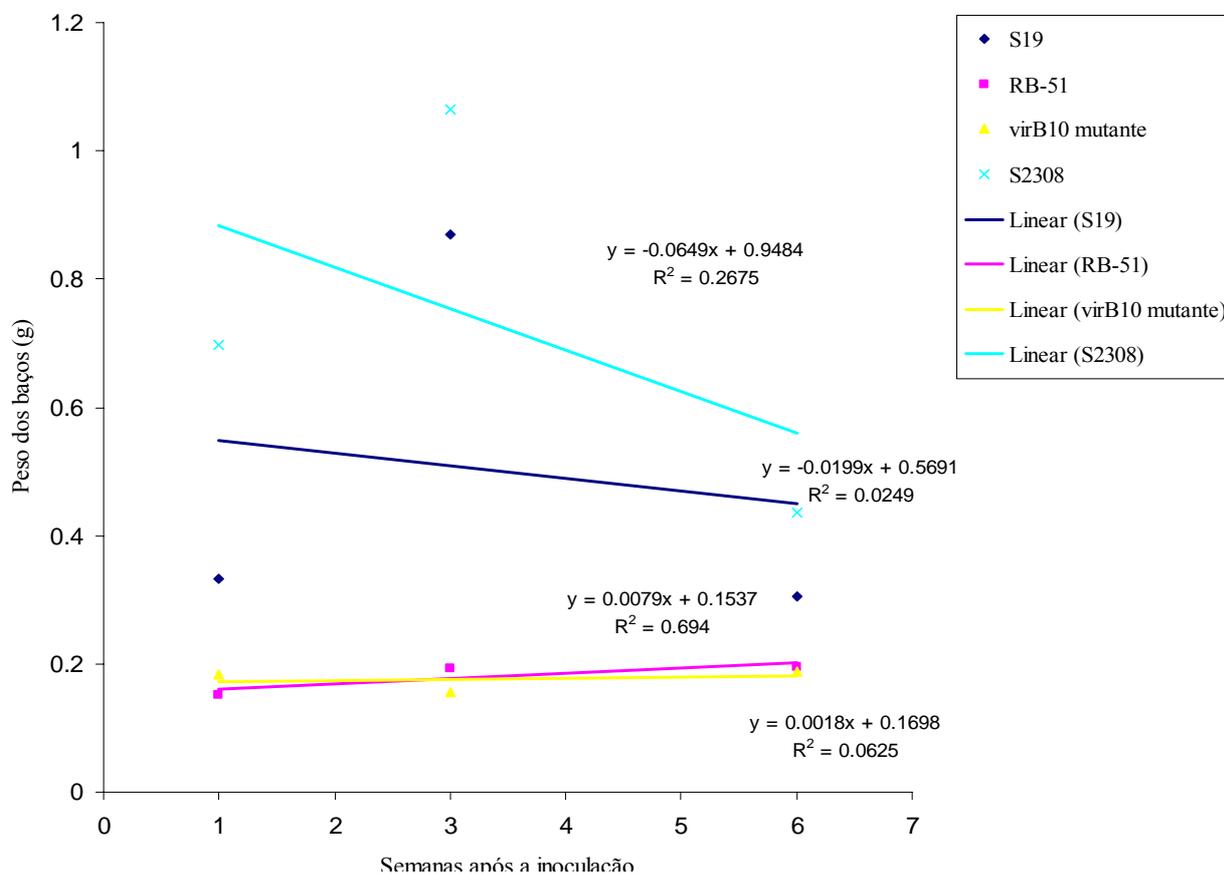


Figura 4: Tendência de peso esplênico das cepas *Brucella abortus* S2308 selvagem, cepas vacinais S19 e RB-51 e, a cepa mutante $\Delta virB10$ de *B. abortus* S2308 no baço de camundongos BALB/c infectados uma, três e seis semanas após a inoculação. Os pontos no gráfico correspondem as médias dos grupos em cada intervalo de tempo analisado.

ANEXO A – Certificado de aprovação concedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 204/2009 da Mestranda Fabiane Gonçalves de Souza, sob a Orientação da Prof^a Ana Luiza Alves Rosa Osório, referente ao projeto de pesquisa **“Desenvolvimento e avaliação de uma nova cepa vacinal geneticamente modificada de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene virB10”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 16 de fevereiro de 2009.

Campo Grande (MS), 16 de fevereiro de 2009.



Dr^a Joice Steir

Presidente da CEUA em exercício