

Thaís Lourdes Santos Lacerda

Estudo do envolvimento da enzima formil-transferase na biossíntese do LPS *da Brucella abortus* e avaliação da persistência e proteção de uma linhagem mutante para este gene em camundongos C57BL/6 e deficientes para IRF-1.

Belo Horizonte
Agosto, 2006

Thaís Lourdes Santos Lacerda

Estudo do envolvimento da enzima formil-transferase, codificada pelo gene *wbkC*, na biossíntese do LPS da *Brucella abortus* e avaliação da persistência e proteção de uma linhagem mutante para este gene em camundongos C57BL/6 e deficientes para IRF-1.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Sérgio Costa Oliveira

Belo Horizonte
Agosto, 2006

"Tanto na vida dos homens, como nos processos históricos, assim como nos processos da natureza, há momentos que caracterizam toda uma época ou dão relevo de imponderável valor à culminação de uma grande etapa. São esses momentos que, com caracteres eternos, se fixam na mente universal".

Carlos Bernardo González Pecotche

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado me guiando.

Ao Professor Sérgio, por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação e amizade.

A Dr^a Patrícia, pelo ótimo trabalho realizado nesse projeto, pelos ensinamentos e amizade.

Às Dr^{as}. Daniela Afonso e Ilana Camargo, minhas co-orientadoras de coração, por terem trabalhado muito para o sucesso deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos, pelas divertidas horas do trio D.T.I., pelo carinho e amizade.

A Cyntia, por todos ensinamentos sobre *Brucella*, camundongos e “baceração”. Pela enorme ajuda com a dissertação, pelo carinho e amizade.

Ao Gilson, pela grande ajuda nos experimentos com camundongos, pelas piadas diárias e pela amizade.

Aos demais componentes da “turma do mal” do L.I.D.I., Natália, Cíntia, Leonardo, Diogo e Narciso pelo companheirismo e amizade.

A todos os componentes da “turma do bem” do L.I.D.I, Lucila, Kika, Michele, Teresa, Fernanda, Júlia, Maurício, Fábio, Jean, Kenyon e Danielle pelo pela ótima convivência em laboratório e amizade.

A Sandra, pelo carinho, apoio, por garantir um bom funcionamento do ambiente de trabalho e pelo ensinamento de que “o usuário é fundamental”.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, por terem lutado para que eu pudesse chegar até aqui, pelo apoio em todos os momentos, por serem meu porto seguro. Esta conquista também é de vocês!

A minha irmã, Isabella, pelo carinho, amizade e apoio.

Às minhas irmãs de coração, Fernanda, Luciana e Hebréia pelo apoio e amizade, sempre.

Aos meus avós, vô João, vó Lourdes e vó Lurdinha, pelo exemplo de vida e determinação, pelo enorme carinho e por manterem a união de nossas famílias.

A todos familiares e amigos que me acompanharam em mais esta etapa, pelo seu apoio.

A todos os amigos da turma de bases.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada!

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A descoberta do patógeno	01
1.2. O gênero <i>Brucella</i>	01
1.3. A brucelose	03
1.4. Fatores de virulência do gênero <i>Brucella</i>	05
1.4.1. O lipopolissacarídeo (LPS)	06
1.4.1.1. A biossíntese do LPS	08
1.4.2. VirB	10
1.5. Patogênese	11
1.5.1. A entrada da <i>Brucella</i> na célula hospedeira	11
1.6. A resposta imune na brucelose	14
1.6.1. A resposta imune inata	14
1.6.2. A resposta imune adquirida	15
1.7. Vacinas contra a brucelose	16
1.8. Modelo animal para avaliação de linhagens mutantes	18
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Linhagens bacterianas	20
3.2. Meios e condições de cultivo	20
3.3. Vetores	21

3.4. Tampões, soluções e enzimas de restrição	21
3.5. Obtenção de DNA genômico da <i>Brucella abortus</i>	22
3.6. Amplificação do gene <i>wbkC</i>	23
3.7. Clonagem do gene <i>wbkC</i> no plasmídeo pBluescript-KS(+)	24
3.8. Obtenção do gene de resistência a canamicina (Kan)	26
3.9. Clonagem do gene que codifica resistência a canamicina no vetor pBluescript: <i>wbkC</i> .	27
3.10. Preparação de células eletrocompetentes da <i>B. abortus</i> S2308 e <i>B. abortus</i> S19	28
3.11. Eletroporação da <i>B. abortus</i> S2308 e <i>B. abortus</i> S19 eletrocompetentes com o plasmídeo pBluescript: <i>wbkC</i> : kan e seleção dos transformantes	28
3.12. Caracterização molecular dos mutantes	29
3.12.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
3.12.2. Isolamento e digestão do DNA genômico e transferência para membrana de nitrocelulose	29
3.12.3. Construção das sondas	30
3.12.4. Marcação das sondas e hibridização das membranas	30
3.13. Caracterização morfológica dos mutantes	31
3.14. Caracterização do tipo de LPS presente nas linhagens mutantes através de <i>immunoblotting</i>	32
3.15. Experimentos <i>in vivo</i>	33
3.15.1. Animais utilizados	33
3.15.2. Determinação da persistência em camundongos C57BL/6	33
3.15.3. Determinação da virulência em camundongos IRF-1 ^(-/-) .	34
3.15.4. Avaliação do nível de imunoproteção induzida em camundongos IRF-1 ^(-/-) .	34
3.16. Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Obtenção do plasmídeo para a deleção do gene <i>wbkC</i>	36
4.1.1. Amplificação da seqüência completa do gene <i>wbkC</i> da <i>B. abortus</i>	36

4.1.2. Clonagem do gene <i>wbkC</i> no plasmídeo pBluescript-KS(+)	37
4.1.3. Inserção do gene que confere resistência à canamicina no vetor pBluescript: <i>wbkC</i>	39
4.2. Obtenção e seleção do mutante da <i>B. abortus</i> para o gene <i>wbkC</i> por recombinação homóloga dupla	41
4.3. Caracterização molecular dos mutantes de <i>B. abortus</i> para o gene <i>wbkC</i>	43
4.4. Caracterização do antígeno-O dos mutantes da <i>B. abortus</i> para o gene <i>wbkC</i> .	46
4.5. Experimentos <i>in vivo</i>	48
4.5.1-Avaliação da persistência das linhagens mutantes <i>B. abortus</i> Δ <i>wbkC</i> S2308 e <i>B. abortus</i> Δ <i>wbkC</i> S19 em camundongos C57BL/6	48
4.5.2. Avaliação da virulência das linhagens mutantes <i>B. abortus</i> Δ <i>wbkC</i> S2308 e <i>B. abortus</i> Δ <i>wbkC</i> S19 em camundongos imunodeficientes IRF-1 ^(-/-)	50
4.5.3. Imunoproteção induzida em camundongos IRF-1 ^(-/-) vacinados com as linhagens mutantes após desafio com a linhagem virulenta <i>B. abortus</i> S2308.	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	59
7. PERSPECTIVAS	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

μ F – micro faraday

μ g - micrograma

μ L – microlitro

° C – graus Celsius

BB - meio de cultura Brucella Broth

D.O.₆₀₀ – Densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm

D.P.- Desvio padrão

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeo 5' monofostato

ELISA- ensaio de absorção imunoenzimático

IL- 12 p 40- subunidade 40 da interleucina 12

INF- γ - interferon gama

IRF- fator regulador de interferon

Kb – kilobase

LB – Meio Luria Bertani

LPS – lipopolissacarídeo

mA – mili Ampere

mg – miligramas

mM – milimolar

ng – nanograma

nm – nanômetros

ORF – janela aberta de leitura

pb – pares de bases

PBS – tampão salina fosfato

PCR - reação em cadeia da polimerase

pmol – picomol

Rpm – rotações por minuto

T₄ DNA ligase- DNA ligase do bacteriófago T₄

Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

U – unidade

UFC – unidade formadora de colônia

UV – radiação ultravioleta

V – volt

W – watt

WHO – Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fontes de infecção ao homem no gênero <i>Brucella</i>	02
Figura 2 - Incidência mundial da infecção pela <i>B. abortus</i> .	04
Figura 3 - Representação esquemática dos LPS da <i>Brucella</i> e <i>E. coli</i> .	06
Figura 4 - Região do cromossomo I de <i>B. abortus</i> na ORF 1429 que consiste de genes envolvidos na síntese do LPS da <i>Brucella</i> .	09
Figura 5- Via de biossíntese proposta para o GDP-4-formamido-4,6, dideoximannose.	10
Figura 6 - Modelo da interação entre <i>B. abortus</i> e as moléculas associadas ao microdomínio de lipídio e a formação do fagossomo replicativo na célula do hospedeiro.	13
Figura 7-Mapa do vetor pBluescript- II KS+	24
Figura 8- Mapa do vetor pUC4K	26
Figura 9 - Gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do gene <i>wbkC</i>	36
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8% demonstrando a análise da clonagem da ORF do gene <i>wbkC</i> no vetor pBluescript-KS(+).	37
Figura 11 - Seqüência de nucleotídeos da ORF do gene <i>wbkC</i> .	38
Figura 12 - Mapa do plasmídeo pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan	39
Figura 13 - Gel de agarose a 0,8% demonstrando a confirmação da construção do vetor pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan.	40
Figura 14 - Esquema dos possíveis eventos de recombinação homóloga entre o genoma da <i>B. abortus</i> e o plasmídeo pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan	42
Figura 15 - Esquema de cultivo das bactérias transformantes em meios seletivos.	43
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8% demonstrando a confirmação por PCR da presença do gene <i>wbkC</i> interrompido pelo gene de resistência à canamicina nos mutantes obtidos.	44
Figura 17 - <i>Southern blot</i> em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação dos mutantes para o gene <i>wbkC</i> .	46
Figura 18 - Caracterização morfológica das colônias pelo método do cristal violeta.	47

Figura 19 - *Immunoblotting* em membrana de nitrocelulose demonstrando a 48
confirmação do LPS rugoso dos mutantes para o gene *wbkC*.

Figura 20 - Persistência das cepas mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* 49
 $\Delta wbkC$ S19 em camundongos C57BL/6.

Figura 21 – Nível de virulência das cepas *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308, *B. abortus* 51
 $\Delta wbkC$ S19, *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 e RB51 em camundongos
IRF-1^(-/-)

Figura 22: Persistência das cepas mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* 52
 $\Delta wbkC$ S19 em camundongos IRF-1^(-/-).

Figura 23 - Proteção de camundongos IRF-1^(-/-) contra o desafio com a cepa 53
virulenta S2308 da *B. abortus* após imunização com as cepas mutantes e vacinais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas bacterianas utilizadas neste trabalho.	20
Tabela 2: Vetores utilizados neste trabalho.	21
Tabela 3: Enzimas utilizadas neste trabalho.	21
Tabela 4: Sondas utilizadas no <i>Southern blot</i>	30

RESUMO

Brucella abortus é uma bactéria intracelular facultativa, Gram-negativa, que infecta animais domésticos e o homem, causando a brucelose. O LPS presente em sua membrana é um dos principais fatores de virulência. Esta estrutura determina a morfologia das colônias que podem ser lisas ou rugosas. Este trabalho tem como objetivo a inativação do gene *wbkC*, que codifica uma enzima formiltransferase envolvida na biossíntese do LPS, das linhagens selvagem e vacinal da *B. abortus* visando o desenvolvimento de uma nova cepa vacinal. Por recombinação homóloga dupla foram obtidos os mutantes *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 e *B. abortus* Δ *wbkC* S19. A confirmação da mutação no gene *wbkC* foi avaliada pelas técnicas de PCR e *Southern blot*. As colônias destes mutantes apresentaram morfologia rugosa quando coradas com cristal violeta. Através da técnica de *immunoblotting* utilizando anticorpo específico para o LPS rugoso, o LPS das cepas mutantes foi reconhecido, porém com um padrão de bandas diferenciado do LPS liso das cepas parentais. Os mutantes obtidos foram avaliados em modelos animais em camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes para o gene que codifica o fator regulador de interferon do tipo 1 (IRF-1^(-/-)). As cepas mutantes da *B. abortus* apresentaram uma menor persistência quando comparadas com as cepas parentais *B. abortus* S2308 e S19, e uma virulência bastante semelhante à cepa vacinal RB51. A capacidade dos mutantes conferirem proteção ao desafio com a cepa selvagem *B. abortus* S2308 também foi avaliada. *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 induziu uma proteção em camundongos IRF-1^(-/-) semelhante à observada naqueles animais vacinados com as cepas vacinais *B. abortus* S19 e RB51. Pode-se concluir que os mutantes da *B. abortus* para o gene *wbkC* apresentaram reduzida virulência quando comparados às linhagens selvagem e vacinais. Além disso, o mutante *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 induziu uma proteção em camundongos IRF-1^(-/-) semelhante às cepas vacinais mostrando-se ser um candidato em potencial para compor uma vacina viva contra a brucelose.

ABSTRACT

Brucella abortus is a Gram-negative facultative intracellular pathogen that affects several domestic animals and occasionally man, causing brucellosis. *Brucella* LPS is one of the main virulence factors of this bacterium. Additionally, the *wbkC* gene product, the focus of this study, participates in LPS biosynthesis as a formyltransferase enzyme. Alterations in *wbkC* may cause modifications in LPS structure altering bacterial colony morphology from smooth (S) to rough (R). The main goal of this study was to inactivate the *wbkC* gene of the *B. abortus* wild type and vaccine strains in order to generate a new vaccine strain. Mutants *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 and *B. abortus* Δ *wbkC* S19 were obtained by double homologous recombination. Characterization of these mutants was performed by PCR using specific primers. Southern blot confirmed that the wild type *wbkC* gene was disrupted within *Brucella* mutants. Morphology of mutant colonies presented rough phenotype demonstrated by crystal violet staining. Immunoblotting analysis of *Brucella* mutants was performed and their LPS were recognized by rough LPS specific monoclonal antibodies. Persistence of the mutants were studied in both murine models: IRF^(-/-) and C57BL/6. *Brucella wbkC* mutants were shown to be less virulent than wild type and *B. abortus* S19 strains and similar phenotype to *B. abortus* RB51 strain. Regarding protective immunity, the mutant *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 strain was able to induce similar protection when compared to S19 and RB51 vaccine strains in IRF^(-/-) mice. In conclusion, *wbkC* mutants were less virulent than the wild type and vaccine strains, but only *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 induced similar protection level as induced by the vaccine strains commercially available. This data suggests that *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 is a potential candidate for the development of a live vaccine against brucellosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A descoberta do patógeno

Em 1887, na Ilha de Malta, David Bruce isolou pela primeira vez o microrganismo que causava uma doença difícil de diferenciar clinicamente de outras febres endêmicas existentes no litoral Mediterrâneo. Este microrganismo ocasionava uma grande debilidade física e levava a morte alguns soldados ingleses residentes na ilha. O agente etiológico foi denominado *Micrococcus melitensis*, uma bactéria, que posteriormente verificou-se que a sua transmissão se dava através do consumo de leite de cabras contaminadas (Bruce, 1887).

Em 1895, foi isolado de tecidos provenientes de um caso de aborto bovino, um pequeno cocobacilo Gram-negativo, que seu descobridor, Berhard Bang denominou *Bacillus abortus*. Com o estudo destes dois organismos, verificou-se o grande parentesco entre estes dois patógenos e decidiu-se homenagear o descobridor deste gênero, denominando-o de "*Brucella*" (Meyer, 1990).

1.2. O gênero *Brucella*

O gênero *Brucella* é constituído por pequenos cocobacilos Gram-negativos, sem motilidade, sem flagelos, que não secretam toxinas (Crawford et al, 1990). Não são capazes de encapsular e nem de esporular (Corbel & Morgan, 1984). As bactérias são muito resistentes às intempéries ambientais e podem sobreviver a grandes períodos no meio ambiente (Crawford et al., 1990). Seu crescimento é aeróbio, mas algumas espécies necessitam de uma atmosfera com adição de 5 a 10 % de CO₂. Crescem bem a 37 °C, em meio rico, com pH entre 6,6 a 7,4. As colônias tornam-se visíveis em meio sólido em dois ou três dias podendo se apresentar sob a forma lisa ou rugosa, dependendo da linhagem, medindo entre 3 e 4 mm de diâmetro (Alton et al., 1988). Assim como outras bactérias Gram-negativas, possui uma membrana celular externa composta de lipopolissacarídeos (LPS), que é considerado o principal fator de virulência deste gênero (Martin & Hancock, 1990).

Atualmente a taxonomia do gênero *Brucella* vem sendo revista e novas espécies vêm sendo descobertas, mas classicamente o gênero se divide em seis espécies, baseado em características metabólicas e bioquímicas. Estas espécies apresentam preferência por diferentes hospedeiros. As espécies são: *Brucella abortus*, isolada de bovinos; *Brucella melitensis*, isolada de caprinos; *Brucella ovis*, isolada de ovinos; *Brucella suis*, isolada de suínos; *Brucella canis*, isolada de caninos e *Brucella neotomae* que foi isolada de um rato do deserto Norte americano (Freney et al., 2000). Recentemente foi proposta a inclusão de duas novas espécies a este gênero, *Brucella cetaceae* e *Brucella pinnipediae* isoladas de mamíferos marinhos, *cetaceans* e *pinnipeds*, respectivamente; ampliando a escala ecológica e a importância deste gênero como zoonose (Clockaert et al., 2001 e 2003;).

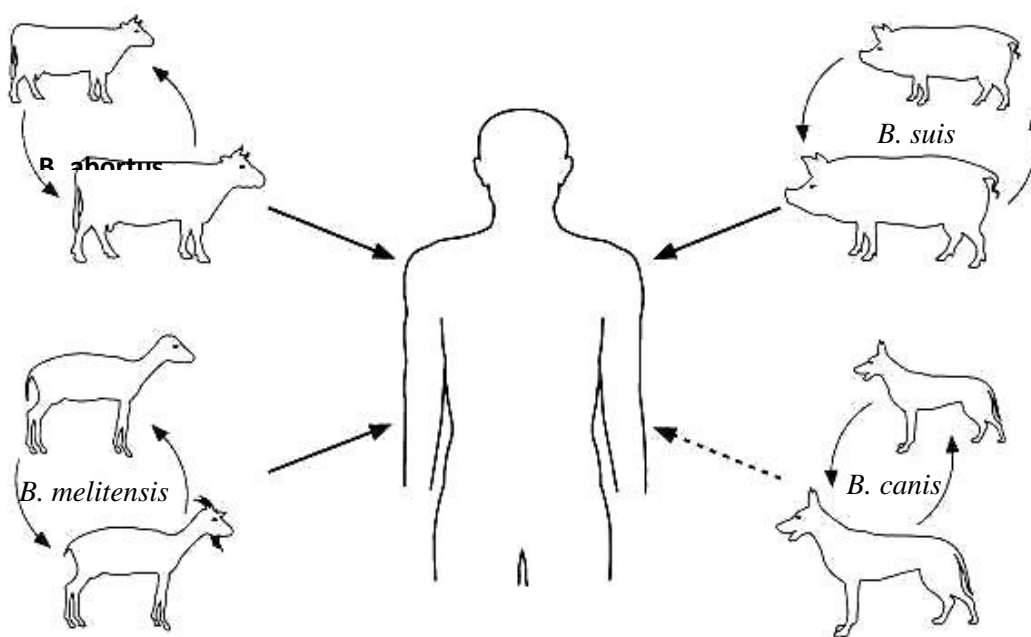


Figura 1 - Fontes de infecção ao homem no gênero *Brucella*

Apenas três espécies apresentam risco de infecção ao homem: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis* (Corbel, 1997). Existem alguns casos descritos na literatura de infecção humana originada por *Brucella canis*, mas a incidência ainda é relativamente baixa (Carmichael, 1990) (Figura 1). A espécie mais patôgena para o

homem é a *Brucella melitensis*, mas a *Brucella abortus* é a mais difundida mundialmente (Corbel, 1997).

O gênero apresenta uma alta similaridade de seqüência entre ácidos nucléicos, tendo uma homologia de 95% em estudos de hibridização DNA-DNA (Verger et al., 1985). O genoma é rico em nucleotídeos G+C, tendo uma proporção em média de 56% a 58% (Smith & Ficht, 1990). O genoma é composto por dois cromossomos circulares, geralmente de cromossomo I (2,1Mb) e cromossomo II (1,15 Mb). Com o sequenciamento completo do genoma da linhagem *B. abortus* 9-941, verificou-se que a maioria dos genes essenciais estão localizados no cromossomo I (Halling et al., 2005). Não há descrição de troca gênica no gênero *Brucella* (Vizcaino et al., 2000).

O sequenciamento do rRNA 16s tem auxiliado na definição de relações filogenéticas da *Brucella*. Baseado na análise destas seqüências 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 a *Rickettsia* (Ugalde, 1999).

1.3. A brucelose

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*, que infectam o homem e animais domésticos (Nicoletti, 1989). Esta enfermidade traz preocupações: sanitárias, devido à sua possibilidade de transmissão ao homem, e econômicas, devido à diminuição na produtividade animal em consequência desta doença (Freney et al., 2000). A brucelose é adquirida principalmente através do contato com animais infectados ou através do consumo de leite e seus derivados contaminados (Nicoletti, 1989). A contaminação direta por contato cutâneo-mucoso é a forma de infecção mais freqüente (75% dos casos) enquanto que a contaminação digestiva (25% dos casos) é dividida essencialmente no consumo de leite e derivados contaminados e raramente pelo consumo de carne contaminada (Freney et al., 2000). Em humanos, a brucelose causa febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas, enquanto nos animais

domésticos afeta principalmente os órgãos reprodutivos, causando aborto e infertilidade temporária (Young, 1988).

A distribuição geográfica da brucelose é bastante ampla (Figura 2), apesar de alguns países já terem erradicado a doença, como o Canadá, Japão, Austrália, Inglaterra e Dinamarca. A principal incidência da doença ocorre na região do Mediterrâneo, Arábia Saudita, alguns países da Europa, África, Ásia e América Latina (Corbel, 1997).

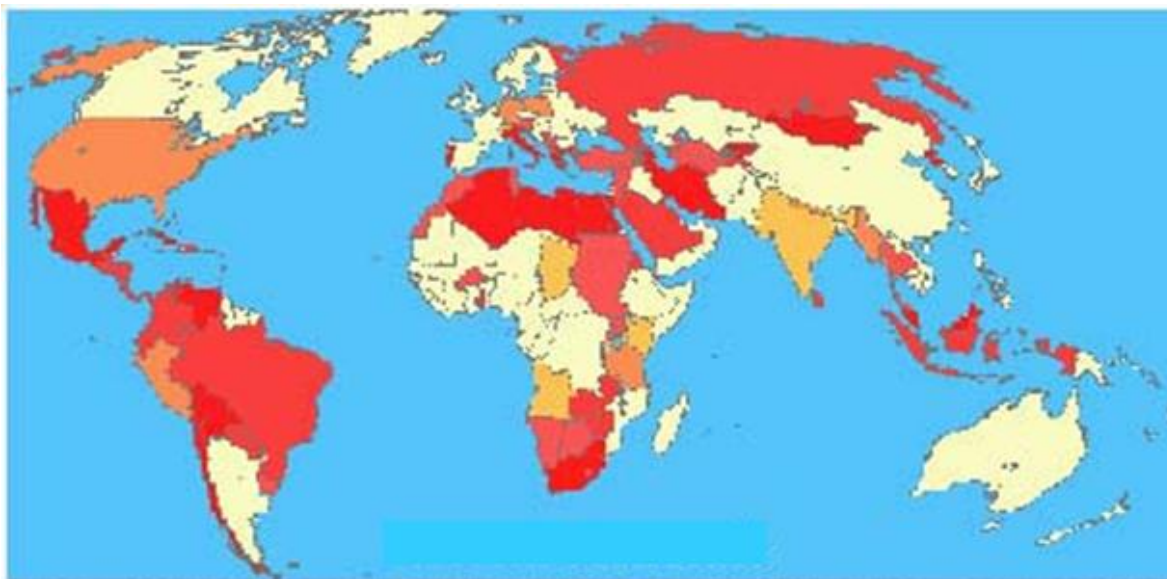


Figura 2 - Incidência mundial da infecção pela *B. abortus*. No mapa as áreas em vermelho indicam regiões onde há alta incidência da brucelose e as áreas em amarelo indicam regiões de baixa incidência

No Brasil, a brucelose ocorre em todo o território nacional, principalmente a brucelose bovina, por ser esta espécie animal a mais difundida e com maior expressão econômica no país. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o número de casos de brucelose bovina no Brasil cresceu de aproximadamente 13.000 casos em 2000 para aproximadamente 80.000 casos em 2004. Isto é extremamente importante para Minas Gerais, já que este estado é o maior detentor do rebanho leiteiro no país. Além da possível contaminação dos consumidores de produtos de origem animal, a brucelose pode causar até 20% de perda da produtividade em rebanhos bovinos e tornar a carne, leite e seus derivados vulneráveis a barreiras sanitárias no mercado internacional, causando um prejuízo de 32 milhões de dólares ao ano para a economia brasileira (Poester, 2002).

Existem vários métodos para o diagnóstico da brucelose, sendo o método bacteriológico o mais eficiente, o qual é realizado através da cultura de sangue ou tecidos de animais ou indivíduos infectados. Os métodos sorológicos, baseados na reação antígeno-anticorpo são largamente utilizados, como os ensaios de ELISA e de soro-aglutinação (Alton et al., 1988).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano são diagnosticados cerca de 500 mil casos de brucelose humana, no mundo (Poester, 2002). A prevenção da brucelose no homem depende até o momento da erradicação ou controle da doença no animal hospedeiro, uma vez que não existe uma vacina para humanos para o controle desta enfermidade.

1.4. Fatores de virulência no gênero *Brucella*

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 da *B. abortus* no interior das células fagocíticas do hospedeiro, como: a produção de enzimas que protegem a bactéria da destruição oxidativa; a produção de enzimas que impedem a fusão fagossomo/lisossomo; e a secreção de 5'-guanosina monofosfato (GMP) e adenosina, inibindo a ação bactericida da mieloperoxidase-H₂O₂ (Tatum et al., 1992).

Aparentemente, a especificidade por determinado hospedeiro pode ser resultado da expressão diferencial de genes que contribuem para a virulência de cada espécie. Estas alterações podem constituir respostas adaptativas às condições presentes em cada hospedeiro (Smith & Ficht, 1990).

Até o momento, não foi evidenciada a produção de toxinas no gênero *Brucella* semelhantes àquelas produzidas pelos demais microrganismos, tais como *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium botulinum* e *C. tetani* (Smith & Ficht, 1990).

A identificação dos genes responsáveis pelos diferentes mecanismos de virulência e patogenicidade utilizados pela *Brucella* é fundamental para o entendimento de como este patógeno causa a doença.

1.4.1. O lipopolissacarídeo (LPS)

Grande importância tem sido atribuída ao lipopolissacarídeo (LPS), que é o principal constituinte da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, como o principal fator de virulência da *Brucella*. Observando a estrutura do LPS da *Brucella* verificou-se que esta possui um LPS peculiar, denominado “não clássico”, quando comparado com o LPS de enterobactérias tais como *E. coli*. O lipídeo A da *B. abortus* possui uma cadeia de diaminoglicose ao invés de glucosamino, os grupos acil são mais longos (C18- C19, C28 ao contrário de C12 e C14) e somente estão ligados ao *core* através de ligações amida (ao contrário de ligações éster e amida) (Moriyon et al., 2003) (Figura 3).

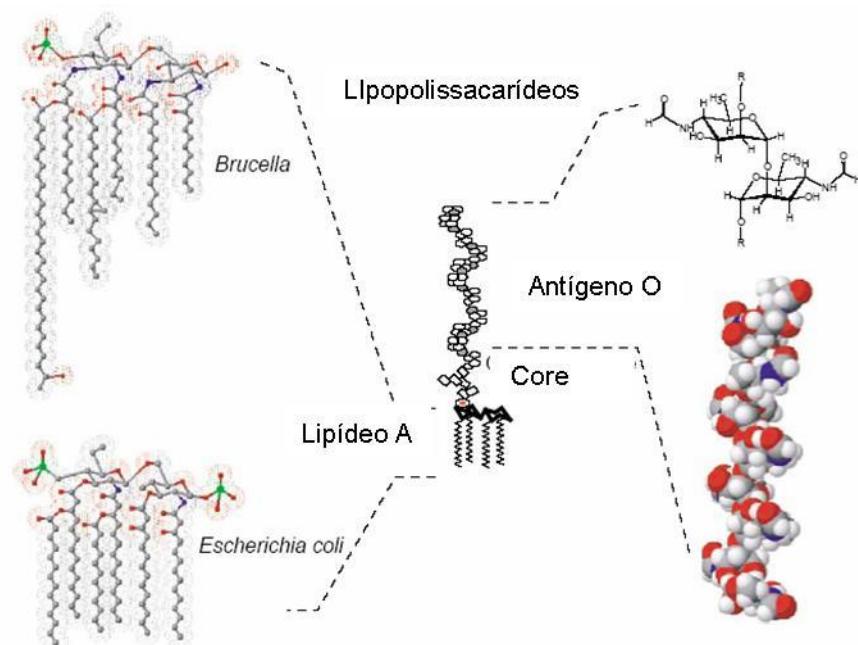


Figura 3: Representação esquemática dos LPS da *Brucella* e *E. coli*.

Adaptado de Lapaque et al. (2005).

Estas propriedades conferem ao LPS da *Brucella* uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação por macrófagos e proteção contra respostas imunológicas (Forestier et al., 2000). Juntas, estas características constituem mecanismos chave de virulência para sobrevivência intracelular e replicação da *Brucella*.

O LPS é responsável pela morfologia das colônias lisa ou rugosa das linhagens desse gênero (Godfroid et al., 1998). As linhagens de colônias lisas apresentam a molécula de LPS completa, ou seja, composta por três domínios: uma porção imuno-dominante externa, chamada de antígeno-O; o núcleo de oligossacarídeos; e a porção glicolipídica interna, chamada de lipídio A (Godfroid et al., 1998). O antígeno-O é composto de homopolímeros de 4,6 dideoxi 4-formamida- α -D-mamipiranosil, cujo grau de polimerização varia de 96 a 100 unidades. O lipídio A é composto de glicosamina, ácido N-tetradecanóico, ácido N-hexadecanóico, ácido 3-hidroxitetradecanóico e ácido 3-hidroxi-hexadecanóico (Ugalde et al., 2000).

As linhagens de colônias rugosas contêm a molécula de LPS incompleta, uma vez que não possui o antígeno O, que é responsável pela proteção contra agentes hidrofóbicos, protege da lise mediada pelo complemento e confere resistência a morte por grânulos microbicidas intracelulares de leucócios polimorfonucleares (Godfroid et al., 1998). Provavelmente, estas são algumas das principais razões pelas quais as linhagens rugosas têm um fenótipo avirulento em modelos animais.

Nas espécies patogênicas lisas da *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*), o antígeno-O do LPS tem sido descrito como um importante fator de virulência. Esta proposição é baseada na observação que as linhagens lisas sobrevivem e replicam nos animais e em cultura de macrófagos com mais eficiência do que os mutantes rugosos (Kreutzer & Robertson, 1979). Entretanto, sabe-se que *B. ovis* e *B. canis*, as quais são naturalmente rugosas, mostram-se completamente virulentas nos seus hospedeiros naturais, indicando que o antígeno-O do LPS não é o único fator necessário para a virulência da *Brucella* (Smith & Ficht, 1990). Com certeza, existem outras moléculas que funcionam como fatores de virulência e que são responsáveis pela sobrevivência da *Brucella* no interior das células do hospedeiro (Ugalde, 1999).

1.4.1.1. A biossíntese do LPS

Os caminhos bioquímicos da biossíntese do LPS em *Brucella* não estão totalmente elucidados, mas as evidências genéticas disponíveis são bastante consistentes com mecanismos similares aos existentes em algumas das bactérias Gram-negativas mais estudadas, como por exemplo a *E. coli* (Godfroid et al., 2000; Keenleyside et al., 1999).

Primeiramente, o lipídeo A é sintetizado na face interna da membrana citoplasmática. Depois, através da ação seqüencial de glicosiltransferases, açúcares são adicionados ao lipídeo A até que o centro oligossacarídico (*core*) esteja completo. Estes dois passos estão interligados, visto que dois resíduos de 3-deoxi-D-mano-2-octulosonato, que compõe o *core*, são adicionados antes do término da síntese do lipídeo A. Já o antígeno-O é sintetizado em uma via independente e, uma vez que a sua biossíntese é concluída, a cadeia-O é ligada ao açúcar receptor presente no lipídeo A-*core* já completo.

São conhecidos três mecanismos de síntese do antígeno-O, e o mecanismo que ocorre em *Brucella* é do tipo dependente de transportador-ABC. Nesta via, um carreador lipídico presente no lado citoplasmático da membrana é ligado a um amino-açúcar pela proteína WecA. Unidades de açúcar são inseridas sucessivamente na extremidade não redutora deste amino-açúcar por glicosiltransferases. Então, proteínas ABC transportam o amino-açúcar ligado ao antígeno-O para o lado periplasmático da membrana, onde uma ligase (WaaL) o ligará ao lipídeo A-*core* já sintetizados (Godfroid et al., 2000).

A nomenclatura mais recente para genes que codificam enzimas da biossíntese do LPS (Reeves et al., 1996) utiliza quatro letras: (i), *lpx** para aqueles envolvidos nas etapas iniciais da síntese do lipídeo A; (ii), *wa*** para aqueles genes envolvidos nas etapas finais da síntese do lipídeo A, na síntese do *core* e na ligação do amino-açúcar/antígeno-O com o lipídeo A-*core*; (iii), *wb*** para aqueles envolvidos na síntese do antígeno O e (iv), *wz*** para aqueles envolvidos no processamento do antígeno-O.

Pelo menos dezesseis genes tiveram seu envolvimento comprovado com a síntese do LPS de *Brucella* pela análise dos mutantes correspondentes e, assim como em muitas bactérias, a maioria dos genes envolvidos na biossíntese do antígeno-O se encontram em grupamentos gênicos, como por exemplo a região *wbk* (Figura 4) (Moriyón et al, 2004).

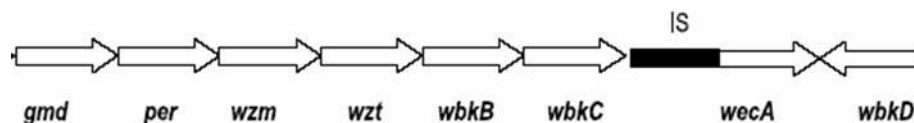


Figura 4 Região do cromossomo I de *B. abortus* que consiste de genes envolvidos na síntese do LPS da *Brucella*.

Tentando contornar os problemas existentes nas vacinas comercialmente disponíveis, principalmente o problema da interferência no diagnóstico da brucelose em animais vacinados, foram desenvolvidas linhagens rugosas mutantes.

Mutações nos genes envolvidos na biossíntese do antígeno-O, podem levar a diversas alterações na estrutura do LPS, resultando em mutantes rugosos. Vários destes mutantes já foram descritos e testados como vacinas (Moriyón et al., 2004).

Os mutantes *B. abortus* 2.17 e *B. abortus* 9.49, por exemplo, foram obtidos da linhagem *B. abortus* S2308 através de mutagênese por transposon nos genes *wbka* e *per* respectivamente. Estes genes codificam uma glicosiltransferase e uma perosamino sintetase, respectivamente; que atuam na via de biossíntese do antígeno-O. Esses mutantes tiveram sua morfologia rugosa confirmada por coloração com cristal violeta e *imunoblotting* utilizando anticorpos específicos para o LPS rugoso. Quando testados em modelo animal, os mutantes rugosos apresentaram uma proteção contra o desafio superior a induzida pela a linhagem vacinal *B. abortus* RB51, porém esta proteção foi menor que a conferida pela linhagem vacinal lisa *B. abortus* S19 (Monreal et al., 2003).

Também foram testadas mutações afetando a biossíntese do *core* do LPS, como nos genes *manB_{core}* e *wa*** que codificam uma fosfomanomutase e uma glicosiltransferase respectivamente (Monreal et al., 2003). No entanto, estas linhagens não induziram proteção contra o desafio, mostrando que é necessário o *core* completo para que as linhagens rugosas sejam eficientes como vacina.

O gene *wbkC*, alvo deste estudo, é um dos genes que participa da via de biossíntese do antígeno-O e sua sequência tem um conteúdo G+C (~ 48%) menor que o normalmente encontrado em *Brucella ssp* (58%) (Cloekaert 2000). A proteína codificada pelo gene *wbkC* da *B. melitensis* 16M mostrou similaridade com várias proteínas que catalisam a

transferência de um grupo formil podendo ser uma formil transferase (FMT) que catalisa a conversão de GDP-4-NH₂-4,6, dideoximannose para GDP-4-formamido-4,6, dideoximannose presente na cadeia O do LPS (Figura 5) de *Brucella*.

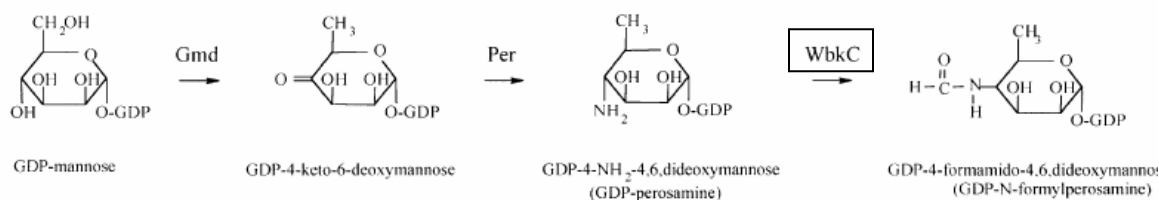


Figura 5: Via de biossíntese proposta para o GDP-4-formamido-4,6, dideoximannose.

1.4.2. VirB

Para sobreviver e multiplicar nas células hospedeiras, a bactéria “sente” o seu meio ambiente, ativa vários genes e secreta proteínas que facilitam a adaptação da bactéria (Eskra et al., 2001). A acidificação do fagossomo faz com que o patógeno expresse fatores de virulência específicos, como o *VirB*, que são requeridos para a proliferação da *Brucella*. (Maria-Pilar et al., 2005). O operon *virB* pertence aos sistema de secreção do tipo IV encontrado em vários tipos de bactéria como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pilori* e *B. abortus*. Este sistema é responsável pela secreção ou transferência direta de célula a célula de fatores de virulência, proteínas ou complexos DNA-proteína, de muitos patógenos para as células eucarióticas (Christie, 1997). Uma possível função efetora do locus *virB* é a injeção de moléculas efetoras que podem ajudar no estabelecimento do nicho de replicação dentro da célula hospedeira. Os produtos do operon *virB* são expressos extracelularmente e são induzidos especificamente dentro dos macrófagos e a acidificação do fagossomo é o sinal intracelular fundamental para a indução da expressão deste operon (Boschioli et al., 2002). Além disto o *VirB* parece ser essencial para a manutenção da interação entre o bruceossomo, fagossomo replicativo da *Brucella*, e o retículo endoplasmático, que é requerido durante o desenvolvimento e sobrevivência da bactéria. Outra possível função de *VirB* é impedir o encontro fagossomo/ lisossomo, já que mutantes de *B. abortus* que não possuem *VirB* não impedem a fusão fagossomo/lisossomo e são destruídos (Roop II et al., 2004).

1.5. Patogênese

Foi determinado que após a infecção, os microrganismos se replicam no tecido da placenta, levando à morte fetal e conseqüentemente ao aborto provavelmente devido ao choque endotóxico causado pela presença destes microrganismos no local (Smith & Ficht, 1990). Em 1960, um glicídio denominado eritritol foi encontrado na placenta de fêmeas de bovino gestantes e verificou-se que este estimulava o crescimento da *B. abortus* neste local. A capacidade de metabolizar o eritritol é muito limitada entre os procaríotos. Entretanto, a *Brucella* é capaz de metabolizá-lo nos testículos, vesículas seminais e nos produtos da concepção encontrados em fêmeas gestantes. Este composto estimula de forma diferencial a multiplicação da bactéria principalmente devido ao fato de que a energia produzida pelo seu metabolismo é maior do que a produzida pela utilização da glicose (27 ATP/molécula versus 12 ATP/molécula). Sendo assim, o eritritol se apresenta com um potente fator de tropismo celular fazendo com que as populações bacterianas tornem-se densas nestes locais podendo, assim, ocasionar um choque endotóxico. A linhagem vacinal *B. abortus* S19 é naturalmente incapaz de metabolizar o eritritol apesar de, em algumas situações, ser capaz de causar aborto em bovinos (Smith & Ficht, 1990).

1.5.1. A entrada da *Brucella* na célula hospedeira

Brucella não possui fatores de virulência clássicos como citolisinas, cápsulas, fímbrias, flagelos ou indutores de apoptose. Esta bactéria é menos agressiva à célula hospedeira, e faz com que esta se torne mais permissiva a sua presença. A infecção por bactérias intracelulares requer uma significativa interação entre o hospedeiro e o patógeno que é feita em quatro passos fundamentais: aderência, invasão, estabelecimento e disseminação (Eskra *et al.*, 2001).

A infecção com a *Brucella* ocorre quando a bactéria penetra na mucosa dos orifícios nasal, oral ou conjuntival. Depois da penetração, a bactéria é transportada livre ou dentro de células fagocíticas para os linfonodos regionais, onde ocorre hiperplasia e inflamação. A multiplicação e conseqüente disseminação da *Brucella* para os linfonodos, baço e fígado

ocorre via corrente sanguínea e linfa, onde os granulomas são formados (Alton & Forsyth, 1999).

A *Brucella* tem a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (Jones & Winter, 1992) e não fagocíticas (Detilleux, 1990). Contudo, os macrófagos são considerados como as principais células de residência do hospedeiro para este patógeno (Corbel, 1997). A *Brucella* entra na célula hospedeira através de microdomínios de lipídios, também conhecidos como “lipid rafts” (Figura 6), existentes na membrana desta célula. Através deste mecanismo, o patógeno consegue evitar a fusão fagossomo/lisossomo e inibe a secreção de TNF- α e a apoptose. Por isto, este mecanismo parece ser a chave da sobrevivência deste patógeno em macrófagos infectados, já que as células do hospedeiro com os microdomínios estruturalmente alterados por substâncias químicas são capazes de eliminar todas as bactérias fagocitadas (Maria-Pilar et al., 2005).

Os receptores encontrados no microdomínio de lipídio parecem reconhecer duas moléculas existentes na membrana da bactéria. No primeiro caso, o lipídeo A do LPS da *Brucella* é reconhecido pelo receptor “scavenger” do tipo A (SR-A), este receptor tem um importante papel na aterogênese, na defesa contra patógenos e na depuração de vários conjuntos de macromoléculas carregadas negativamente. O SR-A media a fagocitose de timócitos apoptóticos e atua na adesão de macrófagos a superfícies cobertas por proteínas do soro. Camundongos com o receptor SR-A depletado tiveram sua susceptibilidade diminuída à infecção pela *B. abortus*, pois a internalização e replicação bacteriana no macrófago foi diminuída. Além de ser um fator ligante, SR-A parece enviar sinais para a indução de um fagossomo replicativo, mas detalhes desta sinalização ainda precisam ser elucidados (Kim et al., 2004).

A outra possível molécula reconhecida por um receptor presente no microdomínio de lipídio é a proteína Hsp-60, uma chaperonina da família GroEL que é um antígeno imunodominante em muitos patógenos, inclusive no gênero *Brucella* (Watarai, 2004). A chaperona Hsp-60 reconhece a proteína prion celular (PrP^C) na membrana da célula hospedeira. A PrP^C é seletivamente incluída em micropinosomos contendo *B. abortus*, mas camundongos deficientes em PrP^C não apresentam dificuldades na internalização da bactéria e sim inibição da replicação intracelular de *B. abortus*, o que sugere que a interação entre Hsp60 e PrP^C nos macrófagos contribui para formação do fagossomo

replicativo e que outros receptores podem estar envolvidos na internalização da bactéria (Kim et al., 2004). Um modelo desta interação entre a bactéria e as moléculas associadas ao microdomínio de lipídio pode ser observado na Figura 6.

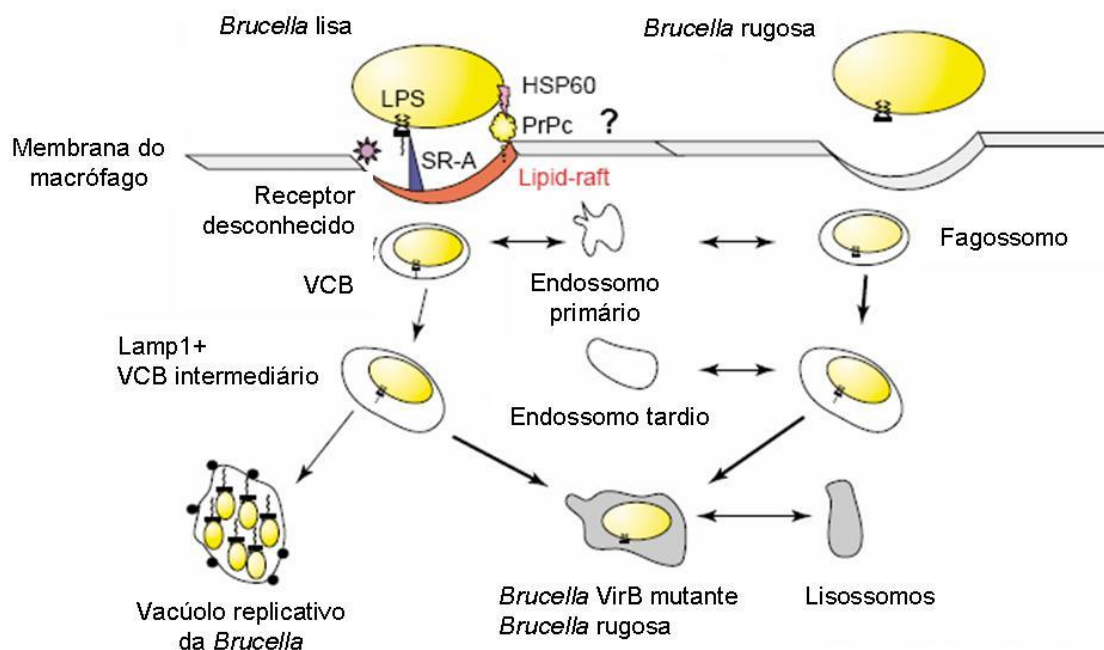


Figura 6 - Modelo da interação entre *B. abortus* e as moléculas associadas ao microdomínio de lipídio e a formação do fagossomo replicativo na célula do hospedeiro. Adaptado de Lapaque et al. (2005).

Depois de entrar na célula do hospedeiro, a *Brucella* é capaz de resistir a peptidases lisossomais devido ao seu LPS, que além desta proteção, tem como função evitar uma resposta pró-inflamatória antibacteriana eficiente, além de atuar nos macrófagos fazendo com que estes se tornem células apresentadoras de antígeno (APC's) ineficientes (Maria-Pilar et al., 2005). Atualmente, também foi descrito o papel do LPS de *Brucella* atuando de forma a evitar a apoptose da célula infectada (Fernandez-Prada et al., 2003). A falta ou modificações da cadeia-O geram profundas mudanças no papel do LPS. A linhagem vacinal *B. abortus* RB51 não possui a cadeia-O do LPS e isto faz com que a sua entrada e permanência no fagócito seja diferente das linhagens lisa, que possuem a cadeia-O íntegra. A linhagem vacinal rugosa não utiliza os microdomínios de lipídio durante a sua entrada na

célula hospedeira e isto faz com que a bactéria se co-localize com o lisossomo ocasionando, assim, uma alta taxa de eliminação bacteriana, o que não foi verificado com a linhagem lisa. A linhagem rugosa também estimula a alta produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e óxido nítrico que são consequência da ativação da via das MAPKinases, o que também não acontece durante a entrada da linhagem lisa (Maria-Pilar *et al.*, 2005). Todos estes resultados sugerem o papel da cadeia-O no recrutamento de fatores, que quando ancorados a superfície do fagossomo bloqueiam sua fusão com o lisossomo, além de impedir uma elevada produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e óxido nítrico. Esta diferença pode ser explicada, pois a ausência ou encurtamento da cadeia-O permite que outros determinantes na membrana da bactéria sejam capazes de ativar o sistema imune de forma mais eficiente.,

1.6. A resposta imune na brucelose

A sobrevivência e multiplicação nos macrófagos são a chave da virulência da *Brucella* (Foulongne *et al.*, 2000). Devido à localização intracelular, o controle da infecção requer uma resposta imune celular, no qual o perfil Th1 é uma arma relevante para uma proteção eficaz contra este patógeno (Ugalde *et al.*, 2003). A resposta imune do hospedeiro contra a infecção pela *B. abortus* envolve a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno específicas, além da resposta humoral. Entretanto, a defesa inicial à infecção bacteriana é executada pela imunidade inata (Golding *et al.*, 2001).

1.6.1. A resposta imune inata

Moléculas associadas à superfície de patógenos, como LPS, são primeiramente reconhecidos pelos receptores do tipo Toll (TLRs), uma família de receptores recentemente descrita, presente na superfície das células de mamíferos (Akira & Takeda, 2004). Os TLRs enviam sinais para ativar as células apresentadoras de antígeno (APCs), como os macrófagos e células dendríticas, facilitando a fagocitose da bactéria e aumentando a eficiência da apresentação antigênica. As células “natural killer” (NK) também fazem parte

da linha inicial de defesa. A bactéria *B. abortus* induz as APCs a liberarem IL-12 e esta citocina, por sua vez, ativa as células NK que irão secretar IFN- γ (Golding et al., 2001).

A ativação do sistema imune inato através dos 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).

1.6.2. A resposta imune adquirida

A imunidade adquirida contra a infecção pela *B. abortus* em camundongos é mediada principalmente por linfócitos T e suas citocinas. Os anticorpos têm o papel de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (Cheers & Ho, 1983), tornando-o mais propício à fagocitose pelos macrófagos. A habilidade da bactéria em sobreviver e repicar dentro dos macrófagos e outras células do hospedeiro, torna-a inacessível aos mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e o sistema do complemento (Cheers & Ho, 1983). Apesar dos anticorpos terem o seu papel na imunidade adquirida contra a *Brucella*, estes não são capazes de reduzir a taxa de crescimento intracelular in vivo e nem são capazes de conferir resistência a camundongos susceptíveis. A imunidade celular contra *B. abortus* é dependente de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 e de linfócitos T CD8⁺ (Araya et al., 1989; Oliveira & Splitter, 1995).

A imunidade mediada por células consiste de dois tipos de reações: a morte da bactéria fagocitada em consequência da ativação dos macrófagos pelas citocinas derivadas das células T, em especial o IFN- γ e a lise das células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺ (Abbas et al., 1994).

A capacidade de antígenos específicos em induzir preferencialmente um perfil de resposta imune Th1 ou Th2 (Mosman et al., 1986) é um aspecto importante no processo de resolução da infecção através da produção de citocinas (Abbas et al., 1996 e London et al., 1998). As citocinas são importantes moléculas que regulam o tipo de resposta imune induzida pelo hospedeiro e consequentemente a infecção. No caso da infecção pela *Brucella abortus*, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que secretam um padrão de citocinas do tipo

Th1 são responsáveis pelo processo de resolução da infecção (Zhan et al., 1993 e Oliveira et al., 1996 e 1998).

Em estudos preliminares, Oliveira e Splitter em 1995, demonstraram que a brucelose murina é mais exacerbada em camundongos deficiente em MHC de classe I do que em camundongos deficientes de MHC de classe II, evidenciando assim, o impacto das células T CD8⁺ na imunidade mediada por células no controle da brucelose experimental.

A identificação das citocinas induzidas pela infecção por *B. abortus* e a elucidação de suas funções específicas é fundamental para o entendimento da imunidade na brucelose. Citocinas derivadas de macrófagos como IL-1, IL-12 e TNF- α , consideradas pró-inflamatórias, contribuem para o controle inicial da infecção por *Brucella*. A IL-12 estimula as células NK e células T a produzirem IFN- γ e TNF- α e, conseqüentemente, ativarem os macrófagos a destruírem as bactérias intracelulares. A produção de IL-12 também promove a diferenciação das células auxiliares T CD4⁺ para o fenótipos Th1. No modelo da brucelose murina, a falta de IL-12 endógena aumenta a susceptibilidade dos camundongos à infecção pela *B. abortus*, estes camundongos mostram uma diminuição na produção de IFN- γ e óxido nítrico e um aumento do número de bactérias no baço e no fígado (Zhan et al., 1996).

Os linfócitos do tipo Th1 secretam IFN- γ como a principal citocina efetora contra a infecção por bactéria intracelulares, incluindo a *Brucella* (Jones & Winter, 1992). Esta citocina possui duas principais funções no controle da brucelose. Primeiro o IFN- γ ativa os macrófagos a produzirem reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio e enzimas capazes de destruir a bactéria fagocitada; segundo, esta citocina estimula a produção de subclasses de anticorpos, como IgG2a em camundongos, os quais ativam o sistema do complemento e opsonizam a bactéria facilitando a fagocitose, favorecendo assim as funções efectoras dos macrófagos (Abbas et al., 1996). A produção do IFN- γ é mediada por fatores de regulação do IFN, os fatores reguladores de interferon-IRF (Jinkyng et al, 2000)

1.7. Vacinas contra brucellose

As vacinas vivas têm se mostrado, até o momento, superiores às vacinas mortas na prevenção da brucelose animal (Zhan & Cheers, 1998). A vacina viva ideal não deve

provocar doença nos animais vacinados, deve prevenir a infecção em ambos os sexos, prevenir o aborto e esterilidade, promover proteção contra infecção por um longo período com uma simples dose, não induzir a produção de anticorpos que podem interferir no diagnóstico sorológico, ser bioquimicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vivo* e *in vitro*, não ser patogênica ao homem e ser facilmente produzida em larga escala (WHO, 1998). O ideal é que a vacina viva também possua marcadores fenotípicos ou genotípicos que permitam uma fácil diferenciação no campo.

Atualmente, a vacinação contra a brucelose é feita através da administração das linhagens lisas atenuadas S19 da *B. abortus* e Rev 1 da *B. melitensis*. Existe também a linhagem rugosa, RB51, que recentemente foi introduzida em países como EUA, Chile e Canadá (WHO, 1998).

A *B. abortus* S19 é a linhagem vacinal atenuada mais comumente utilizada para a prevenção de brucelose bovina e é amplamente utilizada em campanhas de erradicação no mundo todo. No entanto, a *B. abortus* S19 tem três problemas principais: é virulenta para o homem, induz aborto quando administrado em fêmeas gestantes e a presença do seu LPS liso interfere com a discriminação entre os animais infectados e os vacinados durante os procedimentos de triagem imunológica (Ugalde 2003; Smith 1990). Portanto, diversas linhagens vivas da *B. abortus* atenuadas têm sido estudadas. Em geral, são interrompidos genes relacionados ao LPS resultando em linhagens rugosas que seriam úteis no momento de triagem imunológica dos animais. (Shurig 1991; Ugalde 2000; Ugalde 2003).

A *B. abortus* RB51 é uma linhagem rugosa estável que surgiu espontaneamente após múltiplos cultivos da linhagem virulenta *B. abortus* S2308 em meio seletivo. Suas características são resultado da interrupção do gene *wboA* devido à inserção do elemento IS771 e também a mutações em mais de um dos genes necessários para a expressão de um fenótipo liso (Shurig 1991) (Vemulapalli 2000). A linhagem *B. abortus* RB51 é avirulenta em camundongos e bovinos, mantém a capacidade de induzir proteção e imunidade celular, e não interfere no diagnóstico. Porém, a *B. abortus* RB51 é resistente a rifampicina que é o antibiótico de escolha para o tratamento de brucelose em mulheres grávidas, crianças e em casos de endocardites causadas por *Brucella* sp. No entanto, um dos problemas inerentes a linhagens rugosas vacinais de *Brucella* é que elas podem ser muito atenuadas, persistirem pouco no hospedeiro e podem não induzir uma imunidade protetora eficiente (Ugalde 2003).

Portanto, todos os esforços têm sido focados na busca de uma melhor linhagem rugosa vacinal que seja capaz de induzir a imunidade celular e proteção adequada (Vemulapalli 2000; Monreal 2003).

1.8. Modelo animal para avaliação de linhagens mutantes

Os camundongos *knockout* no fator regulador de interferon do tipo 1, que funciona como regulador da resposta celular mediada por interferons (Taniguchi *et al.*,2001), apresentam profundas mudanças em comparação com a sua linhagem parental, os camundongos C57BL/6 (H-2^b). As principais mudanças no sistema imune dos camundongos IRF-1^(-/-) são as seguintes:

- defeitos específicos no desenvolvimento dos timócitos, as células T imaturas, e estas não conseguem se desenvolver em células T CD8⁺ maduras (Taniguchi *et al.*,2001);

- os macrófagos de camundongos IRF-1^(-/-) são defeituosos na indução do gene da *IL-12 p40*, o que afeta também a resposta celular mediada por células T CD4⁺ (Taniguchi *et al.*,2001);

- o promotor da óxido nítrico sintase indutível possui um sítio de ligação ao IRF-1, e a falta deste fator regulador mostrou afetar fortemente a produção da iNOS (Lohoff *et al.*,1997);

- apresentam baixos níveis de MHC de classe I em suas células (Taniguchi *et al.*,2001);

Os primeiros pesquisadores a utilizarem os camundongos IRF-1^(-/-) em seus estudos foi Ko e colaboradores em 2002. Surpreendentemente, este camundongo foi capaz de sobreviver a linhagens atenuadas de *Brucella abortus*, mesmo tendo tantos mecanismos imunológicos importantes para a resolução da infecção pela bactéria comprometidos. Isto demonstra que o camundongo IRF-1^(-/-) apresenta um nível basal de imunidade necessário para o controle das linhagens atenuadas. Estes camundongos demonstraram-se ótimos modelos para detecção de vários graus de virulência de linhagens mutantes de *B. abortus*, de uma forma mais rápida, menos dispendiosa e menos laboriosa que as rotineiramente utilizadas, pois esses animais morrem depois de 14 dias após a inoculação da linhagem selvagem e sobrevivem por mais de 30 dias quando a linhagem é atenuada.

2.Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudo do envolvimento da enzima formil-transferase, codificada pelo gene *wbkC*, na biossíntese do LPS da *Brucella abortus* e avaliação da persistência e proteção de uma cepa mutante para este gene em camundongos C57BL/6 e deficientes para IRF-1."

2.2.Objetivos específicos

- ✓ Sequenciamento e análise genômica do gene *wbkC*.
- ✓ Construção molecular de um vetor suicida contendo o gene *wbkC* com um marcador de resistência a canamicina.
- ✓ Produção do mutante da *Brucella abortus* por recombinação homóloga dupla do gene *wbkC*.
- ✓ Avaliar a persistência e virulência dos mutantes em camundongos C57BL/6 e *knockout* para IRF-1, comparado com a cepa virulenta *B. abortus* S2308 e as cepas vacinais S19 e RB51.
- ✓ Avaliar a capacidade destas bactérias mutantes de proteger camundongos contra a brucelose experimental.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Espécie	Linhagem	Fonte ou referência
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	GIBCO/BRL
<i>Brucella abortus</i>	S2308	Linhagem virulenta - estoque do laboratório
<i>Brucella abortus</i>	RB51	Linhagem vacinal – Schurig et al., 1991
<i>Brucella abortus</i>	S19	Linhagem vacinal – Estoque do laboratório
<i>Brucella abortus</i>	$\Delta wbkC$ S19	Linhagem mutante - este trabalho
<i>Brucella abortus</i>	$\Delta wbkC$ S2308	Linhagem mutante - este trabalho

3.2. Meios e condições de cultivo

A linhagem de *Escherichia coli* foi crescida em meio Luria Bertani (LB) composto de 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl, pH 7,4 à 37° C sob agitação de 200 rpm (Gallenkamp Orbital Incubator Shaker, Sanyo, UK), ou em meio LB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico (VETEC Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As linhagens da *B. abortus* foram crescidas em meio *Brucella* Broth – BB (BD Sparks, MD, USA), à 37° C sob agitação de 200 rpm, ou em meio BB solidificado com 1,5% de ágar bacteriológico. Os antibióticos utilizados para *E. coli* foram ampicilina (100 μ g/mL) e canamicina (50 μ g/mL) e para *B. abortus* foram ampicilina (10 μ g/mL) e canamicina (25 μ g/mL).

3.3. Vetores

Os vetores utilizados neste trabalho foram os seguintes:

Tabela 2: Vetores utilizados neste trabalho.

Vetor	Características	Fonte ou referência
pBluescript-KS(+)	ColE 1- Amp ^r	Stratagene
pUC-4K	ColE 1- Amp ^r - Kan ^r	Amersham Biosciences
pAT153	ColE 1- Amp ^r	Bronwlie et al., 1990
pBluescript: <i>wbkC</i>	ColE 1- Amp ^r	Este trabalho
pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan	ColE 1- Amp ^r - Kan ^r	Este trabalho

3.4. Tampões, soluções e enzimas de restrição

Os tampões e as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas segundo Sambrook & Russel (2001) em água bidestilada ou milli-Q. As enzimas de restrição utilizadas estão listadas na Tabela 3 Os tampões utilizados para as reações e a temperatura de incubação foram utilizadas conforme recomendações do fabricante.

Tabela 3: Enzimas utilizadas neste trabalho.

Enzima	Sítio de restrição	Fabricante
<i>Dra</i> I	G [↓] CTAG _↓ C	Invitrogen
<i>Sph</i> I	G _↓ CATG [↓] C	Promega
<i>Nhe</i> I	G [↓] CTAG _↓ C	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	C [↓] TCGA _↓ G	New England Biolabs
<i>Xba</i> I	T [↓] CTAG _↓ A	New England Biolabs

3.5. Obtenção de DNA genômico da *Brucella abortus*

A extração do DNA genômico da *B. abortus* linhagem S2308 foi feita de acordo com Halling et al. (1991), com algumas modificações. Uma alíquota estoque da S2308 foi cultivada em meio BB ágar para a obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C. Uma colônia isolada foi subsequentemente inoculada em 10mL de meio BB e incubada a 37 °C sob agitação (200 rpm) durante 48 horas. Após este tempo, a cultura foi inativada por 1 hora a 65 °C, centrifugada a 5840 g por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL de TE (10mM de tris/HCL pH=8,0 e 1 mM de EDTA pH=8,0). Logo após a total ressuspensão, foram adicionados 90 µL de SDS e 15 µL de proteinase k (20 mg/mL), esta mistura foi incubada a 37 °C durante 1 hora. Após este período, foram adicionados 300 µL de NaCl 5M e 240 µL de CTAB/NaCl (CTAB 10 % e NaCl 0,7M), a mistura foi homogeneizada e incubada a 65 °C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado volume igual de fenol-clorofórmio (1:1 vol/vol), a mistura foi incubada em gelo e agitada delicadamente por 5 minutos. Logo em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 9300 g por 10 minutos e a fase aquosa recuperada. Esse processo foi repetido por duas vezes. Após a última repetição, a fase aquosa foi recuperada e adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio, a mistura foi incubada em gelo e agitada delicadamente por 5 minutos, sendo posteriormente submetida a centrifugação a 9300 g por 10 minutos. A fase aquosa foi mais uma vez recuperada e a ela adicionada 1 volume de etanol para a precipitação do DNA genômico. A mistura foi incubada a -20° C por 18 horas e centrifugada a 15700 g por 30 minutos. Após a precipitação do DNA, o sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em 100 µL de água milli-Q estéril. Para verificar a qualidade e concentração de DNA, este foi diluído (1:200) e submetido à leitura nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em espectrofotômetro (UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu). A D.O.₂₆₀ foi multiplicada por 10000 obtendo-se a concentração do DNA (ng/µL)

3.6. Amplificação do gene *wbkC*

Em posse do DNA genômico da *B. abortus* S2308, o gene *wbkC* foi amplificado com os seguintes iniciadores, desenhados a partir de seqüências da *B. abortus* depositadas no *GenBank* com número NC004310:

WBKXHO F: 5' GCG **CTC GAG** TAC GAA TGG CAG CGC GAA CT 3'

WBKXBA R: 5' GCG **TCT AGA** GCC AGA AGC CTT TAT CAT CA 3'

Em negrito estão destacados os sítios de restrição para as enzimas *Xho* I no iniciador F e *Xba* I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) no iniciador R inseridos no fragmento amplificado. Para a reação de amplificação utilizou-se 10ng de DNA genômico, 5pmoles de cada iniciador, o tampão Taq DNA polimerase ,1,5 mM de MgCl₂ , 1,25 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água q.s.p. para 20 µL de reação.

A reação de PCR foi realizada seguindo o seguinte programa:

- primeira desnaturação: 95° C por 2 minutos;
- 30 ciclos de: desnaturação - 95° C por 36 segundos,
anelamento - 55° C por 36 segundos,
extensão - 72° C por 2,5 minutos;
- extensão final: 72° C por 10 minutos.

Após a reação de PCR, o produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% e o fragmento de interesse foi purificado do gel através do kit Qiaex II (QIAGEN, Valencia, CA, USA), conforme orientações do fabricante. Logo em seguida, o fragmento foi quantificado em gel de agarose 0,8% com fragmentos de DNA de concentração conhecida.

3.7. Clonagem do gene *wbkC* no plasmídeo pBluescript-KS(+)

O produto amplificado e o plasmídeo pBluescript-KS(+) (Figura 7) foram duplamente digeridos, em tubos separados, com as enzimas de restrição *Xho* I e *Xba* I. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris base 40mM pH 7,2, NaOAc 20mM e EDTA 1mM) corado com brometo de etídeo (10mg/mL). O vetor pBluescript-KS(+) e o fragmento de interesse de 970 pb foram retirados do gel e purificados através do kit Qiaex II (QIAGEN) e, em seguida, submetidos à eletroforese com o padrão de peso molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad,CA, USA) e DNA de concentração conhecida.

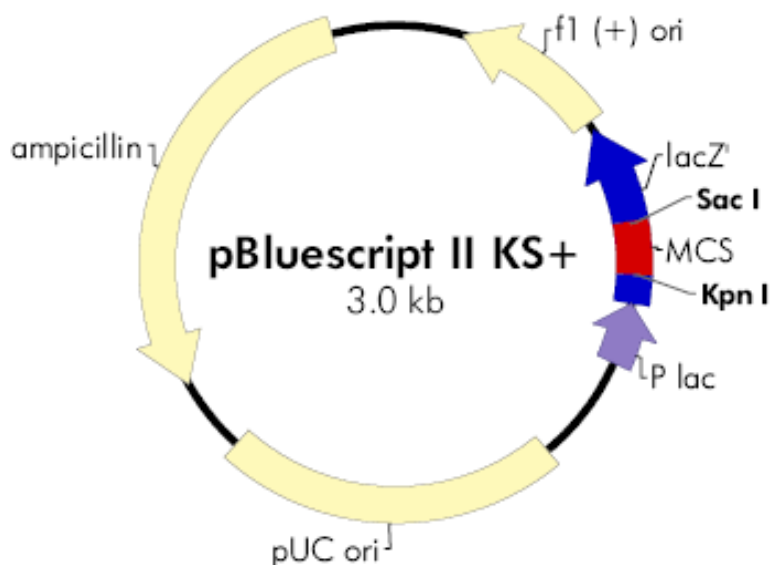


Figura 7-Mapa do vetor pBluescript- II KS+

A ligação do fragmento de 970 pb no vetor pBluescript-KS(+) foi realizada obedecendo a razão molar vetor/fragmento de 1:3. Para a reação de ligação utilizou-se 2 μ L do tampão de ligação 5X e 1,5 μ L da enzima T4 DNA Ligase 1U/ μ L (GIBCO BRL, Carlsbad,CA, USA) em volume final de 10 μ L. As ligações foram realizadas por 16 horas à 16° C. O produto da ligação passou a ser denominado pBluescript:*wbkC*.

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas, estas foram preparadas segundo Sambrook et al. (1988). Para a transformação com o vetor

pBluescript:*wbkC* foi utilizado o produto da reação de ligação do vetor em 50 µL de células eletrocompetentes. Estas foram lentamente descongeladas em gelo e acrescidas ao vetor pBluescript:*wbkC*, após o acréscimo as células foram mantidas por 5 minutos no gelo. Em seguida foram colocadas em uma cubeta de eletroporação (0,2 cm Bio Rad, CA, USA), e eletroporadas no aparelho Gene Pulser II (Bio Rad). Após o choque, acrescentou-se 900 µL de meio SOC (Invitrogen) estéril e a cultura foi colocada sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C por 1 hora. Após este período as células foram centrifugadas, ressuspensas em 100 µL de LB e cultivadas em LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 40 µg/mL de X-gal e 0,032 mM de IPTG, as placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. As colônias brancas foram selecionadas e inoculadas através da ponta de uma ponteira estéril em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). O cultivo foi incubado por 16 horas à 37 °C sob agitação constante (200 rpm).

O DNA das colônias recombinantes foi extraído pelo método de lise alcalina utilizando o kit Wizard mini prep (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e foi submetido à análise de restrição com as enzimas *Xho* I e *Xba* I. A clonagem foi confirmada através do seqüenciamento do DNA plasmidial das colônias recombinantes usando os mesmos iniciadores utilizados na amplificação do gene *wbkC*.

As reações de seqüenciamento foram realizadas pelo método de terminação da cadeia de DNA descrito por Sanger et al. (1997). As reações foram preparadas com o kit ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE) e o seqüenciamento foi feito no MegaBACE 1000 *capillary sequencer* (GE Healthcare, São Paulo, Brazil). As seqüências obtidas foram posteriormente analisadas e editadas manualmente para a eliminação de ambiguidades, regiões de vetor e dados de baixa qualidade existentes no final das seqüências.

3.8. Obtenção do gene de resistência a canamicina (Kan^r)

O gene que confere resistência à canamicina foi obtido do plasmídeo pUC-4K (Figura 8) (GE Healthcare). A partir da sequência do gene foi desenhado um par de iniciadores (seqüências abaixo), que amplificam o mesmo.

KANSPH F : 5'- GCG **GCA TGC** CGC TGA GGT CTG CCT C -3'

KANSPH R: 5'- GCG **GCA TGC** GGG GAA AGC CAC GTT GT -3'

Na extremidade 5' de cada primer foi inserido um sítio de restrição da enzima *Sph* I, indicado em negrito nas seqüências acima. Essa enzima foi escolhida após análise de restrição do gene *wbkC* e do vetor pBluescript -KS(+), como o auxílio do programa NEBcutter V2.0, disponível no site <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>. A reação de amplificação do gene da canamicina foi feita pelo mesmo protocolo descrito para o gene *wbkC*.

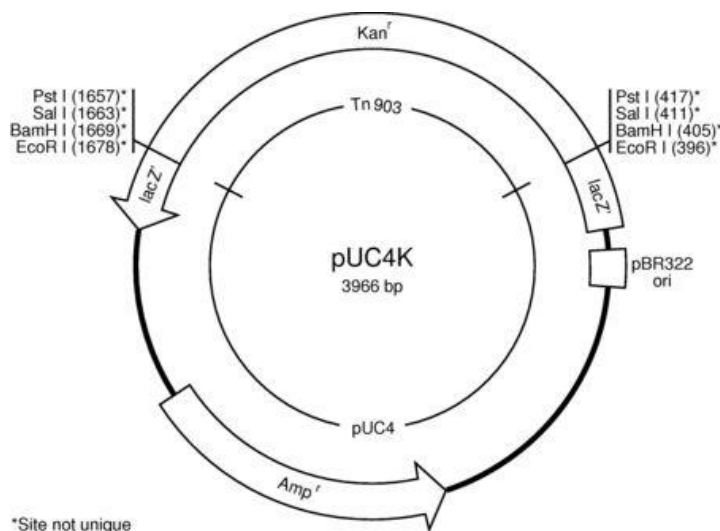


Figura 8- Mapa do vetor pUC4K

3.9. Clonagem do gene que codifica resistência a canamicina no vetor pBluescript:*wbkC*.

A reação de digestão do vetor pBluescript:*wbkC* e do gene de resistência a canamicina (1208 pb) com a enzima *Sph* I foi realizada com 1 µg do vetor, de acordo com orientações do fabricante da enzima. Após a digestão, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% com o padrão de peso molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), em tampão TAE corado com brometo de etídeo. Em seguida os fragmentos foram retirados do gel e purificados através do kit Qiaex II (QIAGEN), e em seguida submetidos a eletroforese juntamente a um DNA de concentração conhecida para sua quantificação.

A ligação do gene de resistência a canamicina no vetor pBluescript:*wbkC* foi realizada obedecendo a razão molar vetor/fragmento de 1:3. Para a reação de ligação utilizou-se 2 µL do tampão de ligação 5X e 1,5 µL da enzima T4 DNA Ligase 1U/µL (Invitrogen) em volume final de 10 µL. As ligações foram realizadas por 16 horas à temperatura de 16° C. O produto da ligação passou a ser denominado pBluescript:*wbkC*-kan.

A transformação das células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α foi realizada conforme descrito no item 3.7, utilizando o vetor pBluescript:*wbkC*-Kan. As células foram cultivadas em LB ágar suplementado com ampicilina, X-gal e IPTG, as placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. As colônias brancas foram selecionadas e inoculadas através da ponta de uma ponteira estéril em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). O cultivo foi incubado por 16 horas à 37 °C sob agitação constante (200 rpm).

O vetor pBluescript:*wbkC*-Kan foi extraído da *E. coli* DH5α através do método de lise alcalina utilizando o kit Wizard mini prep (Promega). A quantificação de plasmídeo foi estimada em gel de agarose 0,8% em tampão TAE corado com brometo de etídeo, através da comparação com uma banda de concentração conhecida.

3.10. Preparação de células eletrocompetentes da *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19

As células eletrocompetentes da *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 foram preparadas de acordo com Halling et al. (1991), implementando algumas modificações. A partir do estoque das linhagens, foram feitas culturas em meio BB ágar, as placas foram crescidas por 72 horas em estufa a 37 °C. Cinco colônias isoladas de ambas as linhagens foram inoculadas em 50 mL de BB e incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir uma D.O.₆₀₀ em torno de 0,5-0,8. A cultura foi centrifugada a 3290 g durante 10 minutos e o sedimento foi lavado com 20 mL de água apirogênica gelada. Este procedimento foi repetido mais 5 vezes. O sedimento final foi ressuscitado em 500 µL de água apirogênica e separado em alíquotas de 50 µL estocadas a -70 °C, para posterior uso.

3.11. Eletroporação da *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 eletrocompetentes com o plasmídeo pBluescript:*wbkC*- kan e seleção dos transformantes

O experimento foi baseado no protocolo proposto por Drazek et al. (1995), com algumas modificações. Células eletrocompetentes da *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 (50 µL) foram lentamente descongeladas em banho de gelo e imediatamente acrescidas a 5µg da construção (não excedendo o volume de 10 µL). Esta mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm, estéril, resfriada e deixada no gelo até o momento da eletroporação. O eletroporador (Gene-Pulser/Pulse Controller, BioRad CA, USA) instalado em fluxo laminar, foi ajustado com os seguintes parâmetros: 25 µF de capacitância, 2,5 kV de voltagem e 400 Ω de resistência. Após a eletroporação as células foram ressuscitadas em 1000 µL de meio SOC (Invitrogen) e incubadas a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm durante 18 horas. Posteriormente, 200 µL destas suspensões foram cultivadas em meio BB sólido suplementado com canamicina e incubados a 37 °C em estufa, durante 3 a 5 dias.

As colônias isoladas da placa original foram sub-cultivadas em meio BB ágar suplementado com canamicina e BB ágar suplementado com ampicilina. As placas foram crescidas durante 72 horas a 37 °C. Os clones nos quais ocorreu recombinação homóloga simples cresceram em ambos meios seletivos. Por outro lado, os clones nos quais ocorreu recombinação homóloga dupla cresceram somente em meio contendo canamicina.

3.12. Caracterização molecular dos mutantes

Com o objetivo de comprovar geneticamente que o gene *wbkC* intacto das linhagens *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 foi trocado pelo gene interrompido pelo cassete da canamicina, foram utilizadas as técnicas de PCR e *Southern blot*, técnicas que também permitiram a diferenciação dos transformantes em que ocorreu recombinação homóloga simples daqueles em que ocorreu recombinação homóloga dupla.

3.12.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O isolamento do DNA genômico dos clones foi realizado de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 3.5. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se de 10 ng de DNA genômico das linhagens mutantes, selvagem de *B. abortus* S2308 e da linhagem vacinal *B. abortus* S19. A reação foi feita com o par de iniciadores que amplificam o gene *wbkC*, descritos no item 3.6.

3.12.2. Isolamento e digestão do DNA genômico e transferência para membrana de nitrocelulose

O isolamento do DNA genômico das linhagens parentais e dos mutantes foi realizado de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 3.5. Aproximadamente 2 µg do DNA genômico de cada transformante foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Dra* I (New England Biolabs) conforme o protocolo sugerido pelos fabricantes. Como controle foi utilizado o DNA genômico da linhagem parental *B. abortus* S2308 e da linhagem vacinal *B. abortus* S19 digerido com as mesmas enzimas de restrição.

Após a digestão, as amostras, juntamente ao padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE, contendo brometo de etídeo, durante 6 horas a 60V. Em seguida o gel foi fotografado para registro.

A transferência do DNA genômico para a membrana de nitrocelulose Hybond-N+ (GE Healthcare, São Paulo, Brazil) foi realizada à vácuo, no aparelho “VacuGene XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare). O gel foi tratado no sistema de transferência com as soluções de HCl 0,25 M por 20 min, NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 N por 20 min, Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 e NaCl 1,5 M por 20 min e finalmente com SSC 20 X, por 1 hora. Após a transferência, o DNA foi imobilizado na membrana através do tratamento com luz ultravioleta no aparelho CL 1000 Crosslinker (UVP, Upland-CA, USA) por 5 minutos.

3.12.3. Construção das sondas

Foram construídas sondas para o gene *wbkC* e para os genes de resistência a canamicina e ampicilina de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 4: Sondas utilizadas no *Southern blot*

Sonda	Origem	Enzimas de restrição utilizadas	Tamanho da sonda
<i>wbkC</i>	Gene <i>wbkC</i>	<i>Nhe I e DraI</i>	597 pb
Ampicilina	pAT 153	<i>Pst I e Ssp I</i>	546 pb
Canamicina	pUC 4K	<i>Eco RI</i>	1208 pb

A reação de digestão dos vetores indicados na Tabela 4 foram feitas com 1µg do vetor de acordo com orientações do fabricante das enzimas. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% com o padrão de peso molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), em tampão TAE corado com brometo de etídeo. Em seguida os fragmentos de interesse foram retirados do gel e purificados através do kit Qiaex II (QIAGEN) e em seguida, submetidos à eletroforese juntamente a um DNA de concentração conhecida para sua quantificação.

3.12.4. Marcação das sondas e hibridização das membranas

Para marcação dos fragmentos obtidos para sonda foi utilizado o kit AlkPhos Direct (GE Healthcare). O DNA a ser marcado (100 ng) foi colocado em banho a 100 °C por 5 minutos e rapidamente colocados no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 10µL do tampão de reação, 2 µL do reagente de marcação e 10µL do reagente “cross linker” agitando gentilmente o tubo no gelo após a adição de cada um destes. A reação foi então incubada por 30 minutos a 37°C.

As membranas foram pré-hibridizadas (Alkphos Direct Labeling and Detection Systems) durante 30 minutos a 65°C sob agitação moderada, em 15 mL de solução de hibridização. A solução de hibridização foi preparada com o tampão de hibridização do kit AlkPhos Direct, acrescido de NaCl a uma concentração final de 0,5M e o reagente de bloqueio a uma concentração final de 4%. A solução ficou sob agitação por 2 horas e foram utilizados 15 mL desta para cada sonda. As sondas marcadas foram adicionada à esta mesma solução, após 30 minutos de pré-hibridização. A hibridização foi feita a 65°C durante 16 horas em forno de hibridização (Techne hybridiser HB-1D, Techne , Cambridge, U.K.), sob agitação branda.

As membranas foram lavadas por duas vezes durante 10 minutos a 65°C com o tampão I (uréia ultra pura 2M, SDS 0,1% p/v, fosfato de sódio 50mM pH 7,0, NaCl₂ 150mM, MgCl₂ 1mM e reagente de bloqueio 0,2% p/v). Depois foram lavadas 2 vezes durante 5 minutos a temperatura ambiente com o tampão II (Tris base 1M e NaCl₂ 2M, pH10) diluído 1:20 e acrescido de 2 mM de MgCl₂.

Finalmente as membranas foram colocadas sobre um plástico, o excesso de tampão foi retirado com um papel absorvente e foi adicionado o reagente de detecção do kit AlkPhos Direct sobre a membrana. Após 5 minutos as membranas foram expostas a um filme de radiografia (Hiperfilm-ECL - GE Healthcare), em um “cassete” para auto-radiografia durante 20 minutos.

3.13. Caracterização morfológica dos mutantes

Para verificar a morfologia da linhagem selvagem *B. abortus* S2308, das linhagens vacinais *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51 e dos mutantes obtidos para o gene *wbkC* foi utilizada a técnica de coloração com cristal violeta .

A caracterização morfológica das colônias com cristal violeta foi realizada segundo Alton et. al. (1988). Esta técnica permite a diferenciação das colônias lisas e rugosas, sendo que estas se apresentam brancas e roxas na presença do corante, respectivamente.

Foi preparada uma solução **C**, feita com 20% da solução **A** (10% p/v de cristal violeta em etanol absoluto) e 80% da solução **B** (1% p/v de oxalato de amônio em água), que foi posteriormente diluída na proporção 1/40 de água. O volume de 10 mL desta solução foi colocado na placa com as colônias a serem caracterizadas e 20 segundos depois o excesso foi retirado.

3.14. Caracterização do tipo de LPS presente nas linhagens mutantes através de *imunoblotting*

A técnica de *Western blot* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Godfroid et al.(2000), com algumas modificações. Culturas das linhagens *B. abortus* S2308, *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e dos mutantes foram inoculadas em 3 mL de meio BB, incubadas por 72 horas, a 37 °C e 200 rpm. Estas foram submetidas a centrifugação a 12000 g, lavadas em 0,0625M Tris-HCl (pH 6,8) e centrifugadas novamente. Foram acrescidos 200µL de tampão de lise (SDS 1%, Glicerol 2% e 0,0625 M Tris-HCl pH6,8), fervidas por 10 minutos e esfriadas a 50 °C. As amostras foram digeridas com 20 µg de proteinase K a 50 °C por duas horas e por 18 horas a temperatura ambiente. Um volume de 20 µL deste extrato bruto foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) 12% e posteriormente transferido (Sistema BioRad) para uma membrana de nitrocelulose (Hybond- ECL, Amersham Biosciences, Germany) utilizando o tampão de transferência 4 X (0,025 M tris, 0,192 M de glicina) diluído 1:4 acrescido de 200 mL de metanol.

O bloqueio da membrana foi realizado com 50 ml de solução de bloqueio (TBS – 10mMTris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl) acrescido de Tween 20 a 0.05% (500 µL Tween 20 em 1L de TBS); e 3% leite desnatado em pó (Nestlé®). As membranas ficaram imersas nesta solução por duas horas. Após este período a solução de bloqueio foi descartada e a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS Tween (TBST) e incubada com o anticorpo primário A68/24D08/609 (IgG1 ,R-LPS) ou 04F9 (IgG2a, O-LPS), diluído 1:1000 em solução de TBST BSA (TBS com 5% BSA e 0.05% Tween 20), por 18 horas. Os anticorpos monoclonais A68/24D08/609 e 04F9 foram cedidos pelo Dr.Axel Cloeckert (*Institut National de la Recherche Agronomique, France*).

A membrana foi então lavada 3 vezes por 5 minutos com 30 mL de solução de lavagem TBST (TBS com 0,05% Tween 20) e posteriormente incubada com o anticorpo secundário (conjugado) anti-IgG total de camundongo marcado com fosfatase alcalina, diluído (1:4000) em solução de bloqueio TBST acrescido de leite em pó 1%. A membrana foi incubada na solução por uma hora a temperatura ambiente.

Finalmente, a solução contendo o anticorpo secundário foi removida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com 30 ml de solução de lavagem TBST. O *imunoblot* foi revelado o reagente de detecção do kit AlkPhos Direct (GE Healthcare). A membrana foi exposta a um filme de radiografia (Hiperfilm-ECL - GE Healthcare), em um “cassete” de auto-radiografia durante 20 minutos.

3.15. Experimentos *in vivo*

3.15.1. Animais utilizados

Foram utilizadas fêmeas e machos de camundongos C57BL/6, com idade entre 6 e 9 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Também foram utilizados camundongos IRF- 1^(-/-), machos e fêmeas, com idades entre 6 e 12 semanas, criados no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas ICB/UFMG (Biotério F-2, sala F2-255)

3.15.2. Determinação da persistência em camundongos C57BL/6

Cinco grupos de camundongos, com 28 animais em cada grupo, foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC (unidade formadora de colônia) da linhagem selvagem *B. abortus* S2308 e da linhagem vacinal *B. abortus* S19 e com 1×10^8 UFC da linhagem vacinal *B. abortus* RB51 e das linhagens mutantes.

Após 1, 2, 3, e 6 semanas, 7 camundongos de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e seu baço foi retirado, processado e submetido a diluição seriada em PBS e cultivado em meio BB ágar. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Ao término do terceiro dia, as placas foram contadas e foi determinado o número de UFC no baço destes animais.

3.15.3. Determinação da virulência em camundongos IRF-1^(-/-).

Cinco grupos de 8 Camundongos IRF-1^(-/-), com idade entre 6 e 12 semanas, foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC das linhagens selvagem *B. abortus* S2308, vacinal *B. abortus* S19, vacinal *B. abortus* RB51 e das linhagens mutantes. Após a infecção dos camundongos, a sobrevivência dos animais foi diariamente observada, durante 30 dias.

Também foi avaliado o numero de UFC no baço dos camundongos IRF-1^(-/-). Para isso, foi feito o mesmo procedimento descrito acima, porém, dez dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e seu baço foi retirado, processado, submetido à diluição seriada em PBS e cultivado em meio BB. As placas foram incubadas em estufa a 37°C. Ao término do terceiro dia, o número de UFC recuperados do baço destes animais foi determinado.

3.15.4. Avaliação do nível de imunoproteção induzida em camundongos IRF-1^(-/-).

Grupos de seis camundongos IRF-1^(-/-), com idade entre 8 e 12 semanas, foram vacinados intraperitonealmente com 1×10^7 bactérias das linhagens mutantes e da linhagem vacinal RB51. A dose utilizada para inocular a linhagem vacinal *B. abortus* S19 foi de 1×10^5 bactérias. No grupo controle foi inoculado 100 µL de PBS. Após 6 semanas, os

camundongos foram desafiados com 1×10^6 células da linhagem selvagem *B. abortus* S2308. Após a infecção dos camundongos, a sobrevivência dos animais foi diariamente observada, durante 30 dias

3.16. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student, do programa MINITAB (Minitab Inc., State College, PA).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do plasmídeo para a deleção do gene *wbkC*

4.1.1. Amplificação da seqüência completa do gene *wbkC* da *B. abortus*

A seqüência completa do gene *wbkC* foi amplificada pela técnica de PCR, a partir do DNA genômico da *Brucella abortus*. Os iniciadores WBKXHO F e WBKXBA R foram utilizados para a reação de PCR, que foi realizada conforme descrito no item 3.6. O produto amplificado está representado na Figura 9. O tamanho do fragmento de 970pb do gene *wbkC* foi confirmado comparando-o com o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

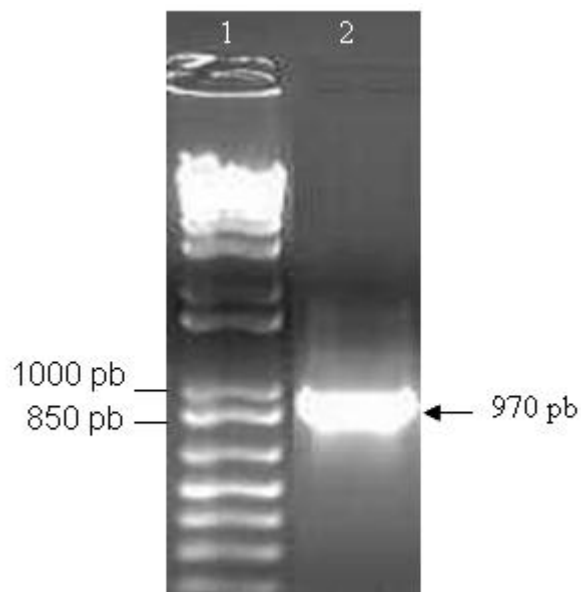


Figura 9 – Gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do gene *wbkC* . 1- Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 2- Produto da amplificação do gene *wbkC* da linhagem *B. abortus* S2308.

4.1.2. Clonagem do gene *wbkC* no plasmídeo pBluescript-KS(+)

O fragmento amplificado relativo à ORF do gene *wbkC* foi clonado no vetor pBluescript-KS(+) nos sítios das enzimas *Xho* I e *Xba* I conforme descrito na metodologia. Colônias brancas de clones transformados em *E. coli* com a construção foram escolhidos aleatoriamente para a confirmação do inserto. Cada clone foi crescido em meio LB líquido e a seguir o DNA plasmidial foi extraído e digerido com as enzimas *Xho* I e *Xba* I. Também foi realizado o sequenciamento para a confirmação da ORF do gene *wbkC*.

A análise de restrição para confirmação da clonagem do gene *wbkC* no vetor pBluescript-KS(+) está demonstrada na Figura 10. O fragmento de aproximadamente 2960 pb corresponde ao plasmídeo enquanto o fragmento de aproximadamente 970 pb corresponde ao gene *wbkC*.

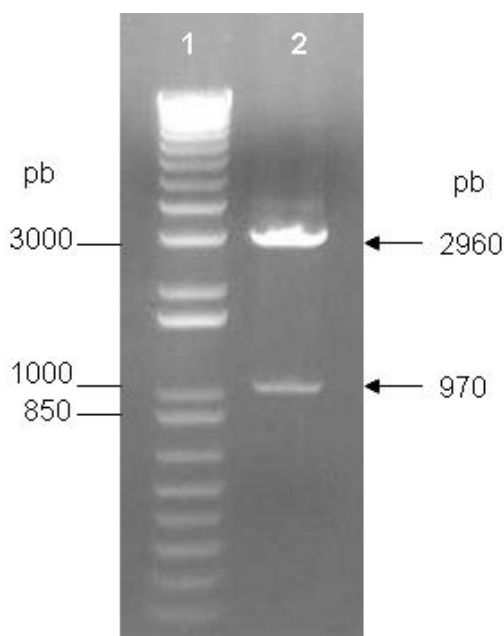


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8% demonstrando a análise da clonagem da ORF do gene *wbkC* no vetor pBluescript-KS(+). 1 - Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 2- Produto da digestão do DNA plasmidial do clone de *E. coli* transformada com o plasmídeo pBluescript: *wbkC*. A banda de aproximadamente 970 pb corresponde a ORF do gene *wbkC* e a banda de 2960 corresponde ao vetor pBluescript-KS(+).

Na Figura 11 podemos observar o resultado do sequenciamento do DNA plasmidial dos clones de *E. coli* recombinantes.

GCGTCTAGAGCCAGAAGCCTTTATCATCAAACTACACCATCACCTGCTGGGA
 CCAAAAACCTAAACAAGCAACAAGCCATTTTACCGAGGGAATACCCCTCATAA
 GAGAGCGGTAAATATCTATAGAAGGAACATAATATACCTTGCCATCAATCTT
 CAATACTGCCGGTGGGAACGGAGGAAAGAACATTGCTCGGATAAAACGATCA
 ATCTGGACTTCCGACCATCTTGGGTCGATAACGCCACCGAAAGGAAGTTTCGC
 GGGCGTAATAGCTAGCCTCACCCAATTGAGCAAATCCCGGATCTCCTTGATC
 TAGTTTAAGGATGACTTCCTCTAAGCGCAGCATCGCGCGCAATTTGTTCGG
 TGAAATAAAGAAAAGGCTGTATCGGTTTCTTCAACCGAAATTCGCTCTTGCA
 ACAATATTGCACCCGTATCGAAATTTTCGTACCATACGATGATAGCTGAAAC
 CGGTTTCGCTCTCGCCATTTATAATCACCCACGCAACCGAGTTTGTTCGCG
 ATAAGCAGGAAGAAGCGACGGATGACGATTTACGCTCCCCTTTTTTGCCAAT
 TTTAGGAAGCGACCCGGGATTAACGATCGATAGTGCATGC]TTATAATCATGT
 CCGGATCGAAATTAGCTCCAAATTCGTAGAATTCTTCCGAATTTGCAGCTGC
 GGTAGTGAATTGAATGTTCCCTAAGCCTTAACATGGAATGTAAACCACAATTA
 CGATTGTCTTCTCTATGCGTCGCAACCGCAATCTTATCAATCTCTACGCCCA
 TGCCAATCAAGTTGTAAACGCAAAATTCGCGCGGCAATCCGTATCCTTGCTAC
 CAAAACGCGTGTATTTGGTGCAATCGCCATTTAAAATGCCTCTTTTTTCGTCA
 GTTACTATGCGTAAATACTCACCCGCGACTGCATTCCAACCTGGGTAACGTT
 CGTAC**AGTTCGCGCTGCAATTCGTA**CTCGAGCGC****

Figura 11 - Sequência de nucleotídeos da ORF do gene *wbkC*. Os códons de iniciação (ATG) e de terminação (TGA) do gene *wbkC* estão sublinhados. Os iniciadores utilizados para sequenciar o plasmídeo estão em negrito. O sítio de clivagem da enzima *Sph* I está evidenciado na caixa e em vermelho estão os sítios de restrição para a enzima *Xho* I e *Xba* I adicionados a ORF do gene *wbkC*.

4.1.3. Inserção do gene que confere resistência à canamicina no vetor pBluescript:*wbkC*

Com o objetivo de interromper a sequência do gene *wbkC* presente no plasmídeo pBluescript:*wbkC*, foi inserido o gene que confere resistência à canamicina. A ORF deste gene foi amplificada do vetor pUC 4K com o par de iniciadores específicos KANSPH F e KANSPH R (item 3.8).

Na extremidade 5' de cada iniciador foi inserido o sítio de restrição da enzima *Sph* I. Esta enzima cliva em um sítio único e central do gene *wbkC* e não é capaz de reconhecer nenhum sítio de restrição no vetor pBluescript –KS(+), permitindo a clonagem do gene de resistência à canamicina neste vetor. Para a escolha do local de inserção do gene resistência a canamicina foi levado em consideração o mínimo de aproximadamente 400 pares de base disponíveis em cada extremidade do gene para que pudesse haver recombinação homóloga.

O fragmento de aproximadamente 1208 pb, correspondente ao gene de resistência a canamicina amplificado foi devidamente isolado do gel de agarose 0,8%, purificado e digerido com a enzima *Sph* I. O produto da digestão foi ligado ao vetor pBluescript:*wbkC*, previamente digerido com a mesma.

Alguns clones resistentes à canamicina foram obtidos e selecionados para análise por digestão enzimática para a confirmação da inserção do gene de resistência a este antibiótico. A Figura 12 mostra um desenho esquemático do vetor pBluescript:*wbkC*-Kan.

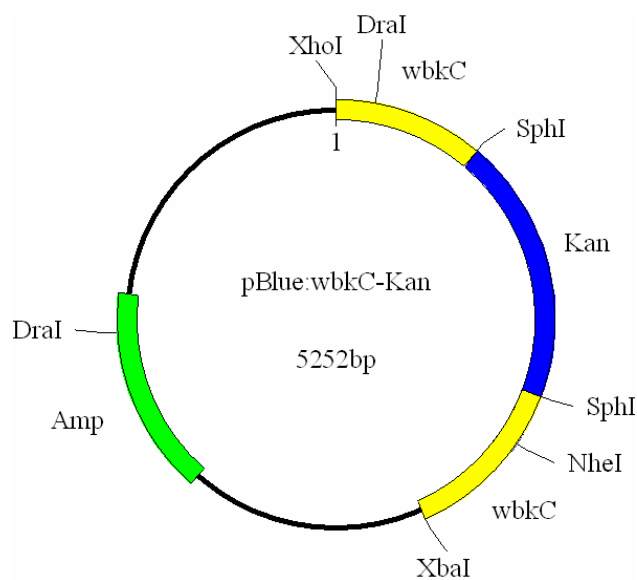


Figura 12 - Mapa do plasmídeo pBluescript:*wbkC*-Kan

Para confirmar o sucesso da clonagem, foi realizada a digestão do DNA plasmídial com as enzimas *Xho* I e *Xba* I de um dos clones (Figura 13). Tal plasmídeo gerou três bandas, uma de aproximadamente 2960 pb que corresponde ao vetor pBluescript-KS (+), uma banda de 1460 pb e outra de 700 pb, que juntas correspondem aos 2200 pb do gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência à canamicina, já que este apresenta um sítio de restrição para *Xho* I. Esta construção foi denominada pBluescript:*wbkC*-Kan.

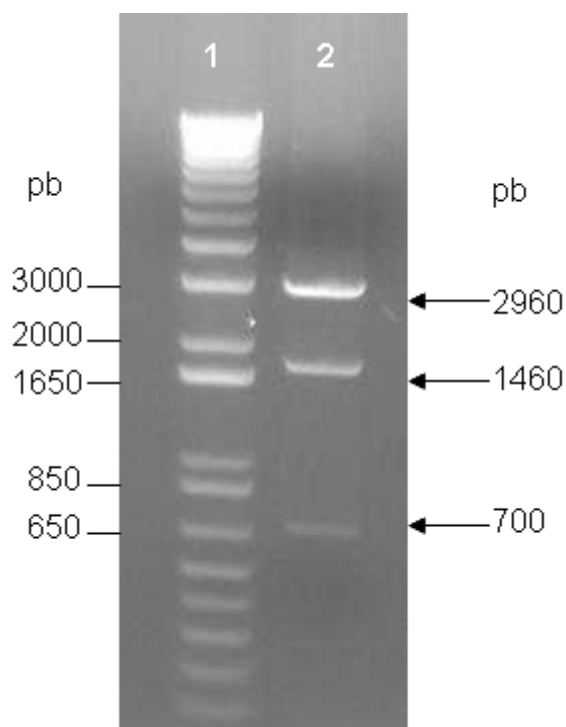


Figura 13 - Gel de agarose a 0,8% demonstrando a confirmação da construção do vetor pBluescript:*wbkC*-Kan. 1- Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder. 2- Produto da digestão do plasmídeo pBluescript: *wbkC*-Kan com as enzimas de restrição *Xho* I e *Xba* I de um clone transformado.

4.2. Obtenção e seleção do mutante da *B. abortus* para o gene *wbkC* por recombinação homóloga dupla

Esta etapa teve como objetivo inativar o gene *wbkC* da linhagem selvagem *B. abortus* S2308 e da linhagem vacinal *B. abortus* S19 através da recombinação homóloga dupla.

O plasmídeo pBluescript:*wbkC*-Kan foi introduzido por eletroporação nas linhagens da *B. abortus* conforme descrito na metodologia. O plasmídeo pBluescript:*wbkC*-Kan que é derivado do pBluescrip-KS(+), é considerado um vetor suicida para o gênero *Brucella* por possuir apenas origem de replicação de *E. coli*, ColE1, que o torna incapaz de replicar dentro de bactérias do gênero *Brucella* (Rigby et al., 1989).

A única maneira das bactérias transformadas sobreviverem em um meio seletivo contendo canamicina é se estas tiverem incorporado em seu genoma o gene de resistência a este antibiótico. Há duas maneiras deste evento ocorrer. A primeira forma é se houver a recombinação em apenas uma das extremidades do gene através da recombinação homóloga simples, desta forma a bactéria transformante será resistente aos antibióticos canamicina e ampicilina, já que todo o vetor foi inserido no seu genoma (Figura 14 A). A segunda forma é se houver a recombinação em ambas as extremidades do gene através da recombinação homóloga dupla, desta forma a bactéria transformante será resistente somente ao antibiótico canamicina, já que houve a troca do seu gene funcional pelo gene interrompido pelo cassete de canamicina (Figura 14 B). As duas formas de possíveis recombinações estão esquematizadas na Figura 14.

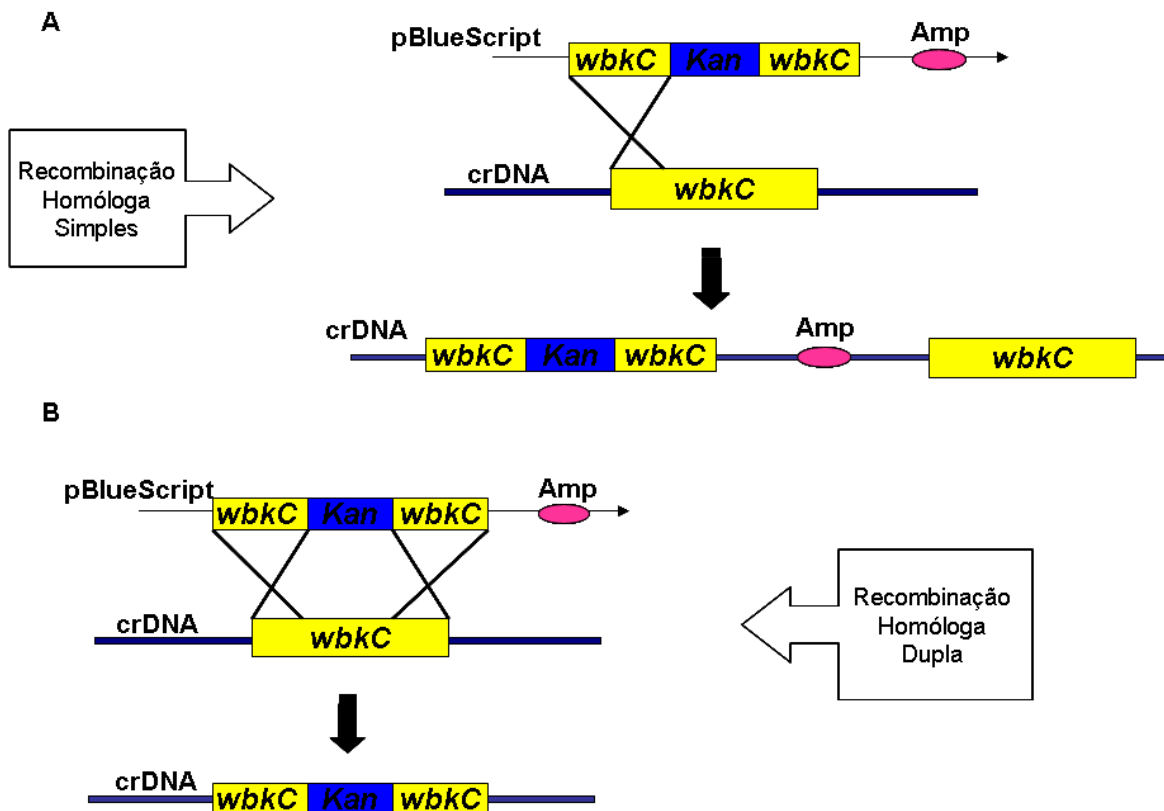


Figura 14 - Esquema dos possíveis eventos de recombinação homóloga entre o genoma da *B. abortus* e o plasmídeo pBluescript:*wbkC*-Kan A- Recombinação homóloga simples. B - Recombinação homóloga dupla.

Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas a 37 °C em placas contendo meio BB ágar acrescidas de canamicina por 72 horas para que pudesse haver a observação das colônias obtidas.

As bactérias que sobreviveram no meio contendo canamicina foram cultivadas em placas contendo meio com ampicilina e placas contendo canamicina, separadamente (Figura 15). As bactérias que sofreram recombinação homóloga dupla são sensíveis a ampicilina (Amp^s) e resistentes a canamicina (Kan^r), já que trocaram o seu gene *wbkC* funcional pelo gene interrompido pelo cassete de canamicina. Já as bactérias que sofreram recombinação homóloga simples são capazes de crescer em ambos os meios seletivos, já que todo o vetor foi inserido em seu genoma e passam a possuir duas cópias do gene *wbkC*,

uma funcional e outra com a sua fase de leitura interrompida pelo cassete de canamicina (Figura 15).

Através deste processo foram selecionados dois mutantes para o gene *wbkC*, um pela transformação da linhagem selvagem *B. abortus* S2308 e outro da transformação da linhagem vacinal *B. abortus* S19. Estes mutantes foram denominados *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19, respectivamente.

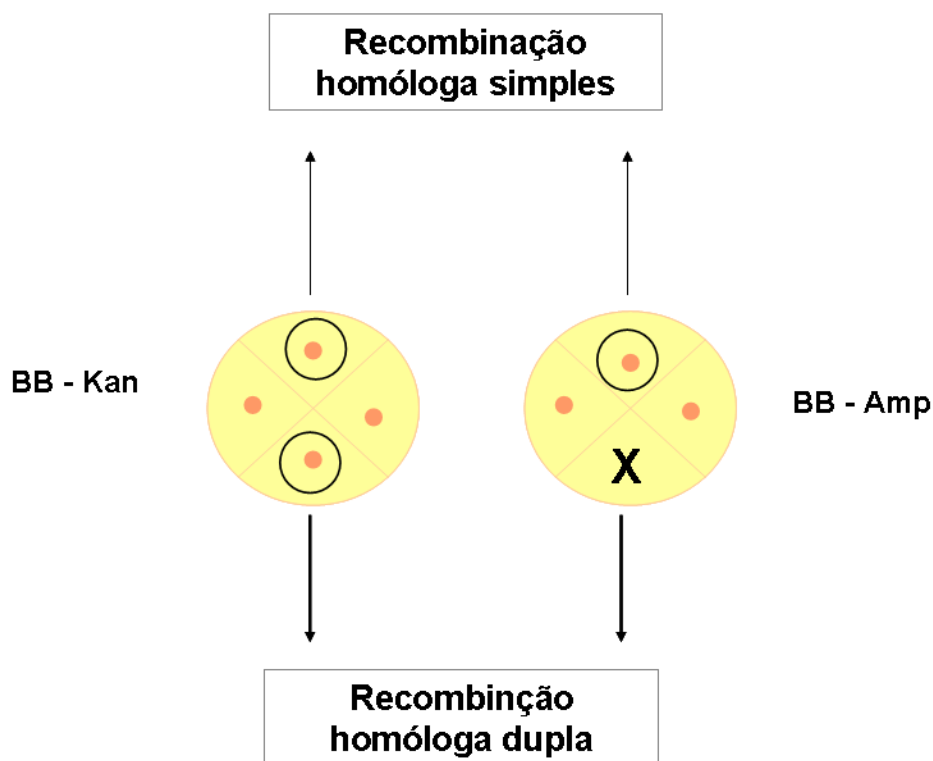


Figura 15 - Esquema de cultivo das bactérias transformantes em meios seletivos. BB- Kan- Meio BB acrescido de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina; BB- Amp – Meio BB acrescido de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina; X indica o não crescimento da colônia.

4.3. Caracterização molecular dos mutantes de *B. abortus* para o gene *wbkC*

A mutação foi primeiramente confirmada por PCR, mostrando que a ORF do gene *wbkC* funcional havia sido substituída pelo gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência à canamicina. (Figura 16). Para isso, o DNA genômico das linhagens parentais e

dos mutantes foi extraído, conforme descrito anteriormente, e o gene *wbkC* foi amplificado com os iniciadores específicos WBKXHO F e WBKXBA R (item 3.6). Pode-se observar na Figura 16 que o tamanho do fragmento amplificado na linhagem parental *B. abortus* S2308 difere do amplificado nos mutantes obtidos. Isto porque a linhagem parental apresenta o gene *wbkC* funcional de 970 pb e os mutantes apresentam o gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência a canamicina de aproximadamente 2200 pb.

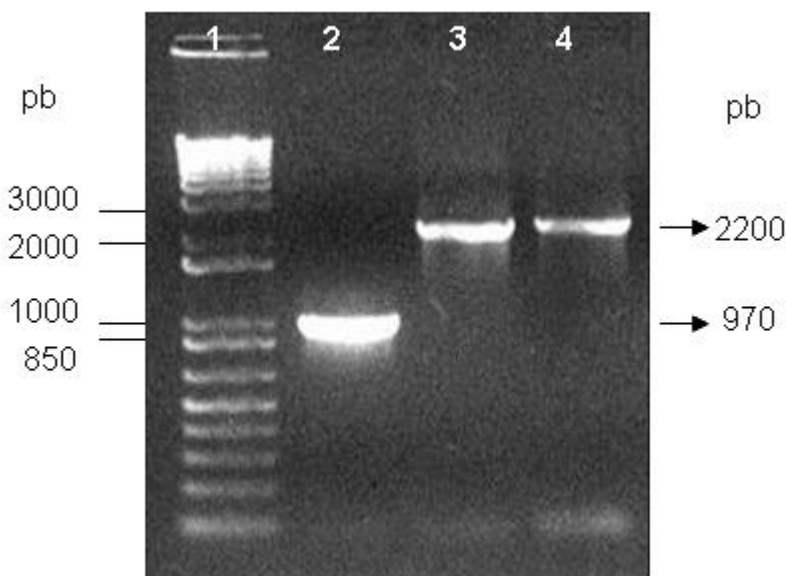


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8% demonstrando a confirmação por PCR da presença do gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência à canamicina nos mutantes obtidos. 1 - Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). 2- Produto de amplificação do gene *wbkC* da linhagem selvagem *B. abortus* S2308. 3 e 4-Produtos de amplificação do gene *wbkC* do genoma dos mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308, respectivamente.

A confirmação da mutação no gene *wbkC* também foi realizada pela técnica de *Southern blot*. Neste experimento, foi adicionado um clone em que ocorreu recombinação homóloga simples como controle positivo para as sondas do gene da canamicina e ampicilina. As linhagens parentais foram utilizadas também como controle negativo para as sondas de ambos antibióticos.

O DNA genômico das linhagens parentais e dos transformantes foram digeridos com as enzimas *Dra* I e *Nhe* I e os fragmentos obtidos foram separados em géis de agarose a 0,8% e posteriormente foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Três sondas distintas foram utilizadas neste experimento: uma para o gene *wbkC*, outra para o gene da canamicina e outra para o gene que confere resistência ampicilina (Figura 17).

Quando o gene de resistência a canamicina foi utilizado como sonda, esta hibridizou no DNA genômico dos transformantes e não hibridizou no DNA genômico das linhagens parentais *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 (Figura 17, A).

Quando utilizada a sonda correspondente a ORF do gene *wbkC* (Figura 17, B) houve hibridização de um fragmento de aproximadamente 600 pb para as linhagens parentais *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19; e uma banda de aproximadamente 1800 pb para os clones duplo recombinantes, *B. abortus* Δ *wbkC* S2308 e *B. abortus* Δ *wbkC* S19. A diferença de 1200 pb observada no perfil de hibridização entre os mutantes e as linhagens parentais é devido a inserção do cassete de canamicina interrompendo o gene *wbkC*. Este perfil indica que a recombinação homóloga dupla ocorreu entre o plasmídeo e o DNA genômico. No transformante por recombinação homóloga simples todo o vetor foi inserido no genoma da bactéria, como demonstrado anteriormente, portanto este apresentou tanto o fragmento de 600 pb que corresponde ao gene *wbkC* funcional, quanto o fragmento de 1800 pb que corresponde ao gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência a canamicina.

Este resultado foi confirmado quando se utilizou o gene da ampicilina como sonda, onde só se observou hibridização no transformante proveniente de recombinação homóloga simples, não havendo o reconhecimento nas linhagens parentais ou nos mutantes por recombinação homóloga dupla (Figura 17, C).

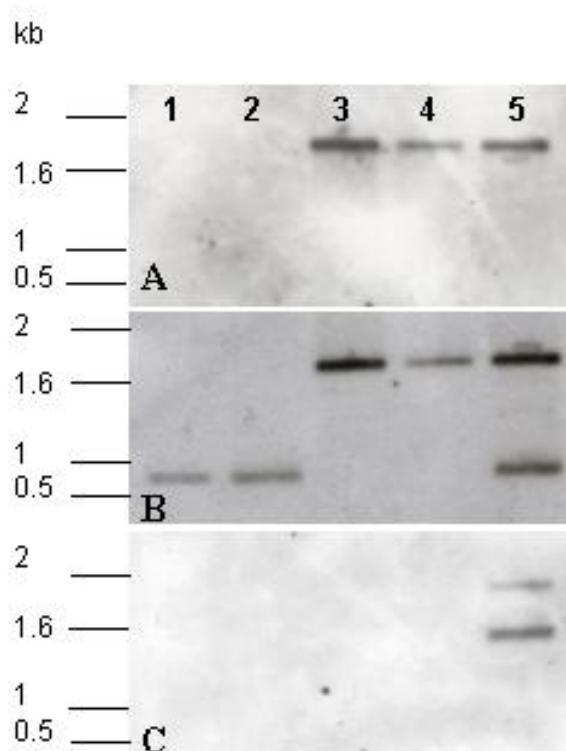


Figura 17- Southern blot em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação dos mutantes para o gene *wbkC*. 1- DNA da linhagem parental *B. abortus* S2308; 2- DNA da linhagens parental *B. abortus* S19. 3- Mutante obtido por recombinação homóloga dupla *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 4- Mutante obtido por recombinação homóloga dupla *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19. 5- Mutante obtido por recombinação homóloga simples. **A** - Sonda para o gene de resistência a canamicina. **B** - Sonda para o gene *wbkC*. **C** - Sonda para o gene de resistência à ampicilina.

4.4. Caracterização do antígeno-O dos mutantes da *B. abortus* para o gene *wbkC*.

Como descrito anteriormente, o gene *wbkC* participa da via de biossíntese do antígeno-O, componente do LPS de bactérias Gram-negativas. A presença ou ausência do antígeno-O diferencia as linhagens como sendo lisas ou rugosas, respectivamente. Para verificar se a mutação no gene *wbkC* resultou em uma alteração na estrutura do LPS, foram utilizadas duas técnicas, a coloração por cristal violeta e o *Western blot*.

Na coloração com cristal violeta as colônias rugosas absorvem o corante ficando roxas, mas o mesmo não ocorre com as colônias lisas, que permanecem brancas. Esse padrão foi observado quando foi realizada a coloração das placas contendo as linhagens

parentais *B. abortus* S2308 (Figura 18B) e *B. abortus* S19 e as linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 (Figura 18A) e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19, todas cultivadas em meio BB Ágar. Como referência de linhagem rugosa também foi realizada a coloração da linhagem vacinal *B. abortus* RB51 (dados não mostrados).

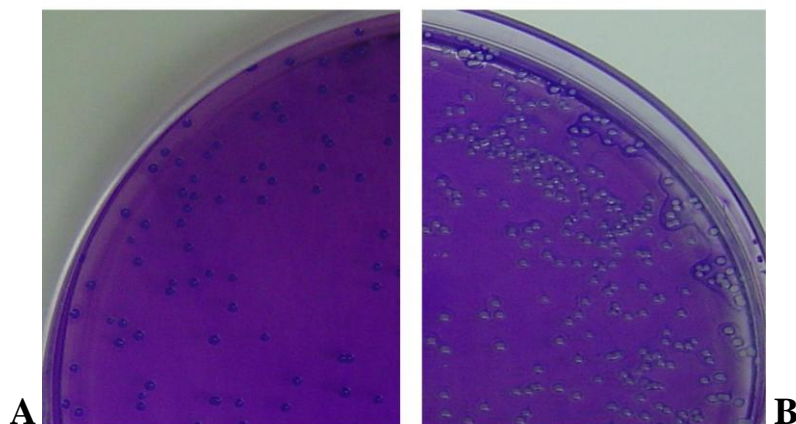


Figura 18. Caracterização morfológica das colônias pelo método do cristal violeta.

A, linhagem *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 – rugosa; B, linhagem *B. abortus* S2308 – lisa.

Para realização do *Immunoblotting*, o extrato bruto das linhagens parentais, mutantes e vacinal *B. abortus* RB51 foi submetido à eletroforese (SDS-PAGE) e transferido para uma membrana de nitrocelulose, conforme descrito anteriormente. Esta membrana foi então incubada separadamente com dois tipos de anticorpos: 04F9 (IgG2a) (Figura 19 A) que reconhece LPS liso (O-LPS) e o A68/24D08/609 (IgG1) que reconhece LPS rugoso (R-LPS) (Figura 19 B).

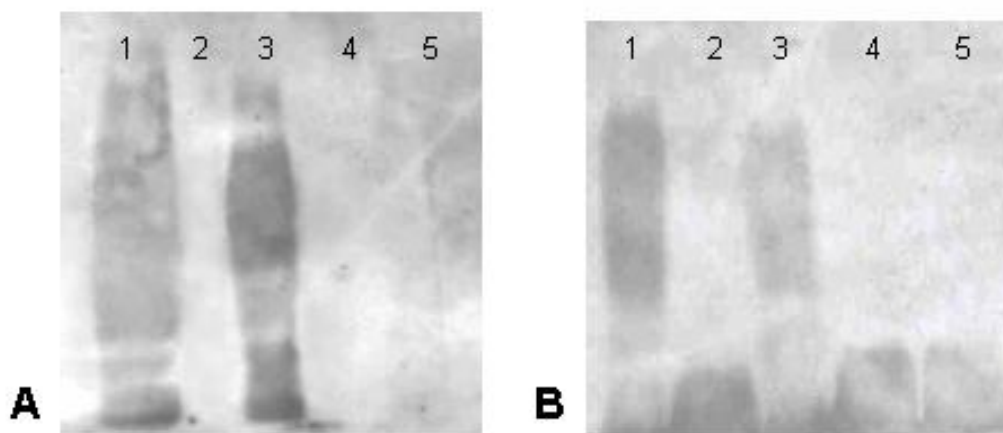


Figura 19 - Immunoblotting em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação do LPS rugoso dos mutantes para o gene *wbkC*. 1-Extrato bruto da linhagem selvagem *B. abortus* S2308; 2- Extrato bruto do mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308; 3- Extrato bruto da linhagem vacinal parental *B. abortus* S19; 4- Extrato bruto do mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19; 5- Extrato bruto da linhagem vacinal *B. abortus* RB51. A-Membrana incubada com o anticorpo anti LPS liso 04F9 (IgG2a) e B-Membrana incubada com o anticorpo anti LPS rugoso A68/24D08/609 (IgG1).

A Figura 19 A mostra o resultado obtido da membrana contendo o extrato bruto das linhagens incubada com o anticorpo que reconhece LPS liso (S-LPS). Nas canaletas contendo as linhagens parentais lisas, *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19, observa-se um arraste devido à presença de moléculas do LPS de diversos tamanhos. Porém, não há o reconhecimento do LPS das linhagens mutantes nem da linhagem vacinal *B. abortus* RB51.

A Figura 19 B mostra o resultado obtido da membrana incubada com o anticorpo que reconhece o LPS rugoso (R-LPS). Houve a formação de um arraste tanto nas linhagens lisas quanto nas linhagens rugosas, no entanto, estes arrastes se apresentam de forma diferenciada entre as linhagens lisas e as rugosas, devido a diferença estrutural nas moléculas do antígeno-O.

4.5. Experimentos *in vivo*

4.5.1-Avaliação da persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos C57BL/6

Cinco grupos de animais foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC das linhagens parentais *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 e 1×10^8 UFC dos mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 e da linhagem vacinal *B. abortus* RB51 com o objetivo de comparar a persistência destas linhagens em camundongos C57BL/6 (Figura 20).

As linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19, demonstraram ter uma persistência reduzida em todos os tempos analisados quando comparadas às linhagens parentais. Esta diferença foi estatisticamente significativa com um $p \leq 0,05$. Três semanas após a inoculação dos camundongos, as linhagens mutantes já haviam sido eliminadas do baço, porém elas apresentaram um comportamento bastante semelhante à linhagem vacinal rugosa *B. abortus* RB51.

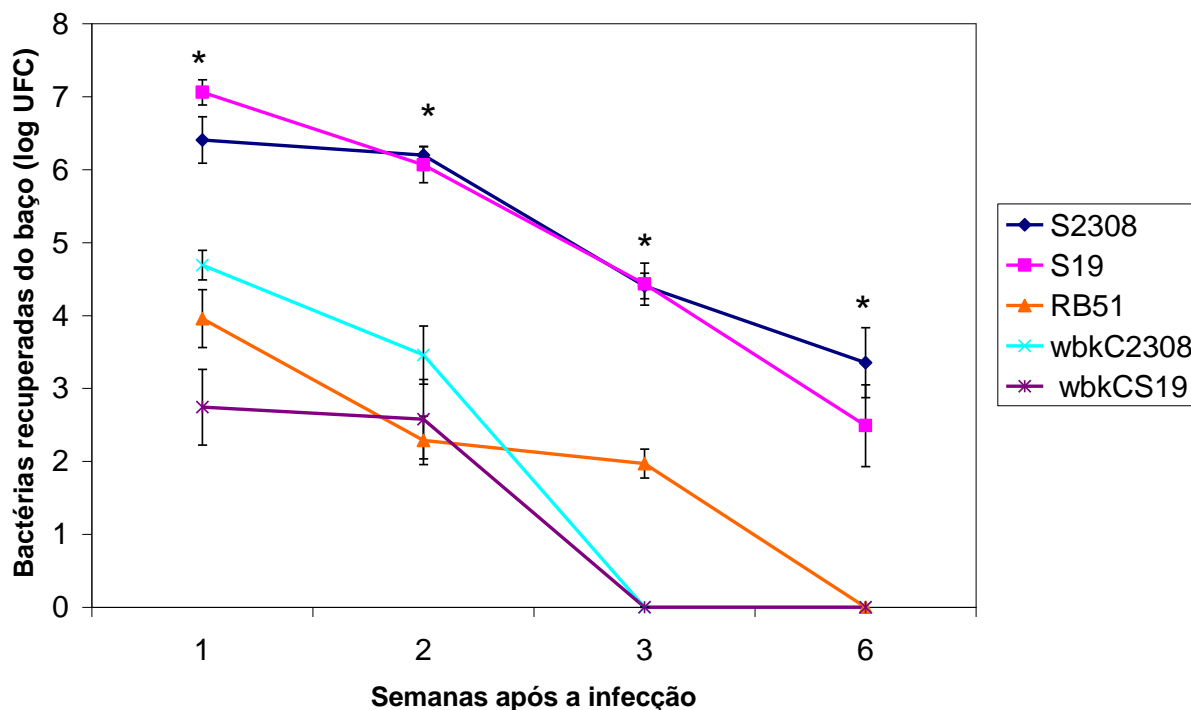


Figura 20 - Persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos C57BL/6. Sete camundongos por grupo foram infectados com as linhagens parentais, mutantes e a vacinal RB51. Os baços foram coletados 1, 2, 3 e 6 semanas após a infecção e o número de UFC foi determinado nos tecidos macerados diluídos serialmente. Os valores são expressos como log de UFC. Os asteriscos representam a diferença estatisticamente significativa dos mutantes em relação às linhagens parentais ($p \leq 0,05$).

4.5.2. Avaliação da virulência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos imunodeficientes IRF-1^(-/-)

Segundo Ko et al. (2002), o camundongo *knockout* para o fator regulador de interferon do tipo 1 (IRF-1^(-/-)) se apresenta como um ótimo modelo experimental que é capaz de determinar diferentes níveis de virulência entre as linhagens de *B. abortus*. Estes camundongos são caracterizados por 90% de redução de células T CD8+ e uma desregulação na produção da interleucina 12 (IL-12) e na indução da óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Apesar disto, camundongos IRF-1^(-/-) mostram um nível basal de imunidade necessária para controlar a infecção. Para determinar a virulência dos mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19, foram realizados experimentos para verificar o nível de sobrevivência dos camundongos IRF-1^(-/-) infectados com essas linhagens da *Brucella*.

Com o objetivo de avaliar a virulência no modelo murino dos mutantes comparada com as linhagens parentais da *B. abortus* e à linhagem vacinal *B. abortus* RB51, grupos de camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC das respectivas linhagens. Durante 4 semanas, os camundongos foram diariamente observados. Cem por cento dos camundongos inoculados com a linhagem selvagem *B. abortus* S2308 morreram entre o nono e o décimo sexto dia, 30% dos camundongos inoculados com a linhagem parental vacinal *B. abortus* S19 morreram até o vigésimo terceiro dia e todos os camundongos inoculados com as linhagens mutantes e com a linhagem vacinal RB51 sobreviveram durante as quatro semanas após a infecção (Figura 21).

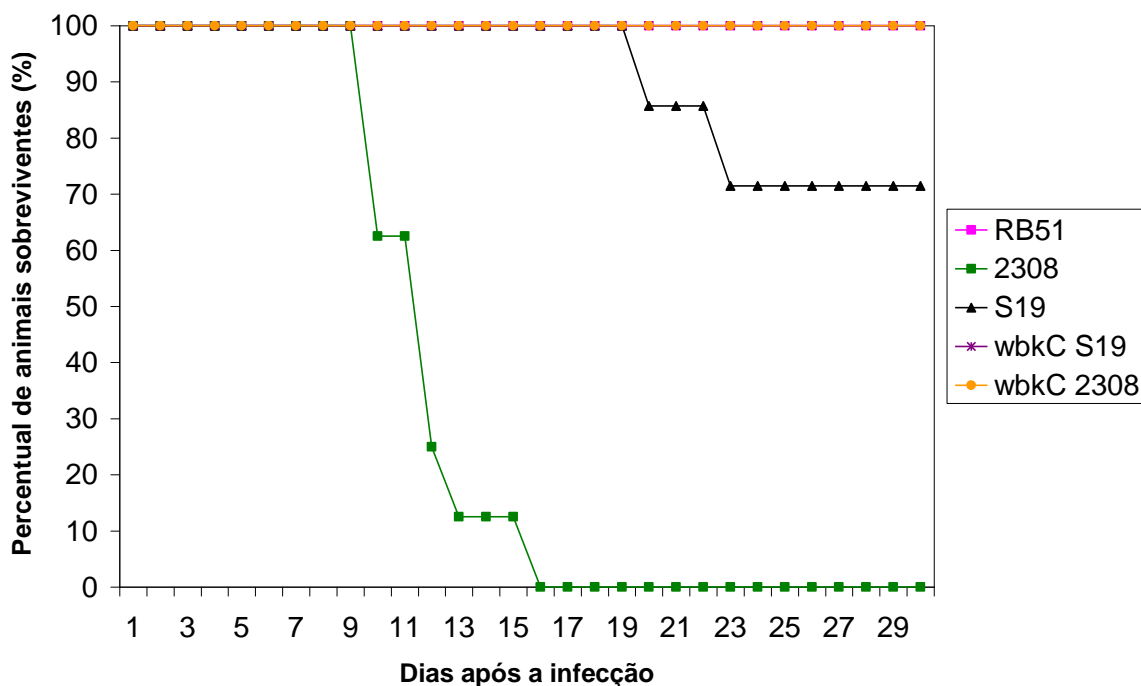


Figura 21 – Nível de virulência das linhagens *B. abortus* Δ wbkC S2308, *B. abortus* Δ wbkC S19, *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 e RB51 em camundongos IRF-1^(-/-). Oito camundongos por grupo foram infectados com uma dose de 1×10^6 UFC. A morte dos camundongos foi diariamente acompanhada até 30 dias após a infecção.

Também foi determinado o número de UFC nos camundongos IRF-1^(-/-) inoculados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC das linhagens selvagem *B. abortus* S2308, vacinal *B. abortus* S19, vacinal *B. abortus* RB51 e das linhagens mutantes. Dez dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados e foi determinado o número de UFC recuperados do baço destes animais.

Na Figura 22 pode-se observar que as linhagens mutantes e a linhagem vacinal RB51 apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparadas com a linhagem selvagem *B. abortus* S2308. A quantidade de bactérias mutantes recuperadas foi menor quando comparada com suas respectivas linhagens parentais. O número de bactérias recuperadas da linhagem mutante *B. abortus* Δ wbkC S2308 é semelhante ao observado na linhagem vacinal *B. abortus* RB51, no entanto o mesmo não foi observado para o mutante *B. abortus* Δ wbkC S19.

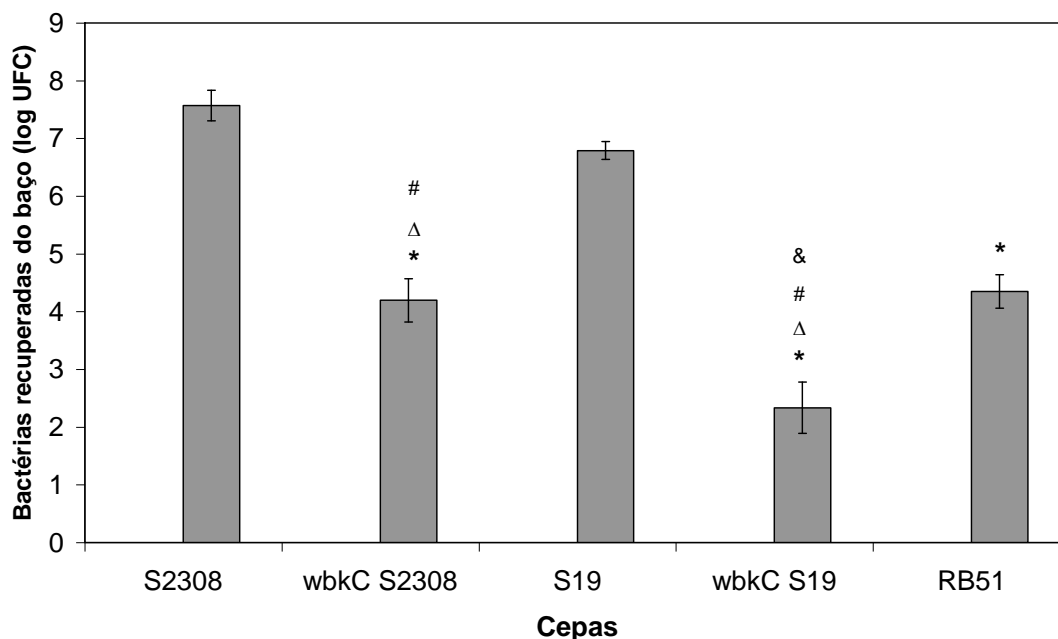


Figura 22: Persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos IRF-1^(-/-). (*) Estatisticamente significativo em relação à linhagem selvagem *B. abortus* S2308; (Δ) estatisticamente significativo em relação às linhagens parentais; (#) estatisticamente significativo em relação à linhagem vacinal *B. abortus* S19 e (&) estatisticamente significativo em relação à linhagem vacinal *B. abortus* RB51.

4.5.3. Imunoproteção induzida em camundongos IRF-1^(-/-) vacinados com as linhagens mutantes após desafio com a linhagem virulenta *B. abortus* S2308.

Para determinar se as linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 são capazes de induzir imunidade protetora contra a infecção causada pela *B. abortus* selvagem, camundongos IRF-1^(-/-) imunizados com a linhagem parental vacinal *B. abortus* S19, as linhagens mutantes e a linhagem vacinal *B. abortus* RB51 foram desafiados com a linhagem virulenta *B. abortus* S2308 seis semanas após a vacinação. Todos os camundongos vacinados com as linhagens da *Brucella* sobreviveram por mais tempo que aqueles camundongos não imunizados (PBS), (Figura 23). A linhagem mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 apresentou o menor índice de proteção (60 % de sobrevivência). Já as

linhagens *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308, *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51 apresentaram uma proteção similar, sendo que 80% dos animais sobreviveram após o desafio.

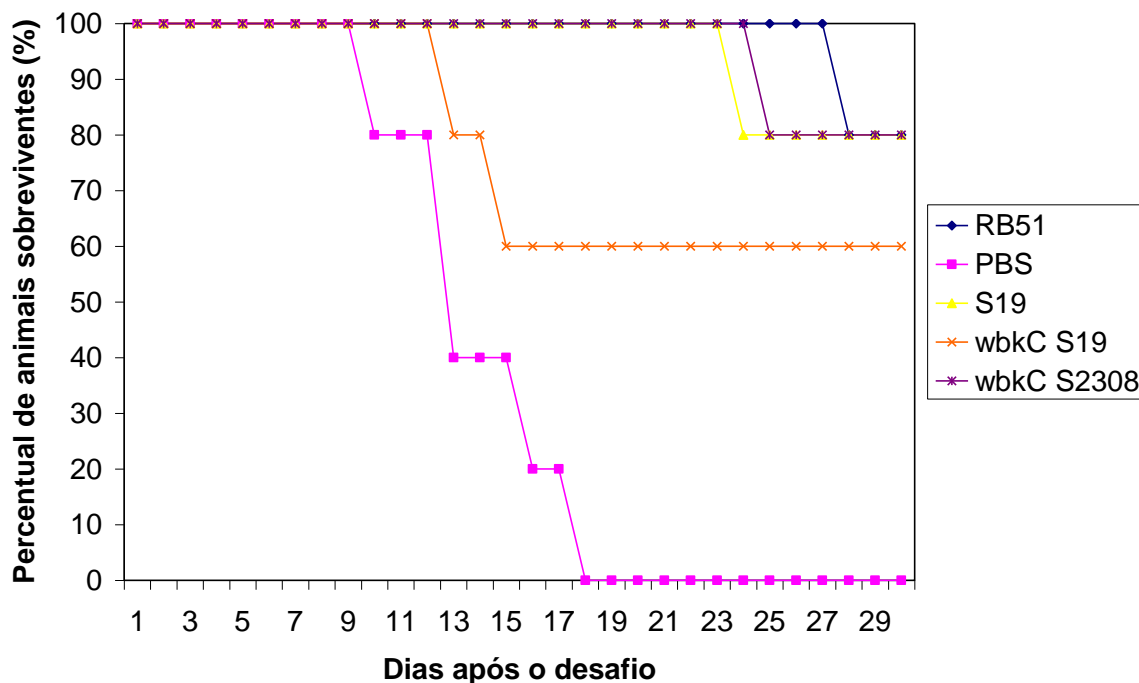


Figura 23 - Proteção de camundongos IRF-1^(-/-) contra o desafio com a linhagem virulenta S2308 da *B. abortus* após imunização com as linhagens mutantes e vacinais. Camundongos foram imunizados intraperitonealmente com uma dose de 1×10^7 UFC das linhagens mutantes $\Delta wbkC$ S2308 e $\Delta wbkC$ S19 e da linhagem vacinal *B. abortus* RB51 e com uma dose de 1×10^5 da linhagem parental vacinal *B. abortus* S19. No grupo controle, 100 μ L de PBS foram injetados intraperitonealmente. Seis semanas após a imunização foram desafiados pela mesma via com 1×10^6 UFC da linhagem virulenta *B. abortus* S2308. A morte dos camundongos foi acompanhada por 30 dias.

5. DISCUSSÃO

Brucella abortus é uma bactéria intracelular facultativa que replica nas células fagocíticas e não fagocíticas do hospedeiro e que também pode infectar o homem. Vários grupos de pesquisa no mundo inteiro têm se dedicado na busca do desenvolvimento de novas linhagens vacinais e neste sentido, muitos esforços têm sido aplicados com o objetivo de isolar, identificar e caracterizar novos antígenos e fatores de virulência encontrados nesta bactéria.

Assim como em outras bactérias Gram- negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) é um importante componente da membrana externa da *Brucella*, sendo também considerado um dos seus principais fatores de virulência. O LPS é formado por três domínios: o lipídio A, uma camada de oligossacarídeos densa (*core*) e o antígeno-O. A ausência do antígeno-O é que determina o fenótipo rugoso encontrado em algumas linhagens da *Brucella*.

Já existem vacinas comercialmente disponíveis contra a brucelose, no entanto, como foi descrito anteriormente, estas vacinas apresentam desvantagens. A linhagem vacinal rugosa, *B. abortus* RB51, apesar de conferir proteção, é resistente a um dos antibióticos mais usados no tratamento da brucelose, a rifampicina.

Neste trabalho, com o intuito de desenvolver uma linhagem rugosa da *Brucella abortus*, o gene *wbkC* foi escolhido como foco deste estudo. Este gene codifica uma formiltransferase que atua na via de biossíntese do LPS. Mais especificamente, esta enzima atua catalisando a conversão de GDP-4-NH₂-4,6 dideoximanose em GDP-4-formamido-4,6 dideoximanose, que é a unidade monomérica que constitui o antígeno-O do LPS da *Brucella* (Godfroid et al., 2000).

Ugalde et al. (2000) produziram um mutante rugoso por interrupção do gene *pgm* (fosfoglicomutase) da *B. abortus*. Em *Agrobacterium tumefaciens*, este gene participa da biossíntese de doadores de açúcares necessários à biossíntese do LPS. Mutantes para este gene em *Brucella* são avirulentos, rugosos e incapazes de sintetizar componentes do LPS, comprovando assim a relação desta molécula na virulência bacteriana.

O gene *wboA* da *B. abortus* codifica uma glicosiltransferase, enzima essencial à biossíntese do antígeno-O. A interrupção deste gene em linhagens de bactérias lisas (*B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M e *B. suis* biovar 4) resulta na conversão para um fenótipo rugoso. Foi também verificado que o gene *wboA* é interrompido na linhagem rugosa

vacinal de *B. abortus* RB51 (Vemulapalli et al. 1999). Apesar da complementação desta linhagem com o gene *wboA* funcional não restaurar seu fenótipo liso, nem sua virulência em camundongos, seu fenótipo rugoso e sua atenuação confirmaram mais uma vez que uma alteração no LPS diminui a virulência nesta bactéria.

Nesse estudo, mutantes para o gene *wbkC* foram obtidos, *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19. A partir daí foram realizados a caracterização morfológica e os experimentos *in vivo*. Na caracterização morfológica pela coloração com cristal violeta, as linhagens rugosas absorvem o corante ficando roxas e as linhagens lisas não absorvem o corante, permanecendo brancas, como descrito por Alton et al. (1988). As linhagens mutantes obtidas absorveram o corante, ao contrário das linhagens parentais lisas também submetidas a esta técnica, que não ficaram coradas. As linhagens mutantes foram coradas com o cristal violeta, assim como a linhagem rugosa vacinal *B. abortus* RB51 de acordo com o relatado por Vemulapalli et al., (2000). A utilização desta técnica permitiu uma confirmação visual da alteração da estrutura do LPS dos mutantes para o gene *wbkC*, visto que estas apresentaram um perfil diferente das linhagens parentais lisas.

A confirmação da alteração da estrutura do LPS dos mutantes também foi realizada através dos ensaios de *imunoblotting*. No extrato bruto das linhagens *B. abortus* S2308 e S19 incubado com o anticorpo que reconhece o LPS liso (S-LPS), observou-se a formação de um arraste nas canaletas contendo essas linhagens parentais lisas. O arraste se deve à presença de moléculas do LPS de diversos tamanhos. Porém, não houve o reconhecimento do LPS das linhagens mutantes nem da linhagem vacinal *B. abortus* RB51, visto que este anticorpo reconhece especificamente o antígeno-O, confirmando uma alteração na estrutura deste nas linhagens mutantes. A mutação no gene *wbkC* interferiu na biossíntese do antígeno-O de forma que sua estrutura não foi mais reconhecida pelo anticorpo específico para o LPS liso (S-LPS).

Como foi dito anteriormente, o antígeno-O é sintetizado separadamente do lipídio A e do *core*, que são sintetizados simultaneamente. Poderia ser sugerido que o antígeno-O tivesse sido sintetizado no citoplasma, mas não tivesse sido carregado para se ligar ao restante da estrutura do LPS, como já foi descrito para o mutante Δwzm por Godfroid et al. (2000). No entanto, pode-se afirmar que não é isso que ocorre no caso do gene *wbkC*, pois

se isso ocorresse o extrato bruto dos mutantes deveria ter sido reconhecido pelo anticorpo anti-LPS liso (S-LPS) devido à presença do antígeno-O citoplasmático.

Foi utilizado também um anticorpo que reconhece o LPS de linhagens rugosas (R-LPS). Esse anticorpo reconhece o *core* oligossacarídico, que conecta o antígeno-O ao lipídio A. Quando a membrana contendo extratos bacterianos foi incubada com esse anticorpo houve a formação de um arraste tanto nas linhagens lisas quanto nas linhagens rugosas, já que ambas apresentam a estrutura reconhecida pelo anticorpo (R-LPS). No entanto, o perfil eletroforético se apresentou de forma diferenciada entre as linhagens lisas e as rugosas. Isso provavelmente se deve ao fato do LPS das linhagens rugosas não apresentarem o antígeno-O e, portanto, terem um LPS de menor peso molecular quando comparado ao LPS liso (S-LPS). Pode-se sugerir ainda que a estrutura do *core* não foi alterada, já que foi reconhecida pelo anticorpo para R-LPS que reconhece especificamente o *core* do LPS.

Para verificar a virulência e proteção conferida pelos mutantes, foram realizados testes *in vivo* com camundongos C57BL/6 e camundongos *knockout* para o fator regulador de interferon do tipo 1 (IRF-1^(-/-)). A persistência dos mutantes foi menor do que a persistência das linhagens parentais, tanto em camundongos IRF-1^(-/-) quanto nos camundongos C57BL/6. Neste último, mesmo tendo sido usada uma dose 100 vezes maior das linhagens mutantes, elas apresentaram menor persistência. Três semanas após a infecção, as linhagens mutantes já haviam sido eliminadas no camundongo C57BL/6, uma persistência ainda menor que a apresentada pela linhagem vacinal *B. abortus* RB51, que foi totalmente eliminada com 6 semanas.

Geralmente as linhagens com mutações no LPS são menos virulentas que a linhagem selvagem, com exceção da *Brucella ovis* e *Brucella canis*, que são naturalmente rugosas mas virulentas (Godfroid et al., 1998). Já foi demonstrado que mutantes rugosos são mais sensíveis à lise mediada pelo complemento, e provavelmente esta é a razão principal para explicar o porque de variantes rugosas terem um fenótipo avirulento em modelos animais.

A alteração da estrutura do LPS também pode interferir na entrada da bactéria na célula hospedeira, no entanto isso ainda é uma questão que precisa ser melhor investigada. Alguns autores descreveram que o LPS liso é essencial para a sobrevivência intracelular da

Brucella, como por exemplo, a linhagem vacinal RB51 tem uma baixa persistência e não consegue se replicar em macrófagos (Schurig et al, 1991). Por outro lado, existem alguns relatos mostrando que mutantes rugosos geneticamente caracterizados não perderam a capacidade de se replicar intracelularmente, apesar da total ausência do antígeno-O (Allen et al., 1998).

Pelo teste de persistência em camundongos IRF-1^(-/-) pôde-se observar ainda que a linhagem mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 é mais rapidamente eliminada e conseqüentemente menos virulenta do que a linhagem mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308. Isso se deve ao fato de que o mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 ser derivado da linhagem S19 que já é atenuada naturalmente.

Ko et al. (2002) demonstraram a eficiência do modelo de camundongos IRF-1^(-/-) na avaliação da virulência de mutantes de *Brucella* e proteção contra infecção. Estes autores mostraram que a utilização de uma dose maior da linhagem vacinal rugosa da *B. abortus* RB51 (5×10^7 UFC) acarretou em um nível maior de proteção contra o desafio com *B. abortus* 2308, quando comparado com doses menores da vacina. Em geral, uma dose maior é utilizada na vacinação de animais com linhagens rugosas da *Brucella*, uma vez que estas são menos virulentas do que as linhagens lisas, o que faz com que estas sejam mais rapidamente eliminadas, levando a um estímulo antigênico insuficiente (Moriyon et al., 2004).

Splitter et al. (2006) avaliaram a proteção induzida por mutantes de *B. melitensis* em camundongos IRF-1^(-/-). A mutação do gene *galE* nesta bactéria causa uma alteração no seu LPS. Camundongos IRF-1^(-/-) vacinados com uma dose de 1×10^7 UFC do mutante para o gene *galE* ficaram parcialmente protegidos contra o desafio com a linhagem virulenta e essa linhagem foi capaz de replicar em células do hospedeiro. Isto está de acordo com a observação de que a sobrevivência de linhagens vacinais no hospedeiro determina a eficácia de vacinas contra a brucelose (Pommet, 1995).

Neste trabalho, a vacinação de camundongos IRF-1^(-/-) com os mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 induziu uma proteção relativamente menor quando comparada às linhagens vacinais *B. abortus* S19 e RB51. Este fato pode ser explicado provavelmente pela menor persistência destes mutantes em camundongos em relação às linhagens vacinais. Entretanto, o aumento da dose vacinal dos mutantes nestes

camundongos pode acarretar em um aumento da proteção induzida. Como as doses de linhagens rugosas são normalmente maiores que as doses de linhagens lisas devido à atenuação de virulência, experimentos futuros serão realizados com o objetivo de se verificar se há o aumento da proteção induzida pelos mutantes em camundongos IRF-1^(-/-) com o aumento da dose utilizada.

6. CONCLUSÕES

O produto codificado pelo gene *wbkC* está envolvido na biossíntese do antígeno-O do LPS da *Brucella abortus*

Os mutantes para o gene *wbkC* da *Brucella abortus* mostraram virulência reduzida em camundongos C57BL/6 e IRF-1^(-/-) quando comparados com as cepas parentais .

A enzima codificada pelo gene *wbkC*, uma formil-transferase, é um fator de virulência da *Brucella abortus*.

Os mutantes para o gene *wbkC* da *B. abortus* induziram proteção em camundongos IRF-1^(-/-), similar à cepa vacinal RB51, o que sugere o potencial vacinal destas novas cepas atenuadas.

7. PERSPECTIVAS

Avaliar a proteção induzida pelas cepas mutantes em camundongos C57BL/6.

Analisar a persistência das cepas mutantes em comparação com as cepas parentais em macrófagos peritoniais.

Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelas cepas mutantes comparadas com as parentais.

Complementação das cepas mutantes com o gene selvagem e avaliação do seu fenótipo.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature 383(6603): 787-793.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol 4(7): 499-511.
- Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Alton, G.G., Forsyth, J. R. L. (1999). *Brucella*. <http://129.109.112.248/microbook/ch028.htm>.
- Araya, L. N., P. H. Elzer, et al. (1989). "Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*." J Immunol 143(10): 3330-3337.
- Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, et al. (2002). "The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1544-1549.
- Bricker, B. J., D. R. Ewalt, et al. (2003). "Brucella 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs)." BMC Microbiol 3: 15.
- Bricker, B. J., D. R. Ewalt, et al. (2000). "Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals." J Clin Microbiol 38(3): 1258-1262.
- Brownlie, L., J. R. Stephenson, et al. (1990). "Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* HB101(pAT153)." J Gen Microbiol 136(12): 2471-2480.
- Bruce, D. (1887). Note on discovery of a microorganism in Malta Fever. Practitioner. 39: 161-163.
- Carmichael, L. E. (1990). *Brucella canis*. In: Animal Brucellosis. K. Nielsen and J.R. Duncan, eds. CRC Press, Inc., p.335-350.
- Cheers, C. and M. Ho (1983). "Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria." J Reticuloendothel Soc 34(4): 299-309.

- Cheville, N. F., M. G. Stevens, et al. (1993). "Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*." Am J Vet Res 54(10): 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(10): 3085-3094.
- Cloeckaert, A., M. Grayon, et al. (2003). "Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests." Microbes Infect 5(7): 593-602.
- Cloeckaert, A., M. Grayon, et al. (2000). "Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp." Res Microbiol 151(3): 209-216.
- Cloeckaert, A., J. M. Verger, et al. (2001). "Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus." Microbes Infect 3(9): 729-738.
- Corbel, M. J. (1997). "Brucellosis: an overview." Emerg Infect Dis 3(2): 213-221.
- Corbel, M.J.; Morgan, W.J.B. (1984). Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920,173AL. In: Holt, J.G., editor. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, p.377-388.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe, et al. (1990). "Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro." Infect Immun 58(7): 2320-2328.
- Drazek, E. S., H. S. Houn, et al. (1995). "Deletion of purE attenuates *Brucella melitensis* 16M for growth in human monocyte-derived macrophages." Infect Immun 63(9): 3297-3301.
- Eskra, L., A. Canavessi, et al. (2001). "Brucella abortus genes identified following constitutive growth and macrophage infection." Infect Immun 69(12): 7736-7742.
- Fernandez-Prada, C. M., E. B. Zelazowska, et al. (2003). "Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis." Infect Immun 71(4): 2110-2119.

- Forestier, C., F. Deleuil, et al. (2000). "Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation." J Immunol 165(9): 5202-5210.
- Foulongne, V., G. Bourg, et al. (2000). "Identification of Brucella suis genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis." Infect Immun 68(3): 1297-1303.
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. and Bollet, C. (2000). *Precis de Bacteriologie Clinique*. Paris: ESKA. P 1413-1423.
- Godfroid, F., A. Cloeckert, et al. (2000). "Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of brucella melitensis 16M (wbk)." Res Microbiol 151(8): 655-668.
- Godfroid, F., B. Taminiau, et al. (1998). "Identification of the perosamine synthetase gene of Brucella melitensis 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in Brucella survival in mice and in macrophages." Infect Immun 66(11): 5485-5493.
- Godfroid, J., A. Cloeckert, et al. (2005). "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 36(3): 313-326.
- Golding, B., D. E. Scott, et al. (2001). "Immunity and protection against Brucella abortus." Microbes Infect 3(1): 43-48.
- Halling, S. M., P. G. Detilleux, et al. (1991). "Deletion of the BCSP31 gene of Brucella abortus by replacement." Infect Immun 59(11): 3863-3868.
- Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, et al. (2005). "Completion of the genome sequence of Brucella abortus and comparison to the highly similar genomes of Brucella melitensis and Brucella suis." J Bacteriol 187(8): 2715-2726.
- Jimenez de Bagues, M. P., S. Dudal, et al. (2005). "Cellular bioterrorism: how Brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation." Clin Immunol 114(3): 227-238.
- Jones, S. M. and A. J. Winter (1992). "Survival of virulent and attenuated strains of Brucella abortus in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages." Infect Immun 60(7): 3011-3014.

- Kim, S., M. Watarai, et al. (2004). "Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*." Microb Pathog 37(1): 11-19.
- Ko, J., A. Gendron-Fitzpatrick, et al. (2002). "Virulence criteria for *Brucella abortus* strains as determined by interferon regulatory factor 1-deficient mice." Infect Immun 70(12): 7004-7012.
- Ko, J., A. Gendron-Fitzpatrick, et al. (2002). "Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis." J Immunol 168(5): 2433-2440.
- Kreutzer, D. L. and D. C. Robertson (1979). "Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*." Infect Immun 23(3): 819-828.
- Lapaque, N., I. Moriyon, et al. (2005). "Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor." Curr Opin Microbiol 8(1): 60-66.
- Lohoff, M., D. Ferrick, et al. (1997). "Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo." Immunity 6(6): 681-689.
- London, C. A., A. K. Abbas, et al. (1998). "Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development." Vet Immunol Immunopathol 63(1-2): 37-44.
- McKnight, A. J., G. J. Zimmer, et al. (1994). "Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo." J Immunol 152(5): 2172-2179.
- Monreal, D., M. J. Grillo, et al. (2003). "Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model." Infect Immun 71(6): 3261-3271.
- Moriyon, I., M. J. Grillo, et al. (2004). "Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status." Vet Res 35(1): 1-38.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (2005). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986." J Immunol 175(1): 5-14.
- Oliveira, S. C., J. S. Harms, et al. (1996). "Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from

- Brucella-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs." Cell Immunol 172(2): 262-268.
- Oliveira, S. C., J. S. Harms, et al. (1998). "The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection." Braz J Med Biol Res 31(1): 77-84.
- Oliveira, S. C. and G. A. Splitter (1995). "CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice." Eur J Immunol 25(9): 2551-2557.
- Poester, F. P., V. S. Goncalves, et al. (2002). "Brucellosis in Brazil." Vet Microbiol 90(1-4): 55-62.
- Rajashekara, G., D. A. Glover, et al. (2006). "Attenuated bioluminescent Brucella melitensis mutants GR019 (virB4), GR024 (galE), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice." Infect Immun 74(5): 2925-2936.
- Reeves, P. R., M. Hobbs, et al. (1996). "Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature." Trends Microbiol 4(12): 495-503.
- Rigby, C. E. and A. D. Fraser (1989). "Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in Brucella abortus." Can J Vet Res 53(3): 326-330.
- Roop, R. M., 2nd, B. H. Bellaire, et al. (2004). "Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche." Mol Microbiol 52(3): 621-630.
- Sambrook J. Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Aguero, J. (1989). Molecular cloning: Laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harfor Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." Biotechnology 24: 104-108.
- Schurig, G. G., R. M. Roop, 2nd, et al. (1991). "Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus." Vet Microbiol 28(2): 171-188.
- Smith, L. D. and T. A. Ficht (1990). "Pathogenesis of Brucella." Crit Rev Microbiol 17(3): 209-230.
- Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol 16(1): 3-9.

- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol 19: 623-655.
- Tatum, F. M., P. G. Dettloux, et al. (1992). "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 60(7): 2863-2869.
- Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, et al. (2001). "Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors." Science 291(5508): 1544-1547.
- Ugalde, J. E., D. J. Comerci, et al. (2003). "Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine." Infect Immun 71(11): 6264-6269.
- Ugalde, J. E., C. Czibener, et al. (2000). "Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication." Infect Immun 68(10): 5716-5723.
- Ugalde, R. A. (1999). "Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts." Microbes Infect 1(14): 1211-1219.
- Vemulapalli, R., Y. He, et al. (2000). "Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation." Infect Immun 68(7): 3927-3932.
- Vemulapalli, R., Y. He, et al. (2002). "*Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines." Vet Microbiol 90(1-4): 521-532.
- Vizcaino, N., A. Cloeckert, et al. (2000). "DNA polymorphism in the genus *Brucella*." Microbes Infect 2(9): 1089-1100.
- Watarai, M. (2004). "Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains." Microbes Infect 6(1): 93-100.
- Young, E. J. (1988). "Brucellosis: a model zoonosis in developing countries." APMIS Suppl 3: 17-20.
- Zhan, Y. and C. Cheers (1993). "Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection." Infect Immun 61(11): 4899-4901.

- Zhan, Y. and C. Cheers (1998). "Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors." J Immunol 161(3): 1447-1453.
- Zhan, Y., Z. Liu, et al. (1996). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms." Infect Immun 64(7): 2782-2786.