



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

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 cepa mutante para este gene em camundongos C57BL/6 e deficientes para IRF-1.*

Sérgio Costa Oliveira
Orientador

Belo Horizonte
Julho, 2010

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 cepa mutante para este gene em camundongos C57BL/6 e deficientes para IRF-1.*

Tese de Doutorado 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
Julho, 2010

“...recorro à minha vontade a fim de que me dispense, com a devida solícitude, estes três fatores volitivos que, indefectivelmente, devem reger e promover todas as criações da inteligência: esforço, empenho e constância.”

Da sabedoria Logosófica.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela infra-estrutura, apoio e valiosos conhecimentos adquiridos.

Ao CNPq, a CAPES e a FAPEMIG pelo financiamento do projeto e pela bolsa de doutorado concedida, sem a qual a realização deste sonho não seria possível.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia pelo apoio e ensinamentos. Em especial à Celise, pela ajuda constante na secretaria do curso.

Ao Prof. Sérgio Costa, por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação, ensinamentos e empenho em sempre nos proporcionar um laboratório de qualidade.

Aos habitantes do LIDI, por todos esses anos de companheirismo, pelo ambiente de laboratório sempre muito divertido e por me deixarem fazer parte dessa grande família.

Ao Leo, Gilson, Cyntia, Camila e a todos os que participaram nesse projeto tornando possível sua realização.

A Sandra, por toda sua dedicação em manter nosso local de trabalho o mais funcional possível, pelo carinho e amizade.

Ao *Centre d'Immunologie Marseille-Luminy*, por ter me recebido para a realização do meu doutorado sanduíche. Ao Dr. Jean-Pierre Gorvel por ter me acolhido em seu laboratório. As colegas de laboratório, Anna, Aude-Agnes e Monika, por me fazerem sentir querida mesmo muito longe de casa, pelo apoio constante, carinho e amizade. Em especial a Dra. Suzana Salcedo pelas discussões científicas, por

toda paciência e dedicação ao me ensinar microscopia confocal, por não me deixar desanimar com as milhares de contagens ao microscópio, por ter me acolhido como parte da sua família e por ser uma fonte constante de inspiração, motivação, carinho e amizade. E aos demais amigos e funcionários do CIML por todo apoio e carinho recebidos durante a minha estadia em Marseille.

A Dani Zauli pelo enorme apoio, carinho e amizade, fundamentais nos meus primeiros meses em Marseille. Sem você eu estaria perdida Chu!

As grandes amigas Ilana Camargo e Dani Afonso, por tudo que me ensinaram no lab, pelas incontáveis horas de experimentos e diversão juntas, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a crescer. D.T.I. *forever!*

As amigas desde sempre, Juliana, Fernanda, Luciana e Hebréia, pela amizade e carinho constantes, por sempre estarem ao meu lado, na alegria e na tristeza!

A toda minha família, pelo exemplo, apoio e carinho em todas as difíceis etapas desta longa jornada. A minha irmã Isabella pelo enorme carinho e incentivo. E em especial aos meus pais, Sérgio e Valdete, por fazerem dos meus sonhos os sonhos deles também, colocando a minha felicidade a frente de tudo. Pelo exemplo de vida, por serem meu porto seguro, por nunca me deixarem desistir, por todo o amor, dedicação e sacrifícios para que eu pudesse chegar até aqui. A vocês, a minha gratidão eterna.

A todos que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização deste sonho, aqui vai o meu MUITO OBRIGADA!

Thaís L. S. Lacerda

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A descoberta do patógeno	2
1.2. O gênero <i>Brucella</i>	2
1.3. A brucelose	5
1.4. Fatores de virulência no gênero <i>Brucella</i>	7
1.4.1. Sistema de secreção do tipo IV - VirB	8
1.4.2. O lipopolissacarídeo (LPS)	9
1.4.2.1. A biossíntese do LPS	12
1.5. Patogênese	15
1.5.1. A entrada da <i>Brucella</i> na célula hospedeira	16
1.6. A resposta imune na brucelose	19
1.6.1. A resposta imune inata	20
1.6.2. A resposta imune adquirida	20
1.7. Vacinas contra brucelose	23
1.8. Modelo animal para avaliação de linhagens mutantes	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Linhagens bacterianas	35
4.2. Meios e condições de cultivo	35
4.3. Vetores	36
4.4. Tampões, soluções e enzimas de restrição	37
4.5. Obtenção de DNA genômico da <i>Brucella abortus</i>	37

4.6. Amplificação do gene <i>wbkC</i>	39
4.7. Clonagem do gene <i>wbkC</i> no plasmídeo pBluescript-KS(+)	40
4.8. Obtenção do gene de resistência a canamicina (Kan ^r)	42
4.9. Clonagem do gene que codifica resistência a canamicina no vetor pBluescript: <i>wbkC</i> .	43
4.10. Preparação de células eletrocompetentes da <i>B. abortus</i> S2308 e <i>B. abortus</i> S19	44
4.11. 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	45
4.12. Caracterização molecular dos mutantes	46
4.12.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	46
4.12.2. Isolamento e digestão enzimática do DNA genômico e transferência para membrana de nitrocelulose	46
4.12.3. Obtenção das sondas	47
4.12.4. Marcação das sondas e hibridização das membranas	48
4.13. Caracterização morfológica dos mutantes	50
4.14. Caracterização do tipo de LPS presente nas linhagens mutantes através de <i>imunoblotting</i>	50
4.15. Extração do LPS, purificação do lipídeo A e espectrometria de massa.	52
4.16. Experimentos <i>in vitro</i>	52
4.16.1. Extração e cultivo de células da medula óssea	53
4.16.2. Diferenciação das células da medula em Macrófagos (BMDM)	53
4.16.3. Infecção de BMDM	54
4.16.4. Microscopia de imunofluorescência	55
4.16.5. Dosagem de citocinas	57
4.17. Experimentos <i>in vivo</i>	58
4.17.1. Animais utilizados	58
4.17.2. Determinação da persistência dos mutantes Δ <i>wbkC</i> em camundongos C57BL/6	58
4.17.3. Determinação da virulência em camundongos IRF-1 ^(-/-)	59
4.17.4. Avaliação do nível de imunoproteção induzida em camundongos	59

C57BL/6	
4.17.5. Avaliação do nível de imunoproteção induzida em camundongos IRF-1 ^(-/-) .	60
4.18. Análises estatísticas	60
5. RESULTADOS	61
5.1. Obtenção do plasmídeo para a mutação do gene <i>wbkC</i>	62
5.1.1. Amplificação da seqüência completa do gene <i>wbkC</i> da <i>B. abortus</i>	62
5.1.2. Clonagem do gene <i>wbkC</i> no plasmídeo pBluescript-KS(+)	63
5.1.3. Inserção do gene que confere resistência à canamicina no vetor pBluescript: <i>wbkC</i>	65
5.2. Obtenção e seleção do mutante da <i>B. abortus</i> para o gene <i>wbkC</i> por recombinação homóloga dupla	67
5.3. Caracterização molecular dos mutantes de <i>B. abortus</i> para o gene <i>wbkC</i>	70
5.4. Caracterização do antígeno-O dos mutantes da <i>B. abortus</i> para o gene <i>wbkC</i> .	74
5.5. Espetrometria de massa do lipídeo A.	77
5.6. Experimentos <i>in vitro</i>	78
5.6.1. Caracterização do tráfego intracelular dos mutantes $\Delta wbkC$ da <i>B. abortus</i>	78
5.6.1.1. Sobrevivência intracelular dos mutantes	78
5.6.1.2. Análise do tráfego intracelular dos mutantes por microscopia.	81
5.6.2. Dosagem de citocinas	84
5.7. Experimentos <i>in vivo</i>	86
5.7.1. Avaliação da persistência das linhagens mutantes <i>B. abortus</i> $\Delta wbkC$ S2308 e <i>B. abortus</i> $\Delta wbkC$ S19 em camundongos C57BL/6	86
5.7.2. Avaliação da virulência das linhagens mutantes <i>B. abortus</i> $\Delta wbkC$ S2308 e <i>B. abortus</i> $\Delta wbkC$ S19 em camundongos deficientes para a molécula IRF-1 ^(-/-)	87
5.7.3. Imunoproteção induzida em camundongos C57BL/6 e IRF-1 ^(-/-) vacinados com as linhagens mutantes após desafio com a linhagem virulenta <i>B. abortus</i> S2308.	90
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÕES	102

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
9. ANEXOS	118
9.1. Mapas dos plasmídeos utilizados neste trabalho	119
9.1.1. Mapa do vetor pBluescript-II KS+	119
9.1.2. Mapa do vetor pUC4K	119
9.2. Artigos	120
9.2.1. Aceite e dados do artigo publicado referente a esta tese.	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial da infecção pela <i>B. abortus</i> .	6
Figura 2. Representação esquemática dos LPS da <i>Brucella</i> e <i>E. coli</i> .	10
Figura 3. 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> .	13
Figura 4. Via de biossíntese proposta para o GDP-4-formamido-4,6, dideoximannose.	15
Figura 5. Trafego intracelular da <i>Brucella</i> e marcadores dos BCVs em seus diferentes estágios de maturação.	18
Figura 6. Gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do gene <i>wbkC</i> .	62
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a análise da clonagem da ORF do gene <i>wbkC</i> no vetor pBluescript-KS(+).	63
Figura 8. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>wbkC</i> .	64
Figura 9. Mapa do plasmídeo pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan	66
Figura 10. Gel de agarose 0,8% demonstrando a confirmação da construção do vetor pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan.	67
Figura 11. Esquema dos possíveis eventos de recombinação homóloga entre o genoma da <i>B. abortus</i> e o plasmídeo pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan.	69
Figura 12. Esquema de cultivo das bactérias transformantes em meios seletivos.	70
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a confirmação por PCR da presença do gene <i>wbkC</i> interrompido pelo gene de resistência à canamicina nos mutantes obtidos.	71
Figura 14. <i>Southern blot</i> em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação dos mutantes para o gene <i>wbkC</i> .	73
Figura 15. Caracterização morfológica das colônias pelo método do cristal violeta.	75
Figura 16. <i>Immunoblotting</i> em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação do LPS rugoso dos mutantes para o gene <i>wbkC</i> .	76
Figura 17. Análise por espectrometria de massa do lipídeo A extraído da	78

linhagem parental lisa *Brucella abortus* S19 (quadro superior) e da linhagem mutante rugosa *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 (quadro inferior).

Figura 18. Avaliação do crescimento intracelular dos mutantes $\Delta wbkC$ em BMDM. 80

Figura 19. Quantificação de vacúolos contendo *Brucella* (BCVs) positivos para LAMP-1. 82

Figura 20. Localização intracelular dos mutantes para o gene *wbkC* e linhagens parentais em BMDMs. 83

Figura 21. Dosagem de citocinas em BMDMs. 85

Figura 22. Persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos C57BL/6. 86

Figura 23. Nível de virulência das linhagens *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308, *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19, *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 e RB51 em camundongos IRF-1^(-/-). 89

Figura 24. Persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos IRF-1^(-/-). 90

Figura 25. Proteção de camundongos IRF-1^(-/-) contra o desafio com a linhagem virulenta S2308 da *B. abortus* após imunização com as linhagens mutantes e vacinais. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.	35
Tabela 2. Vetores utilizados neste trabalho.	36
Tabela 3: Enzimas utilizadas neste trabalho.	37
Tabela 4: Sondas utilizadas no <i>Southern blot</i>	48
Tabela 5. Anticorpos utilizados para imunofluorescência.	56
Tabela 6. Proteção conferida pelas linhagens vacinais <i>B. abortus</i> S19, RB51 e pelas linhagens mutantes <i>B. abortus</i> Δ wbkC2308 e <i>B. abortus</i> Δ wbkCS19 após desafio com a linhagem virulenta <i>B. abortus</i> S2308.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

μ F – micro faraday

μ g - micrograma

μ L – microlitro

°C – graus Celsius

BB - meio de cultura Brucella Broth

BCV – *Brucella containing vacúolo*

BMDM – Macrófagos derivados de medula óssea

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

D.P.- Desvio padrão

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

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

LAMP-1 - proteína de membrana associada ao lisossomo-1

LB – Meio Luria Bertani

LCCM - L929 *cell conditioned medium*

LPS – lipopolissacarídeo

L-omp – Proteína de membrana externa lipidada

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*

TLR – Receptor do tipo Toll

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

Resumo

Os membros do gênero *Brucella* são bactérias Gram-negativas, intracelulares facultativas que podem causar infecções crônicas em mamíferos. Várias tentativas têm sido feitas com o objetivo de se obter uma vacina eficaz para esta doença. No entanto, apesar de conferir proteção, as vacinas comerciais atualmente disponíveis apresentam desvantagens, tais como a interferência no diagnóstico de animais infectados e resistência a antibióticos. Considerando LPS *Brucella* de um dos seus principais fatores de virulência, nós interrompemos o gene *wbkC* da *Brucella abortus*, que está relacionado com a biossíntese do seu LPS. Mais especificamente, o gene *wbkC* catalisa a conversão de GDP-4-NH₂-4,6 dideoximanose em GDP-4-formamido-4,6 dideoximanose, que é a unidade monomérica do antígeno-O presente no LPS da *Brucella*. Neste trabalho foram gerados mutantes pela estratégia de recombinação homóloga dupla para a linhagem selvagem *Brucella abortus* S2308 vacinal e S19. Nas análises *in vitro* realizadas em macrófagos de medula óssea, foram observadas alterações na sobrevivência e tráfico intracelular dos mutantes em comparação com as linhagens parentais. Também foram realizados experimentos *in vivo* em camundongos C56BL/6 e *knockout* para IRF-1 (fator regulador de interferon-1). As linhagens mutantes *wbkC* apresentaram uma menor persistência em ambos os modelos murinos analisados, mostrando o papel fundamental deste gene na virulência da *Brucella abortus*. Experimentos de proteção revelaram que as linhagens mutantes *wbkC* induziram uma menor imunidade protetora em camundongos C56BL/6 quando comparados à linhagem vacinal lisa S19, no entanto o mutante Δ *wbkC* S2308 mutante apresentou o mesmo nível de proteção observado para a cepa da vacina rugosa RB51.

Abstract

Members of genus *Brucella* are Gram negative, facultative intracellular bacterial pathogens that can cause chronic infections in mammals. Several attempts to get an efficient vaccine have been developed. However, in spite of conferring protection, the vaccines currently commercial available show disadvantages as diagnostic interference and resistance to antibiotics. Considering *Brucella*'s LPS one of its main virulence factors, we disrupted *Brucella abortus wbkC* gene which is related to LPS biosynthesis pathway. More specifically, *wbkC* catalyzes the GDP-4-NH₂-4,6 dideoximanose conversion in GDP-4-formamido-4,6 dideoximanose, the monomeric unit of antigen-O present in *Brucella* LPS. Mutants for smooth wild type *Brucella abortus* S2308 and vaccine strain S19 were generated by double recombination strategy. *In vitro* analyses were performed in bone marrow macrophages, where we observed alteration in intracellular survival and trafficking of the mutants compared to the parental strains. *In vivo* experiments in C56BL/6 and IRF-1 (interferon regulation factor-1) knockout mice models were also performed. *wbkC* mutants had a lower persistence in both mice models, showing the critical role of the selected gene for full bacterial virulence. Challenge experiments revealed that *wbkC* mutant strains induced lower protective immunity in C56BL/6 when compared to smooth vaccine strain S19, however $\Delta wbkC$ 2308 mutant could induce the same level of protection observed for rough vaccine strain RB51.

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 levou 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 *et al.*, 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 *al.*, 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 um dos principais fatores de virulência deste gênero (Kelly *et al.*, 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). No ano de 2001 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 (Cloeckaert *et al.*, 2001 e 2003).

Recentemente foram descritas duas outras espécies, *Brucella microti*, isolada de raposas vermelhas na Austrália, e *Brucella inopinata*, isolada de uma infecção de implante mamário em humanos (Audic *et al.*, 2009 e Scholz *et al.*, 2010). Também foi relatada recentemente a infecção de babuínos por *Brucella*, que mostrou indícios de ser uma espécie que ainda não havia sido descrita até o momento (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009).

Três espécies apresentam um maior risco de infecção ao homem: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis* (Corbel *et al.*, 1997). Existem alguns casos descritos na literatura de infecção humana originada por *Brucella canis*, mas a incidência ainda é relativamente baixa (Carmichael *et al.*, 1990). A espécie mais patogênica para o homem é a *Brucella melitensis*, mas a *Brucella abortus* é a mais difundida mundialmente (Corbel *et al.*, 1997).

O gênero apresenta uma similaridade de seqüência entre ácidos nucleicos, tendo 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).

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 *et al.*, 1999).

1.3. A brucelose

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*, que infectam o homem e animais domésticos (Nicoletti *et al.*, 1989). Esta enfermidade é um problema de saúde pública devido à sua possibilidade de transmissão ao homem, e causa perdas 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 *et al.*, 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 devida 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 *et al.*, 1988).

A distribuição geográfica da brucelose animal é bastante ampla (Figura 1), 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 *et al.*, 1997).

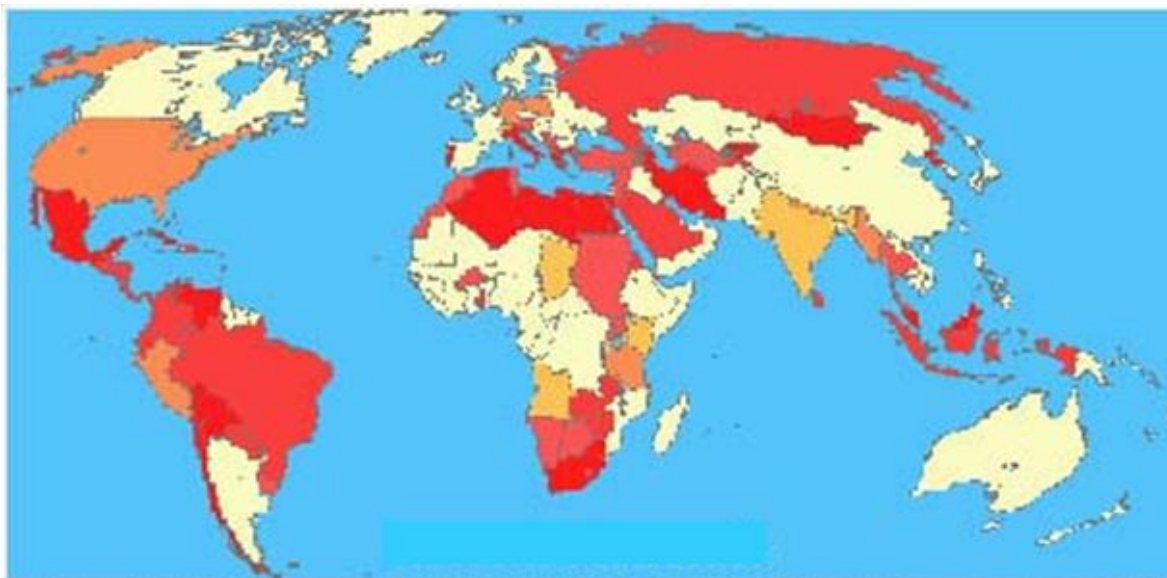


Figura 1. Incidência mundial da infecção pela *B. abortus*. No mapa as áreas em vermelho indicam regiões onde há alta incidência da brucelose e as áreas em amarelo indicam regiões de baixa incidência.

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. Atualmente, a prevalência de animais soropositivos para a brucelose no estado de Minas Gerais é de 1,1% (Gonçalves *et al.*, 2009). 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 *et al.*, 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. 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 às aquelas 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. Sistema de secreção do tipo IV - VirB

Para sobreviver e multiplicar nas células hospedeiras, a bactéria ativa vários genes e secreta proteínas que facilitam a sua adaptação em um ambiente intracelular hostil (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* codifica o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) encontrado em vários tipos de bactéria como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pilori* e *Brucella spp.* 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 induzidos especificamente dentro dos macrófagos e a acidificação do fagossomo é o sinal intracelular fundamental para a indução da expressão deste operon (Boschirolì *et al.*, 2002). Além disso, o *VirB* é essencial para a manutenção da interação entre o vacúolo replicativo da *Brucella* (BCV) e o retículo endoplasmático (RE), que é requerido durante o desenvolvimento e sobrevivência da bactéria (Celli *et al.*, 2003).

O operon *virB* é composto de 12 genes que formam o T4SS. Este operon é regulado e induzido nas etapas iniciais da fase exponencial e após a exposição a condições ácidas, como no meio endossomal/lisossomal. A entrada por microdomínios de lipídeos, também conhecidos como *lipid rafts*, e o processo de invasão celular não são afetados em mutantes *virB* (Porte *et al.*, 2003), mas é indispensável para a maturação do nicho replicativo intracelular da *Brucella* (Rolan *et al.*, 2007). Este mutante é capaz de se disseminar no organismo de camundongos, porém incapaz de se replicar e persistir no hospedeiro.

1.4.2. 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 um dos principais fatores 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*

e *Salmonella spp.* 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 2).

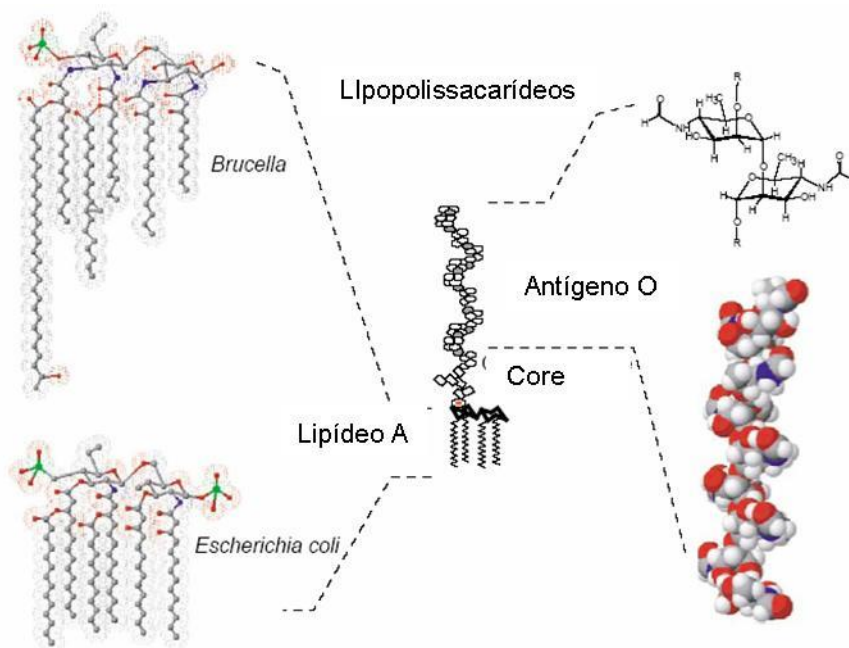


Figura 2: Representação esquemática dos LPS da *Brucella* e *E. coli*. Adaptado de Lapaque *et al.* (2005).

Estas propriedades conferem ao LPS da *Brucella* uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação por macrófagos e proteção contra respostas imunológicas do hospedeiro (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 lipídeo 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 lipídeo A é composto de glicosamina, ácido N-tetradecanóico, ácido N-hexadecanóico, ácido 3-hidroxitetradecanóico e ácido 3-hidroxihexadecanóico (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 leucócitos 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 (Fernandez-Prada *et al.*, 2003). 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 *et al.*, 1999).

1.4.2.1. A biossíntese do LPS

As vias bioquímicas 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, o antígeno-O é ligado 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 3) (Moriyón *et al.*, 2004).

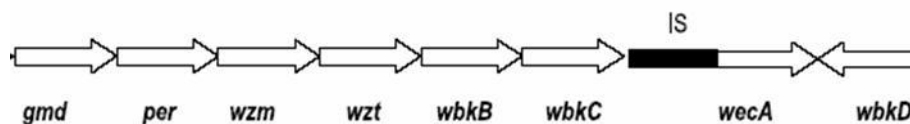


Figura 3. Região do cromossomo I de *B. abortus* na ORF 1429 que consiste de genes envolvidos na síntese do LPS da *Brucella*.

Tentando contornar os problemas existentes nas vacinas comercialmente disponíveis, principalmente a questão do diagnóstico referente à dificuldade na diferenciação de animais vacinados dos infectados, 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, que atuam na via de biossíntese do antígeno-O. Esses mutantes tiveram sua morfologia rugosa confirmada por coloração com cristal violeta e *immunoblotting* 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 possam ser testadas como vacina.

O gene *wbkC*, alvo deste estudo, é um dos genes que participa da via de biossíntese do antígeno-O e sua seqüência nucleotídica tem um conteúdo G+C (~48%) menor que o normalmente encontrado em *Brucella ssp* (58%) (Cloeckeaert 2000). A proteína codificada pelo gene *wbkC* da *B. melitensis* 16M mostrou similaridade com várias proteínas que catalisam a transferência de um grupo formil, possivelmente atuando como 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 4) da *Brucella*.

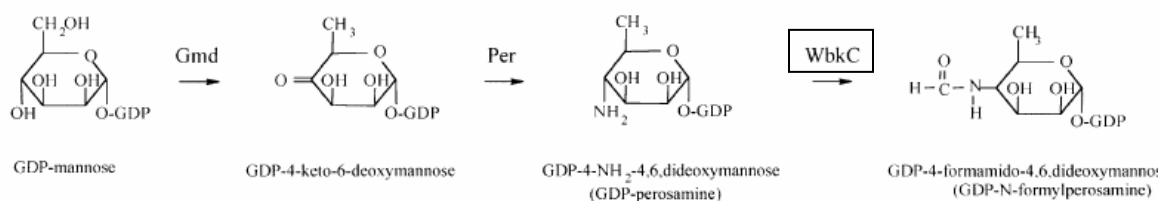


Figura 4. Via de biossíntese proposta para o GDP-4-formamido-4,6, dideoximannose.

1.5. Patogênese

Foi determinado que após a infecção, os microrganismos se replicam no tecido da placenta de bovinos, 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*. A capacidade de metabolizar o

eritritol é muito limitada entre os procariotos. 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 ou flagelos. 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 (Alton & Forsyth, 1999).

A *Brucella* tem a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (Jones & Winter, 1992) e não fagocíticas (Detilleux *et al.*, 1990). Contudo, os macrófagos (Corbel *et al.*, 1997) e trofoblastos (Carvalho Neta *et al.*, 2008) são considerados como as principais células de residência do hospedeiro para este patógeno. A *Brucella* entra na célula hospedeira através de microdomínios de lipídeos (Figura 5), existentes na membrana desta célula. Através deste mecanismo, o patógeno consegue evitar a fusão fagossomo/lisossomo. 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 nos microdomínios de lipídeo parecem reconhecer duas moléculas existentes na membrana da bactéria. Foi proposto que a proteína prion celular (PrP^C) e o receptor “scavenger” do tipo A (SR-A), seriam os receptores para os ligantes expostos na superfície da *Brucella*, a chaperona Hsp-60 e o LPS da *Brucella*, respectivamente (Kim *et al.*, 2004). No entanto o papel da PrP^C na infecção por *Brucella* ainda é controverso (Fontes *et al.*, 2005).

A sobrevivência e replicação da linhagem selvagem *B. abortus* S2308 em macrófagos é dependente da entrada e tráfego intracelular diferenciado desta bactéria nestas células (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998). Quando a *B. abortus* S2308 é internalizada, ela permanece em um compartimento denominado *Brucella*-

containing vacuole (BCV). A formação do BCV vem sendo amplamente caracterizada, e já foram estabelecidos diversos marcadores presentes em cada uma dos seus estágios de formação (Figura 5).

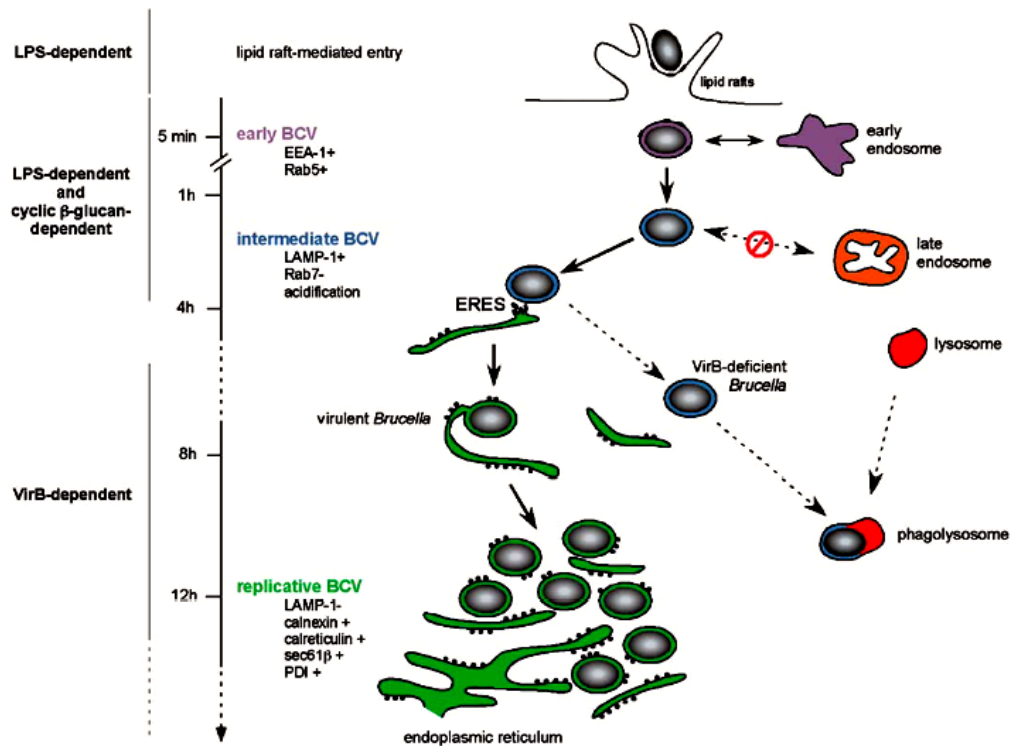


Figura 5. Tráfego intracelular da *Brucella* e marcadores dos BCVs em seus diferentes estágios de maturação. Celli, 2006.

Após a entrada da *Brucella* na célula do hospedeiro, dependente do LPS, pelos microdomínios de lipídeos, a bactéria é encontrada em um BCV primário (5-10 min pós-infecção) que interage com endossomos primários, adquirindo transitoriamente a GTPase Rab5 e o antígeno de endossomo primário EEA-1. Os BCVs então amadurecem em vacúolos ácidos intermediários que acumulam a proteína de membrana associada ao lisossomo 1 (LAMP-1), evitando interações com endossomos tardios e fusão com lisossomos, essa etapa é dependente do

LPS e do ciclo-1,2- β -glicano. No período de 2 a 8 horas pós-infecção os BCVs intermediários interagem com os locais de saída do retículo endoplasmático (ERES). Tais interações são dependentes do sistema de secreção tipo IV, *virB*, e levam a fusão entre BCVs e o retículo endoplasmático (RE) no período de 8 a 12 horas pós-infecção. Esse processo gera uma organela derivada do RE permissiva à replicação bacteriana, que vai ocorrer no período de 12 horas pós-infecção em diante.

Os BCVs replicativos excluem LAMP-1 e adquirem vários marcadores do RE (calnexina, calreticulina, sec61 β , PDI), através das trocas com a membrana do RE. A replicação bacteriana é seguida da fissão do BCV em dois BCVs filhos, via acréscimo adicional de membranas RE. Vacúolos contendo mutantes da *Brucella* deficientes em *virB* não podem manter as interações ou fundir com o RE, eles são então direcionados para a fusão com os lisossomos e eliminados (Celli, 2006).

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 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* ativam 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⁺ (Oliveira & Splitter, 1995).

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 (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 efetoras dos

macrófagos (Abbas *et al.*,1996). A produção do IFN- γ é mediada por fatores de regulação do IFN, denominados os fatores reguladores de interferon-IRF (Jinkyng *et al.*, 2000).

1.7. Vacinas contra a brucelose

As vacinas vivas têm se mostrado mais eficientes que as 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 anti-LPS 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). Seria também recomendável que a vacina viva possua marcadores fenotípicos ou genotípicos que permitam uma fácil diferenciação das linhagens patogênicas no campo.

Vários grupos de pesquisa no mundo têm caracterizado antígenos da *Brucella*, como o objetivo de encontrar um componente protéico que possa ser usado para conferir proteção em animais. Como exemplo dessas proteínas antigênicas da *Brucella*, pode-se citar: p39 (Al-Mariri *et al.*, 2001), Cu-Zn SOD (Tabatabai e Pugh, 1994), L7/L12 (Bachrach *et al.*,1994; Oliveira e Splitter 1996;

Mallick *et al.*, 2007), GroEL & GroES (Oliveira *et al.*, 1996), YaJC (Vemulapalli *et al.*, 2000) e OMP31 (Cassataro *et al.* 2005, Kaushik *et al.*, 2010).

Recentemente, foi também demonstrado que a imunização de camundongos com formas lipidadas e não lipidadas de proteínas recombinantes de membrana OMP-16 e OMP-19, juntamente com adjuvante, foi capaz de induzir uma resposta imune Th1 e níveis significativos de proteção comparável à vacinação com *Brucella* viva (S19) (Pasquevich *et al.*, 2009). Porém os níveis de proteção utilizando-se vacinas de subunidade ainda estão longe do ideal.

Microrganismos geneticamente modificados também têm sido usados como vetor para estimular o sistema imune do hospedeiro. Recentemente, Harms e colaboradores (2009) desenvolveram um mutante de *E. coli* capaz de infectar uma grande variedade de tipos celulares e liberar de um produto terapêutico dentro das células do hospedeiro infectado. Elas apresentaram um vetor vacinal que imita a infecção do patógeno, induzindo a diferenciação de um perfil de resposta imune Th1 e estimulando linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos.

Uma nova estratégia de vacinação são as vacinas de DNA, que vêm sendo intensamente pesquisadas devido a sua capacidade de induzir resposta imune humoral e celular (Leclercq *et al.*, 2003). Diferentes genes de *Brucella* foram avaliados através da vacinação DNA (Velikovsk *et al.*, 2002; Onate *et al.*, 2003 e Cassataro *et al.*, 2005) No entanto, até agora, nenhuma vacina monovalente de DNA demonstrou uma eficácia superior à obtida com vacinas comercialmente disponíveis atualmente.

Visto que um nível de proteção ideal não foi atingido por meio dessas vacinas alternativas, a vacinação contra a brucelose vem sendo feita com a

utilização de vacinas vivas atenuadas que até o momento, apesar das desvantagens apresentadas, são as que conferem um melhor nível de proteção em animais. As vacinas vivas atenuadas têm a vantagem de usar das propriedades naturais do próprio organismo, tais como invasão celular e tropismo tecido-específico, além de apresentar uma enorme gama de imunógenos (Fitch *et al.*, 2009).

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 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 *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1990). Outras vacinas lisas já foram descritas, dentre elas o mutante Δpgk (Trant *et al.*, 2010), desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, que apresentou níveis de proteção iguais aos obtidos com a linhagem vacinal S19.

Diversas linhagens vivas da *B. abortus* atenuadas têm sido estudadas. Em geral, são interrompidos genes relacionados à biossíntese do LPS resultando em linhagens rugosas que seriam úteis no momento de triagem sorológica dos

animais (Shurig *et al.*, 1991; Ugalde *et al.*, 2000; Ugalde *et al.*, 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 *et al.*, 1991; Vemulapalli *et al.*, 2000). A linhagem *B. abortus* RB51 é avirulenta em camundongos e bovinos, mantém a capacidade de induzir proteção quando administrada em altas doses, 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 spp.* No entanto, um dos problemas inerentes a linhagens rugosas vacinais da *Brucella* é que elas podem ser muito atenuadas, persistirem pouco no hospedeiro e podem não induzir uma imunidade protetora eficiente (Ugalde *et al.*, 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 *et al.*, 2000; Monreal *et al.*, 2003).

1.8. Modelo animal para avaliação de linhagens mutantes da *Brucella spp.*

Os camundongos *knockout* no fator regulador de interferon do tipo 1 (IRF-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. 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 à infecção por linhagens atenuadas da *Brucella abortus*, mesmo possuindo componentes de diversos 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 da *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.JUSTIFICATIVA

A brucelose constitui-se um grave problema para a sanidade animal, afetando conseqüentemente a saúde pública da população. O Boletim do Departamento de Defesa Sanitária Animal (2001) demonstrou que a prevalência média da brucelose bovina no Brasil é da ordem de 5%. Considerando o efetivo bovino no Brasil em torno de 204.000.000 de cabeças (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004) pode-se estimar que o prejuízo causado por esta enfermidade é de mais de 30 milhões de dólares por ano, sem falar nas outras espécies domésticas.

As vacinas existentes no mercado não atendem de maneira eficiente e segura as necessidades da nossa sociedade produtora. Uma das linhagens vacinais utilizadas, *B. Abortus* S19, apesar de conferir proteção aos animais imunizados apresentam interferência no diagnóstico dos animais imunizados (Cheville *et al*, 1993). Tentando contornar este problema foi desenvolvida uma linhagem rugosa que não interfere no diagnóstico de rebanhos infectados, mas apresenta resistência ao antibiótico utilizado no tratamento da doença em humanos (Ugalde *et al.*, 2003).

Estimulados por estes dados, nosso grupo de pesquisa vem tentando desenvolver uma nova linhagem vacinal que consiga conferir proteção aos animais imunizados e não apresente os problemas encontrados nas vacinas atualmente disponíveis no mercado. O gene *wbkC* foi selecionado como alvo para deleção gênica, visto que este está envolvido da via de biossíntese do LPS da *Brucella*. Além de ser um dos principais fatores de virulência desta, a alteração de sua estrutura resulta na obtenção de linhagens rugosas, que são ideais para

serem utilizadas como linhagens vacinais por não interferirem no diagnóstico do rebanho infectado.

3.OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o 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 macrófagos e camundongos C57BL/6 e deficientes para o IRF-1.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Construção molecular de um vetor suicida contendo o gene *wbkC* com o marcador de resistência à canamicina.
- ✓ Obtenção do mutante da *Brucella abortus* por recombinação homóloga dupla do gene *wbkC* ($\Delta wbkC$) nas linhagens parentais S23008 e S19 .
- ✓ Confirmação da mutação no gene *wbkC* através de *Southern blot* e *immunoblotting*.
- ✓ Avaliar a persistência e virulência dos mutantes $\Delta wbkC$ em camundongos C57BL/6 e *knockout* para IRF-1, comparado com a linhagem virulenta *B. abortus* S2308 e as linhagens vacinais S19 e RB51.
- ✓ Determinação da persistência e localização intracelular dos mutantes obtidos em macrófagos murinos e a produção de citocinas pró-inflamatórias.
- ✓ Avaliar a capacidade destas bactérias mutantes de proteger camundongos C57BL/6 e *knockout* para IRF-1 contra a brucelose experimental.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. 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 <i>et al.</i> , 1991
<i>Brucella abortus</i>	S19	Linhagem vacinal – Estoque do laboratório
<i>Brucella abortus</i>	<i>virB9</i> ⁻	Celli <i>et al.</i> , 2003
<i>Brucella abortus</i>	Δ <i>wbkC</i> S19	Linhagem mutante - este trabalho
<i>Brucella abortus</i>	Δ <i>wbkCS</i> 2308	Linhagem mutante - este trabalho

4.2. 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 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) e para *B. abortus* foram ampicilina (10 µg/mL), canamicina (25 µg/mL).

4.3. 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 <i>et al.</i> , 1990
pBluescript: <i>wbkC</i>	ColE 1- Amp ^r	Este trabalho
pBluescript: <i>wbkC</i> -Kan	ColE 1- Amp ^r - Kan ^r	Este trabalho

4.4. Tampões, soluções e enzimas de restrição

Os tampões e as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas segundo Sambrook e colaboradores (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>DraI</i>	G[↓]CTAG_↓C	Invitrogen
<i>SphI</i>	G_↓CATG[↓]C	Promega
<i>NheI</i>	G[↓]CTAG_↓C	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	C[↓]TCGA_↓G	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	T[↓]CTAG_↓A	New England Biolabs

4.5. Obtenção de DNA genômico da *Brucella abortus*

A extração do DNA genômico da *B. abortus* linhagem S2308 foi realizada de acordo com Halling e colaboradores (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 ressuspendido 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 ressuspendido 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/ μ L)

4.6. 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*.

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 *XhoI* no iniciador F e *XbaI* (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 μ L 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.

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

O produto amplificado e o plasmídeo pBluescript-KS(+) (Anexo 1) 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.

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 µL do tampão de ligação 5X e 1,5 µL da enzima T4 DNA Ligase 1U/µL (GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA) em volume final de 10 µL. As ligações

foram realizadas por 16 horas à 16 °C. O produto da ligação passou a ser denominado pBluescript:*wbkC*.

Em seguida, células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas, estas foram preparadas segundo Sambrook e colaboradores (1988). Para a transformação com o vetor pBluescript:*wbkC*, foi utilizado o produto da reação de ligação do vetor em 50 μ L de células eletrocompetentes. Estas foram lentamente descongeladas em gelo e acrescentadas ao vetor pBluescript:*wbkC*, em seguida as células foram mantidas por 5 minutos no gelo. Posteriormente, 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 impulso elétrico, acrescentou-se 900 μ L 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 μ L de LB e cultivadas em LB ágar suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina, 40 μ g/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 μ g/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 e colaboradores (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, Brasil). 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.

4.8. Obtenção do gene de resistência à canamicina (Kan^r)

O gene que confere resistência à canamicina foi obtido do plasmídeo pUC-4K (Anexo 1) (GE Healthcare). A partir da seqüência 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 *SphI*, 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. A reação de amplificação do gene da canamicina foi realizada pelo mesmo protocolo descrito para o gene *wbkC*.

4.9. Clonagem do gene que codifica resistência à canamicina no vetor pBluescript:*wbkC*.

A reação de digestão do vetor pBluescript:*wbkC* e do gene de resistência à canamicina (1208 pb) com a enzima *SphI* foi realizada com 1 μ g 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 à canamicina no vetor pBluescript:*wbkC* 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 (Invitrogen) em volume final de 10 μ L. 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* DH5 α 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.

4.10. 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 agar e 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 ressuspendido em 500 µL de água apirogênica e separado em alíquotas de 50 µL estocadas a - 70 °C, para posterior uso.

4.11. 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 e colaboradores (1995), com algumas modificações. Células eletrocompetentes da *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 (50 μ L) foram lentamente descongeladas em banho de gelo e imediatamente acrescidas a 5 μ g da construção (não excedendo o volume de 10 μ L). Esta mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm, estéril, resfriada e incubadas 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 μ F de capacitância, 2,5 kV de voltagem e 400 Ω de resistência. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1000 μ L de meio SOC (Invitrogen) e incubadas a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm durante 18 horas. Posteriormente, 200 μ L 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 cultivadas 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.

4.12. 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 os ensaios de PCR e *Southern blot*, técnicas que também permitiram a diferenciação dos transformantes nos quais ocorreu recombinação homóloga simples daqueles em que ocorreu recombinação homóloga dupla.

4.12.1. 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.

4.12.2. Isolamento e digestão enzimática 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 *NheI* e *DraI* (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 na concentração de 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 ultra-violeta no aparelho CL 1000 Crosslinker (UVP, Upland-CA, USA) por 5 minutos.

4.12.3. Obtenção das sondas

Foram construídas sondas para o gene *wbkC* e para os genes de resistência à 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</i> e <i>DraI</i>	597 pb
Ampicilina	pAT 153	<i>Pst I</i> e <i>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 na concentração de 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 com um DNA de concentração conhecida para sua quantificação.

4.12.4. 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 reagentes. 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.

Em seguida, 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.

4.13. 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 e colaboradores (1988). Esta técnica permite a diferenciação das colônias lisas e rugosas, sendo que estas se apresentam brancas ou 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 adicionado na placa com as colônias a serem caracterizadas e 20 segundos depois o excesso do corante foi retirado.

4.14. Caracterização do tipo de LPS presente nas linhagens mutantes através de *immunoblotting*

A técnica de *immunoblotting* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Godfroid e colaboradores (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 sob agitação de 200 rpm. Estas foram submetidas a centrifugação a 12000 g,

lavadas em 0,0625M Tris-HCl (pH 6,8) e centrifugadas novamente. Foram acrescentados 200 μ L 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 μ g de proteinase K a 50 °C por duas horas e por 18 horas a temperatura ambiente. Um volume de 20 μ L deste extrato bruto foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) 12% e foi 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 μ L 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 da 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 1%

de leite em pó. 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 *immunoblot* foi então revelado utilizando 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.

4.15. Extração do LPS, purificação do lipídeo A e espectrometria de massa.

O LPS liso das linhagens parentais, *B. abortus* S2308 e S19 e o LPS rugoso das demais linhagens foram purificados de acordo com Moreno e colaboradores (1979). O lipídeo-A foi isolado por hidrólise ácida do LPS já purificado destas linhagens de acordo com Campos *et al.*, 2004. O lipídeo-A isolado foi então analisado por *electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry* (ESI-TOF-MS) utilizando o equipamento Q-TOF-MS (Ultima, Micromass Ltd., Manchester, United Kingdom). O lipídeo-A de *E. coli* (Sigma) foi utilizado como controle para calibrar o equipamento.

4.16. Experimentos *in vitro*

4.16.1.Extração e cultivo de células da medula óssea

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos C57BL/6 foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades proximal e distal destes ossos foram seccionadas e foram injetados 5 mL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO) em cada osso.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a 600 *g* por 10 minutos, a 4 °C, e o precipitado foi ressuspendido em 10 mL/por animal de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO) e submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 µm (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, as células foram plaqueadas em placas de petri para cultivo celular e incubadas por duas horas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, de maneira a obter apenas células que ainda não se diferenciaram. Para isso, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 600 *g* por 10 minutos, a 4 °C, e ressuspendidas em 2 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

4.16.2.Diferenciação das células da medula em Macrófagos (BMDM)

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL/poço. As células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified*

Eagle Medium, GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1 M (GIBCO) e 10% de LCCM (L929 *cell conditioned medium*), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas foram então incubadas a 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO₂.

Quatro dias após o plaqueamento das células, foram adicionados 100 µL de LCCM por poço e no sétimo dia, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo também 10% de LCCM. No décimo dia de cultura as células estão completamente diferenciadas em macrófagos (Gomes & Appelberg, 2002).

4.16.3. Infecção de BMDM

Os macrófagos já diferenciados foram infectados com suspensões bacterianas da *B. abortus* S2308, S19, RB51, *virB9*, Δ *wbkC* 2308 e Δ *wbkC* S19 que correspondiam à multiplicidade de infecção (MOI) de 50 bactérias/célula. As placas foram centrifugadas 600g por 10 min a 4 °C para sincronizar a infecção. As células foram incubadas a 37 °C por 15 min. Após este tempo o meio foi removido e as células lavadas 4 vezes com DEMEM. Depois da lavagem as células foram incubadas por 90 min a 37 °C em meio completo contendo 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) para destruir as bactérias extracelulares. O meio foi removido e substituído por meio completo acrescido de 10 µg/ml de gentamicina. Células infectadas foram lavadas 3 vezes com PBS e então lisadas com 1 ml de 0.1% Triton-X 100 em ddH₂O. O número de bactérias intracelulares viáveis foi determinado durante 2hs, 24hs e 48hs após a infecção. Diluições seriadas da

suspensão bacteriana em PBS foram plaqueadas em triplicata em meio sólido (Brucella Broth). O número de UFC foi determinado após 3 dias de incubação em estufa a 37° C. Este experimento foi realizado em triplicata.

4.16.4. Microscopia de imunofluorescência

Foram plaqueadas 1×10^5 células/poço de BMDMs em placas de 24 poços recobertas com lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro (VWR International). As células foram infectadas como descrito no item anterior, porém usando-se um MOI de 25 bactérias/célula. Nos tempos de 2 e 24 horas após a infecção realizou-se a fixação das células. Para isso, as lamínulas contendo as células foram transferidas para uma nova placa de 24 poços contendo 0,5 mL de paraformaldeído (Electron Microscopy Science) a 3% em pH 7.4 e foram incubadas à 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, o paraformaldeído foi removido e as lamínulas foram lavadas 4 vezes com 0,5 mL de PBS.

Em seguida, estas lamínulas foram utilizadas para marcação por imunofluorescência. Todas as informações referentes aos anticorpos utilizados se encontram na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Anticorpos utilizados para imunofluorescência.

Anticorpo	Origem	Utilização	Diluição	Fluoróforo	Absorção (λ)	Emissão (λ)	Fonte
Anti- LPS liso de <i>B.abortus</i>	Bovino	Primário	1:100	--	--	--	Soro de animal infectado
Anti-LPS rugoso de <i>B.abortus</i>	Bovino	Primário	1:100	--	--	--	Soro de animal infectado
Anti-LAMP-1 de camundongo (1D4B)	Rato	Primário	1:200	--	--	--	<i>a</i>
Anti-Rato	Cabra	Secundário	1:1000	ALEXA 488	493 nm	518 nm	<i>b</i>
Anti-Bovino	Cabra	Secundário	1:1000	Texas Red	596 nm	620 nm	<i>b</i>

(a) *Developmental Studies Hybridoma Bank, National Institute of Child Health and Human Development, University of Iowa*

(b) *Jackson ImmunoResearch Laboratories*

As lamínulas foram invertidas com sua face contendo as células em preparações contendo os anticorpos primários diluídos em uma solução de PBS, acrescido de 10% de soro de cavalo (Sigma) e 0,1% de saponina (Quillaja bark, Sigma). Para as linhagens lisas *B. abortus* 2308, S19 e *virB9* foi utilizado o anticorpo primário anti-LPS liso, já para as linhagens rugosas RB51, $\Delta wbkC$ 2308 e $\Delta wbkC$ S19 foi utilizado o anticorpo anti-LPS rugoso (Tabela 5). Todas as

lamínulas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e depois lavadas duas vezes com PBS acrescido de saponina (0,1%) e incubadas outros 30 minutos a temperatura ambiente com os anticorpos secundários. Em seguida foram lavadas novamente duas vezes com PBS acrescido de saponina (0,1%), uma vez com PBS e uma vez com ddH₂O. Após as lavagens, as amostras já marcadas foram invertidas em uma lâmina de vidro para microscópio contendo 10 µL de meio de montagem Mowiol 4-88 (Calbiochem) e deixadas em um local com ausência de luz por no mínimo duas horas.

Após a marcação, as lamínulas referentes ao tempo de 2 e 24 horas pós-infecção foram analisadas em um microscópio de epifluorescência. Foi feita a quantificação de bactérias intracelulares positivas e negativas para o marcador LAMP-1 por colocalização, sendo contadas as bactérias intracelulares de no mínimo 50 células por lamínula em 3 experimentos independentes. As amostras foram também examinadas no microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510 para a aquisição de imagens. As imagens de 1024 x 1024 pixels foram agrupadas usando o programa ADOBE Photoshop 7.0.

4.16.5. Dosagem de citocinas

A dosagem das citocinas TNF- α e IL-12 p40 nos sobrenadantes da cultura de BMDMs foi baseada no método de ELISA sanduíche, utilizando os kits fornecidos pela R&D System (Minnessota, MN,USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

4.17. Experimentos *in vivo*

4.17.1. 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)

4.17.2. Determinação da persistência dos mutantes $\Delta wbkC$ 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 $\Delta wbkC$ S2308 e $\Delta wbkC$ S19.

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 bactérias foram contadas e foi determinado o número de UFC no baço destes animais.

4.17.3. 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 número de UFC no baço de 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.

4.17.4. Avaliação do nível de imunoproteção induzida em camundongos C57BL/6

Camundongos C57BL/6, com 6 a 9 semanas de idade, foram vacinados intraperitonealmente com 100 µL de PBS contendo 1×10^8 bactérias das linhagens mutantes ou da linhagem vacinal RB51. Já a dose utilizada para a linhagem vacinal *B. abortus* S19 foi de 1×10^5 bactérias. No grupo controle foi inoculado 100 µL de PBS (8 animais por grupo). Após 6 semanas os camundongos foram desafiados com 100 µL de PBS contendo 1×10^6 células/ml

da linhagem virulenta S2308. Depois de 15 dias, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e seu baço foi retirado, processado e plaqueado em diluição seriada em meio *Brucella Broth* (BB). As placas foram inoculadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Ao término do terceiro dia as bactérias foram contadas e foi determinado o número de UFC no baço destes animais. O experimento foi realizado em triplicata.

4.17.5. 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 1×10^8 bactérias das linhagens mutantes e da linhagem vacinal RB51 e 10^5 bactérias da linhagem S19. 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.

4.18. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student, two way ANOVA e teste de Bonferroni do programa *GraphPad prism* 2.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção do plasmídeo para a mutação do gene *wbkC*

5.1.1. 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 4.6. O produto amplificado está representado na Figura 6. O tamanho do fragmento de 970pb do gene *wbkC* foi confirmado comparando-o com o padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

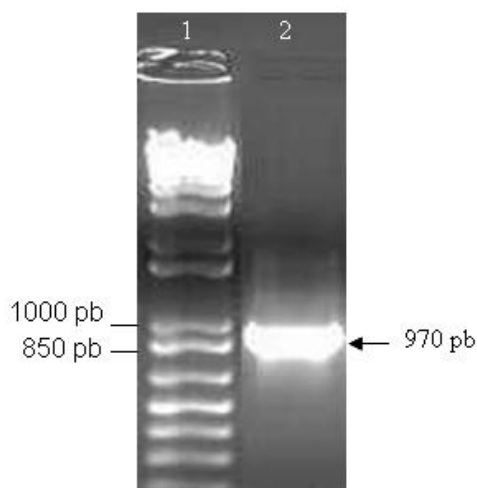


Figura 6. Gel de agarose 0,8% demonstrando a amplificação do gene *wbkC*.

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.

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

O fragmento amplificado relativo ao gene *wbkC* foi clonado no vetor pBuescript-KS(+) nos sítios das enzimas *XhoI* e *XbaI* 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 *XhoI* e *XbaI*. Também foi realizado o sequenciamento para a confirmação do gene *wbkC*.

A análise de restrição para confirmação da clonagem do gene *wbkC* no vetor pBluescript-KS(+) está demonstrada na Figura 7. O fragmento de aproximadamente 2960 pb corresponde ao plasmídeo enquanto o fragmento de aproximadamente 970 pb corresponde ao gene *wbkC*.

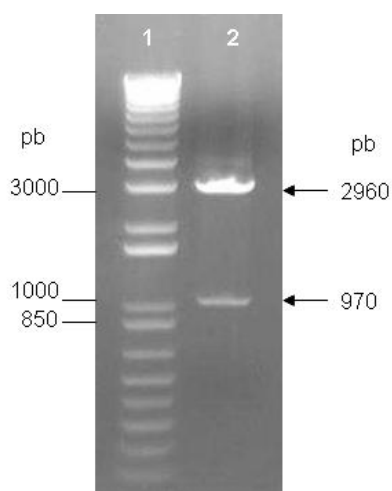


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a análise da clonagem da ORF do gene *wbkC* no vetor pBluescript-KS(+). 1 - Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 2- Produto da digestão do DNA plasmidial do clone de *E. coli* transformada com o 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 8 podemos observar o resultado do sequenciamento do DNA plasmidial contendo o gene *wbkC* das *E. coli* recombinantes.

GCGTCTAGAGCCAGAAGCCTTTATCATCAAACTACACCATCACCTGCTGGGACCAAAA
 ACCTAAACAAGCAACAAGCCATTTTACGAGGGAATACCCCTCATAAGAGAGCGGTAAATATCTA
 TAGAAGGAACATAATATACCTTGCCATCAATCTTCAATACTGCCGGTGGGAACGGAGGAAAGA
 ACATTGCTCGGATAAAACGATCAATCTGGACTTCCGACCATCTTGGGTGATAACGCCACCGA
 AAGGAAGTTCGCGGGCGTAATAGCTAGCCTCACCCAATTGAGCAAATCCCGGATCTCCTTGAT
 CTAGTTTAAGGATGACTTCCTCTAAGCGCAGCATCGCGCGCAATTTGTCGGTGAAATAAAG
 AAAAGGCTGTATCGGTTTCTTCAACCGAAATTCGCTCTTGCAACAATATTGCACCCGTATCGAA
 ATTTTCGTACCATACGATGATAGCTGAAACCGGTTTCGCTCTCGCCATTTATAATCACCCACGC
 AACCGAGTTTGTTCGCGATAAGCAGGAAGAAGCGACGGATGACGATTTACGCTCCCCTTTTT
 TGCCAATTTTAGGAAGCGACCCGGGATTAACGATCGATAGTG**CATGC**TTATAATCATGTCCGG
 ATCGAAATTAGCTCCAAATTCGTAGAATTCTTCCGAATTTGCAGCTGCGGTAGTGAATTGAATG
 TTCCTAAGCCTTAACATGGAATGTAAACCACAATTACGATTGTCTTCTCTATGCGTCGCAACCG
 CAATCTTATCAATCTCTACGCCCATGCCAATCAAGGTTGTAACGCAAATTCGCGCGCAATCC
 GTATCCTGCTACCAAACGCGTGTATTTGGTGCAATCGCCCATTTAAAATGCCTCTTTTTCGTCA
 GTTACTATGCGTAAATACTCACCCGCGACTGCATTCCAACCTTGGGTAACGTTTCGTAC**AGTTCGC**
GCTGCAATTCGTACTCGAGCGC

Figura 8. Seqüência de nucleotídeos 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 *SphI* está evidenciado na caixa e em vermelho estão os sítios de restrição para a enzima *XhoI* e *XbaI* adicionados ao gene *wbkC*.

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

Com o objetivo de interromper a seqüência do gene *wbkC* presente no plasmídeo pBluescript:*wbkC*, foi inserido o gene que confere resistência à canamicina. Este foi amplificado do vetor pUC 4K com o par de iniciadores específicos KANSPH F e KANSPH R (item 4.8).

Na extremidade 5' de cada iniciador foi inserido o sítio de restrição da enzima *SphI*. 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 à canamicina foi levado em consideração o mínimo de aproximadamente 400 pares de base disponíveis em cada extremidade do gene para facilitar a ocorrência do evento de recombinação homóloga.

O fragmento de aproximadamente 1208 pb, correspondente ao gene de resistência à canamicina amplificado, foi devidamente isolado do gel de agarose 0,8%, purificado e digerido com a enzima *SphI*. 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 9 mostra um desenho esquemático do vetor pBluescript:*wbkC*-Kan.

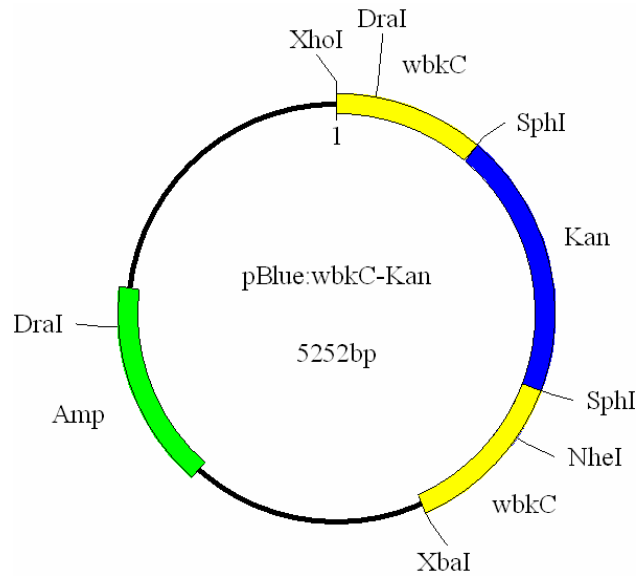


Figura 9. Mapa do plasmídeo pBluescript:*wbkC*-Kan.

Para confirmar o sucesso da clonagem, foi realizada a digestão do DNA plasmidial com as enzimas *XhoI* e *XbaI* (Figura 10) de um dos clones. Como produto da digestão do plasmídeo foram geradas 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. Isso se deve ao fato do gene de resistência à canamicina apresentar um sítio de restrição para *XhoI*. Esta construção foi denominada pBluescript:*wbkC*-Kan.

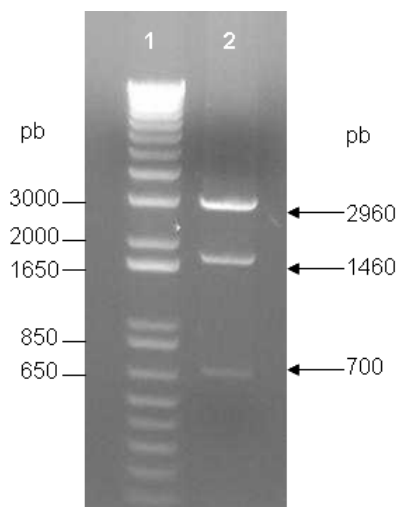


Figura 10. Gel de agarose 0,8% demonstrando a confirmação da construção do vetor pBluescript:wbkC-Kan. 1- Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder. 2-Produto da digestão do plasmídeo pBluescript: *wbkC*-Kan com as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI* de um clone transformado.

5.2. 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 11 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 11 B). As duas formas de possíveis recombinações estão esquematizadas na Figura 11.

Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas a 37 °C em placas contendo meio BB ágar acrescidas de canamicina por 72 horas para se observar o crescimento das colônias obtidas.

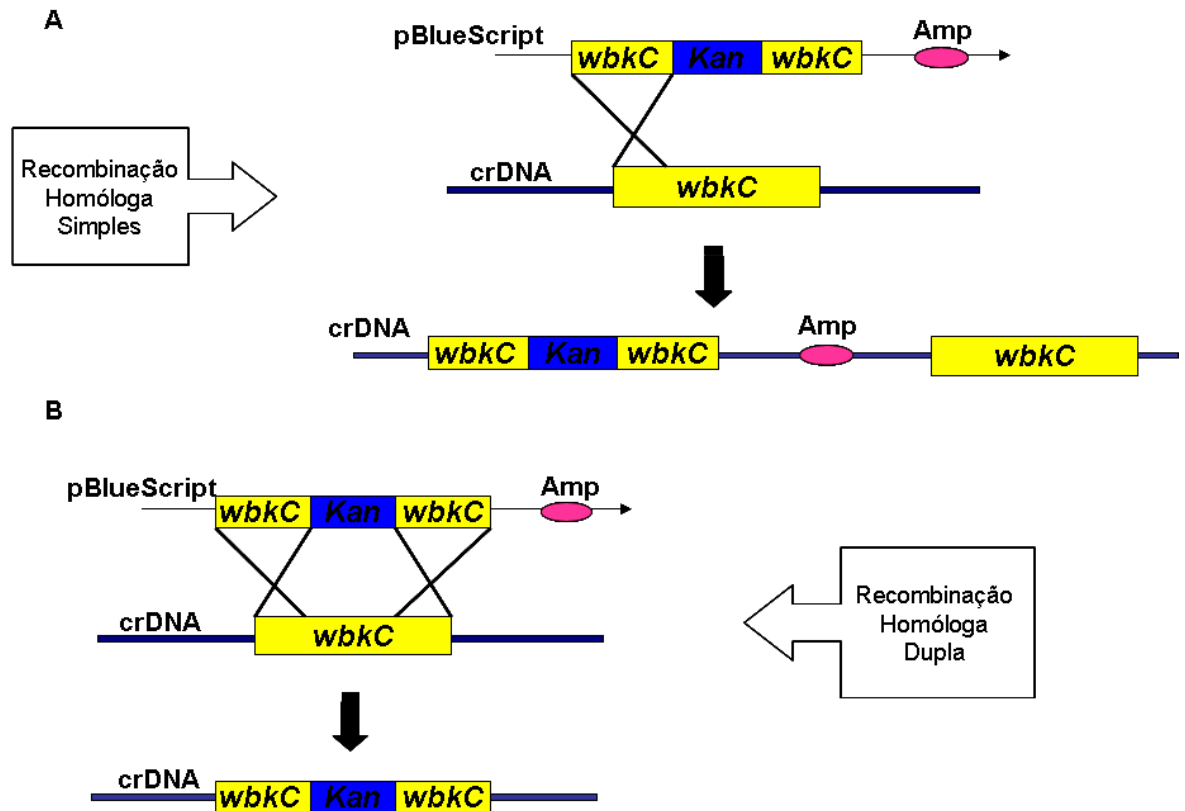


Figura 11. Esquema dos possíveis eventos de recombinação homóloga entre o genoma da *B. abortus* e o plasmídeo pBlueScript:wbkC-Kan. A- Recombinação homóloga simples. B - Recombinação homóloga dupla.

As bactérias que sobreviveram no meio contendo canamicina foram cultivadas em placas réplica contendo meio com ampicilina ou canamicina, (Figura 12). As bactérias que sofreram recombinação homóloga dupla são sensíveis a ampicilina (Amp^s) e resistentes à 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, uma vez 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 12).

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.

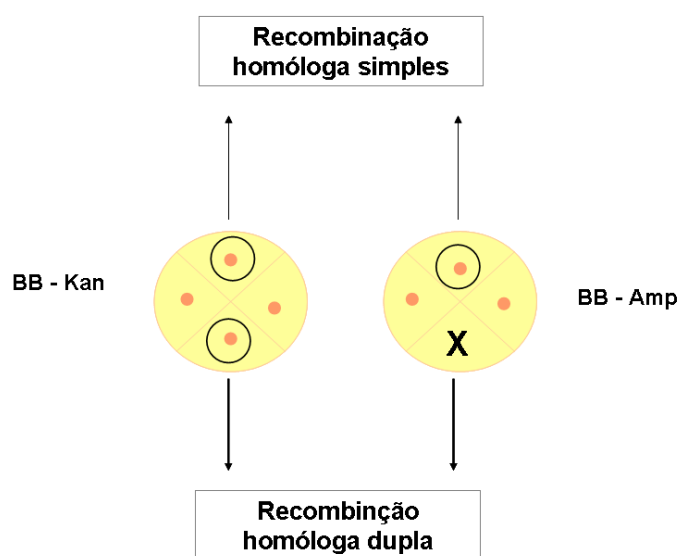


Figura 12. Esquema de cultivo das bactérias transformantes em meios seletivos. BB- Kan- Meio BB acrescido de 25 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina; BB- Amp – Meio BB acrescido de 10 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina; X indica o não crescimento da colônia.

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

A mutação foi primeiramente confirmada por PCR, mostrando que o gene *wbkC* funcional havia sido substituído pelo gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência à canamicina. (Figura 13). 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 13 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 à canamicina de aproximadamente 2200 pb.

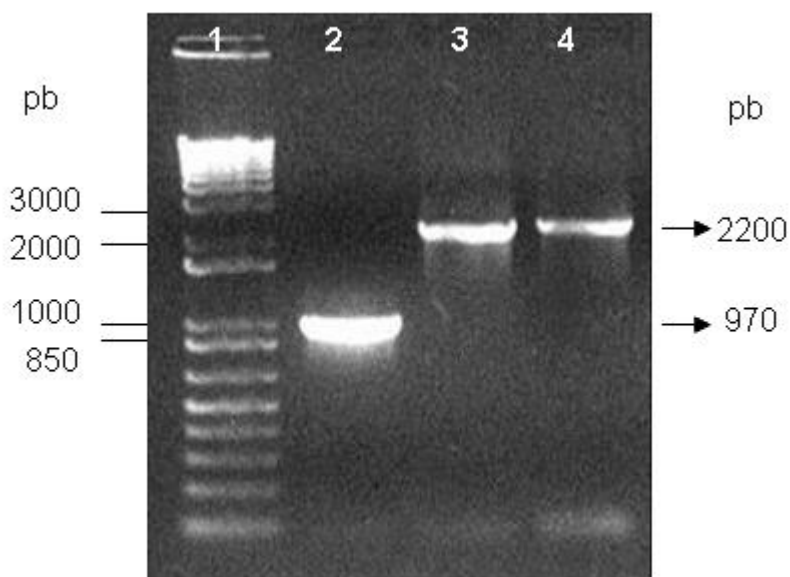


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a confirmação por PCR da presença do gene *wbkC* interrompido pelo gene de resistência à canamicina nos mutantes obtidos. 1 - Perfil eletroforético do padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). 2- Produto de amplificação do gene *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 *DraI* e *NheI* 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 14).

Quando o gene de resistência à 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 14 A).

Quando utilizada a sonda correspondente ao gene *wbkC* (Figura 14 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 à 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 14 C). A presença de duas bandas com a sonda de ampicilina se deve ao fato do gene desta ter um sítio de restrição para *DraI*, uma das enzimas utilizadas para digestão do DNA total que foi utilizado no *Southern blot*.

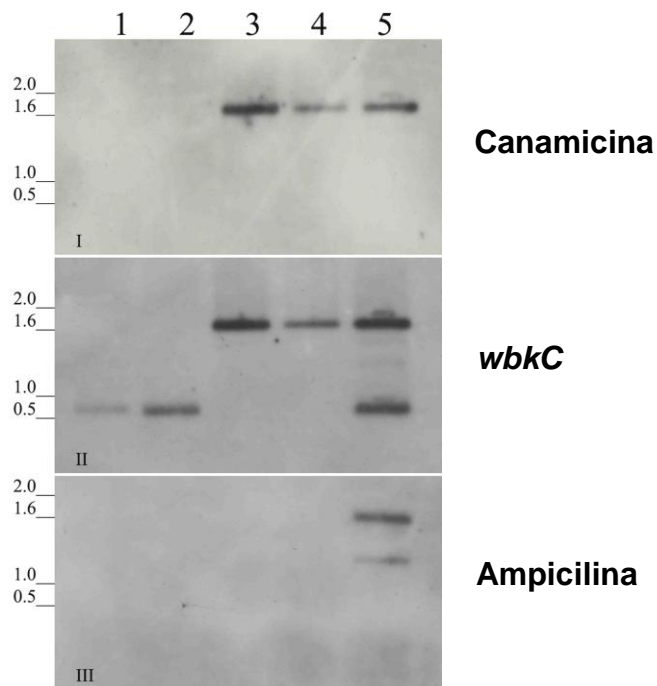


Figura 14. Southern blot em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação dos mutantes para o gene *wbkC*. DNA total digerido com a enzimas de

restrição *NheI* e *DraI*: 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. I - Sonda para o gene de resistência à canamicina. II - Sonda para o gene *wbkC*. I - Sonda para o gene de resistência à ampicilina.

5.4. 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 *immunoblotting*.

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 15 B) e *B. abortus* S19 e as linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 (Figura 15 A) 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).

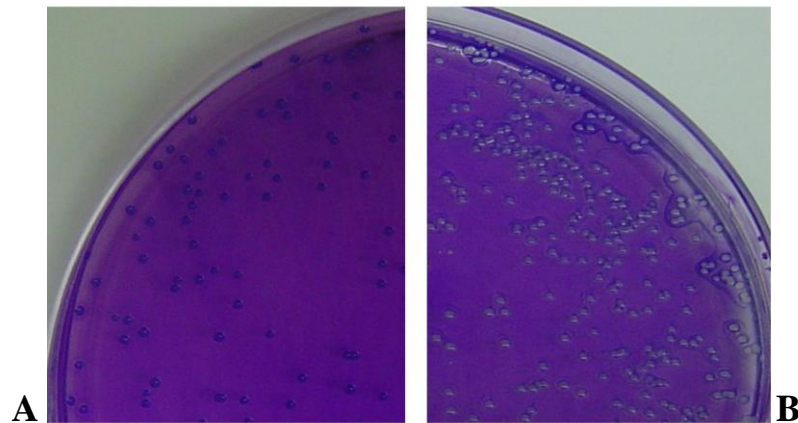


Figura 15. Caracterização morfológica das colônias pelo método do cristal violeta. A, linhagem *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 – rugosa; B, linhagem *B. abortus* S2308 – lisa.

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 16 A) que reconhece LPS liso (S-LPS) e o A68/24D08/609 (IgG1) que reconhece LPS rugoso (R-LPS) (Figura 16 B).

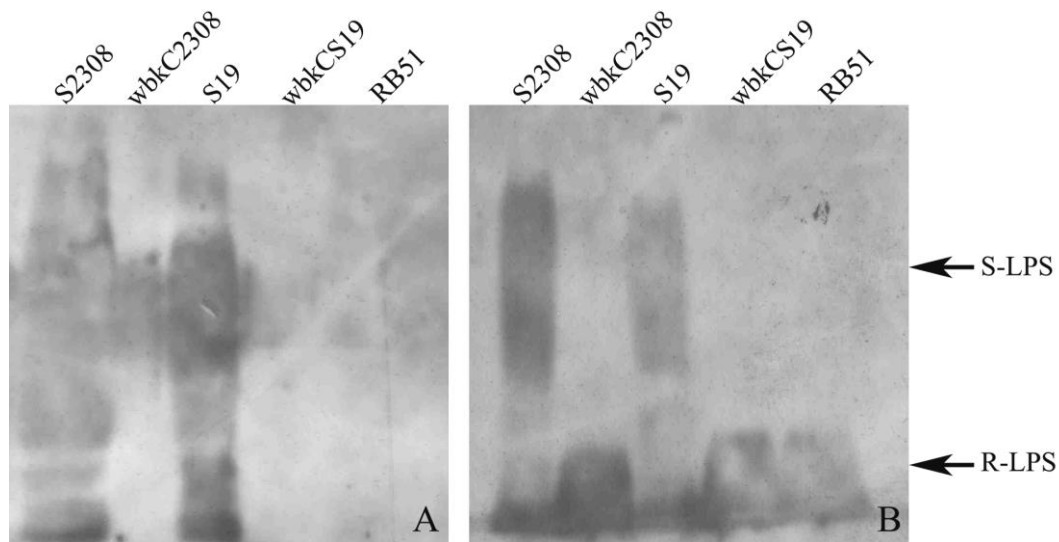


Figura 16. Immunoblotting em membrana de nitrocelulose demonstrando a confirmação do LPS rugoso dos mutantes para o gene *wbkC*. Extratos brutos da linhagem selvagem *B. abortus* S2308; do mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308; da linhagem vacinal parental *B. abortus* S19; do mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19; e da linhagem vacinal *B. abortus* RB51 foram submetidos à técnica de *immunoblotting*. 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 16 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 16 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.

5.5. Espectrometria de massa do lipídeo A.

Grande importância tem sido atribuída ao lipídeo A como o principal componente do LPS responsável por suas propriedades pró-inflamatórias (Erridge *et al.*, 2002; Galanos *et al.*, 1985). Com a finalidade de confirmar que a deleção do gene *wbkC* não afetou a biossíntese e, conseqüentemente, a estrutura do lipídeo A dos mutantes, foi realizada a espectrometria de massa (ESI-TOF-MS) do lipídeo A dos mutantes e suas linhagens parentais (Figura 17). Como esperado, o padrão dos grupos iônicos dos lipídeos-A dos mutantes foi o mesmo quando comparados ao padrão das linhagens parentais. Como observado na Figura 17, a linhagem mutante rugosa *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 (quadro inferior- Figura 17), possui o mesmo perfil espectrométrico da linhagem parental *B. abortus* S19 (quadro superior- Figura 17). O mesmo padrão foi observado quando foi comparado o perfil espectrométrico do lipídeo-A da linhagem parental lisa *B. abortus* S2308 com o da linhagem mutante rugosa *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 (dado não mostrado), demonstrando que a deleção do gene *wbkC* não influenciou a biossíntese e estrutura do lipídeo A das linhagens mutantes.

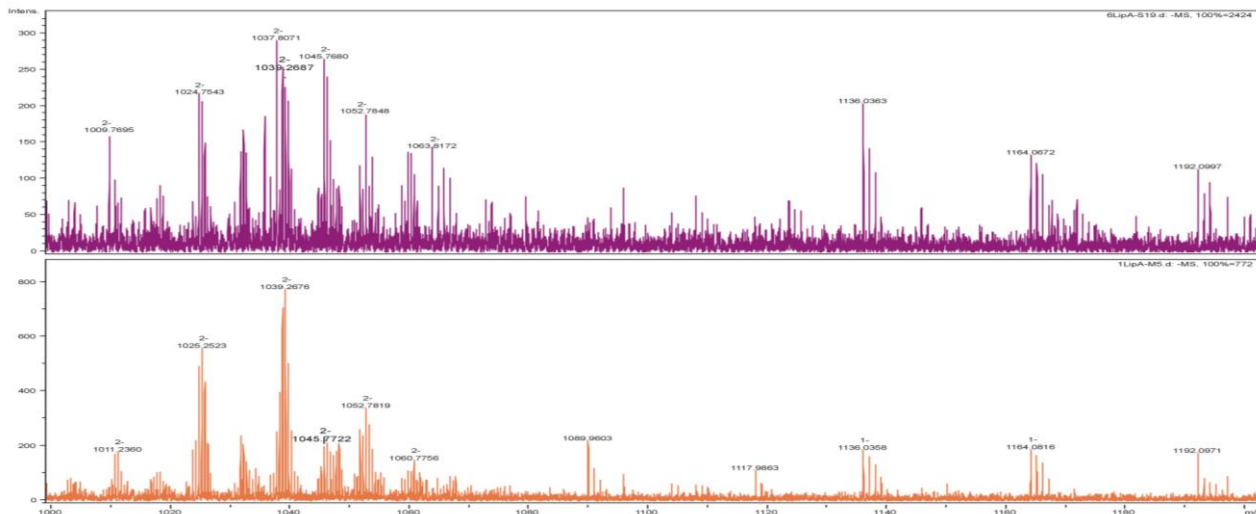


Figura 17. Análise por espectrometria de massa do lipídeo A extraído da linhagem parental lisa *Brucella abortus* S19 (quadro superior) e da linhagem mutante rugosa *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 (quadro inferior). Observar que se apresentam em escalas diferentes.

5.6. Experimentos *in vitro*

5.6.1. Caracterização do tráfego intracelular dos mutantes $\Delta wbkC$ da *B. abortus*

5.6.1.1. Sobrevivência intracelular dos mutantes

Para caracterização do tráfego intracelular, a primeira característica a ser avaliada é o perfil de replicação intracelular da bactéria. Para isso, BMDMs foram infectados com as linhagens parentais *B. abortus* S2308 e S19, com a linhagem vacinal rugosa RB51, com o mutante de *B. abortus* para o sistema de secreção do

tipo IV, *virB9*⁻ e com os mutantes rugosos de *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 e $\Delta wbkC$ S19.

Para os mutantes $\Delta wbkC$ 2308 (Figura 18 A) e $\Delta wbkC$ S19 (Figura 18 B) observou-se uma entrada em maior numero nos macrófagos quando comparado às parentais *B. abortus* S2308 e S19 respectivamente ($p < 0.001$), no tempo de duas horas após a infecção. No entanto não conseguiram se replicar de forma eficiente intracelularmente, sendo observada uma redução no numero de UFC 48 horas após a infecção ($p < 0.001$), ao passo que as linhagens parentais apresentaram uma queda no numero de UFC 24 horas após a infecção, mas se replicaram, aumentando o numero de UFC 48 horas após a infecção. O mesmo perfil dos mutantes foi observado para a linhagem vacinal rugosa RB51. Já para o mutante *virB9*⁻, observou-se uma entrada semelhante às linhagens parentais, visto que todas são linhagens lisas, no entanto, apresentou uma redução mais acentuada, tanto em relação às linhagens parentais, quanto aos mutantes *wbkC* 48 horas após a infecção.

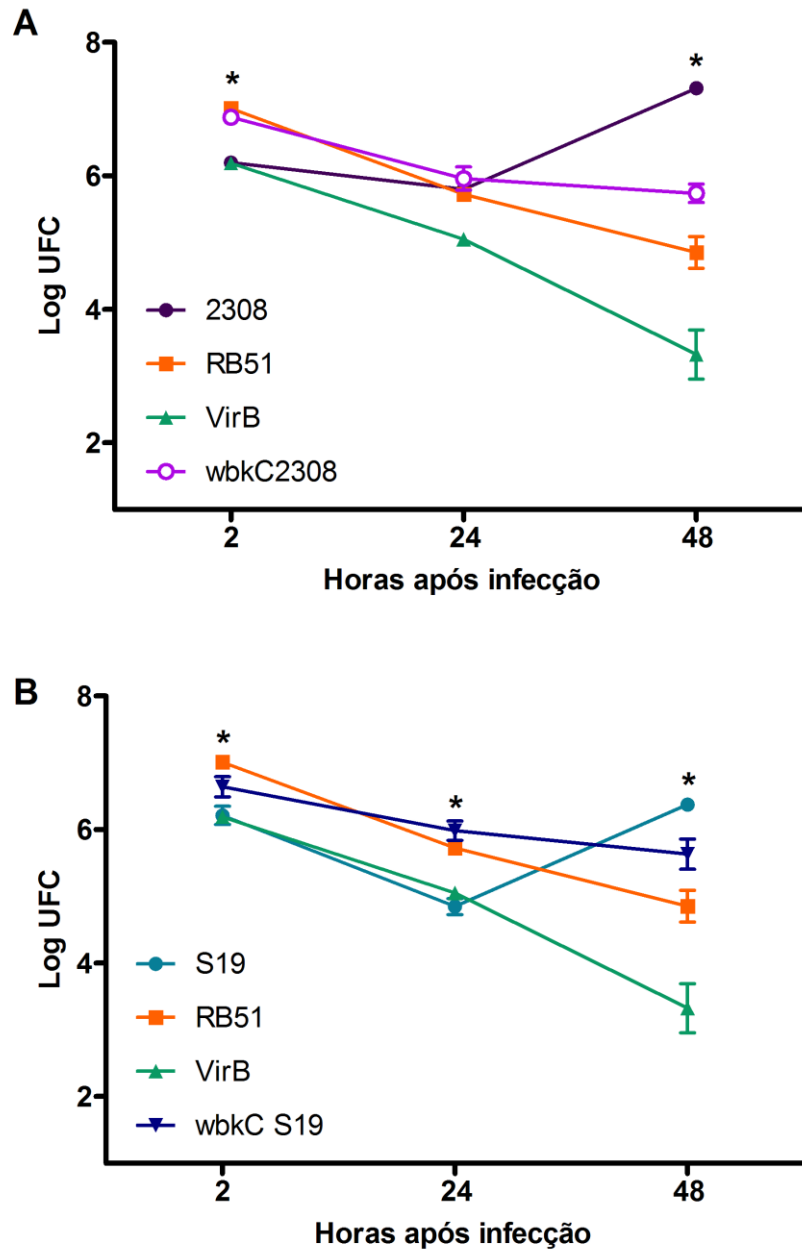


Figura 18. Avaliação do crescimento intracelular dos mutantes $\Delta wbkC$ em BMDM. Macrófagos derivados e medula óssea foram infectados com *B. abortus* S2308, S19, RB51 e os mutantes *virB9-*, *wbkC* 2308 (A) e *wbkC* S19 (B). O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado 2, 24 e 48 horas após a infecção. (*) Diferença estatisticamente significativa dos mutantes em relação às linhagens parentais ($p \leq 0,05$).

5.6.1.2. Análise do tráfego intracelular dos mutantes por microscopia.

Para avaliar o tráfego intracelular dos mutantes *B. abortus*, $\Delta wbkC$ 2308 e $\Delta wbkC$ S19, BMDMs aderidos em lamínulas de vidro foram infectados com estas linhagens, assim como com as linhagens parentais, *B. abortus* 2308 e S19, a linhagem rugosa vacinal RB51 e o mutante *virB9*. As lamínulas contendo os BMDMs infectados foram marcadas com anticorpos anti-LPS e anti LAMP-1 e analisadas por microscopia de imunofluorescência, conforme descrito na metodologia, 2 e 24 horas após a infecção (Figura 19).

Duas horas após a infecção mais de 80% de todas as linhagens bacterianas analisadas encontrava-se em compartimentos positivos para LAMP-1. No entanto, 24 horas após a infecção as linhagens lisas *B. abortus* S2308 e S19 apresentaram apenas 20% e 50% de bactérias positivas para LAMP-1 respectivamente, ao passo que as demais bactérias analisadas mantiveram-se com mais de 80% das bactérias positivas para este marcador. Na Figura 20 encontram-se imagens obtidas por microscopia confocal representativas das bactérias analisadas 24 horas após a infecção.

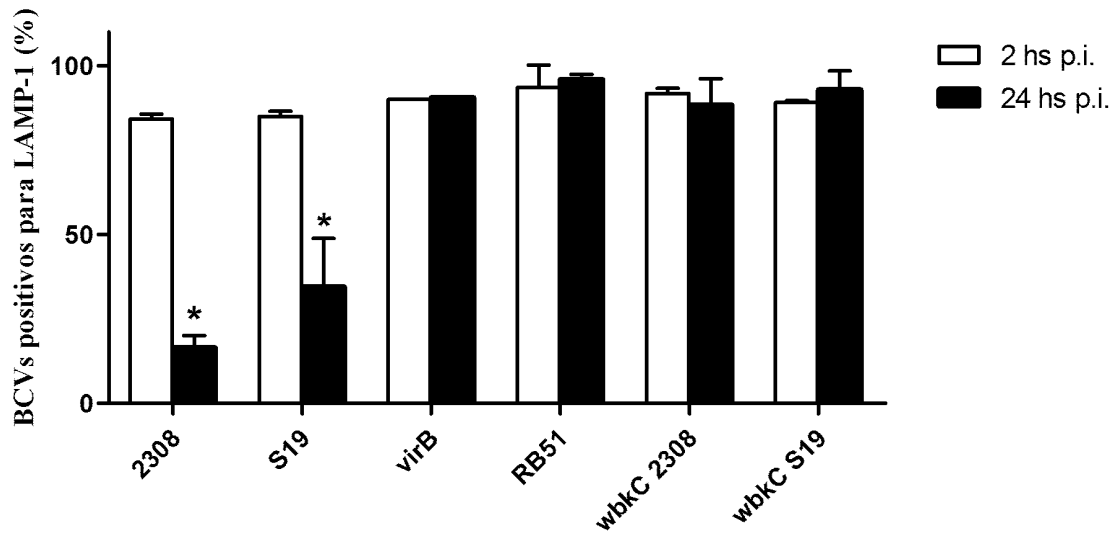


Figura 19. Quantificação de vacúolos contendo *Brucella* (BCVs) positivos para LAMP-1. BMDMs infectados com as linhagens mutantes e parentais foram quantificados para BCVs positivos ou negativos para o marcador LAMP-1, com auxílio de um microscópio de epifluorescência. Os valores estão representados em porcentagem de bactérias positivas para o marcador LAMP-1 em relação ao número total de bactérias intracelulares, 2 e 24 horas após a infecção. (*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

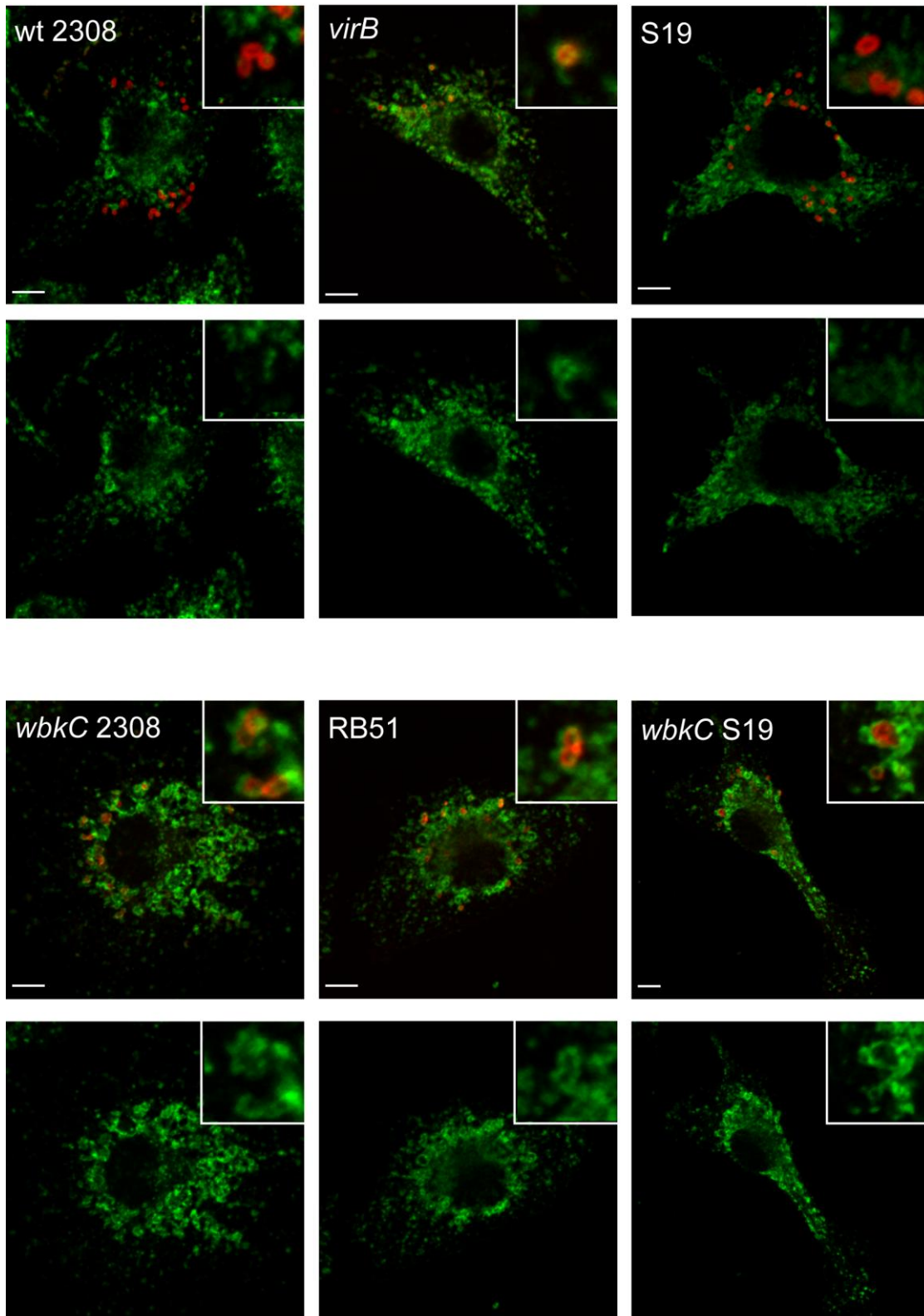


Figura 20. Localização intracelular dos mutantes para o gene *wbkC* e linhagens parentais em BMDMs. Imagens obtidas por microscopia confocal

representativas de BMDM infectados com *B. abortus* 2308, S19, RB51, mutante *virB9* ou mutantes *wbkC* 24 horas após a infecção. O LPS está marcado em vermelho e LAMP-1 em verde. As barras de escala são de 5 μ m.

5.6.2. Dosagem de citocinas

O reconhecimento da *Brucella* por células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células e concomitante produção de citocinas pró-inflamatórias. Com o intuito de avaliar o perfil de produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12p40, BMDMs foram estimulados com *B. abortus* S2308, S19, RB51, Δ *wbkC* 2308 e Δ *wbkC* S19 e os sobrenadantes destas culturas foram coletados 24 e 48 horas após a infecção para análise.

Os mutantes *B. abortus* Δ *wbkC* 2308 e Δ *wbkC* S19 apresentaram uma maior produção de TNF- α (Figura 21 A) e IL-12p40 (Figura 21 B) quando comparados às linhagens parentais *B. abortus* S2308 e S19, respectivamente ($p < 0.01$). Esse perfil foi similar ao observado para linhagem vacinal rugosa RB51.

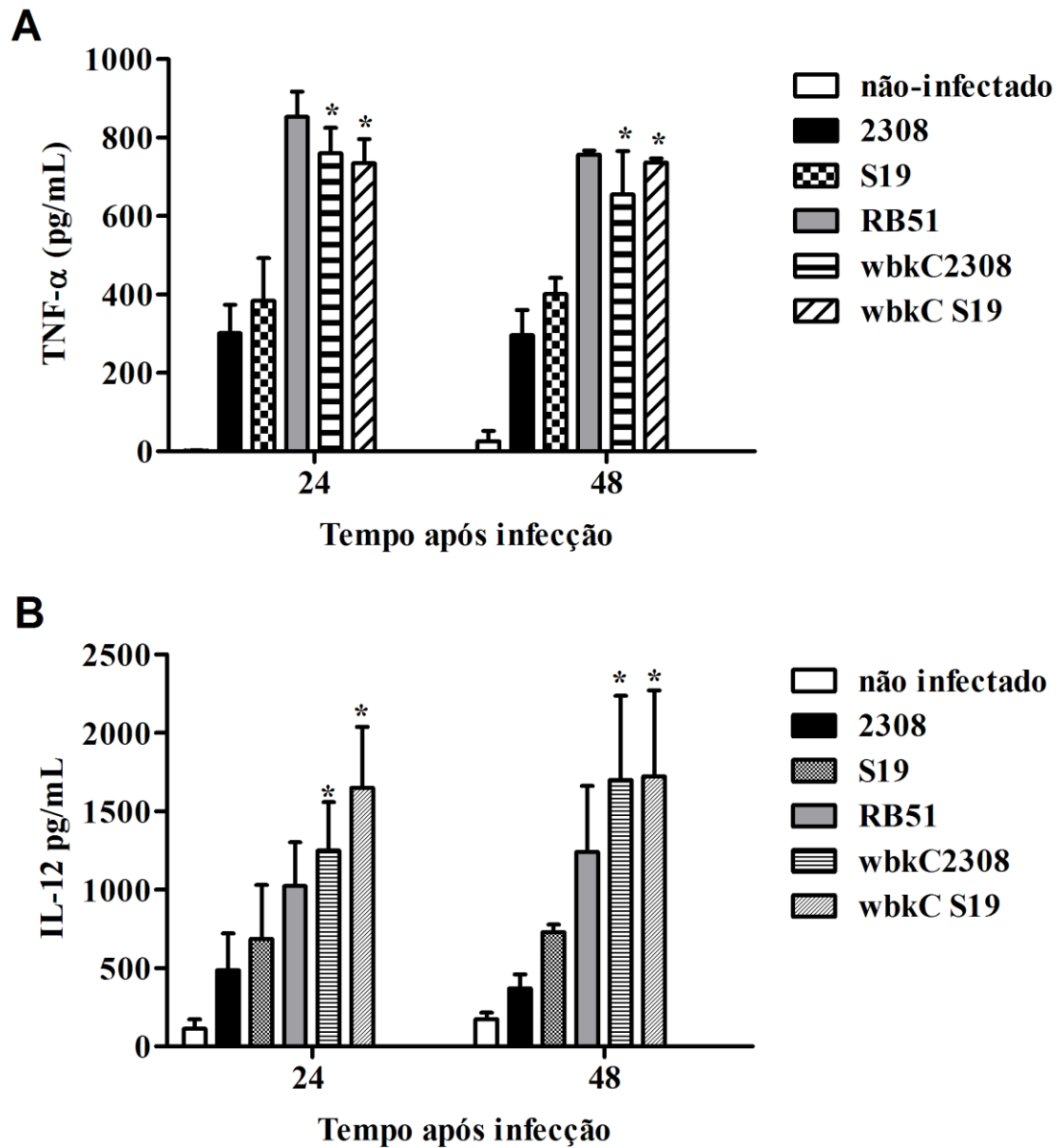


Figura 21. Dosagem de citocinas em BMDMs. A secreção de TNF- α (A) e IL-12 (B) foi analisada por ELISA nos sobrenadantes de BMDMs não infectados ou infectados com *B. abortus* S2308, S19, RB51 ou com os mutantes $\Delta wbkC$ 2308 e $\Delta wbkC$ S19. (*) Diferença estatisticamente significativa dos mutantes em relação às linhagens parentais ($p \leq 0,01$).

5.7. Experimentos *in vivo*

5.7.1. 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 22).

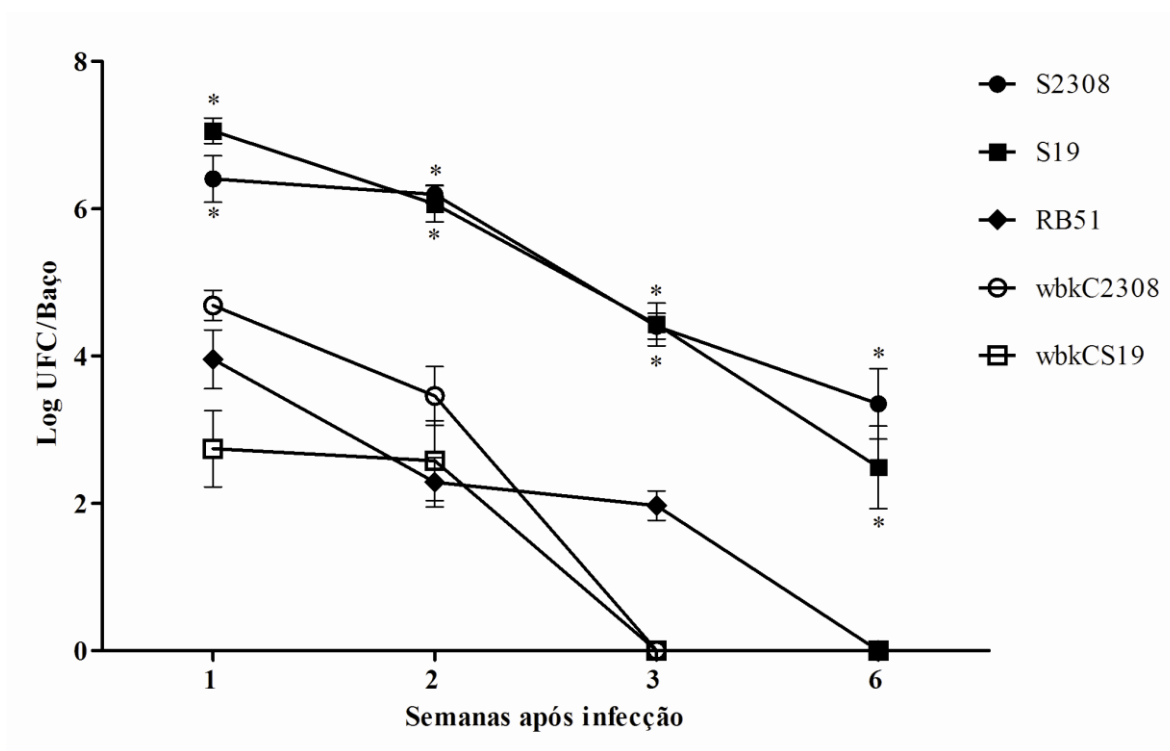


Figura 22. Persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos C57BL/6. Sete camundongos por grupo foram infectados com as linhagens parentais, mutantes e a vacinal RB51. Os baços foram

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 ($p \leq 0,05$).

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, e essas linhagens apresentaram um comportamento bastante semelhante à linhagem vacinal rugosa *B. abortus* RB51.

5.7.2. Avaliação da virulência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos deficientes para a molécula IRF-1^(-/-)

Segundo Ko e colaboradores (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 décimo 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 23).

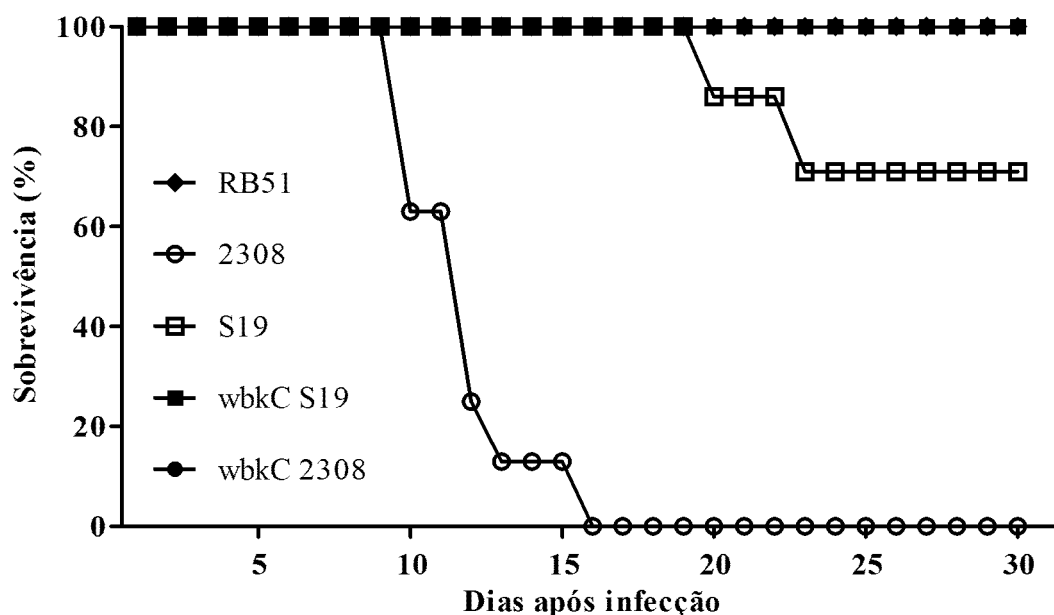


Figura 23. Nível de virulência das linhagens *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308, *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19, *B. abortus* S2308 e *B. abortus* S19 e RB51 em camundongos IRF-1^(-/-). Oito camundongos por grupo foram infectados com uma dose de 1×10^6 UFC. A morte dos camundongos foi diariamente acompanhada até 30 dias após a infecção.

Também foi determinado o número de UFC no baço dos 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 24 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 e S19. 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* $\Delta wbkC$ S2308 é semelhante ao observado na linhagem vacinal *B. abortus* RB51, já para o mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 o número de UFC recuperado foi menor do que o encontrado para a cepa vacinal RB51.

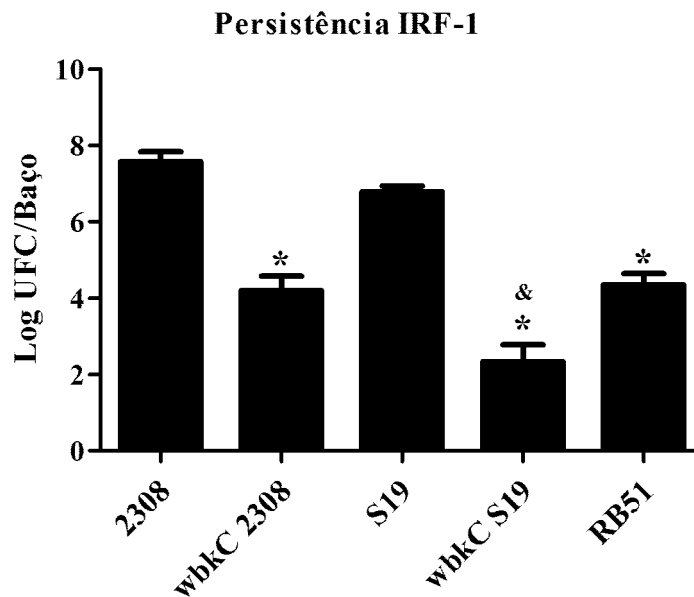


Figura 24. Persistência das linhagens mutantes *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 em camundongos IRF-1^(-/-). (*) Estatisticamente significativo em relação às linhagens parentais S2308 e S19 e (&) estatisticamente significativo em relação à linhagem vacinal *B. abortus* RB51.

5.7.3. Imunoproteção induzida em camundongos C57BL/6 e 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 C57BL/6 e 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.

Para determinar o nível de proteção induzido em camundongos C57BL/6, o número de UFC da linhagem virulenta foi determinado no baço dos animais duas semanas após o desafio. Todos os camundongos vacinados, tanto com as linhagens vacinais quanto com as linhagens mutantes, apresentaram menor número de *Brucella* no baço, comparado aos animais do grupo controle imunizados com PBS (Tabela 6). A linhagem mutante $\Delta wbkC$ S2308 apresentou uma proteção equivalente à linhagem vacinal RB51 porém menor que a linhagem vacinal S19, na qual foi observado o maior nível de proteção. A linhagem mutante $\Delta wbkC$ S19 demonstrou o menor nível de proteção quando comparada com as demais linhagens testadas. Os resultados demonstraram que a linhagem mutante $\Delta wbkC$ S2308 é capaz de induzir um aumento de resistência contra a infecção causada pela *B. abortus* S2308 comparável à linhagem vacinal RB51, porém inferior à proteção gerada pela linhagem S19.

Tabela 6. Proteção conferida pelas linhagens vacinais *B. abortus* S19, RB51 e pelas linhagens mutantes *B. abortus* Δ wbkC2308 e *B. abortus* Δ wbkCS19 após desafio com a linhagem virulenta *B. abortus* S2308.

Vacina	Log ₁₀ UFC de <i>B. abortus</i> S2308 No fígado (média \pm SD) ^a	Unidades de proteção Log ₁₀
PBS controle	6.14 \pm 0.14	
<i>B. abortus</i> S19	4.45 \pm 0.50	1,70 ^b
<i>B. abortus</i> RB51	5.31 \pm 0.35	0,84 ^b
<i>B. abortus</i> Δ wbkC2308	5.57 \pm 0.48	0,58 ^b
<i>B. abortus</i> Δ wbkCS19	5.90 \pm 0.35	0,24

^a Camundongo imunizado com PBS, 10⁵ UFC de *B. abortus* S19 e 10⁸ UFC das demais linhagens, 6 semanas depois foram desafiados por infecção i.p de 10⁶ UFC de *B. abortus* 2308.

^b Estatisticamente diferente do grupo PBS ($P \leq 0.05$).

Todos os camundongos IRF-1^(-/-) vacinados com as linhagens da *Brucella* sobreviveram por mais tempo que aqueles camundongos não imunizados (PBS), (Figura 25). A linhagem mutante *B. abortus* Δ wbkC S19 apresentou o menor índice de proteção (60 % de sobrevivência). Já as linhagens *B. abortus* Δ wbkC S2308, *B. abortus* S19 e *B. abortus* RB51 apresentaram uma proteção similar, sendo que 80% dos animais sobreviveram após o desafio.

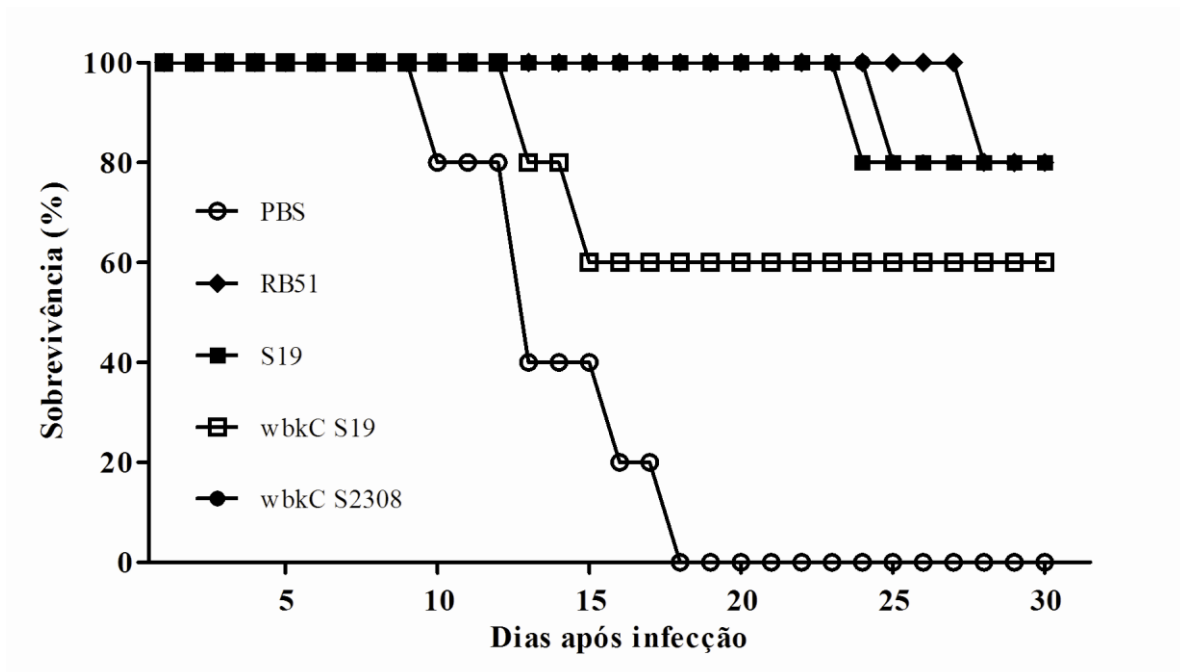


Figura 25. Proteção de camundongos IRF-1^(-/-) contra o desafio com a linhagem virulenta S2308 da *B. abortus* após imunização com as linhagens mutantes e vacinais. Camundongos foram imunizados intraperitonealmente com uma dose de 1×10^7 UFC das linhagens mutantes $\Delta wbkC$ S2308 e $\Delta wbkC$ 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 sobrevivência dos camundongos foi acompanhada por 30 dias.

6. Discussão

Neste trabalho, mutantes rugosos da *Brucella abortus* foram desenvolvidos, caracterizados e avaliados como potencial candidato vacinal. A *B. abortus* é o agente etiológico da brucelose humana e animal, e muitos grupos de pesquisa em todo o mundo vêm dedicando esforços na identificação e caracterização de novos antígenos e fatores de virulência desta espécie. As primeiras observações de que as linhagens rugosas da *B. abortus* eram atenuadas e não produziam anticorpos que poderiam interferir no diagnóstico de animais infectados, levaram ao surgimento do conceito de uma vacina rugosa para o controle da brucelose (Monreal et al., 2003). Desta forma, esforços têm sido maximizados na busca por uma melhor vacina viva atenuada que seja capaz de induzir com eficiência a imunidade celular e proteção contra a bactéria virulenta (Vemulapalli et al., 2000; Monreal et al., 2003).

Na tentativa de desenvolver uma vacina rugosa da *B. abortus*, o gene *wbkC*, que está envolvido na biossíntese do antígeno-O do LPS, foi escolhido como alvo do nosso estudo. Dois mutantes $\Delta wbkC$ foram gerados por substituição gênica utilizando a estratégia de recombinação homóloga dupla e foram denominados *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 e $\Delta wbkC$ S19. A inativação do gene *wbkC* foi confirmada por *southern blot* (Figura 14), e o fenótipo rugoso resultante foi determinado pela coloração com cristal violeta (Figura 15) e por *immunoblotting* (Figura 16). Além disso, pela análise por espectrometria de massa, verificamos que a mutação do gene *wbkC* não interferiu na biossíntese e estrutura do lipídeo-A dos mutantes da *B. abortus* (Figura 17). Godfroid e colaboradores (2000) também

demonstraram que o gene *wbkC* é necessário para a biossíntese do antígeno-O e portanto do LPS liso na *B. melitensis* 16 M.

Mudanças na estrutura do LPS podem interferir na entrada da bactéria nas células do hospedeiro, alguns autores descreveram o LPS liso como fator de virulência essencial para a sobrevivência intracelular (Gonzalez et al., 2008). Quando infectamos BMDMs, foi constatado que apesar dos mutantes $\Delta wbkC$ apresentarem maior taxa de entrada, estes apresentaram uma taxa reduzida de sobrevivência no interior dessas células quando comparados às linhagens parentais (Figura 18). Uma maior penetração na célula do hospedeiro já havia sido descrita anteriormente para mutantes rugosos (Fernandez-Prada et al. 2003), assim como para a linhagem rugosa RB51, perfil também demonstrado em nosso trabalho. O mutante *virB9*⁻, por possuir o LPS liso, teve uma taxa de entrada similar à apresentada pelas linhagens parentais, contudo, este mutante não conseguiu se replicar como a linhagem parental. Isso se deve ao fato do sistema de secreção tipo IV da *Brucella* ser essencial para eventos tardios de maturação do BCV, necessários para a biogênese de uma organela replicativa em BMDMs (Celli et al., 2003).

A linhagem rugosa *B. abortus* RB51 tem uma baixa persistência *in vivo* e não consegue se replicar como a linhagem parental lisa no interior de macrófagos (Schurig et al., 1991). No entanto, já foi demonstrado que mutantes rugosos geneticamente caracterizados não perderam sua capacidade de replicar intracelularmente mesmo na ausência da estrutura do antígeno-O em seu LPS (Allen et al., 1998).

O perfil de sobrevivência intracelular dos mutantes $\Delta wbkC$ foi melhor elucidado quando realizamos análises por microscopia de imunofluorescência. Os mutantes *B. abortus*, $\Delta wbkC$ 2308 e $\Delta wbkC$ S19, apesar de não serem internalizados nos macrófagos pela mesma via, apresentaram o mesmo perfil do mutante *virB9*⁻, com a permanência em compartimentos positivos para LAMP-1 (Figura 19) e a posterior redução no número de UFC. Desta forma pôde-se constatar que não só a presença de um LPS intacto é necessária para o estabelecimento do nicho replicativo da *B. abortus*, mas também outros fatores de virulência são essenciais para esse fim. O padrão que observamos para *B. abortus* S2308 está de acordo com o que já havia sido descrito na literatura (Celli et al., 2003). O BCV perde o marcador de endossomo LAMP-1 e passa a adquirir marcadores de retículo endoplasmático, conseguindo estabelecer um nicho replicativo dentro do macrófago. Já o mutante *virB9*⁻, não consegue seguir a mesma via intracelular, permanecendo com o marcador LAMP-1, sendo direcionado para fusão com lisossomos e posteriormente eliminado.

Vários genes relacionados à via de biossíntese do LPS de *Brucella* já foram estudados. Em 2008 Gonzáles e colaboradores descreveram 13 mutantes, representando os principais fenótipos rugosos relacionados à síntese e exportação do antígeno-O e núcleo oligossacarídico do LPS da *Brucella melitensis*. Esse grupo de pesquisadores observou que, de acordo com sua taxa de multiplicação e persistência no baço, os mutantes rugosos poderiam ser classificados em diferentes graus de atenuação. Quanto maior a persistência em camundongos, menor a atenuação dos mutantes. Apenas os mutantes rugosos, classificados com

menor nível de atenuação, dos genes *wbkD*, *wbkF* e *wa***, envolvidos na biossíntese do antígeno-O, conseguiram adquirir marcadores de retículo e ter um maior tempo de sobrevivência intracelular em macrófagos infectados.

A presença do antígeno-O na estrutura do LPS também pode influenciar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Quando infectamos BMDMs com os mutantes $\Delta wbkC$ foi observado uma maior produção de IL-12 e TNF- α quando comparados às linhagens parentais (Figura 21). Esse perfil também já foi observado por Jimenez de Bagues e colaboradores (2004), demonstrando que linhagens rugosas da *Brucella* induzem uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias quando comparadas às linhagens lisas. A citocina IL-12 está envolvida no direcionamento para um perfil de resposta Th1, que *in vivo* é crítico para a eliminação da *Brucella* (Sathiyaseelan *et al.*, 2006), o que pode vir a ser uma explicação parcial para eliminação intracelular mais rápida dos mutantes rugosos $\Delta wbkC$.

Todos estes resultados sugerem o envolvimento do antígeno-O no recrutamento de fatores que, quando ancorados à superfície do fagossomo bloqueiam sua fusão com o lisossomo, além de impedir uma elevada produção de citocinas inflamatórias pela *Brucella* lisa. A ausência ou encurtamento do antígeno-O poderia permitir que outras moléculas presentes na membrana da bactéria ficassem mais expostas, sendo capazes de ativar o sistema imune de forma mais eficiente.

Para avaliar a persistência dos mutantes *in vivo*, foram realizados ensaios em camundongos C57BL/6 (Figura 22) e camundongos *knockout* para IRF-1

(Figura 23). As linhagens mutantes foram eliminadas mais rapidamente que as linhagens parentais nos dois modelos analisados. Três semanas após a infecção, os mutantes já tinham sido eliminados nos camundongos C57BL/6 mesmo sendo utilizada uma dose dos mutantes 100 vezes maior do que a utilizada para as linhagens parentais. Os mutantes $\Delta wbkC$ demonstraram uma persistência reduzida quando comparada com a linhagem rugosa vacinal *B. abortus* RB51, que foi completamente eliminada 6 semanas após a infecção. Nesse mesmo período, as linhagens parentais lisas ainda apresentavam mais de 3 logs de UFC. Resultados estes que corroboram com o perfil de sobrevivência intracelular observado nos experimentos com BMDMs.

Allen e colaboradores (1998) também descreveram a atenuação de mutantes rugosos em modelo murino. Realizando ensaios com mutantes deficientes na biossíntese do antígeno-O da *Brucella abortus*, foi observado que a diminuição da persistência destes mutantes quando comparados às linhagens parentais era explicada, dentre outros fatores, pela maior sensibilidade destes aos peptídeos catiônicos e lise mediada pelo complemento.

Ko e colaboradores (2002) demonstraram previamente que o camundongo IRF-1^(-/-) é uma ferramenta importante para determinar o nível de virulência e atenuação de mutantes da *Brucella*. Ko e colaboradores (2002) relataram que a sobrevivência deste camundongo pode ser correlacionada com a virulência de linhagens da *Brucella*, quanto maior a virulência da *Brucella* menor o tempo de sobrevivência do camundongo IRF-1^(-/-) infectado por esta bactéria.

Portanto, comparamos a virulência dos mutantes $\Delta wbkC$ com a linhagem virulenta *B. abortus* S2308 e as linhagens vacinais *B. abortus* S19 e RB51 nestes

camundongos. Os mutantes $\Delta wbkC$ apresentaram a mesma atenuação na virulência que a linhagem vacinal *B. abortus* RB51 e uma menor virulência quando comparados às linhagens parentais *B. abortus* S2308 e S19. Em geral, as linhagens contendo alterações no LPS são menos virulentas quando comparado com a linhagem selvagem, com exceção da *Brucella ovis* e *Brucella canis*, que são bactérias naturalmente rugosas, porém virulentas (Godfroid et al. 1998).

Ko e colaboradores (2002) também mostraram que a utilização de uma elevada dose de vacina da linhagem rugosa *B. abortus* RB51 (5×10^7 UFC) suscitou um maior nível de proteção ao desafio com *B. abortus* 2308 quando comparada a doses mais baixas. Assim, usamos uma dose 1×10^8 UFC para as linhagens rugosas nos experimentos proteção em camundongos C57BL/6 (Tabela 6). Nossos resultados mostraram que *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 conferiu proteção semelhante à da vacina rugosa atualmente utilizada, a RB51, mas uma menor proteção em relação à linhagem vacinal lisa *B. abortus* S19.

Os camundongos IRF-1^(-/-), apesar de apresentarem diversas alterações, conseguem manter uma memória imunológica adaptativa necessária para a proteção, que é dependente do nível de virulência da bactéria e da dose da imunização. Portanto, foi realizado o experimento de proteção em camundongos IRF-1^(-/-) e o mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 conseguiu impedir a morte de 80% dos camundongos desafiados, induzindo proteção semelhante às linhagens vacinais *B. abortus* RB51 e *B. abortus* S19 (Figura 25). Já o mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 não conseguiu conferir proteção em camundongos C57BL/6 e conferiu apenas 60% de proteção em IRF-1^(-/-).

Essa menor proteção do mutante $\Delta wbkC$ S19 provavelmente se deve ao fato deste mutante ser proveniente da linhagem vacinal S19 que já é atenuada, promovendo uma atenuação adicional com a modificação de seu LPS, o que pode levar a uma inibição de um crescimento bacteriano suficiente para induzir uma imunidade protetora. No entanto, já foram relatados candidatos vacinais eficientes, resultantes de mutações na linhagem vacinal S19. O mutante S19 $\Delta vjbR$ (Arenas-Gamboa *et al.*, 2009) se mostrou um candidato vacinal mais seguro por não induzir esplenomegalia, que é provocada pela S19 em animais vacinados e conferiu proteção em camundongos contra a brucelose experimental igual à linhagem vacinal parental, quando encapsuladas em microcápsulas de alginato. Porém, neste mutante a estrutura de seu LPS não foi alterada, permitindo uma maior persistência em camundongos.

7.CONCLUSÕES

Como conclusão, podemos afirmar que o gene *wbkC* é necessário para a biossíntese do antígeno-O do LPS e virulência da *Brucella abortus*. Além disso, os mutantes $\Delta wbkC$ gerados neste estudo se comportam intracelularmente como a maioria dos mutantes rugosos da *Brucella*. O mutante $\Delta wbkC$ 2308 apresentou proteção similar a linhagem vacinal rugosa, *B. abortus* RB51, tendo a vantagem de não ser resistente à rifampicina e ter a identidade de sua mutação conhecida, o que ainda não foi completamente estabelecido para RB51. Apesar do mutante *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 não conferir o mesmo nível de proteção quando comparado com a linhagem vacinal lisa *B. abortus* S19, ele tem a vantagem de não interferir com o diagnóstico sorológico de animais infectados. Devido à sua eficácia de proteção moderada, o mutante $\Delta wbkC$ 2308 requer maiores estudos para ser considerado um candidato vacinal contra a brucelose.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Purphy, K.M.; Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383, p.787-793.

Akira, S.; Takeda, K., 2004. Toll-Like receptors signaling. *Nature Reviews*. v.4, p.499-511.

Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godefroid J, et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infection and immunity* 2001 Aug;69(8):4816-22.

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.M.; Elzer, P.H.; Rowe, G.R.; Enright, R.M. and Winter, A.J., 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *The Journal of Immunology*. 143, p.3330-3337.

Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Gomez G, Rice-Ficht AC. The *Brucella abortus* S19 DeltavjbR live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infect Immun*. 2009 Feb;77(2):877-84. Epub 2008 Dec 1.

Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC. 2009 *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*. Aug 4;10:352.

Axel Cloeckeaerta, Maggy Grayon, Jean-Michel Verger, Jean-Jacques Letesson, Fabrice Godfroid. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Res. Microbiol*. 151 (2000) 209–216

Boschioli, M. L., Quarani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachons, S., Bourg, G., Allarde-Servent, A., Cazevielle, C., Liautard, J. P., Ramuz, M., and

- O'Callaghan, D., 2002. The *Brucella suis* operon *virB* is induced intracellularly in macrophages. Proc. Nat. Academy of Scientific USA. 7, p 248-254.
- Bricker, B. J., Ewalt, D. R., McMillan, A.P., Foster, G. and Brew, S.,2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Journal of Clinical Microbiology. 38, p 1258-1262.
- Brownlie L, Stephenson JR, Cole JA, Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* HB101(pAT153). J Gen Microbiol. 1990 Dec;136(12):2471-80
- 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.
- Carvalho Neta AV, Stynen AP, Paixão TA, Miranda KL, Silva FL, Roux CM, Tsolis RM, Everts RE, Lewin HA, Adams LG, Carvalho AF, Lage AP, Santos RL. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. Infect Immun. 2008 May;76(5):1897-907. Epub 2008 Mar 3.
- Cassataro J, Velikovsky CA, de la Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, et al. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. Infection and immunity 2005 Oct;73(10):6537-46.
- Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. 2003. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. The Journal of Experimental Medicine.198(4):545-56.
- Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. Res Microbiol. 2006 Mar;157(2):93-8. Epub 2005 Nov 9.
- Cheers, C. & Ho., M., 1983. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. Journal of Reticuloendothelial Society. 34, p 299-309.

Cheville, N. F., Stevens, M. G., Jensen, A. E., Tatum, F. M. and Halling, S. M., 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strain of *Brucella abortus*. American Journal Veterinary Research. 54, 175-180.

Chistie, P., 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multi-functional transporters in eubacteria. Journal of Bacteriologic. 179, p 3085-3094.

Cloekaert A, Grayon M, Grépinet O, Boumedine KS: Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes Infect 2003, 5:593-602.

Cloekaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J: Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. Microbes Infect 2001, 3:729-738.

Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an overview. Emerging Infectious Diseases. 2, p.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.

Crawford, R. M., Heber, J. D. and Bruce, S., 1990. Epidemiology and surveillance. In: K. Nielsen & J. R. Duncan. Animal Brucellosis. CRC Press. P 131-152.

Detilleux, P.G.; Deyoe, B.L.; Cheville, N.F., 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. Infection and Immunity. 58, p.2320-2328.

Drazek, E. S., Houg, H. S., Crawford, R. M., Hadfield, T. L., Hoover, D. L. and Warren, R.L., 1995. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* 16M for growth in human monocytes-derived macrophages. Infection and Immunity. 63, p 3297-3301.

Eskra, L., Canavessi, A., Carey, M. and Splitter, G., 2001. *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophages infection. *Infection and Immunity*. 69, p 7736-7742.

Fernandez- Prada, C. M., Zelazowska, E. B., Nikolich, M., Hadfield, T. L., Roop II, R.M., Robertson, G. L. and Hoover, D.L., 2003. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O- polysaccharide inhibits phagocytosis bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infection and Immunity*. 71, p 2110-2119.

Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine*. 2009 Nov 5;27 Suppl 4:D40-3.

Fontes P., M.T. Alvarez-Martinez, A. Gross, C. Carnaud, S. Kohler, J.P. Liautard, Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*, *Infect. Immun*. 73 (2005) 6229–6236.

Forestier C, Deleui F, Lapaque N, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J. Immunol*. 2000

Foulongne, V., Bourg, G., Cazevielle, C., Michaux-Charachon, S. and O'Callaghan, D., 2000. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by Signature-Tagged Transposon Mutagenesis. *Infection and Immunity*. 68, p. 1297–1303.

Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. and Bollet, C., 2000. *Precis de Bacteriologie Clinique*. Paris: ESKA. P 1413-1423.

Godfroid F, Cloeckeaert A, Taminiau B, Danese I, Tibor A, de Bolle X, Mertens P, Letesson JJ. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *brucella melitensis* 16M (wbk). *Res Microbiol*. 2000 Oct;151(8):655-68.

Godfroid, F.; Taminiau, B.; Danese, I.; Deonel, P.; Tibor, A.; Weyants, V.; Cloeckeaert, A.; Godfroid, J.; Letesson, J.J., 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. *Infection and Immunity*. 66, p.5485-5493.

Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. and Letesson, J., 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. *Veterinary Research*. 36, p-313-326.

Golging, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L.-Y., Zaitseva, M., Lapham, C., Eller, N., Golding, H., 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*, *Microbes and Infection*. 3, p 43-48.

Gonçalves V.S.P.; M.K.V.C. Delphinol; R.A. DiasII; F. Ferreirall; M. Amakull; J.S. Ferreira Netoll; T.B. PortollI; C.M. AlvesIV; V.C.F. FigueiredoV; J.R. LôboV. 2009. Epidemiological status of bovine brucellosis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.61 supl.1 Belo Horizonte.

Gonzalez D, Grillo MJ, De Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* 2008;3(7):e2760.

Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC: Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 2005, 8:2715-2726.

Halling, S.M., Detilleux, P.G., Tatum, F. M., Judge, B.A. and Mayfield, J. E., 1991. Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infection and Immunity*. 59, p 3863-3868.

Jimenez de Bagues MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infection and Immunity* 2004;72(4):2429-33.

Jinkyung, K., Gendron-Fitzpatrick, A. and Splitter, G. A., 2002. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein deficient mice to brucellosis. *Journal of Immunology*. 168, p 2433-2440.

Jones, S.M.; Winter, A.J., 1992. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. 60, p.3011-3014.

Kaushik P, Singh DK, Kumar SV, Tiwari AK, Shukla G, Dayal S, Chaudhuri P. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Vet Res Commun*. 2010 Feb;34(2):119-32. Epub 2009 Dec 16

Keenleyside W.J., Whitfield C., Genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide O-antigens, in: Brade H., Opal S.M., Vogel S.N., Morrison D.C. (Eds.), *Endotoxin in health and disease*, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 331–358.

Kelly NM, MacDonald MH, Martin N, Nicas T, Hancock RE. 1990. Comparison of the outer membrane protein and lipopolysaccharide profiles of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. Sep;28(9):2017-21.

Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T. and Shirahata, T., 2004. Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microbial Pathogenesis*. 37, p 11-19.

Ko, J., Gerdron-Fitzpatrick, A., Ficht, T. and Splitter, G. A., 2002. Virulence criteria for *Brucella abortus* strains determined by interferon regulatory factor 1-deficient mice. *Infection and Immunity*. 70, p 7004-7012.

Ko,J. ; Gerdron-Fitzpatrick, A. and Splitter,G.A., 2002. Suceptibility of IFN regulatory factor–1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis, *Journal of Immunology*. 168, p2433-2440.

Kreutzer, D.L.; Robertson, D.C.,1979. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: Comparison of crII envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*. 23, p.809-828.

Lapaque, N., I. Moriyon, E. Moreno e J. P. Gorvel. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* 8(1): 60-6.

Leclercq S, Harms JS, Oliveira SC. Enhanced efficacy of DNA vaccines against an intracellular bacterial pathogen by genetic adjuvants. *Curr Pharm Biotechnol* 2003 Apr;4(2):99-107.

Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H., Duncan, G. Biscof, S., Rollinghoff, M. and Mark, T., 1997. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity*. 6, 681-689.

London, C. A., Abbas, A.K. and Kelso, A., 1998. Helper T cell subsets : heterogeneity, function and development. *Veterinary Immunology and Immunopathogenesis*. 63, p 37-44.

Mallick AI, Singha H, Chaudhuri P, Nadeem A, Khan SA, Dar KA, et al. Liposomised recombinant ribosomal L7/L12 protein protects BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 infection. *Vaccine* 2007 May 4;25(18):3692-704.

Maria-Pilar, J. B., Dudal, S, Dornand, J. and Gross, A., 2005. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clinical Immunology*. 114, p-227-238.

McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. Related Articles, Links Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol*. 1994 Mar 1;152(5):2172-9.

Meyer, M., 1990. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella* In: *Animal Brucellosis*. K Nielsen and J. R. Duncan, eds. CRC Press. Inc. p.1-17.

Monreal D, Grillo MJ, Gonzalez D, Marin CM, De Miguel MJ, Lopez- Goni I, Blasco JM, Cloeckert A, Moriyon I: 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* 2003, 6:3261-71.

Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goni I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res.* 2004 Jan-Feb;35(1):1-38. Review.

Moriyon I. Against gram-negative bacteria: the LPS case. In *Intracellular Pathogens in Membrane Interactions and Vacuole Biogenesis*. Landes Biosciences 2003.

Mosman, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *Journal of Immunology.* 136, p 2348-2356.

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

Oliveira SC, Splitter GA. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine* 1996 Jul;14(10):959-62.

Oliveira, S.C. and Splitter, G.A., 1995. CD8⁺ type 1 CD44^{hi} CD45RB^{lo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. *European Journal of Immunology.* 25, p.2551-2557.

Oliveira, S.C. and Splitter, G.A., 1998. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Researches.* 31, p 77-84.

Oliveira, S.C., Harms, J.S., Banai, M and Splitter, G.A., 1996. Recombinant *Brucella abortus* protein that induce proliferation and Gamma-interferon secretion by CD4⁺ cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized Guinea pigs. *Cell Immunology.* 172, p262-268.

Onate AA, Cespedes S, Cabrera A, Rivers R, Gonzalez A, Munoz C, et al. A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces

protective immunity in BALB/c mice. *Infection and immunity* 2003 Sep;71(9):4857-61.

Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, et al. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infection and immunity* 2009 Jan;77(1):436-45.

Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity* 1998;66(12):5711-24.

Poester, F. P.; Gonçalves, V.S. P. and Lage, A. P., 2002. Brucellosis in Brasil. *Veterinary microbiology*. 90, p 55-62.

Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. 2003. Role of the *Brucella* suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun*. mar;71(3):1481-90.

Rajashekara G, Glover DA, Banai M, O'Callaghan D, Splitter GA. Related Articles, Links Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (*virB4*), GR024 (*galE*), and GR026 (*BMEI1090-BMEI1091*) confer protection in mice. *Infect Immun*. 2006 May;74(5):2925-36.

Reeves P.R., Hobbs M., Valvano M.A., Skurnik M., Whitfield C., Coplin D., Kido N., Klena J., Maskell D., Raetz C.R., Rick P.D., Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature, *Trends Microbiol*. 4 (1996) 495–503.

Rigby, D. C. and Fraser, A. D., 1989. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Journal Veterinary Research*. 53, 326-330.

Rolán HG, Tsolis RM. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. 2007 *Infect Immun*. Jun;75(6):2965-73. Epub 2007 Apr 9.

Roop II, R. M., Bellaire, B., Valderas, M. and Cardelli, J., 2004. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Molecular Microbiology*. 52, p 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 Harbor Press.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, p 5463-5467.

Sathiyaseelan J, Goenka R, Parent M, Benson RM, Murphy EA, Fernandes DM, Foulkes AS, Baldwin CL. Treatment of Brucella-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cell Immunol*. 2006 Sep;243(1):1-9. Epub 2006 Dec 20.

Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, Dick EJ Jr, Snider CL, Cappelli D, Ebersole JL, Nathanielsz PW, Hubbard GB. A novel Brucella isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J Med Primatol*. 2009 Feb;38(1):70-3.

Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60(Pt 4):801-8. Epub 2009 Aug 6.

Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Burhaman, D. and Srirangathan, N, 1991. Biological properties of RB51. A stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*. 28, p 171-188.

Smith, L.D.; Ficht, T. A., 1990. Pathogenesis of *Brucella*. *Microbiology*. 17, p.209-230.

Tabatabai LB, Pugh GW, Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine* 1994 Aug;12(10):919-24.

Takeda, K.; Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. v.16, p.3-9.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takoaka, A. and Tanaka, N., 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review Immunology*. 19, p 623-655

Tatum, F. M., Detilleux, P. G., Sacks, J. M. and Halling, S. M., 1992. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis *in vitro* in epithelial and phagocytic cell and *in vivo* mice. *Infection and Immunity*. 60, p 2863-2869.

Thoma-Uszynski, S.; Stenger, S. Takeuchi, O. Ochoa, M. T.; Engele, N.; Sieling, P. A.; Barnes, P.F. Röllinghoff, M.; Bölcskei, P. L.; Wagner, M.; Akira, S.; Norgard, M. V.; Belisle, J. T.; Godowski, P. J.; Bloom, B. R.; Modlin, R. L., 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-Like receptors. *Science*. v. 2191, p.1544-1547.

Trant CG, Lacerda TLS, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, Gorvel JP, Oliveira SC. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. *Infect Immun*. 2010 May;78(5):2283-91. Epub 2010 Mar 1.

Ugalde, J.E., Comerci, D. J., Leguizamón, M. S. and Ugalde, R. A., 2003. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (*pgm*) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infection and Immunity*. 71, p 6264-6269.

Ugalde, J.E., Czibener, C., Feldman, M. F. and Ugalde, R. A., 2000. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infection and Immunity*. 68, p 5716-5723.

Ugalde, R. A., 1999. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes and Infection*. 1, p.1211-1219.

Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infection and immunity* 2002 May;70(5):2507-11.

Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. 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*. 2000 Jul;68(7):3927-32.

Vemulapalli R, He Y, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG. Related Articles, Links *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Vet Microbiol*. 2002 Dec 20;90(1-4):521-32.

Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. D. and Grayon, M., 1985. *Brucella*, a monoespecific genus as show by deoxyribonucleic acid hibridization. *Internation Systematic Bacteriologic*. 35, p 292-295.

Vizcaíno N, Cloeckeaert A, Verger J, Grayon M, Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect*. 2000 Jul;2(9):1089-100. Review.

Watarai, M., 2004. Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes and Infection*. 6, p 93-100.

WHO- World Health Organization, 1998. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. The development of New improved Brucellosis Vaccines: report of a WHO Meeting , Geneva.

Young, E.J.,1988. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica (APMIS.) Supplementum*. 3, p.17-20.

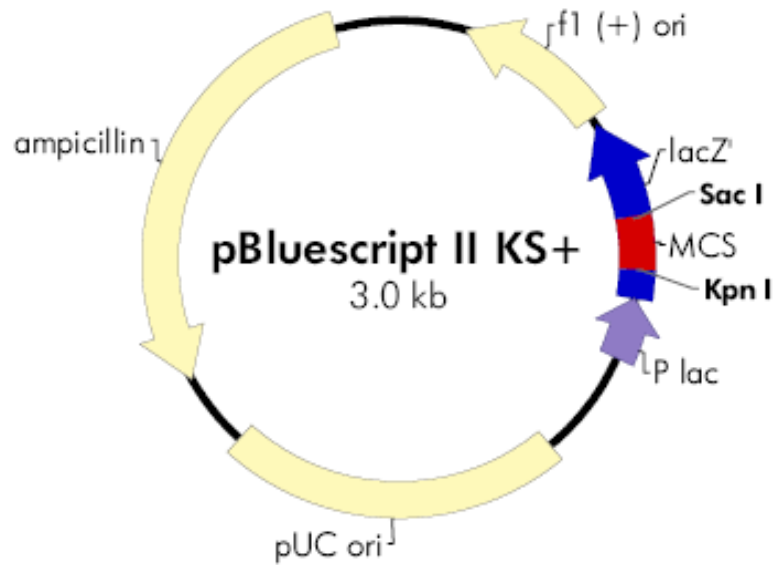
Zhan, Y. and Cheers, C.,1998. Control of IL-12 and IFN- γ production in response to live or dead bacteria by TNF- α and other factors. *Journal of Immunology*.161, p 1447-1453.

Zhan, Y.; Liu, Z.; Cheers, C., 1996. Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infection and Immunity*. 64, p.2782-2786.

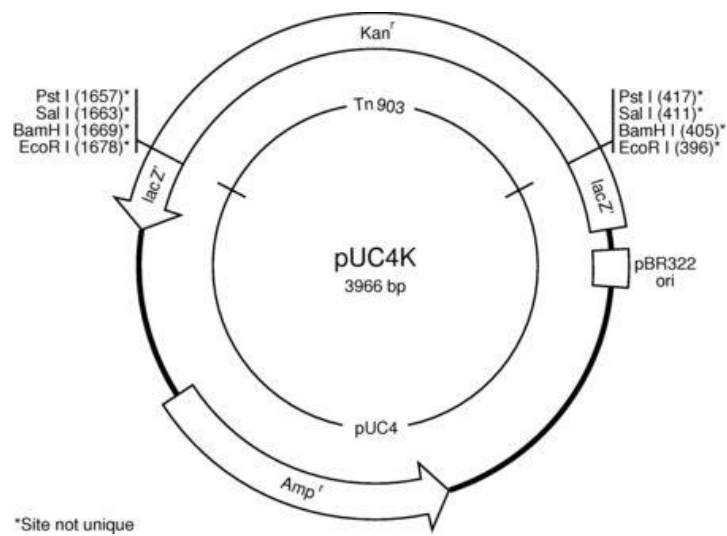
Zhan, Y.; Yang, J. I. and Cheers, C.,1993. Endogenous Interferon gamma mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*. 61, p. 4899-4901.

9.1. Mapas dos plasmídeos utilizados neste trabalho

9.1.1. Mapa do vetor pBluescript-II KS+



9.1.2. Mapa do vetor pUC4K



9.2. Artigos

Lacerda TLS; Cardoso PG; Almeida LA; Camargo ILBC; Afonso DAF; Cardoso-Trant CG; Macedo GC; Campos E; Cravero S; Salcedo SP; Gorvel JP and Oliveira SC. Inactivation of formyltransferase (*wbkC*) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. 2010. Vaccine. (Artigo aceito para publicação).

Trant CG, Lacerda TLS, Carvalho NB, Azevedo V, Rosinha GM, Salcedo SP, Gorvel JP, Oliveira SC. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. Infect Immun. 2010 May;78(5):2283-91. Epub 2010 Mar 1.

Almeida LA, Carvalho NB, de Oliveira FS, Macedo GC, Lacerda TLS, Nogueira, L, Bafica, A., Vaconcelos, AC, Silva, AM, Oliveira, SC. *Brucella abortus* induces MyD88/IRF-3-mediated IFN- β production that triggers host cell apoptosis and enhances susceptibility to bacterial infection. (Artigo submetido).

Salcedo SP, Lacerda TLS, Chevrier N, Arce-Gorvel V, Gorvel JP. *Brucella spp* intracellular replication in human trophoblasts. (Manuscrito em preparação)

9.2.1. Aceite e manuscrito do artigo publicado referente a esta tese

Ms. Ref. No.: JVAC-D-10-00627R1

Title: Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice

Vaccine

Dear Dr. Oliveira,

I am pleased to confirm that your paper "Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice" has been accepted for publication in *Vaccine*.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

James B. Campbell, Ph.D.

Associate Editor

Vaccine

Inactivation of formyltransferase (wbkC) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice

Thaís Lourdes Santos Lacerda¹, Patrícia Gomes Cardoso², Leonardo Augusto de Almeida¹, Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo³, Daniela Almeida Freitas Afonso¹, Cyntia Cardoso Trant¹, Gilson Costa Macedo¹, Eleonora Campos⁴, Silvio L. Cravero⁴, Suzana P. Salcedo^{5,6,7}, Jean-Pierre Gorvel^{5,6,7} and Sérgio Costa Oliveira^{1*}.

Department of Biochemistry and Immunology¹, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil¹; Department of Biology, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil²; Department of Physics and Informatic, Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, Brazil³; Instituto de Biotecnologia, INTA-Castelar, Castelar, Buenos Aires, Argentina⁴; Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université, Faculté de Sciences de Luminy, Marseille, France⁵, INSERM, U631, Marseille, France⁶, CNRS, UMR6102, Marseille, France⁷

*Corresponding author. Mailing address: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil, 31270-901. Phone/Fax: 55-31-34992666. E-mail: scozeus@icb.ufmg.br.

Abstract

Rough mutants of *Brucella abortus* were generated by disruption of *wbkC* gene which encodes the formyltransferase enzyme involved in LPS biosynthesis. In bone marrow-derived macrophages the *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants were attenuated, could not reach a replicative niche and induced higher levels of IL-12 and TNF- α when compared to parental smooth strains. Additionally, mutants exhibited attenuation in vivo in C57BL/6 and interferon regulatory factor-1 knockout mice. $\Delta wbkC$ mutant strains induced lower protective immunity in C56BL/6 than smooth vaccine S19 but similar to rough vaccine RB51. Finally, we demonstrated that *Brucella* *wbkC* is critical for LPS biosynthesis and full bacterial virulence.

Key words: *Brucella abortus*, rough strain, live vaccine

Running title: *Brucella* $\Delta wbkC$ mutant is an attenuated rough strain

1. Introduction

Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella spp.*, a Gram-negative facultative intracellular cocobacilli that affect many species of animals and occasionally humans, resulting in heavy economic losses and human suffering [1]. *Brucella* survives and replicates inside both phagocytic and non-phagocytic host cells by entering in these cells through lipid-rafts [2]. Afterwards, bacteria are found within a compartment termed the *Brucella*-containing vacuole (BCV), which transiently interacts with early endosomes, escapes lysosome fusion and further fuses with membrane of the endoplasmic reticulum (ER), establishing a replicative organelle [3]. This intracellular process is dependent upon the *Brucella* type IV secretion system *virB* [4].

The basis for *B. abortus* strength as an inducer of acquired cellular resistance is likely attributable to its ability to interact with TLRs, stimulating IL-12 production which in turn stimulates NK and T cells to secrete IFN- γ [5]. It is also known that different LPS molecules interact differently with TLRs and stimulation of TLR by *B. abortus* LPS induces low TNF- α and IL-12 production [6]. Entry and replication events are also dependent on its LPS [2]. LPS is a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, one of *Brucella* main virulence factors, and it has been a target for attenuating strains for vaccine development. LPS is composed of three distinct structural regions: lipid A (responsible for endotoxic properties), core oligosaccharide and distal O-antigen. However, LPS is synthesized as two separated components, lipid A/core, and the O-antigen synthesized on a lipid carrier by enzymes encoded by *wb** gene cluster [7]. According to their colony morphology, *Brucella* strains differ into smooth, rough or intermediated/mucoid types [8]. In general, smooth *Brucella* strains have been reported as

more virulent than the rough strains. Currently, there are two main strains in use as live attenuated *B. abortus* vaccines, *B. abortus* S19 (smooth) and *B. abortus* RB51 (rough).

B. abortus S19 is the most commonly used attenuated vaccine for the prevention of bovine brucellosis and is widely used in eradication campaigns worldwide. However, *B. abortus* S19 is virulent for humans and can induce abortion when administered in pregnant cattle [9]. Moreover, its smooth LPS hinder the discrimination between infected and vaccinated animals during immuno-screening procedures [10]. On the other hand, *B. abortus* RB51 is a rough strain that arose spontaneously after multiple passages of the virulent strain *B. abortus* S2308 in selective medium. In this strain, there was an interruption of the *wboA* gene due the insertion of an IS711 element and mutation in more than one of the genes necessary for the expression of a smooth phenotype [8, 11]. *B. abortus* RB51 is currently employed as vaccine for cattle brucellosis in the United States and other countries. It is avirulent in mice and cattle, retains the capacity to induce partial protection and cellular immunity, and does not interfere with diagnosis [12]. However, *B. abortus* RB51 has the limitation to be rifampicin resistant, the antibiotic of choice for brucellosis treatment in pregnant women, children, and brucellosis endocarditis cases [13]. And depending upon dosage and route of delivery, its effectiveness for prevention of abortion is variable [14]. Therefore, all efforts have been focused on searching better live rough attenuated vaccine that could be capable of inducing efficient cellular immunity and protection [8, 15].

Early study has shown that in *B. melitensis* a *wbkC* homologous gene was predicted to be absolutely required for the O-side-chain production [7]. WbkC acts in the LPS biosynthesis pathway catalyzing the GDP-4-NH₂-4,6 dideoximanose conversion in GDP-4-formamido-4,6 dideoximanose, the monomeric unit of antigen-O presents in *Brucella* LPS

[7]. Herein, we have disrupted the *wbkC* gene using gene replacement by double-recombination strategy in *B. abortus* S19 and S2308 strains in order to study its role in virulence, protection and intracellular multiplication in mice and in bone-marrow derived macrophages (BMDM).

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth media

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All *B. abortus* strains were grown on Brucella Broth medium (BB) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) or on plates of BB containing 1.5% Bacto Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37°C. *Escherichia coli* strains were grown on Luria-Bertani (LB) medium (Invitrogen, Carlsdan, CA, USA). If necessary, the medium was supplemented with appropriate antibiotic as follows: ampicillin, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and/or kanamycin, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *Brucella*; ampicillin, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and/or kanamycin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *E. coli*.

2.2. Animals

A pair of IRF-1^{-/-} (interferon regulation factor-1 knockout) mice breeders was kindly donated by Dr. Luis F. Lima Reis from the Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil. C57BL/6 mice were purchased from the Federal University of Minas Gerais. Both mouse strains were bred and maintained at the Department of Biochemistry and Immunology animal care facility, and used at 6 to 9 weeks-old of age.

2.3. Cloning, DNA sequencing, and gene disruption.

Chromosomal mutants were generated from the parental *B. abortus* S2308 and S19 strains using the gene replacement strategy originally described in *Brucella* by Halling *et al* [16]. *Brucella* genomic DNA extraction was performed as previously described [17]. The 970 bp *XhoI/XbaI* PCR-amplified fragment containing *wbkC* was obtained from the *B. abortus* genomic DNA. The primers used were: *wbkCR*, 5'- GCG **CTC GAG** TAC GAA TTG CAG CGC CT - 3'; *wbkCF*, 5'- GCG **TCT AGA** GCC AGA AGC CTT TAT CAT CA -3' and the amplification conditions were performed as follows: 94°C for 2 min; 35 cycles including 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 2 min; and a final extension of 72°C for 10 min. The nucleotides in bold indicates cleavage site of the endonuclease enzymes *XbaI* and *XhoI* added to the *wbkC* primer sequences R (reverse) and F (forward), respectively in order to clone the DNA fragment previously digested with *XhoI/XbaI* into pBluescript KS II (+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) resulting in the pBlue:*wbkC* plasmid. A 1250-bp kanamycin resistance cassette (*kan*) was amplified with primers *kanF* 5'- GCG GCA TGC CGC TGA GGT CTG CCT C - 3' and *kanR* 5'- GCG GCA TGC GGG GAA AGC CAC GTT GT 3' from the plasmid pUC4K (GE Healthcare) and it was cloned into the *SphI* site in the middle of the gene *wbkC* of the pBlue:*wbkC* plasmid resulting in the pBlue:*wbkC-kan* construct. All constructed plasmids were sequenced using the MegaBACE 1000 (GE Healthcare, São Paulo, Brazil). The obtained clone was sequenced using a DYEnamic ET Dye Terminator kit (GE Healthcare), and the primers used were M13 reverse sequence, M13 universal sequence from GE Healthcare, and specific primers were purchased commercially. To prepare *B. abortus* S2308 competent cells, bacteria were grown in 100 mL of Brucella Broth overnight at 37°C to the log phase (optical density at 600 nm, 0.8 to 1.0). The bacterial cells were harvested by centrifugation at 3290 g for 10 min at 4°C, and they were washed three times with cold apyrogenic water

and resuspended in 1.0 ml of the same water. The aliquots were immediately used for electroporation. One to eight micrograms of pBlue:*wbkC*-kan plasmid DNA was added to 0.05-ml aliquots of *B. abortus* competent cells and the electroporation was performed as previously described [17]. Colonies were plated on Brucella Broth agar plates containing kanamycin (25 µg/ml) and incubated at 37°C for 3 days. The recombinant clones were selected in the presence of kanamycin and ampicillin. Ampicillin was used to differentiate deletions resulting from double recombination events (amp^s) from insertions resulting from a single recombination (amp^r).

2.4. Characterization of *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants

To provide genetic evidence that the *B. abortus* *wbkC* gene was interrupted by the kanamycin cassette, PCR and Southern Blot analysis were performed. PCR analysis was conducted with genomic DNA of *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutant strains and the wild type. The specific primer sequences for *wbkC* and *kan* genes described above were used for PCR amplification. Southern blot analysis of *NheI* and *DraI* digested genomic DNA with *wbkC* and *kan* probes labeled with AlkPhos Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare, São Paulo, Brazil) was performed. An internal 600 pb *wbkC* fragment and an *amp* probe was used to confirm the lack of ampicillin resistance gene within the mutants. In order to confirm the rough morphology of the mutants, it was used the crystal violet method [18]. By this methodology, rough colonies take up the dye, whereas the smooth colonies do not. To confirm the lack of LPS O-chain in $\Delta wbkC$ mutant strains, Western Blot analysis was also performed as described before [7]. In this study, it was used mAbs O4F9 (IgG 2a) for S-LPS [19] or A68/24 D08/609 (IgG1) for R-LPS as primary antibodies (1:1000) (kindly donated by Dr. Axel Cloeckert from INRA, France) and anti-mouse total

IgG alkaline phosphatase labeled as secondary antibody (1:4000). The development of the reaction was performed using CDP-Star (GE Healthcare, São Paulo, Brazil).

2.5. Persistence of *ΔwbkC* mutant strains in C57BL/6 mice

Mice were injected intraperitoneally with 1×10^6 CFU of smooth *Brucella* S19 or S2308 or 1×10^8 CFU of rough *Brucella ΔwbkC* mutants or RB51 in 0.1 ml of phosphate-buffered saline (PBS). To count residual *Brucella* CFU in the spleens of mice, 8 animals from each group were examined at 1, 2, 3, and 6-weeks post-infection. Spleens from individual animals were homogenized in PBS, 10-fold serially diluted, and plated on Brucella Broth agar. For *ΔwbkC* mutant strains culture, the BB agar containing kanamycin (25 mg/mL) was used. Plates were incubated at 37°C, and the number of CFU was counted after 3 days. The experiments were repeated twice with similar results.

2.6. Virulence of *ΔwbkC* mutants in IRF-1 KO mice

Five groups of eight IRF-1 KO mice were injected i.p. with 1×10^6 CFU of either *B. abortus* S2308, S19, *ΔwbkC* S2308, *ΔwbkC* S19 or RB51 vaccine strains in 0.1 ml. Number of surviving mice was observed during 30 days post-infection. The experiments were repeated twice with similar results.

2.7. BMDM culture and infection

Bone marrow cells were isolated from femurs and tibias of 6–9-weeks-old C57BL/6 mice and differentiated into macrophages as previously described [20]. Infections were performed at a multiplicity of infection of 50:1. Bacteria were centrifuged onto macrophages at 400 g for 10 min at 4°C then incubating the cells for 30 min at 37°C under

7% CO₂. Macrophages were extensively washed with HBSS to remove extracellular bacteria and incubated for an additional 90 min in medium supplemented with 100 µg/ml gentamicin to kill extracellular bacteria. Thereafter, the antibiotic concentration was decreased to 10 µg/ml. At each time point, samples were washed three times with HBSS before processing. To monitor *Brucella* intracellular survival, infected cells were lysed with 0.1% (vol/vol) Triton X-100 in H₂O and serial dilutions of lysates were rapidly plated onto Brucella Broth agar plates to count the number of CFU. The level of IL-12 (p40) and TNF- α in the supernatants of BMDM were measured by a commercially available ELISA DuoSet kit (R&D Systems, Minnesota, MN).

2.8. Immunofluorescence microscopy

Bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice were infected with a multiplicity of infection of 25:1. Infected cells grown on 12-mm glass coverslips in 24-well plates were fixed in 3% paraformaldehyde, pH 7.4, at 37 °C for 15 min at different time points. Cells were labeled by inverting coverslips onto drops of primary antibodies diluted in 10% horse serum and 0.1% saponin in PBS and incubating for 30 min at room temperature. The primary antibodies used for immunofluorescence microscopy were: cow anti-*B.abortus* polyclonal antibody and rat anti-mouse LAMP1 ID4B (Developmental Studies Hybridoma Bank, National Institute of Child Health and Human Development, University of Iowa, Iowa city, Iowa). Bound antibodies were detected by incubation with 1:1000 dilution of Alexa Fluor 488 goat anti-rat or 1:100 dilution of TexRed goat anti-cow (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, UK) for 30 min at room temperature. Cells were washed twice with 0.1% saponin in PBS, once in PBS, once in H₂O and then mounted in

Mowiol 4-88 mounting medium (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Samples were examined on a Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope for image acquisition. Images of 1024 x 1024 pixels were then assembled using Adobe Photoshop 7.0. Intracellular bacteria of at least 50 cells for each time point and each strain were counted in three independent experiments.

2.9. Protection induced by *ΔwbkC* mutants in IRF-1 KO and C57BL/6 mice.

The challenge infection using the virulent strain *B. abortus* S2308 was performed in two mouse models, C57BL/6 and IRF-1 KO. Groups of eight-weeks-old-male C57BL/6 mice (n=8 per group) were vaccinated intraperitoneally (i.p.) with 1×10^5 CFU of smooth strain *B. abortus* S19 or with 1×10^8 of rough strains *B. abortus* RB51, *ΔwbkC* 2308 or *ΔwbkC* S19, separately. A control group of 8 unvaccinated mice was injected i.p. with 0.1 ml of PBS. Six weeks after vaccination, mice were challenged i.p. with 1×10^6 CFU/mouse of the virulent *B. abortus* S2308 strain. C57BL/6 mice were euthanized by cervical dislocation two weeks after challenge and the bacterial loads in their spleen were determined. Using the IRF-1 KO mouse model, protection was observed in groups of eight-weeks-old-male IRF-1 KO (n=8 per group). These mice were vaccinated with the same strains and doses as mentioned above for the C57BL/6 experiment. Six weeks after vaccination, mice were challenged i.p. with 1×10^6 CFU/mouse of the virulent *B. abortus* S2308 strain. The number of surviving mice was observed during 30 days after challenge. The experiments were repeated twice with similar results.

2.10. Statistical analysis. Student's *t* test was used to analyze the data for bacterial clearance and protection experiments. The other experiments were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-test.

3. Results

3.1. *B. abortus* $\Delta wbkC$ are rough mutants

After disrupting the *wbkC* gene with the kanamycin resistance cassette, *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants where double recombination event took place were successfully obtained. The *wbkC* gene disruption was confirmed by PCR (data not shown) and by Southern blot analysis (Figure 1). A PCR analysis was conducted on genomic DNA with specific primers to amplify *wbkC* gene from *Brucella* parental strains and respective mutants. For Southern blot analysis, genomic DNA was isolated from *B. abortus* S2308 and S19 parental strains and *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants and digested with *DraI* and *NheI*, simultaneously. DNA digested was hybridized with *kan* probe (Figure 1-I) and one band of approximately 1800 bp was observed for the mutants *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 or $\Delta wbkC$ S19. When the same membrane was hybridized with the probe for *wbkC* gene (Figure 1-II), we observed one band of approximately 600 bp in parental strains *B. abortus* S2308 or S19, and another band of 1800 bp in $\Delta wbkC$ S2308 or $\Delta wbkC$ S19 mutant strains that correspond to the kanamycin resistance gene integrated into the *wbkC* gene. The strain where a single recombination occurred presented both bands (600pb and 1800 pb) which indicate the presence of two *wbkC* gene copies, one functional and one interrupted with the kanamycin resistance gene. Also only this strain where a single recombination event took place was recognized when a probe for ampicillin resistance gene was used (Figure 1-III). It presented

two bands that resulted from cleavage of ampicillin gene when the DNA was digested to perform the Southern blot. Southern blot analysis confirmed the disruption of the *wbkC* gene in the $\Delta wbkC$ 2308 and $\Delta wbkC$ S19 mutants. Characterization by crystal violet colony staining also confirmed that the mutants *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 and $\Delta wbkC$ S19, and the vaccine strain *B. abortus* RB51 were all morphologically rough strains as they absorbed the dye, which was not observed for smooth parental strains (data not shown). Additionally, crude extracts of the obtained mutants, the parental strains, and the vaccine rough strain *B. abortus* RB51, were analyzed by Western blot. The immunoblotting with mAbs O4F9 (IgG2a) revealed S-LPS presence only in *B. abortus* S2308 and S19 strains (Figure 2A, lanes 1 and 3). On the other hand, the mutants and the RB51 strains were not recognized by the anti-S-LPS antibodies, once this mAb recognize antigen-O specifically, confirming that the antigen-O was altered in the mutants. However, Western blot analysis with mAbs A68/24 D08/609 (IgG1) specific for R-LPS of *Brucella* revealed high molecular mass ladder-like pattern only in *B. abortus* S2308 and S19, which was absent in rough strains. On the other hand, *B. abortus* RB51, $\Delta wbkC$ 2308 and $\Delta wbkC$ S19 have shown low molecular mass ladder-like pattern when probed with mAb specific for R-LPS (Figure 2B) what was expected considering the absence of the O-chain.

3.2. *B. abortus* $\Delta wbkC$ are attenuated in C57BL/6 and IRF-1 KO mice

To verify if there are differences in virulence of the mutants compared to parental strains and the rough vaccine strain *B. abortus* RB51, we compared the bacterial persistence in C57BL/6 and IRF-1 KO mice inoculated i.p. with these strains. In C57BL/6 mice, the rough mutants were significantly attenuated ($p < 0.001$) at all time points observed when

compared to parental strains and they were undetected by 3 weeks post-infection (Figure 3). The rough vaccine strain RB51 load on mouse spleens was reduced to almost two logs by three weeks post-infection but it was completely eliminated at six weeks post-infection. Regarding testing these strains in IRF-1 KO mice, all infected mice with *B. abortus* S2308 died in 16 days. After 30 days, it was observed that 70% of the *B. abortus* S19 group survived. However, all mice inoculated with the mutants or RB51 group survived during the period of time studied (Figure 4).

3.3. Intracellular survival of *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants and production of pro-inflammatory cytokines by infected BMDM

BMDM were infected with the *B. abortus* $\Delta wbkC$ rough mutants and compared to the parental smooth strains (Figure 5A and B). The parental smooth strain *B. abortus* 2308 was able to replicate and survive inside macrophages, while $\Delta wbkC$ 2308 mutant decreased its intracellular number at 24 and 48 hours post-infection (Figure 5A). For the parental smooth strain *B. abortus* S19 and the mutant $\Delta wbkC$ S19 (Figure 5B), both had a prominent intracellular number decrease at 24 hours post-infection; however, S19 recovered and replicated, while $\Delta wbkC$ S19 mutant maintained its intracellular number at 48 hours after infection. At later time points, after 48 hours, the intracellular numbers of both mutants kept on decreasing and the same profile was observed for the *B. abortus* RB51 strain (data not shown). Meanwhile parental strains replicated inside the macrophages, maintaining their intracellular CFU number.

Because different LPS molecules can interact differently with TLR [21] and it is known that stimulation of TLR-4 by *B. abortus* LPS induces low TNF- α and IL-12 production, we

evaluated IL-12 (Figure 5C) and TNF- α (Figure 5D) production in supernatants of infected cells. *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 mutant produced higher levels of IL-12 at 24 and 48 hours post-infection compared to the its parental strain *B. abortus* 2308. The same profile was observed for *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 mutant ($p < 0.01$). A significant accumulation of TNF- α was observed into supernatants of all rough *Brucella* strains infected-cells, which in each case was significantly higher than cells infected with smooth parental strains.

3.4. Intracellular localization of *Brucella* $\Delta wbkC$ mutants in BMDM

Upon entry, wild type *B. abortus* establishes a replicative niche, acquiring endoplasmic reticulum markers (calnexin, calreticulin, PDI). While mutants, as the $\Delta virB$, maintain late endosomal/lysosomal marker (LAMP-1), fuse with lysosomes and are eliminated. Immunofluorescence analysis of infected BMDM showed that unlike wild type bacteria, over 80% of $\Delta wbkC$ mutant BCVs retained LAMP-1 (Figure 6A and B). Both $\Delta wbkC$ mutants showed the same profile as both the vaccine rough strain RB51 and the $\Delta virB$ mutant.

3.5. Protective efficacy of *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants against *B. abortus* 2308 challenge

To evaluate the potential use of $\Delta wbkC$ mutants as vaccine candidates, the protection level induced in mice against virulent challenge infection was assessed. The degree of vaccine efficacy in C57BL/6 mice was determined by subtracting the mean CFU/spleen recovered from mice after 6 weeks of vaccination and challenged with 2308 from the mean CFU/spleen recovered from non-vaccinated but challenged control mice (PBS). At this time, mice immunized with *B. abortus* S19, RB51 and $\Delta wbkC$ S2308 mutant strain had

significantly ($P < 0.05$) fewer splenic *Brucella* than non-immunized animals (Table 2). However, *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 mutant strain conferred no significant protection compared to the control group. This is probably due to the fact that this mutant came from the parental strain S19 that is already attenuated, so the rough LPS introduced an additional attenuation, inhibiting sufficient bacterial growth to induce protective immunity. The protection tested in IRF-1 KO mice was carried out following the same protocol as for C57BL/6 mice, but instead of counting CFU in mouse spleens, the survival of the animals was observed during 30 days post-challenge. Therefore, *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 mutant showed lower level of protection (60% survival) against virulent challenge in IRF-1 KO mice and the $\Delta wbkC$ S2308 mutant (80% survival) showed similar level of protection as the vaccine strains S19 and RB51 (Figure 7).

4. Discussion

B. abortus is the causative agent of human and animal brucellosis, and many research groups around the world have been dedicating their efforts in isolation, identification and characterization of new antigens and virulence factors. Early observations that rough *B. abortus* strains are attenuated and do not agglutinate with antibody elicited by smooth bacteria led to the concept of *Brucella* rough vaccine [15] avoiding the problem of serological interference presented by smooth strain vaccines. Therefore, all efforts have been focused on searching better live rough attenuated vaccine that could be able of inducing an efficient cellular immunity and protection [8, 15].

In a tentative of developing a *B. abortus* rough vaccine strain, the *wbkC* gene was chosen to be disrupted in our study. Two $\Delta wbkC$ mutants were generated by gene

replacement using double-recombination strategy and they were termed *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 and $\Delta wbkC$ S19. *WbkC* gene disruption, confirmed by Southern blot, resulted in rough mutant strains. Lack of LPS O-side chain was also confirmed by crystal violet staining and immunoblotting assays. Earlier study by Godfroid *et al* [7] has also shown that *wbkC* is required for the O-side chain production in *B. melitensis* 16 M strain. Further, by mass spectrometry analysis we could verify that *wbkC* gene mutation did not interfere in lipid A biosynthesis in *B. abortus* (data not shown).

To evaluate the persistence of the mutants, *in vivo* assays were performed in C57BL/6 and IRF-1 knockout mice. The mutant strains were cleared faster than the parental strains in C57BL/6 mice even though the dose used for the rough mutants was 100 times higher. Three weeks after infection, the mutant strains had already been cleared in C57BL/6 mice. The $\Delta wbkC$ mutants showed reduced persistence when compared to the rough vaccine strain *B. abortus* RB51 which was completely cleared within 6 weeks post-infection. At that time, the parental smooth strains still had more than 3 log of CFU. Ko *et al.* [22] have previously demonstrated that IRF-1 KO mice are an important tool to determine the level of *Brucella* virulence and to evaluate *Brucella* mutants for attenuation. They reported that survival of IRF-1 KO mice can be correlated to virulence of *Brucella* strains, the criteria of *Brucella* virulence among several strains can be based on the rapidity of death in IRF-1 KO mice. Therefore, we have compared the virulence of our $\Delta wbkC$ mutants with the virulent strain *B. abortus* S2308 and the vaccine strains *B. abortus* S19 and RB51 in IRF-1 KO mice. $\Delta wbkC$ mutants showed the same reduced virulence as *B. abortus* RB51 and a lower virulence when compared to *B. abortus* S19 and S2308. All mice infected with the $\Delta wbkC$ mutants survived after infection, in contrast no animals

infected with *B. abortus* S2308 survived after 16 days. In general, strains containing alterations in LPS are less virulent when compared to the wild type strain, except *Brucella ovis* and *Brucella canis* that are naturally rough virulent bacteria [23].

Brucella can infect macrophages and entry in these cells is essential for bacterial replication and survival in animals. Changes in the LPS structure can interfere with bacterial entry into host cells and some authors described that smooth LPS is an essential virulence factor for intracellular survival [24]. The rough strain *B. abortus* RB51 has a low persistence *in vivo* and cannot replicate as the smooth parental strain inside macrophages [11]. However, it has been shown that genetically characterized rough mutants have not lost their ability to replicate intracellularly even without the entire antigen-O structure [25]. Our experiments with bone marrow-derived macrophages demonstrate that $\Delta wbkC$ mutants showed a reduced rate of replication inside these cells. Additionally, as observed with *B. abortus* RB51 strain, $\Delta wbkC$ mutants remained in LAMP-1-positive compartments and were eventually eliminated. This is consistent with previous reports showing that the vaccine strain *B. abortus* RB51 had a low persistence *in vivo* and cannot replicate inside macrophages [25]. As reported before, the smooth LPS and consequently its antigen-O, are important for entry and early stages of BCV development. The LPS O-side chain is involved in the inhibition of early fusion events between *Brucella suis*-containing vacuoles and lysosomes in murine macrophages [2]. Also, $\Delta wbkC$ mutants had the same intracellular fate observed for the $\Delta virB$ mutant. The *Brucella* type IV secretion system has also been shown to be required for late maturation events necessary for the biogenesis of an ER-derived replicative organelle in BMDM [4].

The presence of the O-side chain on LPS structure has also been reported to influence pro-inflammatory cytokine production [26]. These authors have shown that rough *Brucella* strains induce higher production of pro-inflammatory cytokines than smooth strains. IL-12 is involved in the development of Th1 responses, which in vivo are critical for the elimination of *Brucella* [27]. Higher IL-12 and TNF- α production by BMDM infected with $\Delta wbkC$ rough mutants might be one of the reasons for their faster elimination by infected cells when compared to parental smooth strains.

Ko et al [22] also showed that utilization of a high dose of the rough vaccine strain *B. abortus* RB51 (5×10^7 CFU) elicited a higher level of protection against *B. abortus* 2308 challenge when compared to lower doses. So, we used 1×10^8 CFU dose for the rough strains in the protection experiments using C57BL/6 mice. These results showed that *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 conferred similar protection as the currently used rough vaccine RB51, but both induced lower protection compared to the smooth vaccine strain *B. abortus* S19.

As previously demonstrated [22] IRF-1 KO mice maintain an adaptive immunological memory necessary for protection, that is dependent on the level of bacteria virulence and dose of immunization. Therefore, we performed the protection experiment in IRF-1 KO mice and the *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 mutant could prevent death of 80% of challenged mice, inducing similar protection as *B. abortus* RB51 or *B. abortus* S19. However, the *B. abortus* $\Delta wbkC$ S19 mutant showed no protection in C57BL/6 mice and low protection in IRF-1 KO mice.

As a conclusion, we can assume that *wbkC* gene is required for LPS O-side chain biosynthesis and virulence of *Brucella abortus*. Further, the $\Delta wbkC$ mutants behave

intracellularly as most rough *Brucella* mutants. The *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 mutant generated in this study showed similar protection as the current available rough vaccine *B. abortus* RB51, having the advantage of not being rifampicin resistant and the identity of the attenuation is known, which is still not completely known for RB51. Although *B. abortus* $\Delta wbkC$ 2308 mutant does not confer the same level of protection when compared to the smooth vaccine strain *B. abortus* S19, it has the advantage of not interfering with serological diagnosis of infected animals. However, due to this moderate protection efficacy the $\Delta wbkC$ 2308 has to be further evaluated.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq, MAPA/CNPq, FAPEMIG, PNPd/CAPES and INCT/Vacinas.

References

- [1] Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases* 1997;3(2):213-21.
- [2] Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and Immunity* 2003;71(3):1481-90.
- [3] Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity* 1998;66(12):5711-24.

- [4] Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of Experimental Medicine* 2003;198(4):545-56.
- [5] Sathiyaseelan J, Goenka R, Parent M, Benson RM, Murphy EA, Fernandes DM, et al. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cellular Immunology* 2006;243(1):1-9.
- [6] Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, Howard JC, et al. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular Microbiology* 2006;8(3):401-13.
- [7] Godfroid F, Cloeckaert A, Taminiou B, Danese I, Tibor A, de Bolle X, et al. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (wbk). *Research in Microbiology* 2000;151(8):655-68.
- [8] Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. 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. *Infection and Immunity* 2000;68(7):3927-32.
- [9] Smith LD, Ficht TA. Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reviews in Microbiology* 1990;17(3):209-30.
- [10] Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamon MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infection and Immunity* 2003;71(11):6264-9.
- [11] Schurig GG, Roop RM, 2nd, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* 1991;28(2):171-88.

- [12] Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 2002;90(1-4):479-96.
- [13] Ariza J. Brucellosis: an update. The perspective from the mediterranean basin. *Reviews in Medical Microbiology* 1999;10.
- [14] Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Palmer MV, Florance AM. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *American Journal of Veterinary Research* 1996;57(8):1153-6.
- [15] Monreal D, Grillo MJ, Gonzalez D, Marin CM, De Miguel MJ, Lopez-Goni I, et al. 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. *Infection and Immunity* 2003;71(6):3261-71.
- [16] Halling SM, Detilleux PG, Tatum FM, Judge BA, Mayfield JE. Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infection and Immunity* 1991;59(11):3863-8.
- [17] Miyoshi A, Rosinha GM, Camargo IL, Trant CM, Cardoso FC, Azevedo V, et al. The role of the vacB gene in the pathogenesis of *Brucella abortus*. *Microbes and Infection* 2007;9(3):375-81.
- [18] White PG, Wilson JB. Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of *Brucellae*. *Journal of Bacteriology* 1951;61(2):239-40.
- [19] Cloeckaert A, Jacques I, de Wergifosse P, Dubray G, Limet JN. Protection against *Brucella melitensis* or *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella* A and M smooth lipopolysaccharides. *Infection and Immunity* 1992;60(1):312-5.

- [20] Macedo GC, Magnani DM, Carvalho NB, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *Journal of Immunology* 2008;180(2):1080-7.
- [21] Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and Immunity* 2001;69(3):1477-82.
- [22] Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, Ficht TA, Splitter GA. Virulence criteria for *Brucella abortus* strains as determined by interferon regulatory factor 1-deficient mice. *Infection and Immunity* 2002;70(12):7004-12.
- [23] Godfroid F, Taminiau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, et al. 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. *Infection and Immunity* 1998;66(11):5485-93.
- [24] Gonzalez D, Grillo MJ, De Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PloS One* 2008;3(7):e2760.
- [25] Allen CA, Adams LG, Ficht TA. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infection and Immunity* 1998;66(3):1008-16.
- [26] Jimenez de Bagues MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infection and Immunity* 2004;72(4):2429-33.

[27] Zhan Y, Cheers C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity* 1993;61(11):4899-901.

Tables

Table 1. Bacterial strains and vectors used in this study

Strain or plasmid	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> Top 10 F	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Brucella</i> strains		
<i>B. abortus</i> S2308	Wild-type, smooth, virulent	Laboratory stock
<i>B. abortus</i> S19	Vaccine strain, smooth	Laboratory stock
<i>B. abortus</i> RB51	Rif ^r , rough mutant of S2308	Laboratory stock
<i>B. abortus virB9</i> ⁻	Mutation in type IV secretion system	Celli et al. [4]
<i>B. abortus</i> Δ <i>wbkC</i>	Kan ^r Δ <i>wbkC</i> mutant of S2308	This study
Plasmids		
pUC4K	ColE1, Amp ^r Kan ^r	GE Healthcare
pBluescript II KS (+)	ColE1, Amp ^r	Stratagene
pBlue:wbkC-Kan	Amp ^r - Kan ^r , contains <i>wbkC::Kan^r</i>	This study

Kan^r – kanamycin resistance; Amp^r – ampicillin resistance;

Table.2 Protective immunity induced by immunization with the mutant strains *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 and $\Delta wbkC$ S19 in C57BL/6 mice.

Vaccine	Log ₁₀ CFU of <i>B. abortus</i> S2308 in spleen (mean \pm SD) ^a	Log ₁₀ units of protection
PBS control	6.14 \pm 0.14	
<i>B. abortus</i> S19	4.45 \pm 0.50	1.70 ^b
<i>B. abortus</i> RB51	5.31 \pm 0.35	0.84 ^b
<i>B. abortus</i> $\Delta wbkC$ 2308	5.57 \pm 0.48	0.58 ^b
<i>B. abortus</i> $\Delta wbkC$ S19	5.90 \pm 0.35	0.24

^a Mice were immunized with PBS, 10⁵ CFU of *B. abortus* S19 or 10⁸ CFU of the other strains. Six weeks later were challenged i.p with 10⁶ CFU of *B. abortus* 2308 and spleen CFU was enumerated 2 weeks after challenge.

^b Significantly different compared to the PBS control group ($P \leq 0.05$).

Figure Legends

Figure 1. Molecular characterization of *Brucella abortus* $\Delta wbkC2308$ and $\Delta wbkCS19$ mutant strains. Southern blot analysis of $\Delta wbkC$ strains was performed. Genomic DNA of *B. abortus* 2308 (1), S19 (2) *wbkC2308* (3), *wbkCS19* (4) and strain where a single recombinant event took place (5) were restriction endonuclease digested and probed with the *kanamycin* (I), *wbkC* (II) and *ampicillin* (III) genes.

Figure 2. Characterization of LPS morphology by Western blot. Western blot analysis using mAbs O4F9 (IgG 2a) for smooth LPS (A), or mAbs A68/24 D08/609 (IgG1) for rough LPS (B) was performed. (A) Only *B. abortus* S2308 and *B. abortus* S19 had positive results for anti-smooth LPS mAb. *B. abortus wbkC2308*, *wbkCS19* and RB51 were negative for this antibody reaction. (B) *B. abortus* S2308 and *B. abortus* S19 had the typical high molecular ladder-like pattern and all rough strains presented only low molecular ladder-like pattern.

Figure 3. Persistence of *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 and $\Delta wbkC$ S19 mutant strains in C57BL/6 mice. Eight mice of each group were infected i.p. with a dose of 10^6 CFU of smooth strains (S2308 and S19) and 10^8 CFU of rough strains ($\Delta wbkC$ S2308, $\Delta wbkC$ S19 and RB51). Spleens were removed 1, 2, 3 and 6 weeks after infection and the CFU number was determined by serial dilutions and plating. The values correspond to means \pm standard deviations. The asterisks indicate statistically significant differences between the results obtained for the groups that received the parental strains and the results obtained for the groups that received the mutant strains ($P \leq 0.001$).

Figure 4. Virulence of *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 and $\Delta wbkC$ S19 in IRF-1 KO mice.

Eight mice for each group were infected with 1×10^6 CFU of the smooth strains (S2308 and S19) and 1×10^8 of the rough strains ($\Delta wbkC$ S2308, $\Delta wbkC$ S19 and RB51). Mice survival was observed during 30 days after infection.

Figure 5. BMDM infection with $\Delta wbkC$ S2308 and $\Delta wbkC$ S19 mutants and pro-inflammatory cytokine production.

BMDMs infected (MOI:50) with *B. abortus* 2308 or $\Delta wbkC2308$ mutant (A) and *B. abortus* S19 or $\Delta wbkCS19$ mutant (B) were lysed and intracellular CFUs enumerated at different times after inoculation. In both graphs, data are presented as relative fold increase over 2-hour data. All CFU/ml (colony forming units) values were divided by the corresponding two-hour data. Analysis of IL-12 (C) and TNF- α (D) secretion was measured by ELISA from the supernatant of macrophages at 24 and 48 hours after infection. (*) Significantly different compared to parental strains ($p < 0.01$).

Figure 6. Intracellular localization of *B. abortus* $\Delta wbkC$ mutants and parental strains in BMDM.

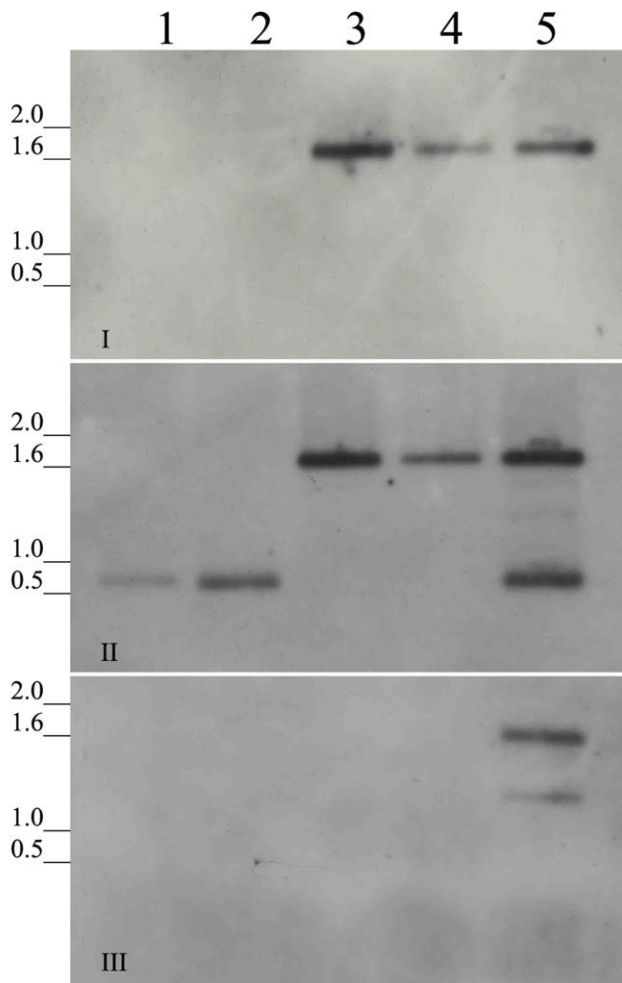
Macrophages infected with *B. abortus* 2308, *B. abortus* S19, $\Delta wbkC$ S2308 mutant, $\Delta wbkC$ S19 mutant, RB51 or $\Delta virB9$. (A) Quantification of the percentage of bacteria BCVs that contain LAMP-1 by confocal immunofluorescence microscopy. The difference between wild type and mutant were statistically significant at 24 hours ($p < 0.001$). Data are means from three different experiments. (B) Representative confocal images of BMDM 24 hours post-infection with wild type *B. abortus* 2308, S19, RB51, or $\Delta wbkC$ mutants. *B. abortus* is labelled in red and LAMP-1 in green. Scale bars are 5 μ m.

Figure 7. Protection induced by *B. abortus* $\Delta wbkC$ S2308 or $\Delta wbkC$ S19 immunization in IRF-1 KO mice . Mouse groups were immunized i.p with 10^8 CFU of the $\Delta wbkC$ mutants and the vaccine strain RB51 and with 1×10^5 of the vaccine strain S19. The control group received 100 μ L of PBS i.p. Six weeks after immunization mice were challenged with 1×10^6 CFU of *B. abortus* S2308 virulent strain. Mice survival was observed during 30 days after infection.

Figures

Vaccine - Lacerda, T.L.S.

Figure 1



Vaccine - Lacerda, T.L.S.

Figure 2

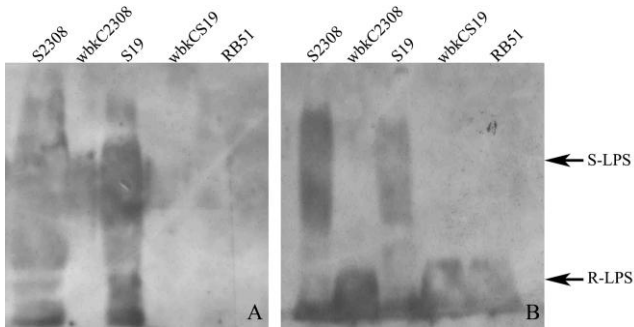


Figure 3

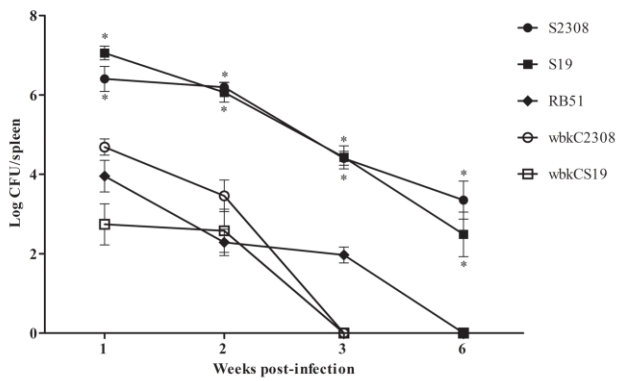
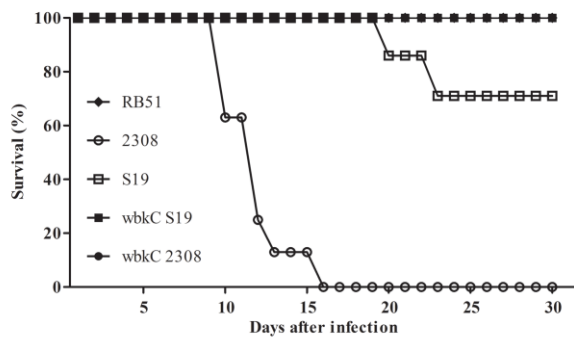
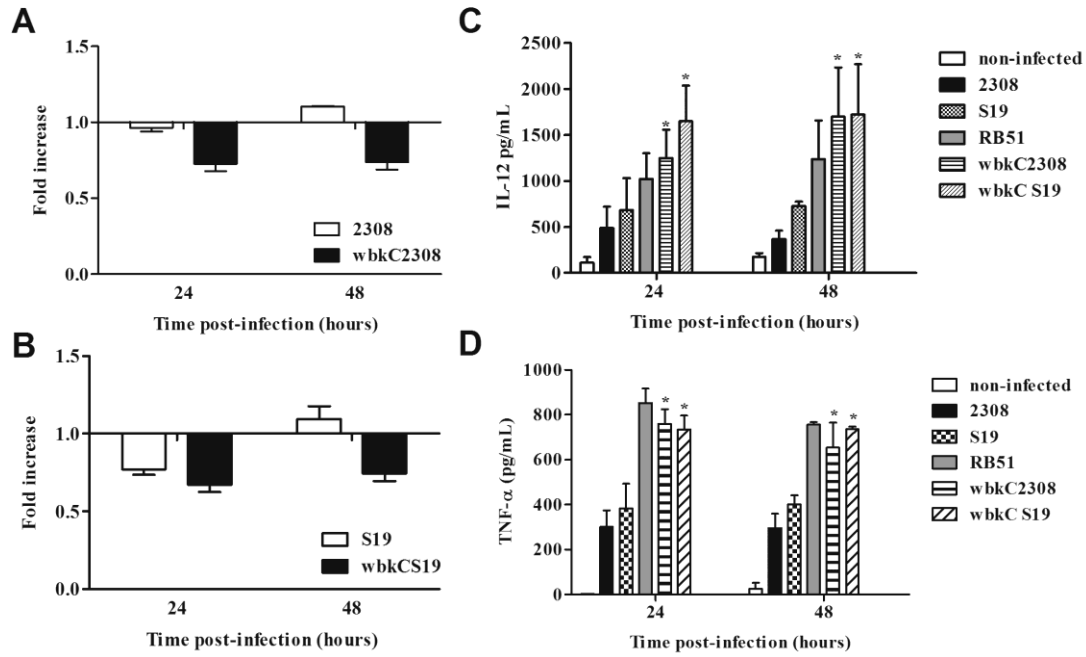


Figure 4

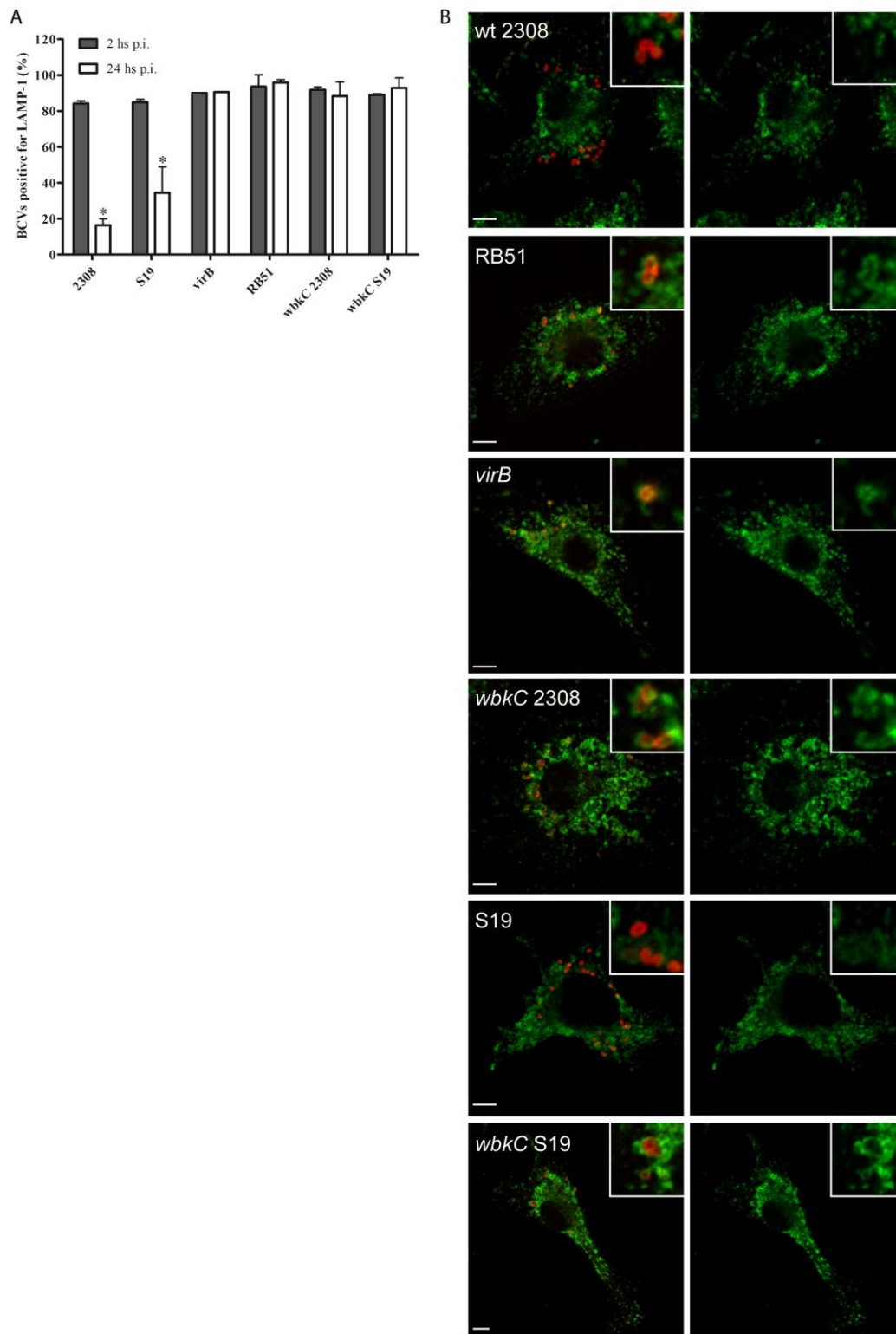


Vaccine - Lacerda, T.L.S.

Figure 5



Vaccine - Lacerda, T.L.S.

Figure 6

Vaccine -Lacerda, T.L.S.

Figure 7

