

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINAS  
CONTRA *Brucella abortus***

**Renata Ribeiro Bastos Pereira**

**CAMPO GRANDE, MS**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE VACINAS  
CONTRA *Brucella abortus***

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF VACCINES AGAINST  
*Brucella abortus***

**Renata Ribeiro Bastos Pereira**

**Orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Grácia Maria Soares Rosinha**

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

**CAMPO GRANDE, MS 2016**

Certificado de aprovação

**RENATA RIBEIRO BASTOS PEREIRA**

**Desenvolvimento e avaliação de vacinas contra *Brucella abortus***

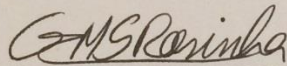
**Development and evaluation of vaccines against *Brucella abortus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

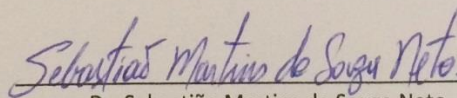
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 29/02/2016

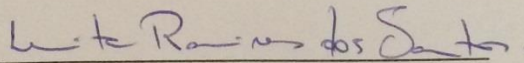
BANCA EXAMINADORA:



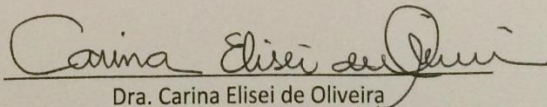
Dra. Grácia Maria Soares Rosinha  
(EMBRAPA CNPGC) – (Coorientadora)



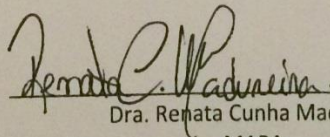
Dr. Sebastião Martins de Souza Neto  
UFGD



Dra. Lenita Ramires dos Santos  
EMBRAPA CNPGC



Dra. Carina Elisei de Oliveira  
UCDB



Dra. Renata Cunha Madureira  
MAPA

*Aos meus pais, fonte de toda força e vontade que carrego comigo ao despertar de cada manhã, pelo encorajamento, compreensão, amor, pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história e pelo apoio ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho...*

*E especialmente, a cada animal envolvido  
neste estudo, que com suas vidas,  
contribuíram muito mais do que eu para a  
realização deste trabalho... Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

O meu sincero agradecimento a Deus pela dádiva da vida, pelos ensinamentos através dos momentos difíceis e pelos muitos momentos de alegria.

À toda minha família. Principalmente aos meus pais **Renato** e **Jupira**, pelo amor incondicional, pela eterna amizade e pela dedicação, sempre torcendo e incentivando, por jamais medirem esforços para a realização dos meus sonhos e por serem um exemplo de vida para mim. À minha mãe pelo carinho e ao meu pai pela compreensão e conselhos para toda vida. A minha irmã pelo companheirismo, amizade e pela alegria de sempre. Vocês fizeram de mim uma pessoa melhor. Aos meus avós, pela oração. A todos que sempre acreditaram em mim. Obrigada. Amo vocês!!!

Aos meus orientadores, **Dr. Cleber Soares** e **Dra. Grácia Rosinha** pelo apoio, ensino, orientação e confiança depositada em mim. Muito obrigada!

Pesquisadora **Dra. Lenita Santos**, pelo apoio e pelas importantes recomendações e conselhos, auxiliando em várias etapas do trabalho.

Ao Dr. **Cleber Galvão**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, e a todos os pesquisadores que contribuíram, e continuam contribuindo, com este estudo.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - e a Fundect - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - pelo apoio financeiro.

A coordenação e aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS.

A todos os colegas e amigos de longas datas, e o atuais, do Laboratório de Engenharia Genética Animal, pela convivência que tornam a nossa caminhada menos árdua, pelo suporte afetivo e intelectual e por estarem sempre presentes, tornando mais fácil cada dia de trabalho.

Aos amigos da Sanidade Animal, por fazerem parte desta caminhada, e também por serem uma porta sempre aberta em seus laboratórios, quando uma ajuda foi necessária, tornando cada dia de trabalho mais especial.

A todas as pessoas colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos os meus Amigos e Familiares que sempre estiveram presentes, dando força, apoio e muitas alegrias a cada dia que se passou durante o meu doutorado, e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

*"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo o mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."*

Chico Xavier

## Resumo

BASTOS, R. Desenvolvimento e avaliação de vacinas contra *Brucella abortus*. 2016. 74 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

A Brucelose bovina é uma zoonose causada por uma bactéria gram-negativa, intracelular-facultativa que sobrevive e multiplica-se dentro de macrófagos, denominada *Brucella abortus*, responsável por ocasionar perdas reprodutivas em animais domésticos e febre ondulante em humanos. A imunoprofilaxia certificada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento são as vacinas B19 e RB51, manipuladas a partir de amostras atenuadas de *B. abortus*, que são obrigatórias para bovinos. As vacinas comerciais disponíveis contra *B. abortus* apresentam algumas limitações como: conferir infecção persistente que pode provocar aborto nas fêmeas gestantes vacinadas, ser patogênica para os seres humanos e possuir custo elevado de produção. Além disso, a amostra B19 produz anticorpos que interferem no diagnóstico para diferenciação de populações infectadas naturalmente e vacinadas. O desenvolvimento de vacinas de DNA e subunidade são uma alternativas bastante promissoras como alternativa as vacinas clássicas, pois além de conferirem resposta imune humoral e celular é também de baixo custo e fácil manipulação. Assim, o objetivo neste estudo foi desenvolver vacinas de DNA e subunidade contra *B. abortus*, testá-las em camundongos BALB/c para avaliar a produção de anticorpos específicos e níveis de proteção conferida aos animais testados. Os genes *virB9* e *virB12*, os quais são essenciais para sobrevivência e multiplicação de *Brucella* spp., foram usados como alvo da construção das vacinas de DNA e subunidade. Para isto, os genes *virB9* e *virB12*, que produzem proteínas potencialmente antigênicas, foram amplificados pela técnica de PCR e clonados, separadamente, nos plasmídeos pET47b e pcDNA3.1+ para produção das proteínas recombinantes *in vitro* e expressão *in vivo*, respectivamente. Grupos de cinco camundongos da linhagem BALB/c receberam três doses dos candidatos vacinais e associações (pcDNAvirB9, pcDNAvirB9+VirB9r, pcDNAvirB12 e pcDNAvirB12+VirB12r e, separadamente, VirB9r e VirB12r), acompanhados das doses controle (pcDNA3.1(+), Montanide, B19 e PBS). O estudo de proteção foi avaliado após o desafio com a amostra de *B. abortus* S2308. A detecção de IgG específico no soro dos camundongos imunizados, bem como suas subclasses IgG1 e IgG2a, foram avaliadas por ELISA indireto. Os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 foram determinados por ELISA de captura a partir dos sobrenadantes de culturas de esplenócitos, estimulados com VirB9r e VirB12r, separadamente. Os candidatos a imunógenos pcDNAvirB9, pcDNAvirB9-VirB9r e pcDNAvirB12-VirB12r, VirB9 e VirB12 induziram a produção de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a em níveis significativos ( $p < 0,05$ ). A resposta imune induzida pela formulação vacinal VirB9r foi capaz de proteger camundongos após o desafio com *B. abortus* virulenta S2308. Essa formulação pode ser promissora contra a brucelose em bovinos.

**Palavras-chave:** Brucelose bovina, *Brucella abortus*, vacina de DNA, proteína recombinante, ELISA.



## Abstract

BASTOS, R. Development and evaluation of vaccines against *Brucella abortus*. 2016. 74 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

The bovine Brucellosis is a zoonosis caused by facultative intracellular Gram-negative bacterial that survive and multiply within macrophages, called *Brucella abortus*, responsible for causing late-term abortions, stillbirths and birth of weak calves of domestic animals and undulant fever in humans. The immunoprophylaxis certified by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply are the B19 and RB51 vaccine, manipulated from attenuated strains of *B. abortus*, which are suitable for cattle. Currently available commercial vaccines against *B. abortus* present some limitations as to confer a persistent infection that can cause abortion in pregnant animals vaccinated and be pathogenic to humans and possess high production cost. Furthermore, sample B19 produce antibodies that interfere with the diagnostic for the differentiation of vaccinated and naturally infected populations. The development of a DNA and subunit vaccines are a considerable alternatives because besides conferring humoral immune response and cell is also inexpensive and easy handling. The objective of this study was development and evaluation of DNA and subunit vaccines against *B. abortus*, test them in BALB / c mice, to evaluate the production of specific antibodies and levels of protection given to test animals. The candidate immunogens *virB9* and *virB12*, which are essential for survival and proliferation of *Brucella spp.*, Were used as a target of construction of DNA and subunit vaccines. For this, the *virB9* and *virB12* genes which produce potentially antigenic proteins were amplified by PCR and cloned, separately, in pET47b and pcDNA3.1 + recombinant plasmids for production of *in vitro* and *in vivo* protein expression, respectively. Groups of five mice of BALB/c received three doses of the candidate immunogens and associations (pcDNAvirB9, pcDNAvirB9 + VirB9r, pcDNAvirB12 and pcDNAvirB12 + VirB12r and separately VirB9r and VirB12r), accompanied by the dose control (pcDNA3.1 (+), Montanide, B19 and PBS). The protection study was evaluated after challenge with sample *B. abortus* S2308. The specific detection of IgG in the serum of immunized mice as well as their isotypes IgG1 and IgG2a were measured by ELISA. The levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 were determined by capture ELISA from the supernatants of splenocyte cultures stimulated with VirB9r and VirB12r separately. The detection of specific IgG in the serum of immunized mice, as well as their isotypes IgG1 and IgG2a were measured by ELISA. IFN- $\gamma$  and IL-10 were determined by capture ELISA from the supernatants of splenocyte cultures stimulated with VirB9r and VirB12r, separately. The candidate immunogens pcDNAvirB9, pcDNAvirB9-VirB9r and pcDNAvirB12-

VirB12r, and VirB9 VirB12 induced IgG production and their isotypes IgG1 and IgG2a levels and achieved significant ( $p < 0.05$ ). The immune responses induced by the vaccine formulations VirB9r were able to protect mice after challenge with virulent *B. abortus* S2308. These formulations may be promising against brucellosis in cattle.

**Keywords:** bovine brucellosis, *Brucella abortus*, DNA vaccine, recombinant protein, ELISA.

## Lista de abreviaturas e siglas

% - por cento

°C – graus Celsius

μL – microlitro

ng – nanograma

nm – nanômetro

APC's – células apresentadoras de antígeno

CEUA – comissão de Ética no Uso de Animais

ConA – Conavalina A

CTL – linfócito T Citotóxico

DEPC – pirocarbonato de dietila

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNase – desoxirribonuclease

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

DO – densidade óptica

DP – Desvio Padrão

ELISA - ensaio de imunoadsorção enzimático

Et al. – e colaboradores

GHRH – fator de liberação do hormônio de crescimento

IFN-γ – interferon gama

IHNV – vírus da necrose hematopoiética infecciosa

IL – interleucina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHNV – vírus da necrose hematopoiética infecciosa

IN – Instrução Normativa

IgG – imunoglobulina

IPTG - isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

LB – Luria-Bertani

Log – Logarítmo

LPS – lipopolissacarídeo

MHC – Complexo de Histocompatibilidade

NIAID – Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas

NK – Natural Killer

OIE – Organização Mundial de Saúde

OPD – o-fenilenediamina

pb – pares de base

PBS – tampão salina fosfato

PBST – tampão salina fosfato contendo tween

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

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

RE – retículo endoplasmático

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – transcrição reversa, seguida de uma reação em cadeia da polimerase

SDS – duodecil sulfato de sódio

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

T CD4 – linfócito T auxiliar

T CD8 – linfócito T citotóxico

TSA – Tryptic Soy Agar

TSB – Tryptic Soy Broth

UFC – unidades formadoras de colônia

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

WNV – vírus do Nilo Ocidental

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1 O gênero <i>Brucella</i> .....	6
2.2 Patogenia .....	7
2.3 Epidemiologia.....	9
2.4 Diagnóstico.....	10
2.5 Resposta imunológica contra <i>B. abortus</i> .....	11
2.5.1 Resposta imune inata .....	11
2.5.2 Resposta imune adaptativa .....	12
2.6 Vacinas atuais brucelose bovina e estudos em vacinas de DNA.....	14
Referências .....	17
Artigos .....	28
Desenvolvimento e avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas de DNA contra brucellose bovina.....	29
Imunogenicidade e proteção de VirB9r e VirB12r recombinantes de <i>Brucella abortus</i> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a brucelose bovina foi descrita em 1914, quando Danton Seixas diagnosticou clinicamente a doença no Rio Grande do Sul. Porém o primeiro estudo, com base em resultados de pesquisas epidemiológicas e exames microscópicos de culturas obtidas de fetos abortados, foi feito por Tineciro Icibaci em 1922, que descreveu um foco de brucelose bovina em São Carlos – SP (BRASIL,1988).

A brucelose bovina é uma zoonose bacteriana de evolução crônica, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, causada por bactéria intracelular facultativa do gênero *Brucella*, cujo principal agente etiológico é *Brucella abortus*. Bactérias do gênero *Brucella* são consideradas agentes de bioterrorismo agrícola, civil e militar, uma vez que a mesma é uma ameaça à oferta de alimentos por causar doenças crônica e debilitante em humanos (HALLING et al., 2005).

A brucelose é uma doença de importância mundial, com exceção do Japão, Austrália, Canadá e vários países da Europa, onde a doença foi erradicada (MONTEIRO, 2004). A duração da doença e o longo período de convalescência torna a brucelose humana importante economicamente, assim como um problema médico para o paciente que fica afastado de suas atividades rotineiras (CORBEL, 2006). Nos animais compromete, sobretudo, os sistemas reprodutivo e ósteo-articular. Nas fêmeas, *B. abortus* acomete principalmente órgãos reprodutivos, ocasionando aborto no terço final da gestação, infertilidade temporária ou parto de fetos prematuros e fracos (YOUNG, 1983; YOUNG, 1988). Em touros, esta bactéria pode provocar orquite (PLANT et al., 1976).

Além de ser uma zoonose, é também um fator limitante para o crescimento dos rebanhos bovinos, limitando a oferta de alimentos e causando grandes prejuízos econômicos em muitos países e, por isso, possui importância sócio econômica e/ou de saúde pública em países cujo comércio internacional de animais e produtos de origem animal é significativo (OIE, 2005).

O Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo, com 212 milhões de bovinos e com abate de 42,07 milhões de cabeças ao ano, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (ABIEC, 2014). As perdas econômicas por conta da brucelose estão relacionadas com a ocorrência de abortos, natimortos, subfertilidade, descartes involuntários, mortalidade, intervenções veterinárias, diminuição da produção de leite e de carne (SANTOS et al., 2013), além de gerar barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal e perdas na indústria com a condenação da carne e leite e desvalorização desses produtos (JARDIM et al., 2006). Um trabalho realizado por Santos et al. (2013), demonstrou que o prejuízo total da brucelose no Brasil é de, aproximadamente, R\$ 892 milhões, e as perdas por fêmea infectada com idade superior a 24 meses, foi estimada em R\$ 420,12 e R\$ 226,47 em rebanhos de corte e leite, respectivamente.

As vacinas recomendadas pela Organização Mundial de Epizotias (OIE) nos programas de controle da brucelose são as vacinas vivas atenuadas B19 e RB51, ambas são boas indutoras de imunidade celular (BRASIL, 2005).

Reconhecendo a brucelose como um importante problema de saúde animal e saúde pública, em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), e adotou a vacina B19 para a imunização em massa de vacas entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2006). No ano de 2007 foi aprovada a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA nº 13 (28/08/2007) que regulamentou o uso da vacina RB51 restringindo sua administração para fêmeas, que não foram vacinadas com a amostra B19, e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (BRASIL, 2007), definindo estratégias para o controle da doença no país. Este programa tem o intuito de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos dessas doenças e criar um número significativo de propriedades certificadas como livres ou monitoradas para a brucelose e tuberculose, e desta forma reduzir o impacto destas zoonoses na saúde animal e humana, além de aumentar a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).



Tais vacinas, no entanto, apresentam um conjunto de desvantagens em relação ao seu uso, além de apresentar limitações para uso veterinário (BERKELMAN, 2003) e não serem seguras para o uso humano (PERKINS et al., 2010). A vacina viva atenuada *B. abortus* B19 é um elemento essencial nos programas de controle da brucelose bovina em diversas partes do mundo. Porém, esta vacina apresenta desvantagens como ser patogênica para humanos; pode causar aborto quando administradas a fêmeas prenhas e induz a produção de anticorpos que interferem no teste de diagnóstico de populações infectadas a campo (CHEVILLE et al., 1993).

Por não haver vacina para humanos contra o agente causador da brucelose, a vacinação dos animais é uma das medidas mais adequadas para preservar a saúde humana em regiões endêmicas (ZINSSTAG et al., 2007).

Além da eficácia vacinal, busca-se uma vacina que seja segura aos manipuladores e, principalmente, que seu uso não interfira nos testes de diagnósticos utilizados nos atuais programas de controle. Dentre as possibilidades de novas vacinas estão: vacinas de subunidades, a expressão de um antígeno protetor sobre uma cepa vacinal de *Brucella* menos virulenta (VEMULAPALLI et al., 2000; OÑATE et al., 2003) e vacinas de DNA (OÑATE et al., 1999).

As vacinas de subunidade recombinante são produzidas a partir do gene de interesse. Geralmente são proteínas antigênicas que podem ser encontradas na membrana do patógeno ou serem secretadas. Quando administrada no hospedeiro, a vacina de subunidade torna-se um antígeno exógeno. A resposta imune inicia-se a partir da endocitose desse antígeno, por células apresentadoras de antígenos (APC's), que é complexado com moléculas do complexo de histocompatibilidade II (MHC de classe II) e apresentado na superfície das APC's para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4 auxiliares (KOWALCZYK & ERTL, 2003; NAGATA et al., 2004).

Diferentes estudos têm avaliado as estruturas da superfície e os antígenos de *Brucella* como potenciais imunógenos, para projetar vacinas de

subunidade contra a brucelose. Testes com a proteína ribossomal L7 / L12 (OLIVEIRA & SPLITTER, 1996), proteínas Cobb e AsnC (FU, et al., 2012), proteínas de membrana externa Omp16 (PASQUEVICH et al., 2009), Omp28 (LIM et al., 2012) e Omp19, induziram resposta de memória do tipo Th1 e apresentaram proteção contra o parasita desafiado (CORIA et al., 2016). Outra proteína recombinante que gerou resultados favoráveis é a proteína de resistência a hidróperóxido orgânico (Ohr). Quando usada como imunógeno essa proteína foi capaz de induzir tanto a imunidade humoral e mediada por células em camundongos (HOP, et al., 2016). Este trabalho sugere que as vacinas de subunidade podem ser potenciais candidatos a vacina para a brucelose animal.

Outra estratégia para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz é a imunização com plasmídeos que codificam antígenos protetores, podendo gerar uma resposta imune humoral e celular (JAIN et al., 2014).

As vacinas de DNA oferecem uma série de vantagens quando comparadas às vacinas clássicas, em termos econômicos e técnicos, dentre as quais estão: simplicidade de produção, baixo custo, segurança e reprodutibilidade lote-a-lote. O controle de qualidade é mais fácil, a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente e podem ser liofilizadas. Estes fatores facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso, o que seria interessante para a realidade brasileira e de outros países em desenvolvimento (GLENTING; WESSLES, 2005; KANO et al., 2007).

Com as vacinas de DNA é possível explorar o uso de diferentes formas de administração, a incorporação de genes codificando citocinas e o desenvolvimento de vacinas multivalentes (SHARMA; KHULLER 2001). Além disso, o uso de vacinas de DNA torna possível a discriminação entre animais vacinados e animais infectados a campo, aumentando a eficácia dos programas de erradicação de doenças animais, característica desejável para o controle da brucelose bovina, como previsto pelo PNCEBT.

Até o presente momento, três vacinas de DNA foram licenciadas, sendo elas: uma vacina para o vírus do Nilo Ocidental (MNV) em cavalos (MARTIN et al., 2007); uma vacina para evitar o vírus da necrose hematopoiética infecciosa em salmão do Atlântico, criados em cativeiro (ACOSTA et al., 2006; PURCELL et al., 2006); uma vacina imunoterapêutica para o melanoma maligno em cães (LIAO et al., 2006). O quarto plasmídeo de DNA licenciado não é uma vacina, mas codifica o fator de liberação do hormônio de crescimento (GHRH para porcas reprodutoras, que auxilia no aumento de leitões vivos e com maior peso ao nascimento (KHAN, 2010)

Um número limitado de genes de *B. abortus* tem sido explorado visando o uso de DNA para o desenvolvimento de métodos imunoproliféricos contra brucelose bovina como, por exemplo, os genes *L7/L12*, que codificam proteínas ribossômicas, o gene *gdpH*, que codifica uma proteína reativa com células T e B e genes para enzima dismutase Cu-Zn super-óxido (KURAR; SPLITTER 1997; LUO et al., 2006; HU et al., 2009; JAIN et al., 2014; GOLSHANI et al., 2015). Salienta-se que os resultados publicados até o momento abrem perspectivas de sucesso pelo uso desta tecnologia, por induzirem um perfil de resposta imune protetor contra infecções intracelulares.

As vacinas de DNA e subunidade vêm ganhando preferência entre os grupos de pesquisa, pela vantagem destas eliminarem as preocupações associadas à segurança das vacinas vivas, por meio da patogenicidade residual (YANG et al., 2013).

Desta forma, objetivou-se neste estudo desenvolver e avaliar novas formulações vacinais contra *B. abortus*, incluindo vacinas de DNA e vacinas de subunidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Brucella*

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella*, que infectam animais domésticos e silvestres, podendo ser transmitida a seres humanos (NICOLETTI, 1989). Esta é uma das doenças infecciosas de maior impacto econômico na medicina veterinária, devido aos prejuízos causados em consequência dos distúrbios reprodutivos ocasionados nos animais. Esta é responsável por problemas sanitários e econômicos, particularmente nos trópicos e em países com pouco investimento nas áreas de produção de leite e carne, onde a sua incidência é alta (POESTER, 2002).

Atualmente, são conhecidas treze espécies desse gênero e são classificadas de acordo com seu hospedeiro e patogenicidade: *Brucella abortus* em bubalinos, cervídeos, canídeos e homem, *Brucella melitensis* em caprinos, bovinos, canídeos e homem, *Brucella suis* em suínos e bovinos, *Brucella canis* em canídeos e homem, *Brucella neotomae* em ratos do deserto, *Brucella ovis* em ovinos (SONGER; POST 2005), *Brucella ceti* em golfinhos e baleias e *Brucella pinnipedialis* em focas e leões marinhos (FOSTER et al., 2007), *Brucella microti* em camundongos do campo (SCHOLZ et al., 2008), *Brucella inopinata* em humanos (SCHOLZ et al., 2010), *Brucella* sp. dos roedores australianos (TILLER et al., 2010), *Brucella* sp. de anuros (EISENBERG et al., 2012; FISHER et al., 2012; WHATMORE et al., 2015) e *Brucella papionis* (WHATMORE et al., 2014). As três principais espécies são divididas em biovares: *B. abortus* com sete biovares, *B. melitensis* com três biovares, *B. suis* com cinco biovares (ACHA, SZYFRES, 2001; BRASIL, 2006).

As bactérias do gênero *Brucella* são pequenos cocobacilos (0,6 a 1,5 µm), Gram-negativos, imóveis, intracelulares facultativas, aeróbias, não capsuladas, não flageladas e não esporuladas (REDKAR et al., 2001; QUINN et al., 2002). Em meios de cultura as colônias podem apresentar características lisa ou rugosa, o que está relacionado à composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, que também está relacionado a

virulência em algumas espécies e, a maior parte dos cultivos requer gás carbônico para suplementar seu crescimento (BRASIL, 2006; LAWINSKY et al., 2010).

Apesar de permanecerem no ambiente, as bactérias do gênero *Brucella* não se multiplicam nele e são moderadamente sensíveis aos fatores ambientais. Entretanto, a sua resistência diminui com o aumento da temperatura e da luz solar direta ou diminuição da umidade do ar. A pasteurização é um método eficiente de destruição de *Brucella* spp., assim como radiações ionizantes (BRASIL, 2006).

*Brucella abortus* infecta, principalmente, bovinos de corte e leite provocando elevados prejuízos econômicos (CORBELL, 1997; POLETTO et al., 2004). Além de *B. abortus*, outras espécies de *Brucella* como *B. suis* e *B. melitensis* também podem causar brucelose nos bovinos quando estes estão em contato com suínos, caprinos e ovinos, que são, respectivamente, os portadores naturais destes agentes (ACHA e SZYFRES, 2001).

## 2.2 Patogenia

A porta de entrada mais importante da *Brucella* parece ser a mucosa oral; entretanto, é sabido que a infecção pode ocorrer através das mucosas nasal, conjuntival e genital, da pele lesada e através da placenta. Após a penetração do agente no organismo, a bactéria é fagocitada por macrófagos, os quais sustentam sua extensiva replicação e subsequente expansão para outras células e órgãos (GORVEL; MORENO, 2002). *Brucella* possui genes de virulência que são importantes para a interação patógeno-hospedeiro e produção de fatores de virulência que modificam a fagocitose, a fusão do fagolisossoma, secreção de citocinas e apoptose (GORVEL; MORENO, 2002; MARIA-PILAR et al., 2005), como também, para o componente externo da membrana, o LPS (LAPAQUE et al., 2005).

A infecção por *B. abortus* ocorre quando a bactéria penetra na mucosa nasal, oral ou conjuntival. Após a penetração no organismo, há um curto período de bacteremia, e as bactérias, caso sobrevivam no interior dos linfonodos regionais, disseminam-se por todo organismo, indo para órgãos ou tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como fígado, baço, medula óssea e articulações (THOEN et al., 1993; MONTEIRO, 2004).

As espécies de *Brucella* têm a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (JONES; WINTER, 1992) e não fagocíticas (DETILLEUX, 1990). As bactérias opsonizadas são internalizadas, enquanto que bactérias não opsonizadas penetram em macrófagos (CAMPBELL et al., 1994).

No interior de macrófagos, ocorre um redirecionamento da bactéria para compartimentos membranosos, sendo primeiramente localizada nos endossomos primários, onde a fusão com lisossomos é inibida pela rápida acidificação do fagossomo e a sua destruição pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio é evitada (PIZARRO-CERDÁ et al, 1998). Deste modo, *Brucella* se multiplica no autofagossomo e no retículo endoplasmático (Figura 1) e a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos facilita a disseminação e a permanência de *B. abortus* no organismo (GORVEL; MORENO, 2002; KO; SPLINTTER, 2003; MARIA-PILAR et al., 2005).

Os órgãos de predileção são aqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, como eritritol, que está presente no útero gravídico, tecidos mamários e osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

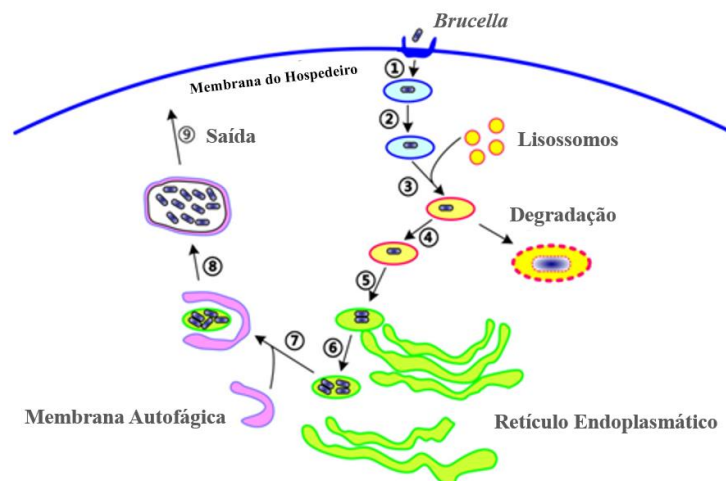


Figura 1. O Ciclo de vida de *Brucella* spp. Dentro de células hospedeiras. Durante a infecção, quando a bactéria encontra-se não opsonizada, ela penetra no macrófago pela membrana, via lipídica (1) formando um vacúolo contendo *Brucella* (2), e se submetem a fusão com o lisossoma de uma maneira controlada (3). Neste passo, cerca de 90% das bactérias são degradadas, e os outros 10% inibe a fusão dos fagossomos com os lisossomos e sobrevivem (4). Posteriormente o vacúolo contendo *Brucella* interage com o retículo endoplasmático (RE) (5), permitindo a formação de um vacúolo especializado no qual a bactéria se multiplica (6 e 7), podendo sobreviver por longos períodos dentro dos macrófagos (8) e, finalmente, evadem das células hospedeiras aumentando a infecção pela invasão de mais células (9). Adaptado de KE et al., 2015.

### 2.3 Epidemiologia

A brucelose é uma das zoonoses de maior importância mundial e as estratégias de combate para a brucelose são baseadas na vacinação, certificação de propriedades livres por testes indiretos, controle da movimentação de animais e sistema de vigilância específico (POESTER et al., 2009). Os biovars encontrados no Brasil são *B. abortus* biovars 1, 2, 3, 4 e 6, *B. suis* biovar 1, *B. ovis* e *B. canis*, sendo que as espécies *B. melitensis* e *B. neotomae* nunca foram isoladas no Brasil (POESTER et al., 2002; LUCERO et al., 2008).

O último diagnóstico nacional de situação da brucelose bovina foi realizado em 1975, tendo estimado a porcentagem de animais soropositivos em 4% na região Sul, 7,5% na Sudeste, 6,8% na Centro-Oeste, 2,5% na

Nordeste e 4,1% na Norte (Poester et al.2002; Brasil 2003; BRASIL, 2006). De acordo com os boletins de Defesa Sanitária Animal, entre os anos de 1988 e 1998, a prevalência de animais soropositivos ficou entre 4 e 5% (FERREIRA NETO, 2009).

A prevalência de focos da brucelose bovina em propriedades pecuárias no Brasil varia de 0,32% a 41,5% (SANTOS et al., 2013). No ano de 2009, foram feitos estudos de prevalência em vários Estados brasileiros, sendo que Mato Grosso do Sul apresentou o maior índice de fazendas que apresentaram pelo menos um animal reagente à prova sorológica, chegando a ser da ordem de 41,5% (CHATE et al., 2009). Estes dados mostram que a presença da brucelose no rebanho brasileiro, tanto de corte como de leite, ainda é muito alta, causando grandes prejuízos aos sistemas de produção.

## 2.4 Diagnóstico

Os métodos de diagnósticos disponíveis para brucelose podem ser utilizados para diversos objetivos, entre eles: diagnóstico confirmatório, estudos de prevalência, certificação de propriedades, e em países onde a brucelose já foi erradicada, são utilizados para evitar a reintrodução da brucelose através da importação de animais infectados ou produtos de origem animal (GODFROID et al., 2010).

O diagnóstico para a detecção da brucelose bovina pode são baseados na identificação do agente por métodos diretos, como isolamento e cultura do agente e detecção do DNA genômico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), ou por métodos indiretos pela detecção de anticorpos contra *B. Abortus*. Os testes para diagnóstico indireto reconhecidos como oficiais são: prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-Mercaptoetanol, fixação do Complemento e prova do anel em leite O teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) é um teste de triagem eleito pelo PNCEBT pelo fato de ter uma alta sensibilidade, fácil execução e baixo custo. A associação de um método sorológico com um método confirmatório é essencial para o diagnóstico da doença (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).



O “padrão ouro” para o diagnóstico da brucelose é o isolamento e identificação de *Brucella* spp., pois esta técnica fornece o diagnóstico definitivo da doença. Entretanto possui como desvantagem o tempo necessário para o isolamento e o risco para os profissionais que trabalham no laboratório (GODFROID et al., 2010; YU & NIELSEN, 2010). Para superar as desvantagens inerentes ao isolamento, a amplificação de ácidos nucleicos tem sido explorada como um caminho adicional para a rápida confirmação e detecção de *Brucella* spp. (PROBERT et al., 2004; OIE, 2009).

### 2.3 Resposta imunológica contra *B. abortus*

O sistema imune é um complexo de órgãos, células e substâncias bioquímicas que são responsáveis pela defesa do corpo animal contra o ataque de invasores externos, seja impedindo a entrada deles ou evitando sua multiplicação e se encarregando de destruí-los (PERRIER, 2008).

Definem-se dois tipos de resposta imune: a inata e a adquirida ou adaptativa. A resposta inata é realizada principalmente por neutrófilos e macrófagos, que realizam a identificação da partícula antigênica, a fagocitose e desencadeiam a liberação de citocinas que contribuem com a instalação do processo inflamatório e a intensificação da resposta imune. A resposta imune adaptativa originam respostas menos danosas e geram memória imunológica, sendo os linfócitos as principais células da resposta imune específica (ABBAS et al., 2008).

#### 2.3.1 Resposta Imune Inata

A imunidade inata acontece no estágio inicial da infecção, funcionando como a primeira linha de defesa contra infecções, e consiste de barreiras epiteliais, fagócitos (como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), células NK (natural killer) e proteínas como as do sistema de complemento e citocinas (ABBAS et al., 2008).

O reconhecimento de *Brucella* Spp. por células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células e concomitante produção de citocinas pró-inflamatórias. Os macrófagos possuem uma importância especial na resposta contra *Brucella*, uma vez que são as principais células reservatórios de sobrevivência e replicação da bactéria (SANGARI & AGUERO, 1996).

Outro componente importante no combate desses patógenos são as células NK (Natural killer) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; LODOEN & LANIER, 2006), as quais são ativadas diretamente por bactérias ou, indiretamente, em resposta a citocina IL-12, proveniente de macrófagos ativados. A ativação das células NK resulta na produção de IFN- $\gamma$ , principal citocina envolvida na ativação de macrófagos, promovendo, assim, a morte das bactérias capturadas.

### 2.3.2 Resposta Imune Adaptativa

Apesar dos anticorpos terem a sua função na imunidade adquirida contra *Brucella*, a proteção efetiva contra a infecção é dependente da imunidade mediada por células T (MACKANESS, 1964).

A resposta imune adaptativa promove memória funcional, que é a estratégia utilizada na vacinação, e tem início principalmente devido as mudanças imunológicas causadas pela cronicidade, como diminuição dos linfócitos T CD4+, baixa produção de IFN- $\gamma$  e liberação de IL-12, citocina responsável pela diferenciação de células Th0 em Th1. Os mecanismos funcionais da resposta imune adaptativa podem ser classificados em: (1) produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos Th1, que ativa as funções efetoras dos macrófagos; (2) destruição de macrófagos infectados pela citotoxicidade mediada por células TCD8+; (3) direcionamento das subclasses de anticorpos IgG que são preferencialmente produzidos na resposta humoral contra microorganismos intracelulares e subsequente opsonização do patógeno, facilitando a fagocitose (GOLDING et al., 2001; BALDWIN, 2002;

KO;SPLITTER, 2003; RIVERS et al., 2006). Já a IL-12 é responsável por atrair células inflamatórias efetoras, como neutrófilos e linfócitos, que, através de mecanismos definidos, agem no combate à infecção brucélica (GOLDING et al., 2001; SCHARF ET AL., 2001; BAE et al.,2002; WYCKOFF 2002; RIVERS et al., 2006)

A imunidade adquirida contra a infecção de *B. abortus* em camundongos é mediada principalmente por linfócitos T e suas citocinas. Os anticorpos, por sua vez, têm o papel de opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção, facilitando a fagocitose pelos macrófagos (CHEERS; HO, 1983; WINTER et al., 1989). Porém, os anticorpos não reduzem a taxa de crescimento intracelular de *B. abortus in vivo* e não conferem resistência a camundongos susceptíveis (CHEERS; HO, 1983).

Apesar dos macrófagos serem uma barreira de defesa contra *Brucella* por serem considerados as células mais importantes do sistema imune, encontrados na interface entre a imunidade inata e adaptativa e, destruindo bactérias fagocitadas (ROSENBERGER; FINLAY, 2003), *Brucella* possui a habilidade de sobreviver e replicar dentro do macrófago e outras células do hospedeiro tornando-se inacessível a mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS; HO, 1983). Dessa forma, a proteção efetiva contra essa infecção é dependente da imunidade celular mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (ARAYA et al., 1989).

Em infecções contra *Brucella* spp, a citocina IL-12 secretada principalmente por células dendríticas e macrófagos parece executar um papel crucial. Esta molécula atua na ativação de células T CD4<sup>+</sup> promovendo sua diferenciação para o perfil Th1, que produz IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . (SPLITTER et al., 1996; HE et al., 2001). O IFN- $\gamma$ , além de ativar as funções microbidas dos macrófagos e linfócitos T citotóxicos, também estimula a apresentação de antígenos através das moléculas de MHC (Complexo de histocompatibilidade principal) de classe I e II e induz a troca do isotipo de imunoglobulina (IgG) para

IgG2a, o que favorece a fagocitose do microrganismo, aumentando assim a proteção contra o patógeno (GOLDING et al., 2001).

Os linfócitos do tipo Th1 secretam IFN- $\gamma$ , que ativam macrófagos, ajudando no combate à infecção causada por bactérias intracelulares, incluindo a *Brucella* (JONES & WINTER, 1992; OLIVEIRA et al., 1998; MURPHY et al., 2001).

Os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10. As citocinas IL-4 e IL-10 têm como principal função inibir a ação dos macrófagos e tem suas ações diminuídas durante a resposta adquirida. A IL-5 é responsável por ativar células B e eosinófilos, bem como induzir produção e secreção de imunoglobulinas, responsáveis pela resposta imune humoral da infecção. Já as células citotóxicas T CD8+ são células efetoras que atuam na eliminação de macrófagos infectados diretamente com *Brucella* (mecanismo de apresentação MHC-I), sendo as perforinas e granzimas seus principais métodos de citotoxicidade (RIVERS, et al., 2006; WYCKOFF, 2002; GOLDING et al., 2001; ZHAN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2002).

As células dendríticas também estão envolvidas na imunidade contra *Brucella* principalmente através do processo de apresentação de antígeno e produção de IL-12 que, conforme já mencionado, estimula a diferenciação para o perfil Th1 (BIRON, 1999; HUANG et al., 2001).

#### 2.4 Vacinas atuais brucelose bovina e estudos em vacinas de DNA

Existem duas vacinas, vivas atenuadas, recomendadas pela OIE (Organização Internacional de Epizootias) contra a brucelose bovina, a B19 e a RB51. No Brasil, o PNCEBT adotou no ano de 2001 a vacina B19 contra a brucelose para a imunização em massa de vacas entre três e oito meses de idade, porém, esta apresenta como inconveniente a interferência no diagnóstico sorológico (MATHIAS et al, 2001; BRASIL, 2006). A B19 pode infectar o homem, ocasionar em bovinos orquite e epididimite nos machos e

aborto em fêmeas vacinadas em final de gestação, como o que ocorre com as cepas de campo da bactéria (BRASIL, 2006).

Apesar da vacinação de vacas adultas ter sido utilizada em alguns programas internacionais de erradicação, o PNCEBT vigente preconiza apenas a vacinação de bezerras entre três e oito meses de vida, pois permite que reação vacinal praticamente desapareça antes de um ano, e busca alternativas de proteção para animais adultos de regiões com alta incidência (MATHIAS et al, 2001; BRASIL, 2006).

No ano de 2007 foi aprovada a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA nº 13 (28/08/2007) que regulamentou o uso da vacina RB51 restringindo sua administração para fêmeas que não foram vacinadas com a amostra B19 e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (BRASIL, 2007), sendo que os procedimentos de referência recomendado pela OIE incluem testes *in vitro* como: pureza (ausência de microrganismos estranhos); viabilidade (número de bactérias viáveis por dose); suavidade (análise de diluente) e testes *in vivo*, como a determinação da virulência residual e imunogenicidade em camundongos (OIE, 2009).

A amostra vacinal RB51 está sendo utilizada como alternativa para a amostra vacinal B19, como uma vacina para prevenção da brucelose e abortos em bovinos, pois os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da incidência de aborto quando foram experimentalmente infectados com a amostra virulenta S2308 de *B. abortus* (SCHURIG, 1991; CHEVILLE et al., 1996). A vacina RB51 quando utilizada em dose única, produz um efeito protetor em bovinos similar à amostra B19, com a vantagem de ser menos patogênica para os seres humanos e poder ser diferenciada de isolados de campo. Porém, esta amostra tem a desvantagem de ser resistente à rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (WHO, 1997).

Grandes estão sendo os esforços entre os pesquisadores do mundo na busca do desenvolvimento de uma nova vacina contra a brucelose em bovinos.

Segundo ADAMS (1990), a vacina ideal contra a brucelose deve apresentar as seguintes características: i) não deve provocar a doença nos animais vacinados; ii) deve prevenir a infecção pela bactéria em ambos os sexos; iii) prevenir aborto e esterilidade; iv) promover proteção contra a infecção por um longo tempo com uma simples dose; v) não induzir a produção de anticorpos persistentes os quais interferem no sorodiagnóstico de infecções a campo; vi) ser biologicamente estável; vii) não apresentar risco de reversão da virulência *in vitro* e *in vivo*; viii) não ser patogênica para humanos e, ix) ser facilmente produzida em grande escala e baixo custo.

A imunidade contra uma determinada doença infecciosa pode ser induzida por vários tipos de vacinas e são baseadas em microrganismos vivos atenuados e/ou inativados (vacinas de primeira geração), extratos de microrganismos e/ou proteínas recombinantes ou de subunidades (vacinas de segunda geração). Além das formas já disponíveis, encontram-se em estágio experimental as vacinas à base de DNA (vacinas de terceira geração), e as que utilizam microrganismos vivos recombinantes (ABBAS, 2008).

Até o presente momento três vacinas de DNA foram licenciadas para uso veterinário e uma quarta construção está licenciada como terapia para suínos (LIU, 2011). A vacina de DNA para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) foi licenciada em 2005, para utilização em cavalos e representa a primeira licença concedida para uma vacina de DNA de utilização em animais. Esta vacina mostrou-se segura e imunogênica em sua primeira fase de estudo em humanos (MARTIN et al., 2007). Ainda em 2005, uma vacina de DNA foi aprovada para o salmão do Atlântico, criados em fazendas, para evitar infecção pelo vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV). A capacidade protetora da vacina de DNA é específica para a proteína particular que é codificada e o mecanismo pode envolver a resposta imune inata que é estimulada pela proteína bem como a resposta imune de memória, com ambos os anticorpos e respostas de células T (LORENZEN et al., 1990; ANDERSON et al., 1996; ACOSTA et al., 2006; PURCELL et al., 2006).

Uma vacina de DNA imunoterapêutica foi licenciada em 2010, depois de receber aprovação condicional em 2007, como uma terapia para o melanoma

maligno em cães. Esta vacina contém DNA humano que codifica uma proteína xenogênica, a tirosinase, ligeiramente diferente da variante canina. A tirosinase é uma enzima envolvida na síntese da melanina, sendo expressa tanto pelos melanócitos normais quanto neoplásicos (melanoma). Assim, o sistema imune do cão reconhece esta proteína estranha e gera uma resposta imune eficaz contra as próprias tirosinases (BERGMAN et al., 2003; LIAO et al., 2006). A capacidade de prolongar a vida de cães, mesmo em estágio avançado da doença, fornece um grau de eficácia para imunoterapia maior do que a observada com outras vacinas imunoterapêuticas em desenvolvimento (BERGMAN et al., 2003). Esta tecnologia é totalmente inovadora em medicina veterinária e consiste no último grande avanço na luta contra o melanoma no cão.

O quarto plasmídeo de DNA licenciado não é uma vacina, mas codifica o fator de liberação do hormônio do crescimento (GHRH) para porcas reprodutoras, na indústria de alimentos, e foi licenciado em 2008. O resultado da injeção de DNA GHRH é que as porcas têm mais leitões vivos em suas ninhadas e os leitões apresentam maior peso ao nascimento (KHAN, 2010).

Apesar de estas vacinas veterinárias serem licenciadas, ainda enfrentam limitações quanto a imunogenicidade, impedindo até hoje a sua utilização em escala global, o mais importante, em humanos. Resultados promissores em experimentos com pequenos roedores foram dificilmente vistos em espécies maiores, incluindo primatas não-humanos ou seres humanos (GRUNWALD e ULBERT, 2015).

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. Estratégias para o desenvolvimento de vacinas. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2008. p. 361–362.

ABIEC. 2014. Estatísticas - Balanço da pecuária. ABIEC. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>. Acesso em 10 de janeiro de 2015.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses e micoses. 3.ed. Washington: OPAS, 2001. 416p.

ACOSTA, F.; COLLET, B.; LORENZEN, N.; ELLIS, A.E. Expression of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on the surface of the fish cell line RTG-P1 induces type 1 interferon expression in neighbouring cells. *Fish Shellfish Immunology*, v.21, p. 272–278, 2006.

ADAMS, G. Development of live *Brucella* vaccine, from *Advances in Brucellosis*. Texas A&M University Press, p. 250-276,1990.

ANDERSON ED, MOURICH DV, FAHRENKRUG SC, LAPATRA S, SHEPHERD J, LEONG JA. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Mar Biol Biotechnology*, v.5, p.114–122, 1996.

ARAYA, L. M. et al. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J Immunol*, v. 143, n. 10, p. 3330-3337. 1989.

BAE J.; SCHURING, G.; TOTH. T. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins use of vaculo virus recombinant-expressing whole insects cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Vet Microbiol*, v.88, p.189- 202, 2002.

BERGMAN,P.J.; MCKNIGHT,J.; NOVOSAD, A.; et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res*, v. 9, p.1284-1290, 2003.

BERKELMAN, R.L. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v.37, p.3, p.407- 424, 2003.

BIRON C.A. Initial and innate responses to viral infections-pattern setting in immunity or disease. *Current Opinion in Microbiology*, n.2, p. 374-381. 1999.



BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 33 de 24 de agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, 6-7, p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/ DAS/ DAS. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. Boletim do Serviço de Defesa Sanitária Animal, número especial, 1988. 101 p.

CAMPBELL, G. A.; ADAMS, L. G.; SOWA, B. A. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 41, n. 3-4. p. 295-306. 1994.

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

CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 61, n. 1, p. 46-55, 2009.

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 the Reticuloendothelial Society*. n. 34, p. 299-309.

CHEVILLE N.F., OLSEN S.C., JENSEN A.E., STEVENS M.G.; PALMER M.V. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res* 57:1153-1156. 1996.

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

CORBEL, M. J.; ELBERG S. S.; COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: WHO Press, 2006. 102 p.

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

DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.* v.58, p. 2320-2328. 1990.

EISENBERG et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* v. 78, n. 10, p. 3753-3755. 2012

FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções. *Ciência Animal Brasileira*. 2009 Disponíveis em: < <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7669>>

FISHER et al. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of Zoo and wildlife Medicine*, v. 43, n. 3, p. 625-628, 2012.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 57, p. 2688-2693, 2007.

FU, S. et al. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* infection. *PLoS One* n. 7, p. 1-5. 2012.

GLENTING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb Cell Fact.* n. 4, v. 26. 2005. doi:10.1186/1475-2859-4-26

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat. Med. J.*, v. 51, p.296-305, 2010.

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

GOLSHANI, M. et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNA vaccine encoding *Brucella* L7/L12-truncated Omp31 fusion protein by a DNA priming and protein boosting regimen. *Molecular Immunology*, n. 66, v. 2, p. 384-91. 2015.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, n. 90. p. 281-297. 2002

GRUNWALD, T.; ULBERT, S. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin Exp Vaccine Res*, v.4, n.1,p. 1-10, 2015.

HALLING, S. M. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* v. 187, n. 8, p. 2715-2726, 2005.

HE, Y.; VEMULAPALLI, R.; ZEYTU,, A.; SCHURIG, G. . Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infection and microbiology*, n. 2, p. 1-33. 2001.

HOP, H. T. et al. Immunization of Mice with Recombinant *Brucella abortus* Organic Hydroperoxide Resistance (Ohr) Protein Protects Against a Virulent *Brucella abortus* 544 Infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* n. 26, v. 1, p. 190–196. 2016.

HU X. D.; YU D. H.; CHEN S. T.; LI S. X.; CAI H. A. combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. *DNA Cell Biol*, v. 28, n. 4, p. 191-199. 2009.

HUANG, L. Y. et al. IL-12 induction by a Th1-inducing adjuvante *in vivo*: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *Journal of Immunology*, n. 167, v. 3, p. 1423-1430. 2001.

JAIN, S. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, n. 32, v. 35, p. 4537-42. 2014doi: 10.1016/j.vaccine.2014.

JANEWAY, C.A.; JR MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Na Ver Immunol.* n. 20, p. 197-216. 2002.

JARDIM, G. C. et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. *Pesq Vet Bras*, v. 26, n. 3, p. 177-182, 2006.

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

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.28, n.4, p.709-726, 2007.

KE, Y. et al. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Front Cell Infect Microbiol.* v. 5, n. 72. doi: 10.3389/fcimb.2015.00072. 2015.

KHAN AS, BODLES-BRAKHOP AM, FIOROTTO ML, DRAGHIA-AKLI R. Effects of maternal plasmid GHRH treatment on offspring growth. *Vaccine* 28:1905-10. 2010.

KO, J.; SPLITTER, G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol*, n. 16, p.65-78, 2003.

KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune response to DNA vaccine. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 55, p.751-701, 1999.

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

LAPAQUE N.; MORIYÓN I.; MORENO E.; GORVEL J. P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, v. 8, n. 1, p. 60-66. 2005.

LAWINSKY, M.L.J.; OHARA, P.M.; ELKHOURY, M.R. Estado da arte da brucelose em humanos. *Rev Pan-Amaz Saúde*, n.4, p.75-84. 2010.

LIAO, J.C; GREGOR, P.; WOLCHOK, J. D.; et al. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immunology*, v.6, n.8, 2006.

LIM, J. J. et al. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice. *J. Vet. Sci.* 13: 287-292. 2012.

LIU, M.A. DNA vaccines: An historical perspective and view to the future. *Immunology Rev*, 239, 62–84, 2011.

LODOEN M.B.; LANIER L.L., Innate Immune recognition. *Na Ver Immunol.* N. 20, p. 1987-216. 2002.

LORENZEN N, OLESEN NJ, JORGENSEN PE. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J Gen Virol*, v.71, p.561–567. 1990.

LUCERO, N. E. et al. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect*, v. 136, n. 4, p. 496-503, Apr 2008. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559694> >.

LUO D. et al. Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. *Infect Immun*, v. 74, n. 5, p. 2734-2741. 2006.

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

MARIA-PILAR, J. B. et al., Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clinical Immunology*, v. 114, n. 3. p. 227-238. 2005.

MARTIN JE, et al. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis*, v.196, p.1732–1740. 2007.

MATHIAS, L. A., CHAVES, L. F., CHEN, A. A., GIRIO, R. J. S., NETO, W. V. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, n° 4, p 139-142, out-dez, 2001.

MONTEIRO, L. A. R. C. , Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul, pag. 89-90, 2004

MURPHY, E. A. et al. Interferon-gama is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C5BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*, n. 103, v. 4, p. 511-518. 2001

NAGATA, T.; AOSHI, T.; UCHUIMA, M.; SUZUKI, M.; KOIDE, Y. Cytotoxic Tlymphocyte, and helper T lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology*. v.23, n.2, p.93-106, 2004.

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

OIE 2005- Organização Internacional de Epizootia. Bovine brucellosis. Article 2.3.1.1. Terrestrial Animal Health code 2005, Part 2, Section 2.3, carpter 2.3.1. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/ged/D6428.PDF>.

OIE 2009- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.04.03\\_BOVINE\\_BRUCCELL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf)

OLIVEIRA, S. C.; SOUERT, N; SPLINTTER, G. A. Molecular ans cellular interactions between *Brucella abortus* and host imune responses. *Veterinary Microbiology*. n. 1-4, v. 90, p. 417-424. 2002.

OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. A. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*. n. 14, p. 959-962. 1996.

OÑATE, A. A. et al. DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun*, v.71, n.9, p.4857-4861. 2003.

OÑATE, A. A.; VEMULAPALLI, R.; ANDREWS, E.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S.; FOLCH, H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 2, p. 986-988. 1999.

PASQUEVICH, K. A. 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. *Infect. Immun.* n. 77, p. 436-445. 2009.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. A. O combate à brucelose bovina: Situação brasileira. 1 ed. Funep, São Paulo, Brasil, 2003, p. 154.

PERKINS, S. D.; SMITHER, S.J.; ATKINS H.S. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol Rev*, 34, n. 3 p. 379–394. 2010.

PERRIER, J. J. Conceitos básicos – Imunidade e vacinas. 2008. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/noticias/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=71303>

PLANT, J.W.; CLAXTON, P.D.; JAKOVLJEVIC, D.; DE SARAM, W. *Brucella abortus* infection in the bull. *Australian Veterinary Journal*, v.52, p.17-20, 1976.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.55- 62, 2002.

POESTER, F. et al.. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.61, p.1-5, 2009.

POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G.. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural*, [online]. v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

PIZARRO-CERDÁ, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmatic reticulum of non professional phagocytes. *Infect Immun*, v. 66, n. 12, p. 5711-5724, 1998.

PROBERT, W.S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N. Y.; BYSTROM, S. L. & GRAVES, M. H. Real Time Multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. mellitensis*. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.3, p. 1290-1293, 2004.

PURCELL MK, et al. Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Immunol*, n. 43, p.2089–2106. 2006.

QUINN, B. K.; MAEKEY, F. C.; LEONARD, E. S. et al. *Brucella* species, In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2 ed. Chichester: Blackwell Science, 2002. p 448-459.

REDKAR, R.; ROSE, S.; BRICKER, B.; DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes*, v. 15, p. 43-52, 2001.

RIVERS, R.; ANDREWS, E.; GONZÁLEZ-SMITH, A.; DONOSO, G.; OÑATE, A. Revisión Bibliográfica - *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. Med. Vet.*, v.38, n.1, p.7-18. 2006.

ROSENBERGER, C.M.; FINLAY, B.B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nature Reviews*, v. 4, n. 5, p. 385-396, 2003.

SANGARI, F.J.; AGUERO, J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: An update. *Microbiología SEM*, n.12, p.207-218. 1996.

SANTOS, R. L. et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq Vet Bras*, v. 33, n.6, p. 759-764, 2013.

SCHARF, O et al. Ontogeny of Th1 memory responses against a *Brucella abortus* conjugate. *Infect Immun*, v.69, p.5417-5422, 2001.

SCHOLZ, H. C., et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 58, n.2, p. 375–382, 2008.

SCHOLZ, H. C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 60, n.4, p. 801-808, 2010.

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

SHARMA, A. K.; KHULLER, G. K. DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol Cell Biol*, v. 79, n. 6, p. 537-546. 2001.

SPLITTER, G. et al., T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Veterinary Immunology Immunopathology*, n. 54, v. 1-4, p. 309-369. 2014.

SONGER J. G. & POST K. W. Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. 1 ed. Saint Louis: Saunders, 2005. p 299-309.

THOEN, C. O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N. F.; *Brucella*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. (Ed.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993, p.236-247.

TILLER, R. V. et al. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. Appl Environ Microbiol. 2010 v. 76, n. 17, p.5837-5845, 2010.

Whatmore, A. M. et al. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). Int J Syst Evol Microbiol 64, 4120–4128. 2014.

WHATMORE, A. M. et al. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*) JMM Case Reports, v. 2, n. 1, 2015.

WHO 1997. World Health Organization Joint FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of a WHO Meeting, Geneva.

WINTER, A. J. et al. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *B. abortus* infection in mice. Infection and Immunity. n. 57, v. 11, p. 3438-3444. 1989.

WYCKOFF III, J. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. Vet Microbiol, v.90, p395-415, 2002.

YANG, X.; SKYBERG, J. A.; CAO, L.; CLAPP, B.; THORNBURG, T.; PASCUAL, D. W. Progress in *Brucella* vaccine development. **Front. Biol.** V. 8(1): 60–77, 2013.

YOUNG, E. J. Brucellosis: a model zoonosis in developing countries. APMIS. Supplement., v. 3, p. 17-20. 1988.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. Reviews Infectious Diseases. v. 5, n. 5, p. 821-842, 1983.

YU, W. L. & NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. Croat. Med. J., v. 51, n.4, p. 306-313, 2010.

ZHAN, Y.; KELSO, A.; CHEERS, C. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun, v.63, p.969-975, 1995.



ZINSSTAG, J. et al. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerging Infections Diseases*. V.13, p. 527–531, 2007.

**ARTIGOS**

## ARTIGO 1

Normas da revista Vaccine

### **Desenvolvimento e avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas de DNA contra brucelose bovina**

Renata Ribeiro Bastos Pereira<sup>a</sup>, Cleber Oliveira Soares<sup>b</sup>, Lenita Ramires dos Santos<sup>b</sup>, Grácia Maria Soares Rosinha<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senator Filinto Müller, nº 2443 – Caixa postal 549, Vila Ipiranga, Campo Grande - MS, Brasil

<sup>b</sup> Embrapa Gado de Corte – Sanidade Animal – Laboratório de Engenharia Genética Animal, Avenida Radio Maia , nº 830, Vila Popular, Campo Grande - MS, Brasil.

\* Autor correspondente: gracia.rosinha@embrapa.br

### **RESUMO**

O sistema de secreção do tipo IV de *Brucella* spp. é composto por doze genes no operon *virB* (*virB1* a *virB12*) e, constitui um dos principais fatores de virulência desta bactéria. Este estudo foi conduzido para avaliar a imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas de DNA contendo os genes *virB9* e *virB12* de *Brucella abortus*. A administração intramuscular das vacinas de DNA em camundongos BALB/c induziu resposta imune humoral e celular específicas contra os antígenos. A detecção de IgG específico no soro dos camundongos imunizados, bem como suas subclasses IgG1 e IgG2a, foram avaliadas por ELISA indireto. Os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 foram determinados por ELISA de captura a partir dos sobrenadantes de culturas de esplenócitos, estimulados com VirB9r e VirB12r, separadamente. Os candidatos a imunógenos pcDNA*virB9*, pcDNA*virB9-VirB9r* e pcDNA*virB12-VirB12r* induziram a produção de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a e obtiveram níveis significativos ( $p < 0,05$ ). No entanto, nenhum dos grupos testados induziu proteção em camundongo Balb/c após o desafio com *B. abortus* virulenta S2308.

Palavras-chave: *Brucella abortus*; *virB*; Vacina de DNA.

## INTRODUÇÃO

*Brucella abortus* é o principal agente causador da brucelose em bovinos, causando aborto e infertilidade em animais adultos. A brucelose é uma doença de distribuição mundial, causando grandes perdas econômicas em áreas endêmicas [1].

Devido à importância para a saúde pública e aos danos que a brucelose causa para a indústria pecuária, grandes esforços têm sido dispendido para controlar e erradicar esta doença em bovinos. Atualmente, a imunização contra infecções causadas por *B. abortus* é amplamente realizada pela administração das vacinas vivas atenuadas B19 e RB51 [2]. A amostra vacinal B19 provou ser eficaz contra infecções de *B. abortus* em bovinos, erradicando essa doença em diversos países. Apesar das vacinas disponíveis serem eficazes no controle da brucelose, eles têm algumas desvantagens, tais como a interferência com os testes de diagnóstico, são patogênicas para os humanos e apresentam potencial de causar aborto em fêmeas prenhas [3].

Uma estratégia para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz é a imunização com plasmídeos que codificam antígenos protetores, gerando uma resposta imune humoral e celular [4]. Estes plasmídeos são chamados de vacinas de DNA, que além de conferir resposta imune humoral e celular, tanto para resposta de linfócitos CD4+ quanto CD8+, sem a necessidade de microrganismos vivos, são também de baixo custo e fácil manipulação.

Importantes fatores de virulência de *B. abortus* podem ser candidatos à componentes de uma vacina contra brucelose bovina. Envolvidas no processo

de replicação intracelular, as proteínas do sistema VirB, que fazem parte do sistema de secreção tipo IV, são consideradas um fator de virulência em *Brucella* spp., após terem sido testadas em modelos de infecção em macrófagos humanos e camundongos [5]. Este sistema está relacionado evolucionária e funcionalmente ao sistema de transferência de DNA por conjugação e ao sistema de secreção de fatores ligados à virulência [6, 7].

As proteínas do sistema VirB de outras bactérias (*Anaplasma marginale* e *Anaplasma phagocytophilum*) e riquetsias (*Ehrlichia canis*), apresentaram-se altamente imunogênicas e antigênicas ao serem testadas como vacinas [8].

A partir do potencial das proteínas do operon *virB* como imunógenos, testou-se em camundongos, duas vacinas de DNA contendo os genes *virB9* e *virB12* de *B. abortus*, quanto a capacidade de proteção e níveis de resposta imune humoral e celular.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Cepas bacterianas, procedimentos de estocagem e cultura**

A cepa S2308 de *B. abortus* foi utilizada para extração de DNA genômico e desafio pós-imunização em camundongos. A cepa B19 de *B. abortus* (Brucelina B19, Vallée®), foi utilizada como controle positivo na vacinação dos camundongos. *Escherichia coli* TOP 10 F' ou *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen®), foram utilizadas para clonagem, armazenamento e expansão plasmidial.

As cepas de *B. abortus* foram aerobicamente crescidas em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (BD Biosciences®) líquido por 72 horas a 37 °C, aliquotadas em glicerol 20% e estocadas a -80 °C. As cepas de *E. coli* TOP 10 F', *Rosetta-gami* e DH5α foram crescidas, com aeração, em meio Luria-Bertani (LB) (BD Biosciences®) líquido por 16 horas a 37 °C, seguindo o mesmo protocolo de aliquotagem e estocagem das cepas de *B. abortus*. Para obtenção de colônias as amostras foram estriadas em placas de Petri contendo LB ágar e incubadas a 37 °C por 16 horas.

## 2.2. Animais

Camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas de idade) foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sendo certificado com o registro nº 360/2011.

## 2.3. Produção e purificação das proteínas recombinantes VirB9r e VirB12r

As construções plasmidiais pET47(b)-virB9 e pET47(b)-virB12, previamente estocadas em *E. coli* Rosetta-gami, armazenadas a -80°C em glicerol 20%, no acervo do Laboratório de Engenharia genética Animal da Embrapa Gado de Corte, foram utilizadas para obtenção das proteínas recombinantes VirB9r e VirB12r.

Após o cultivo dos clones em meio LB ágar com 25 µg/mL de canamicina e 36 µg/mL de cloranfenicol, a indução da expressão dos genes foi realizada com a adição de 1 mM de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) por 4 horas a 37°C, sob agitação constante e foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, corado com azul brilhante de *Comassie*.

A purificação da proteína VirB9r foi realizada por eletroeluição, conforme metodologia descrita por ELISEI e colaboradores [9] e, a purificação da proteína VirB12r foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em coluna de níquel (His Trap-GE), conforme metodologia descrita pelo fabricante.

Após a purificação, as proteínas foram dialisadas em PBS 1X pH 7,2 por 72 horas em câmara fria e quantificadas pelo método de Lowry [10].

A qualidade da purificação foi avaliada por SDS-PAGE 12%, corado com azul brilhante de *Comassie*, bem como por Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6-histidinas (Sigma-Aldrich®), que reconhece uma porção de seis histidinas fusionadas à VirB9r e VirB12r.

As proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas posteriormente como *booster* após administração das vacinas de DNA e, nos sistemas de avaliação da resposta imune (ELISAs e ensaios *in vitro* de avaliação de resposta celular para as vacinas de DNA).

## 2.4. Construção e produção das vacinas de DNA

A cepa S2308 de *B. abortus* foi utilizada para extração de DNA genômico, seguindo a metodologia descrita por BASTOS et al. (2012) [11]. A amplificação dos genes *virB9* e *virB12* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores que contêm sítios de restrição Bam HI e Hind III e a sequência consenso de Kozak no iniciador (Tabela1). Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir do programa DNASTAR®, baseado na sequência genômica da cepa de *B. abortus* (AF 226278.1).

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pcDNA™3.1(+) (Invitrogen®) utilizando-se técnicas de biologia molecular padrão. Os clones positivos foram confirmados por análise de restrição e sequenciamento. O plasmídeo vazio pcDNA3.1(+) e as construções vacinais pcDNAvirB9 e pcDNAvirB12 foram produzidas em larga escala e, purificados usando o Kit EndoFree Giga (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante e diluído a 1mg/mL em PBS.

### Tabela 1.

Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes *virB9* e *virB12* de *B. abortus*

Oligonucleotídeos	Sequência	Sítio de restrição
pcDNA <i>virB9</i> F	<sup>5'</sup> CAAAAGCTTACGATGGAAAGATTCTGCTTGCGTGC <sup>3'</sup>	Hind III
pcDNA <i>virB9</i> R	<sup>5'</sup> CAAGGATCCTCATTGCAGGTTCTCCCCG <sup>3'</sup>	Bam HI
pcDNA <i>virB12</i> F	<sup>5'</sup> CAAAAGCTTACGATGGGCACATTGGTTATGGTGC <sup>3'</sup>	Hind III
pcDNA <i>virB12</i> R	<sup>5'</sup> CAAGGATCCTTACTTGCGTAAAATTTGAT <sup>3'</sup>	Bam HI



## 2.5. Detecção da expressão *in vivo* dos genes *virB9* e *virB12* em células eucarióticas por RT-PCR

Para a avaliação da expressão do RNAm *in vivo* dos genes *virB9* e *virB12* em células de eucarioto, dois grupos compostos por quatro camundongos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem BALB/c, receberam uma única dose de 100 µg das construções vacinais pcDNA*virB9* e pcDNA*virB12*, pela via intramuscular (IM), separadamente, e dois animais receberam 100µL de PBS1X pH 7,2 (controles), pela mesma via de administração. Os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, 24 horas, 48 horas, 72 horas e sete dias após receberem a dose única de DNA, e os animais inoculados com PBS1x pH7,2 foram eutanasiados 7 dias após a inoculação. O músculo quadríceps direito (local onde foram realizadas as inoculações) foi coletado de cada camundongo, de forma asséptica em reagente Trizol (Invitrogen®) e o RNA total foi isolado de acordo com instruções do fabricante. Subsequentemente, o RNA foi extraído com clorofórmio e precipitado com álcool isopropílico. O RNA total extraído foi dissolvido em água DEPC e quantificado utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop®. Antes de realizar o procedimento de transcrição reversa, o RNA total de cada amostra (1 µg) foi tratado com a enzima Amplification grade DNase I (Invitrogen®), e após realizada a transcrição reversa do RNA para cDNA com 1 µg de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa do sistema ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. Para a amplificação de cada cDNA específico, 5 µL de cDNA foi utilizado como molde na reação de PCR.

## 2.6. Imunização

Os camundongos foram divididos em oito grupos de 10 animais, correspondentes aos grupos que receberam: pcDNAvirB9, pcDNAvirB9+VirB9r-Montanide (booster), pcDNAvirB12, pcDNAvirB12+VirB12r-Montanide (booster), pcDNA3.1(+), Montanide, PBS e B19 (vacina comercial). Cada animal dos grupos vacinais (pcDNAvirB9 e pcDNAvirB12) e do grupo controle pcDNA3.1(+) foram inoculados com três doses de 100 µg, por injeção intramuscular (músculo do quadríceps); os animais dos grupos reforço com proteína (pcDNAvirB9+VirB9r e pcDNAvirB12+VirB12r) foram inoculados com duas doses de 100 µg das construções vacinais, por injeção intramuscular e a terceira dose com 30 µg das respectivas proteínas recombinantes preparadas com 70 µL do adjuvante Montanide, por injeção subcutânea (região dorsal). Os animais do grupo Montanide foram inoculados com 70 µL do adjuvante, por injeção subcutânea e, os animais do grupo PBS foram inoculados com três doses 100 µL da solução de PBS pH 7,2 por injeção intramuscular. Cada camundongo foi inoculado nos dias 0, 15 e 30. Os animais do grupo B19 (controle positivo) foram inoculados intraperitonealmente com apenas uma dose de 100 µL contendo  $1 \times 10^5$  Unidades formadoras de colônia (UFC) da amostra vacinal B19 no dia 30 (Tabela 2).

**Tabela 2.**

Programa de imunização dos camundongos

Grupos	Esquema de Imunização (Dias)		
	0	15	30
pcDNA <i>virB9</i>	100 µg (IM)	100 µg (IM)	100 µg (IM)
pcDNA <i>virB12</i>	100 µg (IM)	100 µg (IM)	100 µg (IM)
pcDNA <i>virB9</i> +VirB9r*	100 µg (IM)	100 µg (IM)	30 µg (SC)
pcDNA <i>virB12</i> +VirB12r*	100 µg (IM)	100 µg (IM)	30 µg (SC)
pcDNA3.1(+)	100 µg (IM)	100 µg (IM)	100 µg (IM)
B19**			100 µL (IP)
PBS	100 µL (IM)	100 µL (IM)	100 µL (IM)

(IM): Intramuscular. (SC): Subcutânea. (IP): Intraperitoneal.

\*Última dose dos grupos pcDNA*virB9*+VirB9r e pcDNA*virB12*+VirB12r foi com as respectivas proteínas recombinantes.

\*\*Os camundongos foram vacinados com  $1 \times 10^5$  UFC com a vacina comercial B19.

Cinco animais de cada grupo foram desafiados com 100 µL de *B. abortus* S2308 ( $2 \times 10^5$  UFC) em PBS, por via intraperitoneal, 20 dias após a terceira inoculação. Neste mesmo período os outros cinco animais de cada grupo foram encaminhados para esplenectomia para obtenção de esplenócitos e avaliação da resposta imune celular.

## 2.7. Análise da resposta imune humoral

Amostras de sangue, dos dez animais de cada grupo, foram coletadas por punção do plexo retro-orbital um dia antes de cada imunização e um dia antes do desafio. Os olhos dos animais foram anestesiados antes das coletas com 1 gota de solução oftálmica de Cloridrato de Proximetacaina 0,5%, deixando agir por 30 segundos. Os soros obtidos foram congelados a  $-20$  °C, e descongelados quando necessário.

A resposta imune humoral foi avaliada pelos níveis de IgG e de suas subclasses IgG1 e IgG2a por meio de ELISA indireto.

Para avaliação da produção de anticorpos após injeção com a construção vacinal contendo o gene *virB9*, o antígeno VirB9r foi adsorvido (2µg/mL) em placas de poliestireno de 96 poços (Costar® 3590), diluídos em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 (0,5 µL/100 µL/poço) por 16 horas à 4°C em câmara úmida.

Para a detecção de IgG, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS/0,05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) e incubadas com 200 µL/poço de (PBS-T e 5% de leite bovino em pó), por 1 hora a 37°C. Os soros foram diluídos (1:100) em PBST com 1% de leite bovino em pó. Como controle positivo foi feito um *pool* dos soros dos animais do grupo VirB9r-Montanide, que já haviam recebido as 3 doses da proteína recombinante. O soro controle negativo foi feito com um *pool* dos soros dos animais do grupo PBS, que também já haviam recebido as 3 doses de PBS. Após a incubação, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T, e foram adicionados, em duplicata, 100 µL/poço de cada soro diluído e foram incubados por 1 hora a 37°C. As placas foram então lavadas por cinco vezes com PBS-T, e foi adicionado 100 µL/poço de conjugado anti-IgG mouse com peroxidase (Sigma- Aldrich®), diluído em PBST a 1:10.000. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, e após cinco lavagens com PBS-T, 95 µL/poço do cromógeno/substrato o-fenilenediamina (OPD) (Sigma-Aldrich®), diluído conforme instruções do fabricante. As placas foram então incubadas por 20 minutos protegidas da luz, para ocorrer a reação colorimétrica, e foram paradas pela adição de Ácido Sulfúrico a 3 M. A densidade óptica (DO) foi lida com absorvância de 490 nm em espectrofotômetro.

Para avaliar a produção de anticorpos, por meio de ELISA indireto, da construção vacinal contendo o gene *virB12*, o antígeno VIRB12r foi adsorvido (1µg/mL) conforme descrito anteriormente, com a alteração da diluição dos soros que foram diluídos a 1:200.

Para detecção de IgG1 e IgG2a, seguiu-se o mesmo procedimento inicial de adsorção dos antígenos VirB9r (2 µg/mL) e VirB12r (1 µg/mL) separadamente. Após as lavagens dos poços, o bloqueio de sítios inespecíficos foi feito em câmara úmida por duas horas a temperatura ambiente, com 200 µL de PBS contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (PBS-SFB) e após duas lavagens com PBST. Foi realizada a titulação de todos os soros, para verificar a diferença significativa de IgG1 e IgG2a. Os poços receberam 100 µL das amostras de soros diluídas, em PBS-SFB. Após incubação das placas por uma hora a temperatura ambiente e quatro lavagens com PBS-T, os poços receberam anticorpos biotinizados anti-IgG1 e anti-IgG2a (BD Pharmingen) diluídos a 1:500 e incubadas por 2 horas, seguido de seis lavagens com PBS-T e incubação de 45 minutos com estreptoavidina conjugada a peroxidase (R&D Systems). As placas foram lavadas oito vezes. Os poços receberam então 100 µL de substrato OPD diluído em água destilada. Passados 20 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5N) e a densidade óptica (DO) foi lida com absorvância de 490 nm em espectrofotômetro.

## 2.8. Avaliação da resposta celular

Quinze dias após a terceira imunização, cinco camundongos de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e esplenectomizados

para obtenção dos esplenócitos a serem cultivados para avaliação da resposta imune celular.

Os baços foram macerados em 2 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®). Em placas de 24 poços foram aplicadas  $2 \times 10^6$  esplenócitos/poço, diluídos em meio RPMI suplementado 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, e 50 mM 2-ME (Sigma Immunochemicals®). Os esplenócitos de cada animal foram estimulados com 5 µg/mL de VirB9r e VirB12r, separadamente, e 5 µg/mL de Concanavalina A (ConA). Um controle negativo, composto pelo meio suplementado apenas, para os esplenócitos de cada animal também foi utilizado, onde não foi adicionado nenhum agente estimulante. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida, por 48 horas, em meio RPMI suplementado. Após esse período o sobrenadante das culturas dos esplenócitos foram coletados e armazenados a -20 °C até o uso.

Os sobrenadantes foram utilizados para determinar a concentração das citocinas interferon-gama (IFN-γ) e interleucina 10 (IL-10) nas culturas de esplenócitos de cada animal. Para isso foi realizado o ELISA de captura o kit comercial BD OptEIA™ (BD Biosciences®), diferenciando apenas no uso do cromógeno que foi o SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich®). A DO foi lida com absorvância de 490 nm em espectrofotômetro.

## 2.9. Análise de proteção

Cinco animais de cada grupo foram desafiados, via intraperitoneal, 20 dias após a terceira imunização com uma dose de 100µL contendo  $2 \times 10^5$  UFC da amostra selvagem de *B. abortus* S2308 em PBS. Quatro semanas após o

desafio, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus baços foram removidos assepticamente. Cada baço foi macerado em tampão PBS e as diluições semeadas em TSA foram cultivadas durante três dias a 37°C com CO<sub>2</sub> a 10%. O número de UFC por baço foi determinado para cada animal e os resultados foram expressos como a média Log de UFC ± Desvio Padrão (DP) por grupo.

#### 2.10. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados de proteção foram realizadas por meio dos testes Anova e Tukey (com  $P < 0,05$  quando houve diferença significativa). Estes mesmos testes juntamente com o teste de Šídák (com  $P < 0,0001$  quando houve diferença significativa) foram utilizados para avaliação da diferença entre os grupos, dos resultados dos ELISAS indiretos e dos ELISAS de captura. Para isso foi utilizado o programa *GraphPad Prism*, versão 6 para o Windows (GraphPad®). O mesmo programa foi utilizado para confecção dos gráficos.

### 3. Resultados

3.1. Construção das vacinas de DNA (pcDNAvirB9, pcDNAvirB12) e expressão de RNAm dos genes *virB9* e *virB12* em células eucarióticas *in vivo*

A integridade das vacinas de DNA pcDNA*virB9* e pcDNA*virB12* foi confirmada por análise de restrição e sequenciamento. A presença de RNAm

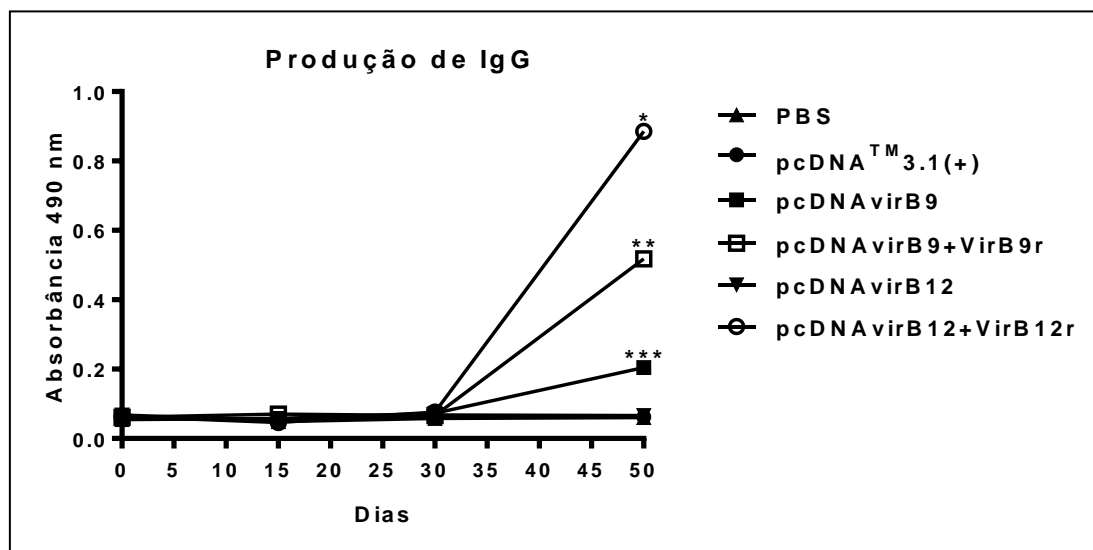
dos genes *virB9* e *virB12* foi observada *in vivo*, por meio da RT-PCR, demonstrando a eficiência do funcionamento do plasmídeo vacinal em células eucarióticas (dados não mostrados).

### 3.2. Resposta imune humoral

A produção de IgG e de suas subclasses, IgG1 e IgG2a, de cada camundongo foi avaliada por ELISA indireto, tendo como antígeno as proteínas VirB9r e VirB12r, separadamente. Para analisar a progressão da indução de IgG nos grupos, foi necessário coletar amostras de sangue, para obtenção dos soros, na pré-imunização (dia 0), e no pré-desafio (dias 15, 30 e 50), totalizando quatro coletas.

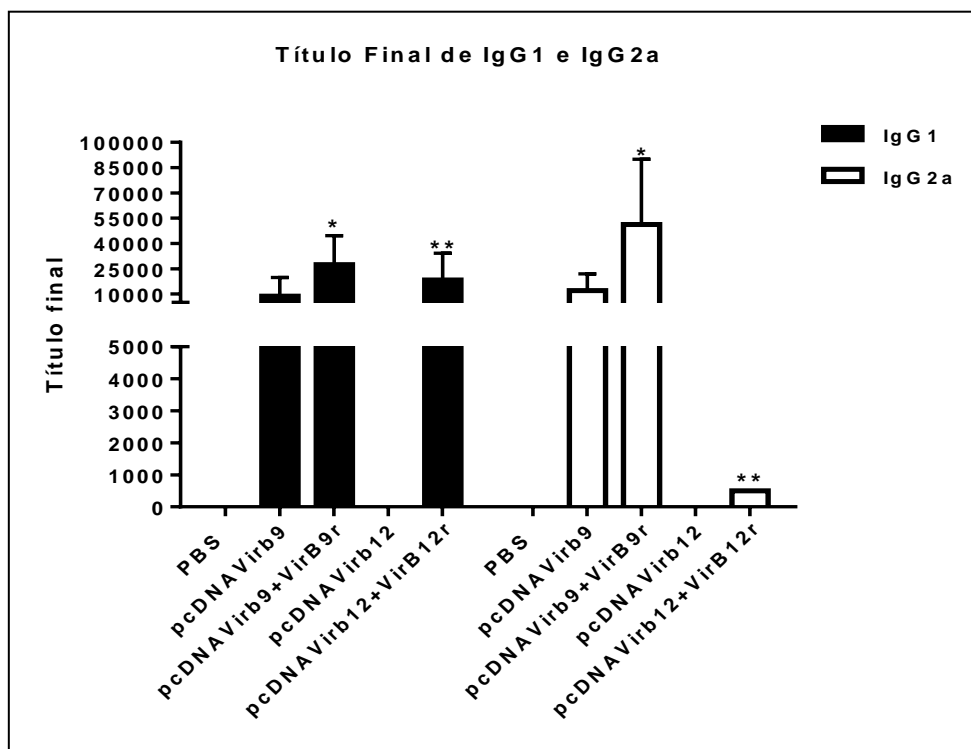
Com base nas médias de densidade óptica foi possível observar que a produção de anticorpos IgG estimulados pelos candidatos a imunógenos pcDNA*virB9*, pcDNA*virB9*-VirB9r e pcDNA*virB12*-VirB12r obtiveram níveis significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparado a resposta induzida pelos demais grupos após a terceira inoculação. Quando os camundongos foram imunizados com pcDNA*virB12*, não foi observada a produção de IgG, igualmente aos grupos controles PBS e pcDNA3.1.(+) (Fig. 1)





**Fig. 1. Cinética de IgG específico anti-VirB9r e anti-VirB12r de camundongos imunizados.** Soros obtidos nos dias 0, 15, 30 e 50 antes do desafio foram diluídos à 1:100 e usados no teste de ELISA. Cada ponto representa a média da Densidade óptica (DO) de anticorpos. A significância estatística está representada por \* Grupo pcDNAvirB12+VirB12r comparado com os grupos controles, \*\* Grupo pcDNAvirB9+VirB9r comparado com os grupos controles e \*\*\* Grupo pcDNAvirB9 comparado com os grupos controles  $P < 0,005$ . Grupos controles imunizados PBS e pcDNA 3.1(+).

A indução de IgG1 e IgG2a foi determinada com os soros obtidos da coleta no 50º dia. A Fig. 2 representa o resultado dos níveis dessas subclasses, um dia antes do desafio. Os grupos pcDNAvirB9+VirB9r e pcDNAvirB12+VirB12r obtiveram níveis significativos ( $P < 0,05$ ) de IgG1. Para o isotipo IgG2a somente o grupo pcDNAvirB9+VirB9r obteve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado aos outros grupos. Quando comparadas as subclasses entre si, houve diferença significativa nos grupos pcDNAvirB9+VirB9r e pcDNAvirB12+VirB12r, com predomínio de IgG2a e IgG1, respectivamente.

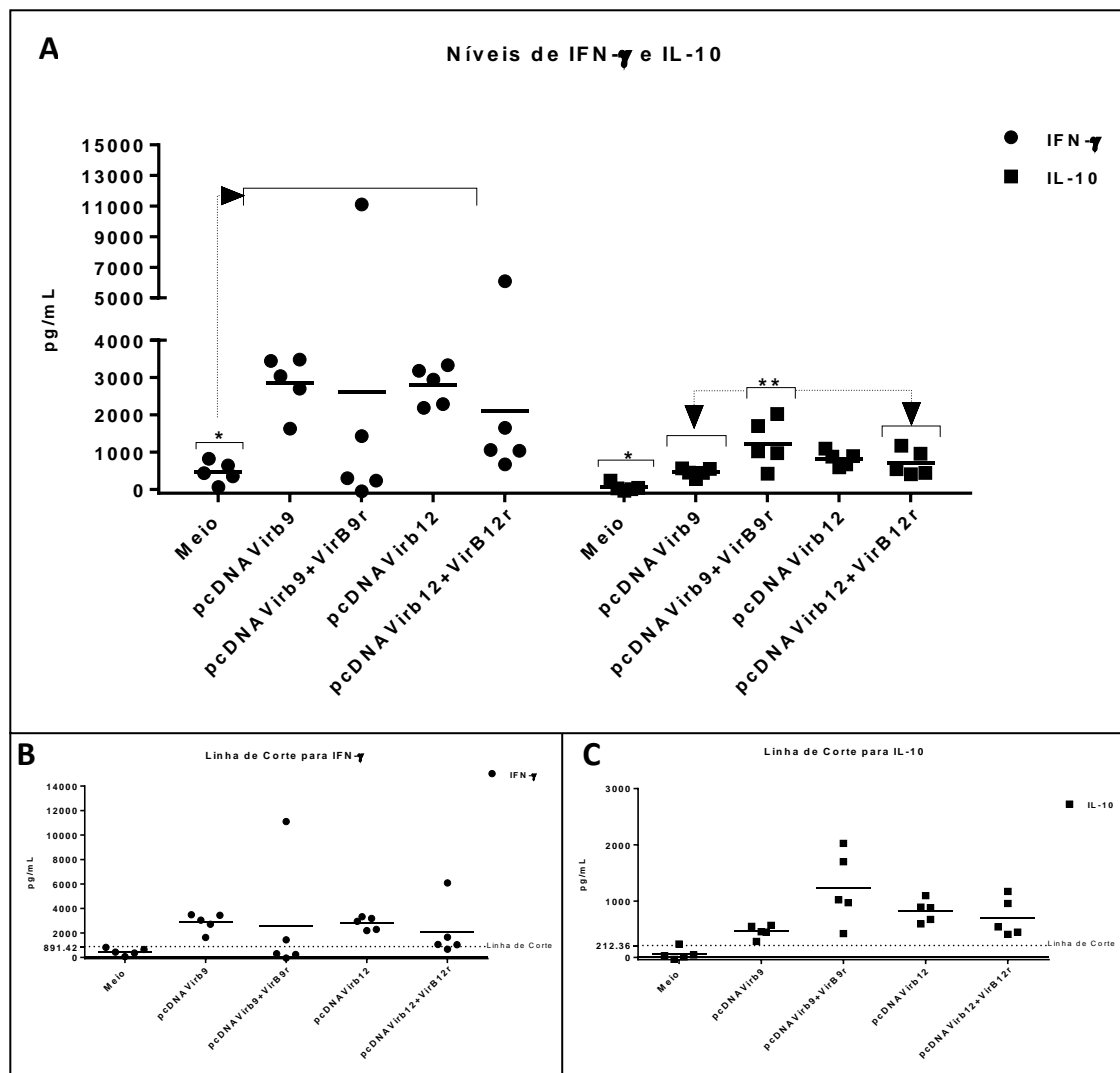


**Fig. 2. Indução de IgG1 e IgG2a específicos anti-VirB9r e VirB12r de camundongos imunizados.** A indução de IgG1 e IgG2a foi determinada com os soros obtidos da coleta do dia 50. Cada barra representa a média da DO de anticorpos. A significância estatística ( $P < 0,0001$ ) está representada por \* Comparativo entre os níveis de IgG1 e IgG2a para o grupo pcNDAvirB9+VirB9 e \*\* Comparativo entre os níveis de IgG1 e IgG2a para p grupo pcNDAvirB12+VirB12..

### 3.3. Resposta imune celular

O perfil das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi determinado por ELISA de captura, utilizando o sobrenadante da cultura de esplenócitos. Esses foram estimulados, anteriormente, com as proteínas VirB9r e VirB12r, separadamente. Na Fig. 3A, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos vacinais para IFN- $\gamma$ . Entretanto, para IL-10 o grupo pcDNA *virB9*+VirB9r apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado com os grupos pcDNA *virB9* e

pcDNA*VirB12*+*VirB12r* (Fig. 3A). Na Fig. 3B e 3C estão representadas os pontos de corte para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10.



**Fig. 3. Níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos camundongos imunizados.** O perfil de produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi determinado por ELISA de captura, utilizando o sobrenadante da cultura de esplenócitos. Esses foram estimulados, anteriormente, com as proteínas *VirB9r* e *VirB12r*, separadamente. Cada barra representa a média da quantidade de citocinas (pg/mL) no sobrenadante das culturas de esplenócitos. \* Houve diferença significativa dos grupos imunizados comparados ao meio de cultivo e \*\* Houve diferença significativa entre os grupos marcados ( $P < 0,05$ ). (A) Níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos dos camundongos imunizados com as candidatas vacinais. (B) Linha de corte para IFN- $\gamma$  e (C) Linha de corte para IL-10.

### 3.4. Estudos de proteção

#### 3.4. Estudos de proteção

Duas semanas após o desafio com a cepa virulenta *B. abortus* S2308, o nível de infecção de cada camundongo foi avaliado por determinação do número de UFC no baço. O grupo de camundongos injetados com PBS obtiveram a maior contagem de bactérias. B19 (vacina controle) reduziu o número de UFC no baço e, induziu 1,04 unidades de proteção contra o desafio de *B. abortus*, com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo PBS e demais grupos vacinais testados (Tabela 3). Nenhum dos grupos testes avaliados foi capaz de induzir proteção como controle.

**Tabela 3.** Análise da proteção de camundongos desafiados com  $2 \times 10^5$  UFC de *B. abortus* S2308, após imunização com formulações de vacinas de DNA e booster com proteína recombinante

Vacina	Log <sub>10</sub> de UFC da <i>B. abortus</i> S2308 no baço (média ± DP) <sup>a</sup>	Unidades de proteção <sup>b</sup>
PBS	5,87 ± 0,15	
B19	4,83 ± 0,61	1,04*
pcDNA 3.1 (+)	5,64 ± 0,15	0,23
pcDNAvirB9	5,74 ± 0,19	0,13
pcDNAvirB12	5,77 ± 0,31	0,10
pcDNAvirB9 + VirB9r	5,52 ± 0,25	0,35
pcDNAvirB12 + VirB12r	5,64 ± 0,22	0,23

<sup>a</sup> O número de bactéria no baço (UFC/baço) é representado como a média do log<sub>10</sub> de UFC ± DP por grupo.

<sup>b</sup> Unidades de proteção foram obtidas pela subtração da média do log de UFC/baço dos grupos imunizados com as formulações vacinais pela média do log/UFC do grupo controle imunizado com PBS.

\*  $P < 0,05$ , significativo comparado ao grupo controle PBS e demais grupos.

#### 4. DISCUSSÃO

As vacinas atuais contra *B. abortus* têm suas limitações e para superá-las é necessário gerar e testar novas vacinas candidatas, entre elas estão as formulações DNA, que são capazes de gerar resposta imune humoral e celular em modelos animais [12]. As vacinas de DNA induzem preferencialmente resposta do tipo Th1 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> [13, 14]. Neste estudo avaliou-se a resposta imune induzida e proteção em camundongos inoculados com os DNAs plasmidiais pcDNAvirB9 e pcDNAvirB12, seguidas de um *booster* das respectivas proteínas recombinantes VirB9 e VirB12.

Duas estratégias de imunização foram utilizadas (a) três imunizações intramuscular das vacinas de DNA e (b) duas imunizações intramuscular das vacinas de DNA seguida de um *boost* com as respectivas proteínas recombinantes administradas subcutaneamente.

Nos resultados de resposta humoral observou-se que a vacina pcDNAvirB9 foi hábil para elicitar IgG total tanto sozinha como com o *booster* de VirB9r, cinquenta dias após a primeira imunização, sendo que a formulação com o *booster* apresentou DO superior comparada à vacina de DNA somente. A vacina pcDNAvirB12+VirB12r elicitou significativamente maior resposta de IgG total, comparada às vacinas pcDNAvirB9 e pcDNAvirB9+VirB9r. A vacina pcDNAvirB12 sem *booster* não elicitou resposta de IgG total, igualmente aos grupos controles PBS e pcDNA3.1(+). As vacinas de DNA seguidas do *booster* com as proteínas recombinantes elicitarão maiores repostas de ambas subclasses IgG1 e IgG2a. Sendo que pcDNAvirB12+VirB12r induziu títulos significativamente maiores de IgG1 comparado à IgG2a, diferentemente de

pcDNA*VirB9+VirB9r* que induziu títulos significativamente maiores de IgG2a comparado à IgG1. A resposta celular tem sido considerada como a mais importante no controle à infecção por *Brucella* spp [15]. O papel dos anticorpos tem sido abordado como responsáveis pela opsonização da bactéria o que resulta no aumento da captação desta pelos macrófagos [16].

O perfil da resposta imune celular induzida em camundongos pelas vacinas pcDNA*VirB9* e pcDNA*VirB12*, com e sem *booster*, foram avaliadas pelos níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em cultura de esplenócitos, estimulada com as proteínas *VirB9r* e *VirB12r*. Todas as vacinas testadas induziram maiores níveis de IFN- $\gamma$  do que IL-10, indicando uma resposta do tipo Th1. O que se observou é que as vacinas de DNA sem o *booster*, induziram níveis mais altos de IFN- $\gamma$  do que as com o booster com proteína, inclusive, a vacina pcDNA*VirB12*, sem o *booster* de proteína, que não induziu a produção de IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a.

A capacidade protetora das vacinas pcDNA*VirB9* e pcDNA*VirB12*, com e sem *booster*, foi avaliada em camundongos BALB/c. Somente o grupo vacinado com a vacina comercial B19 induziu proteção significativa quando comparada ao grupo PBS.

Com base neste estudo, visto a não obtenção de proteção das vacinas testadas, pode-se vislumbrar testes destas vacinas quanto a ajustes em doses e formas de entrega em estudos posteriores. O sucesso das vacinas de DNA depende da habilidade da entrega do material genético em sítios específicos. Devido a isto, os polímeros catiônicos sintéticos ou naturais (carregados positivamente) têm sido amplamente usados para carrear DNA ou siRNA

(ambos carregados negativamente) pois, condensam o material genético em pequenas partículas, facilitando a internalização celular via endocitose por meio de interações eletrostáticas, com sítios aniônicos na superfície das células. Nanopartículas DNA-quitosana podem carrear fragmentos grandes de DNA e ainda permanecer na nanoescala. Essa ligação protege o DNA de uma degradação por nucleases. Outras propriedades superficiais como a mucoadesividade da quitosana facilitam o seu transporte para o interior das células [17].

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] A.V.M.J. Carvalho Neta, M.N. Xavier, T.A. Paixão, A.P. Lage, R.L. Santos. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J*, 184 (2010), pp. 146–155.
- [2] Corbel MJ. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva, Switzerland: WHO Press, World Health Organization. 2006
- [3] Cassataro J, Estein SM, Pasquevich KA, Velikovskiy CA, Barrera S, Bowden R, et al. Vaccination with the recombinant *brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun*. 2005;73:8079–8088.
- [4] JAIN, S.; AFLEY, P.; DOHRE, S. K.; SAXENA, N.; KUMAR, S. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine*, n. 32, v. 35, p. 4537-42. 2014doi: 10.1016/j.vaccine.2014.
- [5] ROUOT, B; ALVAREZ-MARTINEZ, M. T. ; MARIUS, C.; MENANTEAU, P.; GUILLOTEAU L.; BOIGEGRAIN, R. A.; ZUMBIHL, R.; O'CALLAGHAN, D.; DOMKE, N.; BARON, C. Production of the Type IV Secretion System Differs among *Brucella* Species as Revealed with VirB5- and VirB8-Specific Antisera. *Infect Immun*, v. 71, n. 3, p 1075-82. 2003.
- [6] FOULONGNE, V.; BOURG, G.; CAZEVIEILLE, C.; MICHAUX-CHARACHON, S.; O'CALLAGHAN, D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection

- model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun*, v. 68, n. 3, p. 1297-1303. 2000.
- [7] CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol.* v. 40, n. 2, p. 294-305. 2001.
- [8] ROLÁN H. G.; HARTIGH, A. B.; KAHL-MCDONAGH M.; FICHT T.; ADAMS L. G.; TSOLIS R. M. VirB12 Is a Serological Marker of Brucella Infection in Experimental and Natural Hosts. *Clin Vaccine Immunol*, v. 15, n. 2, p. 208-214. 2008.
- [9] ELISEI, C.; SANTOS, L. R.; BASTOS, R; FARIAS, T. A.; RAMOS, C. A. N.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; ROSINHA, G. M. S. Clonagem e Expressão do Gene virB9, Proteína do Sistema de Secreção Tipo IV, de *Brucella abortus*. Comunicado Técnico 115. p. 1-5. 2009. ISSN 1983-9731
- [10] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- [11] BASTOS, R.; SOARES, C. O.; ELISEI, C.; MUNHOZ, A. L. M; BEZERRAI, N. L; CAITANO, M. A.; ROSINHA, G. M. S. Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* vol.32 no.10. 2012.
- [12] YANG, X., SKYBERG, J.A., CAO, L., CLAPP, B., THORNBURGT, PASCUAL, D.W., 2012. Progress in Brucella vaccine development. *Front. Biol.* 8, 60–77.
- [13] KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune response to DNA vaccine. *Cellular and Molecular Life Sciences.* v. 55, p.751-701, 1999.
- [14] NAGATA, T.; AOSHI, T.; UCHUIMA, M.; SUZUKI, M.; KOIDE, Y. Cytotoxic T lymphocyte, and helper T lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology.* v.23, n.2, p.93-106, 2004.
- [15] EZE MO, YUAN L, CRAWFORD RM, PARANAVITANA CM, HADFIELD TL, BHATTACHARJEEAK, ET AL. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infect Immun.* n. 68. p. 257–263. 2000.
- [16] BALDWIN CL, GOENKA R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection. *Crit Rev Immunol.* N.26. p.407–442. 2006.



- [17]CAMBRIDGE C. D.; SINGH S. R.; WAFFO A. B.; FAIRLEY S. J.; DENNIS V. A. Formulation, characterization, and expression of a recombinant MOMP *Chlamydia trachomatis* DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 1759–1771, 2013.

## ARTIGO 2

Normas da revista Vaccine

### **Imunogenicidade e proteção de VIRB9 e VIRB12 recombinantes de *Brucella abortus***

Renata Ribeiro Bastos Pereira<sup>a</sup>, Grácia Maria Soares Rosinha<sup>b,\*</sup>, Lenita Ramires dos Santos<sup>b</sup>, Cleber Oliveira Soares<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senator Filinto Müller, nº 2443 – Caixa postal 549, Vila Ipiranga, Campo Grande - MS, Brasil

<sup>b</sup> Embrapa Gado de Corte – Sanidade Animal – Laboratório de Engenharia Genética Animal, Avenida Radio Maia , nº 830, Vila Popular, Campo Grande - MS, Brasil.

\* Autor correspondente: gracia.rosinha@embrapa.br RESUMO

#### **RESUMO**

A brucelose é uma doença que afeta várias espécies de vida domésticas e selvagens, e é causada pela bactéria do gênero *Brucella* spp. Tendo em vista as graves consequências econômicas e médicas relacionadas à brucelose, grandes os esforços, através da utilização de vacinas, têm sido feito para evitar a infecção por este patógeno. As respostas imunes mediadas por células envolvendo o IFN- $\gamma$  e células T CD4+ e T CD8+ são necessárias para eliminar *Brucella* spp.. O operon *virB* [que codifica o sistema de secreção tipo IV ( T4SS )] foi referido como um importante fator de virulência, que desempenha um papel importante na mediação de sobrevivência intracelular e manipulação de resposta imune do hospedeiro durante a infecção com *Brucella* spp. Neste estudo, os genes *virB9* e *virB12* foram avaliados como imunógenos na forma de vacina de subunidade e a prototoção gerada pelas mesmas foram avaliadas após o desafio. A detecção de IgG específico no soro dos camundongos imunizados, bem como suas subclasses IgG1 e IgG2a, foram avaliadas por ELISA indireto. O candidato a imunógenos VirB12 induziu a produção de IgG e o candidato VirB9 induziu a produção de IgG2a, ambos obtiveram níveis significativos (p,0,05). A resposta imune induzida pela formulação vacinal VirB9r foi capaz de proteger camundongos após o desafio com *B. abortus* virulenta (p<0,05). Essa formulação pode ser promissora contra a brucelose em bovinos.

*Palavras-chave: Brucella abortus; Brucelose bovina; proteína recombinante; resposta imune, virB.*

## **INTRODUÇÃO**

A brucelose é uma zoonose presente no mundo todo, com exceção de alguns países desenvolvidos que conseguiram erradicá-la ou pelo menos reduzir as taxas de prevalência. Em países em desenvolvimento ainda se trabalha para alcançar esta meta. É uma doença infecciosa crônica causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella* que acometem várias espécies de animais domésticos e silvestres, além de humanos [1].

A prevalência de focos da brucelose bovina em propriedades pecuárias no Brasil varia de 0,32% a 41,5% [2]. O Estado de Mato Grosso do Sul apresentou o maior índice de fazendas que apresentaram pelo menos um animal reagente à prova sorológica, chegando a ser da ordem de 41,5% [3].

Estudos realizados em 2013 demonstraram que o prejuízo total da brucelose no Brasil foi estimado em U\$ 448 milhões de dólares americanos, que equivale, hoje, a cerca de R\$ 1,005 bilhão de reais. A cada 1% de variação na prevalência, estima-se o incremento no prejuízo de U\$ 77,85 milhões de dólares ou R\$ 174,70 milhões de reais no custo da brucelose bovina no Brasil. As perdas por fêmea infectada, com idade superior a 24 meses, foram estimadas em R\$ 473,50 e R\$ 255,20 em rebanhos de leite e de corte, respectivamente [3].

Devido à importância para a saúde pública da brucelose e os danos que ela causa para a indústria pecuária, muito esforço tem sido dispendido para controlar e erradicar a doença em bovinos. Atualmente, a imunização contra infecções contra *B. abortus* é amplamente realizada por administração das vacinas vivas atenuadas B19 e RB51 [4]. A amostra vacinal B19 provou ser eficaz contra infecções de *B. abortus* em bovinos, erradicando essa doença em diversos países. Apesar das vacinas disponíveis serem eficazes no controle da brucelose, eles têm numerosas desvantagens, tais como a interferência com os testes de diagnóstico, são patogênicas para os humanos e apresentam potencial de causar aborto em fêmeas grávidas [5].

Com o objetivo de produzir uma vacina segura aos manipuladores e aos animais vacinados e que o seu uso não interfira nos testes de diagnósticos, várias são as possibilidades de desenvolvimento de novas vacinas contra a brucelose animal: vacinas de DNA [6, 7], vacinas vivas atenuadas geneticamente [8,9], vacinas de subunidades [10], expressão de um antígeno protetor sobre uma cepa vacinal de *Brucella* menos virulenta [11] e, vacinação com expressão de antígenos de *Brucella* em *Escherichia coli* [12].

As vacinas de subunidade vêm ganhando preferência entre os grupos de pesquisa, pela vantagem destas eliminarem as preocupações associadas à segurança das vacinas vivas, por meio da patogenicidade residual [13]. As vacinas de subunidades, como as proteínas recombinantes, são promissoras candidatas, porque apresentam menor risco biológico, não são virulentas, não possuem risco de causar infecção nos animais vacinados, podem ser produzidas com alto rendimento e pureza e podem ser manipuladas para

maximizar as características desejadas e minimizar as indesejadas e, além disso, elas são mais seguras para os manipuladores [14].

Assim, objetivou-se neste estudo, avaliar em camundongos BALB/c, duas vacinas de subunidade contra *B. abortus* quanto a resposta imune humoral e proteção.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Cepas bacterianas**

As cepas de *B. abortus* B19 e S2308 foram aerobicamente crescidas em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (BD Biosciences®) líquido por 72 horas a 37 °C, aliqüotadas em glicerol 20% e estocadas a -80 °C. Quando necessário, uma alíquota era utilizada para estriamento e crescimento de colônias por 72 horas a 37 °C em placas de petri contendo meio Tryptic Soy Agar (TSA).

### **2.2. Animais**

Camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas de idade) foram obtidas do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O projeto para o desenvolvimento deste estudo foi submetido, avaliado e provado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sendo certificado com o registro nº 360/2011.

### 2.3. Produção e purificação das proteínas recombinantes VirB9r e VirB12r

As construções plasmidiais pET47(b)-virB9 e pET47(b)-virB12, previamente estocadas em *E. coli* Rosetta-gami, armazenadas a -80°C em glicerol 20%, no acervo do Laboratório de Engenharia genética Animal da Embrapa Gado de Corte, foram utilizadas para obtenção das proteínas recombinantes VirB9r e VirB12r.

Após o cultivo dos clones em meio LB ágar com 25 µg/mL de canamicina e 36 µg/mL de cloranfenicol, a indução da expressão dos genes foi realizada com a adição de 1 mM de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) por 4 horas a 37°C, sob agitação constante e foram avaliadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, corado com azul brilhante de Comassie.

A purificação da proteína VirB9r foi realizada por eletroeluição, conforme metodologia descrita por ELISEI e colaboradores [15] e, a purificação da proteína VirB12r foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em coluna de níquel (His Trap-GE), conforme metodologia descrita pelo fabricante.

Após a purificação, as proteínas foram dialisadas em PBS 1X pH 7,2 por 72 horas em câmara fria e quantificadas pelo método de Lowry [16].

A qualidade da purificação foi avaliada por SDS-PAGE 12%, corado com azul brilhante de Comassie, bem como por Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-6-histidinas (Sigma-Aldrich®), que reconhece uma porção de seis histidinas fusionadas à VirB9r e VirB12r.

As proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas posteriormente como vacinas de subunidades e, nos sistemas de avaliação da resposta imune humoral elicitada por estas vacinas.

#### 2.4. Imunização

Os camundongos foram divididos em 5 grupos de 5 animais, correspondentes aos grupos que receberam: VirB9r, VirB12r, Montanide, PBS e B19 (vacina comercial) (Tabela 1). As amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção do plexo retro orbital um dia antes de cada imunização e um dia antes do desafio para obtenção do soro.

**Tabela 1**

Programa de imunização dos camundongos

Grupos	Esquema de Imunização (Dias)		
	0	15 <sup>o</sup>	30 <sup>o</sup>
VirB9r	30 µg (SC)	30 µg (SC)	30 µg (SC)
VirB12r	30 µg (SC)	30 µg (SC)	30 µg (SC)
Montanide	70 µL (SC)	70 µL (SC)	70 µL (SC)
B19			1x10 <sup>5</sup> (IP)*
PBS	100 µL (IM)	100 µL (IM)	100 µL (IM)

(IM): Intramuscular. (SC): Subcutânea. (IP): Intraperitoneal.

\* Os camundongos foram vacinados com 1X10<sup>5</sup> UFC com a vacina comercial B19.

#### 2.5. Detecção de anticorpos utilizando a técnica de ELISA

Os soros dos animais foram avaliados para a detecção da resposta humoral obtendo-se os níveis de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2a, por

meio de ELISA indireto. Os valores de corte para os ensaios foram determinados a partir da média da Densidade Ótica (DO) do grupo controle (PBS).

## 2.6. Estudos de proteção

Todos os animais foram desafiados, via intraperitoneal, 20 dias após a terceira inoculação com uma dose de 100 $\mu$ L contendo  $2 \times 10^5$  UFC da amostra selvagem de *B. abortus* S2308 em PBS. Quatro semanas após o desafio, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical os seus baços foram removidos assepticamente. Cada baço foi macerado em tampão PBS e as diluições semeadas em TSA foram cultivadas durante três dias a 37 ° C com CO<sub>2</sub> a 10%. O número de UFC por baço foi determinado para cada animal e os resultados foram expressos como a média Log de UFC  $\pm$  Desvio Padrão (DP) por grupo.

## 2.7. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados de proteção foram realizadas por meio dos testes Anova e Tukey (com  $P < 0,05$  quando houve diferença significativa). Estes mesmos testes juntamente com o teste de Šídák (com  $P < 0,0001$  quando houve diferença significativa) foram utilizados para avaliação da diferença entre os grupos, dos resultados dos ELISAS indiretos e dos ELISAS de captura. Para isso foi utilizado o programa *GraphPad Prism*, versão 6 para o



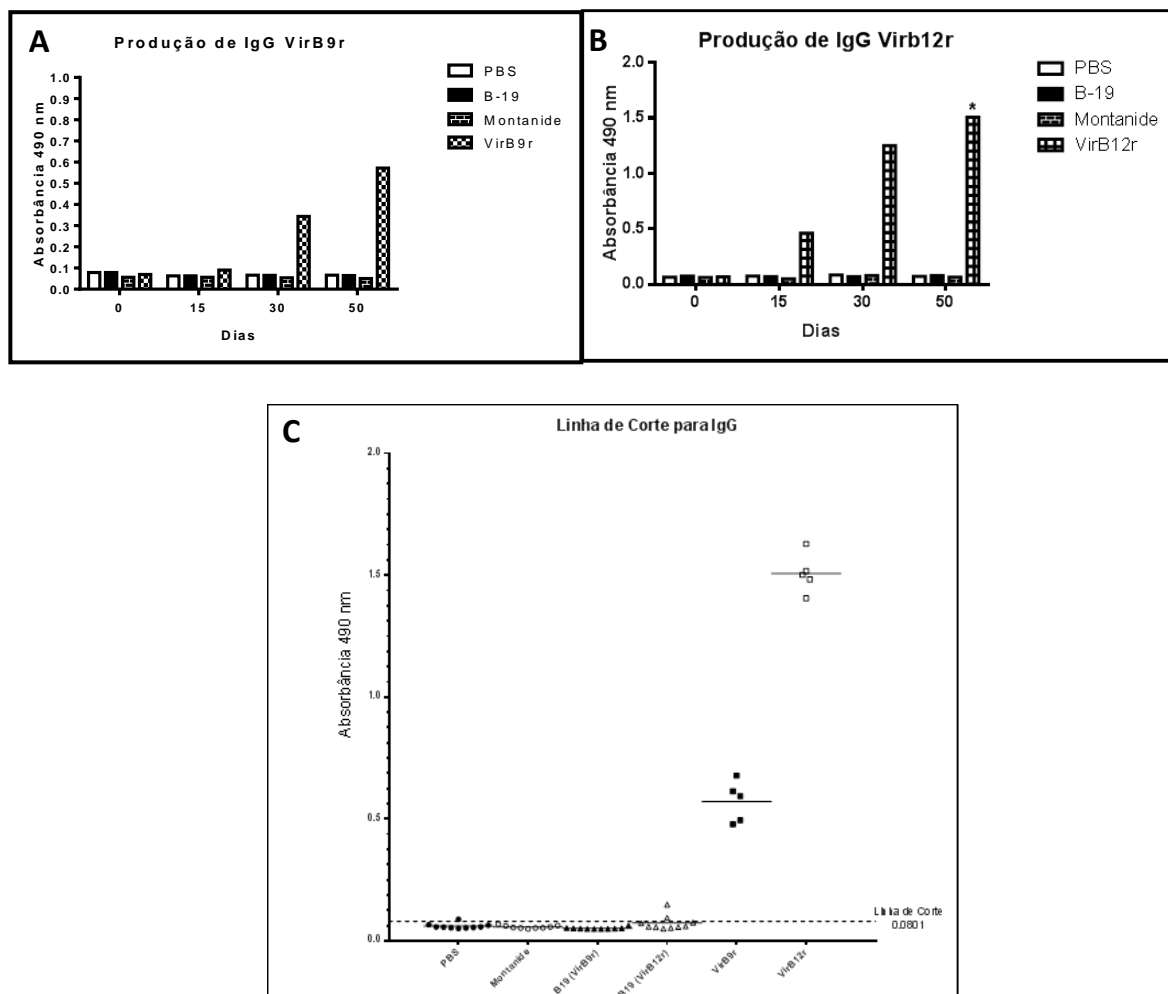
Windows (GraphPad®). O mesmo programa foi utilizado para confecção dos gráficos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Resposta imune humoral

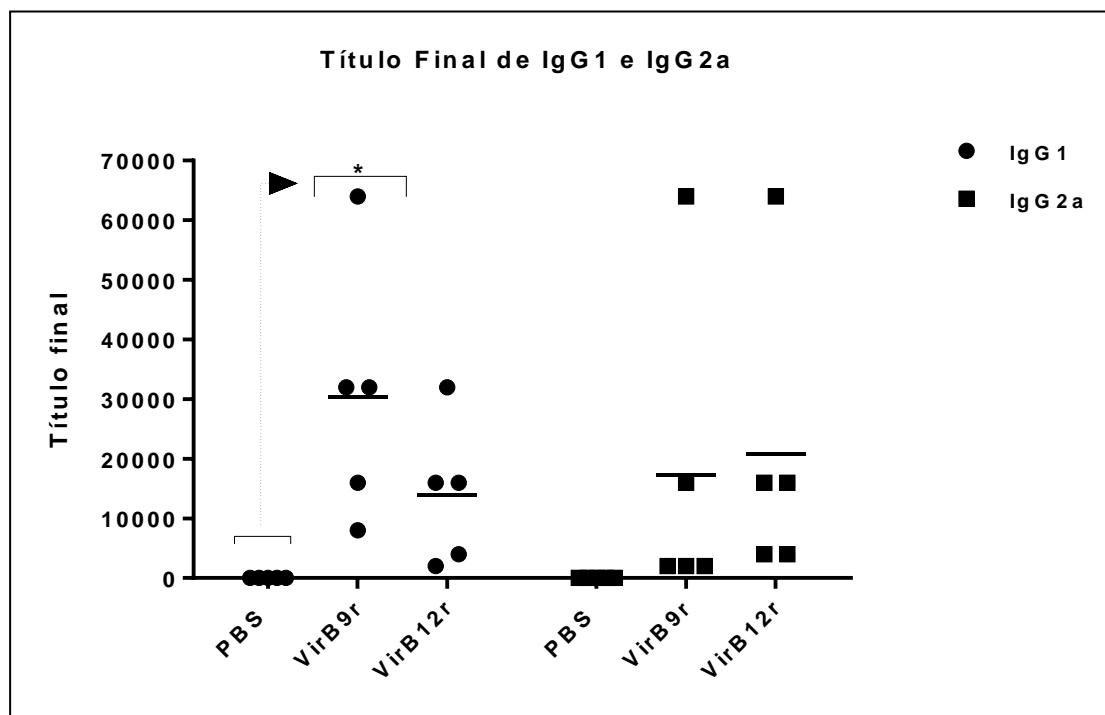
Os níveis de IgG e de suas subclasses, IgG1 e IgG2a, de cada camundongo foram avaliados por ELISA indireto, tendo como antígeno as proteínas VirB9r e VirB12r, separadamente. Para analisar a progressão da indução de IgG nos grupos, foi necessário coletar amostras de sangue, para obtenção dos soros, na pré-imunização (dia 0) e nos pré-desafios (dias 15 e 30 e 50), totalizando quatro coletas. Na Fig. 1, observa-se a cronologia das imunizações a partir da média da DO de cada grupo e o comparativo entre a média dos grupos. Com base nas médias da DO foi possível observar que a produção de anticorpos IgG estimulados pelo candidato a imunógeno VirB12r obteve níveis significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparado a resposta induzida pelos demais grupos após a terceira inoculação.

No dia 30 houve um significativo aumento na indução de IgG no grupo imunizado com a proteína VirB12r. Quando comparado aos outros grupos, obteve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1B). Não foram identificados níveis de IgG significativos no grupo VirB9r (Fig. 1A).



**Fig. 1.** Cinética de IgG específico anti-VirB9r e VirB12r de camundongos imunizados. Soros obtidos nos dias 0, 15, 30 e 50 antes do desafio foram diluídos à 1:100 e usados no teste de ELISA. (A) Comparação da do grupo imunizado com VirB9r com os grupos controle; (B) Comparação da do grupo imunizado com VirB12r com os grupos controle e (C) Linha de corte para IgG. Cada ponto representa a média da DO de anticorpos. A significância estatística está representada por \* $P < 0,005$ , comparada com os grupos controles PBS e Montanide.

A Fig. 2 representa o resultado dos níveis dessas subclasses, um dia antes do desafio. Neste estudo, a avaliação das subclasses IgG1 e IgG2a nos animais dos grupos imunizados, e foi possível observar que os níveis de IgG1 ( $P < 0,05$ ) estavam visivelmente maiores no grupo VirB9r em relação aos outros grupos, apresentou alta reação específica para VirB12r, utilizada como antígenos no ELISA indireto.



**Fig 2.** Detecção por ELISA indireto das subclasses IgG1 e IgG2a específicos para os antígenos VirB9r e VirB12r, nos camundongos imunizados. Níveis de IgG1 e IgG2a nos soros dos camundongos no dia anterior ao desafio (dia 50) com *B. abortus*. O símbolo \*, demonstra diferença significativa ( $P < 0,05$ ), quando comparadas as médias de cada grupo para cada isotipo.

A análise das amostras antes do desafio mostrou que os animais que receberam o candidato a imunógeno VirB9r apresentaram respostas de IgG1 quando comparado aos demais animais do grupo controle (PBS) e, quando comparado ao grupo VirB12r (Fig. 2). No entanto, a comparação das respostas, para IgG2a mostra que os grupos que receberam as inoculações com os candidatos a imunógenos não diferiram estatisticamente do grupo controle (PBS).

### 3.2. Estudos de proteção

Duas semanas após o desafio com a cepa virulenta *B. abortus* S2308, o nível de infecção de cada camundongo foi avaliado por determinação do número de UFC no baço. O grupo imunizado com a proteína VirB12r teve redução no número de UFC no baço e apresentou indução de 1,09 Unidades de Proteção (UP) contra o desafio de *B. abortus*, igual ao grupo controle positivo imunizado com a vacina comercial B19, ambos com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo PBS (Tabela 2). No grupo imunizado com a proteína VirB9r não houve indução de proteção contra *B. abortus*.

**Tabela 2**

Análise da proteção de camundongos desafiados com  $2 \times 10^5$  UFC de *B. abortus* S2308, após imunização com as proteínas VirB9r e VirB12r associadas ao adjuvante montanide

Vacina	Log <sub>10</sub> de UFC da <i>B. abortus</i> S2308 no baço (média ± DP) <sup>a</sup>	Unidades de proteção (log) <sup>b</sup>
PBS	5,87 ± 0,15	
B19	4,83 ± 0,61	1,04*
VirB9r	5,85 ± 0,22	0,02
VirB12r	4,78 ± 0,63	1,09*

<sup>a</sup> O número de bactéria no baço (UFC/baço) é representado como a média do log<sub>10</sub> de UFC ± DP por grupo.

<sup>b</sup> Unidades de proteção foram obtidas pela subtração da média do log de UFC/baço dos grupos imunizados com as proteínas VirB9r e VirB12r, pela média do log/UFC do grupo controle imunizado com PBS.

\*  $P < 0,05$ , significativo comparado ao grupo controle PBS.

## 4. Discussão

A produção das proteínas recombinantes do Operon VirB tem sido realizada por diversos grupos de pesquisa [17, 18, 19, 20]. VirB9 e VirB12 são proteínas do sistema de secreção do tipo IV (TFSS), o qual promove a secreção ou transferência de macromoléculas, proteínas ou complexos de proteína-DNA de uma célula para outra, funções estas importantes para a sobrevivência e virulência de bactérias gram negativas [21].

Neste estudo, o uso de VirB9r e VirB12r de *B. abortus* em camundongos, emulsionadas em adjuvante Montanide, estimulou um significativo aumento na indução de IgG1 no grupo de animais inoculados com VirB9r.

Sabe-se que a utilização de adjuvantes com formulações do tipo água/óleo, como as preparações de Montanide, atuam na modulação de resposta Th1/ Th2, favorecendo preferencialmente a indução de anticorpos e citocinas do tipo Th2 [22, 23]. O estudo da reatividade de IgG1 demonstrou que houve produção significativa desta subclasse após a 4ª imunização com a proteína VirB9r em relação ao controle pré-imune. Em camundongos a troca para a subclasse IgG1 é induzida por IL-4, indicando polarização para resposta do tipo Th2.

O adjuvante Montanide ISA 70 M VG (SEPPIC) é um adjuvante desenvolvido particularmente para uso em bovinos e pequenos ruminantes. A capacidade de induzir forte resposta imune humoral e resposta celular Th1 para antígenos associados foi a característica de eleição para a inclusão deste adjuvante neste estudo [22, 24, 25]. O mecanismo de ação proposto para este adjuvante baseia-se principalmente na formação de depósito, propiciando lenta

liberação do antígeno no sítio de injeção, além da capacidade de potencialização da resposta imune pelo desenvolvimento de processo inflamatório [22, 24]. Comumente, antígenos administrados sem o uso de adjuvantes resultam em respostas imune mais fracas ou mesmo em ausência de resposta [23, 24, 25], o que define por base a necessidade de inclusão de adjuvantes em formulações vacinais, como visto na prática médica e veterinária. Um método simples foi utilizado para preparação da emulsão, garantindo a obtenção de diâmetros adequados para as partículas do adjuvante e mantendo a estabilidade da formulação vacinal [26].

Com base nos resultados obtidos no grupo de camundongos inoculados com a vacina de subunidade VirB12, foi possível observar que a esta induziu uma resposta imune a ponto de proteger camundongos contra *B. Abortus*, com proteção significativa ( $P < 0,05$ ). Essa formulação pode ser promissora contra a *B. abortus* em bovinos.

## 5. REFERÊNCIAS

- [1] GEERING, W. A.; FORMAN, J. A.; NUNN, M. J. Exotic Diseases of Animals. Aust. Gov. Publishing Service, Canberra, Australia, p. 301-306, 1995.
- [2] SANTOS, R. L.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M., PAIXAO, T. A.. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n.6, p. 759-764, 2013.
- [3] CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO,

V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 61, p.46-55, 2009.

- [4] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília: MAPA/ DAS/ DAS. 2005.
- [5] CHEVILLE N.F., OLSEN S.C., JENSEN A.E., STEVENS M.G.; PALMER M.V. Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. Am J Vet Res 57:1153-1156. 1996.
- [6] OÑATE, A. A.; VEMULAPALLI, R.; ANDREWS, E.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S.; FOLCH., H. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. Infection Immunity, v. 67, n. 2, p. 986-988, 1999.
- [7] ROSINHA, G. M. S.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V. SPLITTER, G. A.; OLIVEIRA, S. C. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when coadministered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. J. Med. Microbiol., v. 51, p.661–671, 2002a.
- [8] ROSINHA, G. M. S.; FREITAS, D.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; CAMPOS, E.; CRAVERO, S.; ROSSETI, O.; SPLITTER, G.; OLIVEIRA, S.C. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette (ABC) transporter homolog to *Rhizobium meliloti* *exsA* and its role in virulence and protection in mice. Infect. Immun., v. 70, n. 9, p. 5036-5044. 2002b.
- [9] TRANT C. G.; LACERDA T. L.; CARVALHO N. B.; AZEVEDO V.; ROSINHA G. M.; SALCEDO S. P.; GORVEL J. P.; OLIVEIRA S. C. The *Brucella abortus* Phosphoglycerate Kinase Mutant Is Highly Attenuated and Induces Protection Superior to That of Vaccine Strain 19 in Immunocompromised and Immunocompetent Mice. Infection Immunity, v. 78, n. 5, p. 2283-2291, 2010.

- [10] GHASEMI, A.; SALARI, M. H.; ZARNANI, A. H.; POURMAND, M. R.; AHMADI, H.; MIRSHAFIEY, A.; JEDDI-TEHRANI, M. Immune reactivity of *Brucella melitensis*-vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins. Iranian Journal of Microbiology, n. 5, v. 1. p.19-23, 2013.
- [11] VEMULAPALLI R.; HE Y.; BUCCOLO L. S.; BOYLE S. M.; SRIRANGANATHAN N.; SCHURIG G. G. 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 Immunity, v. 68, n. 7, p. 3927–3932, 2000.
- [12] OÑATE, A. A.; CÉSPEDES, S.; CABRERA, A.; RIVERS, R.; GONZÁLES, A.; MUÑOZ, C.; FOLCH, H.; ANDREWS, E. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. Infection Immunity, v.71, n.9, p.4857-4861, 2003.
- [13] YANG, X.; SKYBERG, J. A.; CAO, L.; CLAPP, B.; THORNBURGT, PASCUAL, D. W. Progress in *Brucella* vaccine development. Front. Biol. 8, 60–77. 2012
- [14] PASQUEVICH K. A.; IBANEZ A. E.; CORIA L. M.; GARCIA SAMARTINO C.; ESTEIN S. M.; ZWERDLING A.; BARRIONUEVO P.; OLIVEIRA F. S.; SEITHER C.; WARZECHA H.; OLIVEIRA S. C.; GIAMBARTOLOMEI G. H.; CASSATARO J. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS ONE 6:e16203 10.1371/journal.pone.0016203. 2011
- [15] ELISEI, C.; SANTOS, L. R.; BASTOS, R; FARIAS, T. A.; RAMOS, C. A. N.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; ROSINHA, G. M. S. Clonagem e Expressão do Gene virB9, Proteína do Sistema de Secreção Tipo IV, de *Brucella abortus*. Comunicado Técnico 115. p. 1-5. 2009. ISSN 1983-9731
- [16] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265–75. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4
- [17] ARAÚJO, F. R.; COSTA, C. M.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; SOUZA, I. I. F.; MELO, E.; ELISEI, C.; ROSINHA, G. M. S.; SOARES, C. O.; FRAGOSO, S. P.; FONSECA, A. H. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, n. 2, p. 186-190, 2008.



- [18] LOPEZ, J. E.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; DARK, M. J.; LEACH, S. E.; BROWN, W. C. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 2, p. 2333-2342, 2007.
- [19] VIDOTTO, M. C.; VENÂNCIO, E. J.; VIDOTTO, O. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolate from Paraná State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 2, p. 460-466, 2008.
- [20] MORSE, K.; NORIMINE, J.; PALMER, G. H.; SUTTEN, E. L.; BASZLER, T. V.; BROWN, W. C. Association and evidence for linked recognition of type IV secretion system proteins VirB9- 1, VirB9-2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 1, p. 215-227, 2012.
- [21] CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: Conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 8, n. 8, p. 354-360, 2000.
- [22] REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2008.
- [23] HABJANEC, L.; HALASSY, B.; TOMASIC, J. Immunomodulatory activity of novel adjuvant formulations based on Montanide ISA oil-based adjuvants and peptidoglycan monomer. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 717-724, 2008.
- [24] MUTISO, J. M.; MACHARIA, J. C.; TARACHA, E.; WAFULA, K.; RIKOI, H.; GICHERU, M. M. Safety and skin delayedtype hypersensitivity response in vervet monkeys immunized with *Leishmania donovani* sonicate antigen delivered with adjuvants. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n. 1, p. 37-41, 2012.
- [25] LANGELLOTI, C. A.; PAPPALARDO, J. S.; QUATTROCCHI, V.; MONGINI, C.; ZAMORANO, P. Induction of specific cytotoxic activity for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization with different adjuvants. *Antiviral Research*, v. 90, n. 3, p. 134-142, 2011.
- [26] MILES, A. P.; MCCLELLAN, H. A.; RAUSCH, K. M.; ZHU, D.; WHITMORE, M. D.; SINGH, S.; MARTIN, L. B.; WU, Y.; GIERSING, B. K.; STOWERS, A. W.; LONG, C. A.; SAUL, A. Montanide® ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and

comparative immunogenicity of vaccine formulations. *Vaccine*, v. 23, n. 19, p. 2530-2539, 2005.